

بررسی کینتیک کایمریسم در گیرندگان پیوند مغز استخوان با استفاده از تکثیر لوکوس های ژنی اس تی آر با روش پی سی آر مالتیپلکس

بهرام چهار دولی^۱، دکتر یوسف مرتضوی^۲، دکتر سید حمیداله غفاری^۳، دکتر کامران علی مقدم^۴،

دکتر اردشیر قوام زاده^۴، دکتر بابک بهار^۴، دکتر مسعود ابروانی^۴، دکتر سید اسداله موسوی^۴

خلاصه

سابقه و هدف: پیوند مغز استخوان در بسیاری از بیماری های خونی که با درمان های رایج قابل کنترل نیستند رو به افزایش است، از این رو توانایی ارزیابی میزان مشارکت سلول های دهنده در روند پیوند دارای اهمیت فراوان می باشد. مطالعه ی حاضر به منظور بررسی میزان مشارکت سلول های فوق (کایمریسم) پس از پیوند توسط روش های مبتنی بر پی سی آر با استفاده از بررسی پلی مرفیسم های تکراری کوتاه پشت سر هم (STR) در بیماران بیمارستان شریعتی تهران در سال ۱۳۸۱ انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه ی توصیفی بر روی ۳۶۰ نمونه ی خون ۱۰ بیمار کاندید پیوند سلول های بنیادی آلوزنیک که از انواع مختلف لوکمی (۶ بیمار) یا اختلالات هماتولوژیکی غیر بدخیم (۴ بیمار) رنج می بردند، انجام شد. با کنترل مولکولی دقیق، در طول ۶ ماه بعد از پیوند وضعیت پیوند مورد بررسی قرار گرفت. ۱/۵ سی سی خون وریدی قبل از عمل پیوند از دهنده و گیرنده گرفته شد و نمونه گیری بعد از پیوند روزانه تا یک ماه و سپس ماهیانه تا ۶ ماه ادامه یافت. الگوهای الیک دهنده و گیرنده با روش مالتیپلکس پی سی آر با استفاده از مجموعه ای از نشان گرهای ژنی اس تی آر بر روی ژن های F13A1, D4S2366, ADA D16S539, D7S820, D13S317ARA, HUMTH01 و VWA, CSF1PO, TPOX, FES/FPS تعیین شد.

یافته ها: در اکثر بیماران الگوی کایمریسم مخلوط در روزهای ۱ تا ۹ بعد از پیوند مشاهده شد. از میان این بیماران ۷ نفر در فاصله روزهای ۹ تا ۱۴ و یک نفر در ماه پنجم کایمریسم کامل را به دست آوردند. ۲ بیمار که در یکی از آن ها از رژیم آماده سازی کم شدت استفاده شده بود تا ۶ ماه در حالت کایمریسم مخلوط باقی ماندند. موفقیت هماتولوژیکی پیوند در فاصله ی روزهای ۸ تا ۱۹ و موفقیت پلاکتی پیوند بین روزهای ۹ تا ۲۵ به دست آمد. بسته به ژن مورد استفاده، حساسیت روش بین ۱ تا ۲ درصد متغیر بوده است.

نتیجه گیری و توصیه ها: نتایج این تحقیق نشان می دهد که بررسی اس تی آر با روش مالتیپلکس پی سی آر می تواند ارزیابی صحیح و کمی با سرعت بالا از وضعیت کایمریسم بعد از پیوند را در بیماران فراهم نماید. چنین اطلاعاتی می تواند در تصمیم گیری برای استفاده از درمان های اضافی جهت جلوگیری از رد پیوند یا سرکوب عود بیماری مفید واقع شود.

واژگان کلیدی: تکرارهای پشت سر هم کوتاه (STR)، پیوند مغز استخوان آلوزنیک، کایمریسم، پی سی آر مالتیپلکس

مقدمه

بیماری که به این نوع درمان احتیاج دارد می تواند مفید باشد. توانایی ارزیابی مشارکت سلول های دهنده در روند پیوند متعاقب استفاده از سلول های مغز استخوان یا سلول های بنیادی خون محیطی، دارای اهمیت فراوان می باشد (۱). گرفتن کامل سلول های بنیادی که باعث هماتوپوئیز طولانی

پیوند مغز استخوان در گروهی از بیمارانی که از طریق راه کارهای درمانی رایج قابل کنترل و درمان نیستند، به عنوان یک درمان انتخابی انجام می شود. پیدایش شیوه های جدید جهت پیوند آلوزنیک از قبیل استفاده از سلول های بنیادی خون محیطی، مغز استخوان و خون بند ناف، تقریباً برای هر

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس

^۲ متخصص هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

^۳ متخصص ژنتیک، مرکز تحقیقات خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران

^۴ فوق تخصص هماتولوژی - انکولوژی، مرکز تحقیقات خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران

بین خواهران و برادران بر روی ژل پلی اکریل امید می باشد. ما در این مطالعه، اهمیت بالینی کایمریسم را توسط تجزیه و تحلیل توالی‌های تکراری پشت سر هم با استفاده از روش پی‌سی‌آر مالتیپلکس در طول ۶ ماه بعد از پیوند بر روی خون محیطی گیرندگان پیوند به منظور پیش‌گویی اولیه گرفتن پیوند، رد پیوند یا عود قریب الوقوع آن مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد و روش‌ها

بیماران: از بیماران دارای اختلالات بدخیم و غیر بدخیم هماتولوژیک که در سال ۱۳۸۱ به مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند، ۱۰ بیمار کاندید پیوند مغز استخوان انتخاب شدند. از ۱۰ بیمار فوق، ۲ بیمار لوسمی لنفوسیتیک حاد، ۲ بیمار لوسمی میلویتیک مزمن، ۲ بیمار لوسمی میلویتیک حاد، ۳ بیمار تالاسمی و یک بیمار مبتلا به آنمی آپلاستیک بودند (جدول ۱). ۹ نفر از بیماران دارای خواهر یا برادر به عنوان دهنده پیوند بودند که ۸ نفر از نظر HLA سازگاری، و در یک نفر (بیمار شماره ۴) در یکی از لوکوس‌های HLA، ناسازگاری وجود داشت. بیمار شماره ۲ از مادر خود پیوند دریافت نمود و از نظر HLA از لوکوس DQ بیمار یک بلانک وجود داشت. یکی از بیماران (بیمار شماره ۷) سلول‌های مغز استخوان و مابقی بیماران، سلول‌های بنیادی خون محیطی دریافت داشتند. همه‌ی بیماران فوق در مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تحت عمل پیوند قرار گرفتند و قبل از عمل پیوند، در ۶ نفر از بیماران (۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۷) رژیم آماده سازی تخریب مغز استخوان و کاهش دهنده‌ی سیستم ایمنی شامل ترکیبی از داروهای بوسولفان و اندوکسان استفاده شد. در ۲ نفر از بیماران تالاسمی (بیمار شماره‌ی ۸ و ۹) و یک بیمار مبتلا به لوسمی مزمن میلویتیک (بیمار شماره‌ی ۵) از رژیم آماده سازی با شدت کم

مدت مشتق از دهنده شود، می‌تواند در بقای بدون بیماری طولانی مدت مهم باشد. مشارکت مغز استخوان دهنده، هم در مرحله پر کردن فضای مغز استخوان و هم در توانایی وساطت اثر پیوند علیه لوکمی^۱، ممکن است توسط مطالعه‌ی کیتیک مراحل پیوند ارزیابی شود. کایمریسم مخلوط نشان دهنده‌ی حضور سلول‌های دهنده و سلول‌های گیرنده در درون گردش خون شخص گیرنده‌ی پیوند می‌باشد. بیشتر گزارش‌ها وجود ۵ تا ۱۰ درصد سلول‌های میزبان را به عنوان ملاکی برای کایمریسم مخلوط در نظر می‌گیرند (۲، ۳).

از روش‌های مختلفی برای ارزیابی کایمریسم بعد از پیوند استفاده شده است. میزان حساسیت و نوع سلول مورد نیاز جهت تجزیه و تحلیل در هر روش متفاوت است. بنابراین میزان کایمریسم گزارش شده بسته به روش، متفاوت می‌باشد. از روش‌های رایج می‌توان به آنالیز کاریوتایپ، پلی مرفیسم‌های پروتئینی، بررسی آنتی ژن اریتروسیستی، تکنیک FISH^۲ و روش‌های مبتنی بر دی‌ان‌آ اشاره نمود (۹-۴). هر یک از روش‌های فوق دارای مزایا و معایبی می‌باشند. به عنوان مثال از انجام کاریوتایپ به طور وسیع در پیوند مغز استخوان استفاده شده است. اما این روش در مورد پیوندهای دارای دهنده و گیرنده‌ی غیر هم جنس و در زمانی که کروموزوم Y به عنوان شاخص پیوند استفاده می‌شود، بیشترین کاربرد را دارد. کشف پلی مرفیسم‌های تکراری پشت سرهم کوتاه (STR)^۳ تحول عظیمی در علم بیولوژی مولکولی ایجاد کرده است. این توالی‌ها که از آن‌ها به عنوان میکروساتلایت‌ها^۴ هم نام می‌برند توالی‌های تکرار شونده از ۷-۳ جفت باز از دی‌ان‌آ می‌باشند که اجازه بررسی کایمریسم را به روش پی‌سی‌آر و در حضور تعداد اندکی سلول گیرنده‌ی پیوند فراهم می‌نمایند (۱۲-۱۰). از دیگر مزایای این توالی‌های دی‌ان‌آ، تکثیر سریع آن‌ها توسط پی‌سی‌آر^۵ و قدرت بالای تفکیک ال‌های دهنده و گیرنده در

^۵ Polymerase chain reaction

^۱ Graft versus leukemia

^۲ Fluorescent in situ hybridization

^۳ Short tandem repeats

^۴ Microsatellites

اس-تی آر - پی سی آر: برای هر بیمار مخلوطی از اجزای زیر داخل یک لوله اپندورف ریخته شد: ۵ میکرو لیتر از بافر ۱۰ بار غلیظ شده (محتوی کلرید منیزیم)، ۲ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و معکوس (غلظت ۱۰ میکرو مولار)، ۲ میکرو لیتر از هر یک از dNTP (۱۰ میلی مولار)، یک واحد آنزیم تک پلی مرز و ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانو گرم از دی ان آ بیمار، حجم کل واکنش توسط آب مقطر به ۵۰ میکرو لیتر رسانیده می شد سپس لوله ها در ترمال سایکلر اپندورف (آلمان) قرار داده می شدند تا دی ان آ طبق برنامه ی مشخص تکثیر شود.

مالتیپلکس پی سی آر^۶: یکی از روش های تغییر یافته ی پی سی آر معمولی، روش مالتیپلکس پی سی آر است. در این روش در هر لوله ی پی سی آر به جای یک جفت پرایمر از چندین جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد. در این مطالعه، از لوکوس های D7S820, D16S539, D4S2366 و لوکوس های VWA, F13A1, FES/FPS و هم چنین از لوکوس های HUMTH01 و CSF1PO, TPOX به صورت مالتیپلکس در یک واکنش استفاده شد.

الکتروفورز ژل وقابل رؤیت کردن باندها: محصولات پی سی آر بر روی ژل آگارز ۳- ۱/۵ درصد در بافر TBE الکتروفورز شدند تا باندهای دی ان آ قابل دید شوند. جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) استفاده شد.

الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید^۷: برای این منظور از ژل پلی اکریل آمید شش درصد استفاده شد. ۱/۵ تا ۲ میکرو لیتر از نمونه های پی سی آر شده را با ۱ میکرو لیتر از بافر لکه گذاری مخلوط کرده، و درون چاهک های ژل ریخته

و کاهش دهنده ی سیستم ایمنی شامل ترکیبی از داروهای فلودارابین، بوسولفان و آنتی تیموسیت گلوبولین استفاده شد. در بیمار مبتلا به آنمی آپلاستیک (شماره ی ۱۰) فقط از رژیم آماده سازی کاهش دهنده ی سیستم ایمنی اندوکسان استفاده شد (جدول ۱).

تعیین کیتیک کایمریسم بر روی ۳۶۰ نمونه ی خون ۱۰ بیمار کاندید پیوند مغز استخوان در ماه اول بعد از پیوند و هم چنین ۵ ماه پس از پیوند انجام شد. برای این منظور، ۱/۵ میلی لیتر خون وریدی بر روی EDTA قبل از عمل پیوند از دهنده و گیرنده گرفته می شد. بعد از عمل پیوند نمونه گیری به صورت روزانه تا یک ماه و سپس به طور ماهانه تا ماه ششم، انجام گرفت.

در این مطالعه شمارش گلبول های سفید و پلاکت به وسیله ی دستگاه شمارشگر MS9 ساخت کشور فرانسه (از نمونه هایی که به طور هم زمان برای انجام اس-تی آر - پی سی آر گرفته می شد) انجام شد. طبق معیارهای بین المللی، موفقیت هماتولوژیکی پیوند شامل موفقیت پیوند سلول های سفید به عنوان اولین روزی که افزایش پایدار لوکوسیتی به بالای ۱۰۰۰ در هر میلی لیتر و شمارش مطلق نوتروفیلی بالای ۵۰۰ در هر میلی لیتر باشد، و موفقیت پیوند پلاکت به عنوان اولین روزی که افزایش پایدار پلاکتی پیوند بالای ۲۰۰۰۰ در هر میلی لیتر باشد، تعیین شد.

استخراج DNA ژنومی: استخراج دی ان آ توسط روش های مختلفی انجام شد که شامل روش های استفاده از کیت QIAGEN، پروتئیناز k، فنل کلروفرم و جوشانیدن می باشد. در این مطالعه، در اکثر موارد جهت استخراج دی ان آ از روش جوشانیدن استفاده شد.

پرایمرها: در این مطالعه از ۱۲ جفت پرایمر برای لوکوس های ARA, ADA, D16S539, D7S820, D13S317،

VWA, CSF1PO, TPOX, F13A1, FES/FPS, D4S2366 و HUMTH01 برای تکثیر نواحی اس-تی آر مربوطه استفاده شد.

⁶ Multiplex-PCR

⁷ Polyacrylamid gel electrophoresis

جدول ۱ - مشخصات بیماران گیرنده پیوند مغز استخوان و وضعیت کایمریسم در آنها

ردیف	جنس	سن (سال)	تشخیص	رژیم آماده سازی	روز کایمریسم	روز برقراری پیوند سلول های سفید	روز برقراری پیوند پلاکت ها
۱	مذکر	۲۳	لوسمی لنفوسیتی حاد	BU,EN	+۱۰	+۱۰	+۱۰
۲	مذکر	۲۳	لوسمی لنفوسیتی حاد	BU,EN	+۱۲	+۱۰	+۹
۳	مؤنث	۱۸	لوسمی میلوپیتی حاد	BU,EN	+۹	+۹	+۱۱
۴	مذکر	۱۹	لوسمی میلوپیتی حاد	BU,EN	کایمریسم مخلوط	+۱۲	+۱۳
۵	مذکر	۴۳	لوسمی میلوپیتی مزمن	FLU,BU, ATG	+۱۵	+۱۲	بدون تغییر
۶	مذکر	۲۳	لوسمی میلوپیتی مزمن	BU,EN	+۱۲	+۱۲	+۱۲
۷	مذکر	۴	تالاسمی	BU,EN	+۱۴	+۱۲	+۲۵
۸	مؤنث	۱۴	تالاسمی	FLU,BU, ATG	ماه دوم	بدون تغییر	+۱۹
۹	مؤنث	۲۴	تالاسمی	FLU,BU, ATG	کایمریسم مخلوط	بدون تغییر	بدون تغییر
۱۰	مؤنث	۲۴	آنمی آپلاستیک	EN	+۱۱	+۸	+۸

BU: بوسولفان، EN: اندوکسان، FLU: فلودارابین، ATG: آنتی تیموسیت گلوبولینی، NC: بدون تغییر

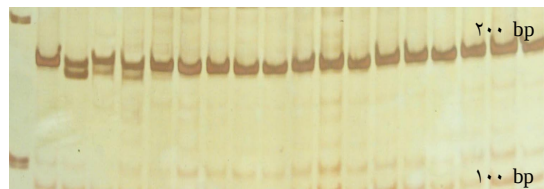
می شد. ژل در ولتاژ ۱۲۰ برای مدت ۱۰-۱۲ ساعت الکتروفورز می شد. پس از اتمام الکتروفورز، باندهای دی آن آ توسط رنگ آمیزی نقره قابل رؤیت شده و در نهایت باندهای به دست آمده، در ناحیه ی مورد نظر تفسیر می شدند. حساسیت پی سی آر برای لوکوس های مورد نظر توسط مخلوط کردن نمونه های دی آن آ قبل از پیوند دهنده و گیرنده با انجام یک توالی غلطی انجام شد. حساسیت به صورت کمترین غلطی از دی آن آ که یک باند اس تی آر قابل رؤیت روی ژل پلی اکریل آمید رنگ آمیزی شده با نیترا ت نقره ایجاد بکند، تعیین شد.

یافته ها

نمونه های دهنده و گیرنده قبل از پیوند مغز استخوان با پرایمرهای مورد نظر، پی سی آر شده و جهت تعیین هتروزیگوسیتی، بروی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند این پرایمرها ۱۲ لوکوس مختلف را بر روی کروموزوم X و سایر کروموزوم ها تکثیر می نمایند. در این مطالعه اکثر دهندگان و گیرندگان برای چند ناحیه ی مورد مطالعه پلی مرفیک بودند. بیشترین پلی مرفیسم ها برای لوکوس های HUMTH01، D4S2366، D16S539، TPOX و VWA به دست آمد (شکل ۴-۱). حساسیت پی سی آر در نشان دادن

درصد سلول های دهنده برای ژن ها و لوکوس های مختلف، حساسیتی از ۱ تا ۲ درصد را نشان داد. بررسی دی آن آ خون محیطی همه ی بیماران در ۲۴ ساعت اول بعد از پیوند حضور کایمریسم مختلط را نشان می داد. در اکثر بیماران کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول و دوم هفته ی اول بعد از پیوند مشاهده شد. در ۷ بیمار (۴، ۲، ۱، ۱۰، ۷، ۶) این حالت تا روز +۹ ادامه داشت و اکثر این بیماران در فاصله ی بین روزهای +۹ تا +۱۴ به کایمریسم کامل دست یافتند. در شکل های (۱) و (۲) تغییرات کایمریسم مخلوط به کایمریسم کامل در ۳ بیمار نشان داده شده است.

M D R 6 8 9 10 11 14 15 18 20 25 28 F2 F3 F4 F5 F6 F7

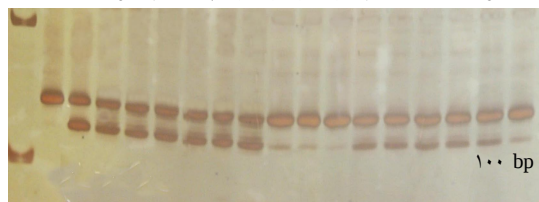


۱۹ ۱۸ ۱۷ ۱۶ ۱۵ ۱۴ ۱۳ ۱۲ ۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱ شماره ستون

شکل ۱- الکتروفورز نمونه دهنده و گیرنده بیمار شماره ی ۱ برای لوکوس D16S539 بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد

M: شاخص وزن مولکولی (۱۰۰ جفت بازی)، D: دهنده، R: گیرنده، ستون های ۴ تا ۱۹ روزهای بعد از پیوند را نشان می دهد، F: ماه های پی گیری

MD R ۲ ۴ ۶ ۸ ۹ ۱۰ ۱۳ ۱۵ ۲۱ ۲۶ ۲۸ F۲ F۳ F۴ F۵



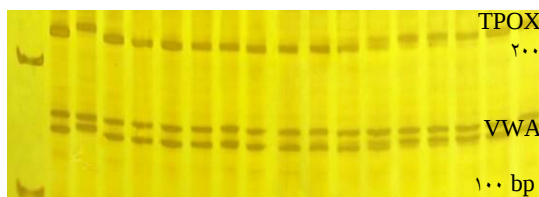
شماره ستون ۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸

شکل ۳ - نتیجه الکتروفورز نمونه‌ی دهنده و گیرنده بیمار شماره ۴ با لوکوس‌های *D16S539* و *D4S2366* به صورت مالتیپلکس

بر روی ژل پلی اکریل آماید ۶ درصد

شکل (۳) نشان می‌دهد که آلل‌های دهنده (D) برای لوکوس و *D16S539* و *D4S2366* هموزیگوس، و آلل‌های گیرنده (R) هتروزیگوس می‌باشد. اندازه باندها در محدوده‌ی ۱۳۵ جفت باز است. در همه‌ی روزها الگوی کایمریسم کامل مشاهده می‌شود و تا آخر پایدار می‌ماند.

MD R ۳ ۵ ۸ ۹ ۱۰ ۱۲ ۱۵ ۲۰ ۲۴ ۲۷ F۲ F۳ F۴ F۵ F۶



شماره ستون ۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸ ۱۹

شکل ۴ - نتیجه الکتروفورز نمونه‌ی دهنده و گیرنده بیمار شماره ۱۰ برای لوکوس‌های *D16S539* و *D4S2366* به صورت مالتیپلکس بر روی ژل پلی اکریل آماید ۶ درصد

همان‌طور که در شکل (۴) ملاحظه می‌شود آلل‌های دهنده (D) و گیرنده (R) برای لوکوس VWA هتروزیگوس است که یکی از آلل‌های آن‌ها (آلل فوقانی) هم‌پوشانی دارد. اندازه باندها در محدوده‌ی ۱۵۰ جفت باز است و برای لوکوس TPOX، آلل‌ها به صورت هموزیگوس است که باند دهنده و گیرنده با هم اختلاف سایز دارند و اندازه‌ی باندها در محدوده‌ی ۱۲۵ جفت باز می‌باشد. آن چنان که مشاهده می‌شود در هر دو لوکوس تا روز ۲۴ فقط الگوی باند گیرنده مشاهده می‌شود سپس بیمار در روزهای ۲۴، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۴، ۳۶، ۳۸، ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸، ۵۰، ۵۲، ۵۴، ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۲، ۶۴، ۶۶، ۶۸، ۷۰، ۷۲، ۷۴، ۷۶، ۷۸، ۸۰، ۸۲، ۸۴، ۸۶، ۸۸، ۹۰، ۹۲، ۹۴، ۹۶، ۹۸، ۱۰۰، ۱۰۲، ۱۰۴، ۱۰۶، ۱۰۸، ۱۱۰، ۱۱۲، ۱۱۴، ۱۱۶، ۱۱۸، ۱۲۰، ۱۲۲، ۱۲۴، ۱۲۶، ۱۲۸، ۱۳۰، ۱۳۲، ۱۳۴، ۱۳۶، ۱۳۸، ۱۴۰، ۱۴۲، ۱۴۴، ۱۴۶، ۱۴۸، ۱۵۰، ۱۵۲، ۱۵۴، ۱۵۶، ۱۵۸، ۱۶۰، ۱۶۲، ۱۶۴، ۱۶۶، ۱۶۸، ۱۷۰، ۱۷۲، ۱۷۴، ۱۷۶، ۱۷۸، ۱۸۰، ۱۸۲، ۱۸۴، ۱۸۶، ۱۸۸، ۱۹۰، ۱۹۲، ۱۹۴، ۱۹۶، ۱۹۸، ۲۰۰، ۲۰۲، ۲۰۴، ۲۰۶، ۲۰۸، ۲۱۰، ۲۱۲، ۲۱۴، ۲۱۶، ۲۱۸، ۲۲۰، ۲۲۲، ۲۲۴، ۲۲۶، ۲۲۸، ۲۳۰، ۲۳۲، ۲۳۴، ۲۳۶، ۲۳۸، ۲۴۰، ۲۴۲، ۲۴۴، ۲۴۶، ۲۴۸، ۲۵۰، ۲۵۲، ۲۵۴، ۲۵۶، ۲۵۸، ۲۶۰، ۲۶۲، ۲۶۴، ۲۶۶، ۲۶۸، ۲۷۰، ۲۷۲، ۲۷۴، ۲۷۶، ۲۷۸، ۲۸۰، ۲۸۲، ۲۸۴، ۲۸۶، ۲۸۸، ۲۹۰، ۲۹۲، ۲۹۴، ۲۹۶، ۲۹۸، ۳۰۰، ۳۰۲، ۳۰۴، ۳۰۶، ۳۰۸، ۳۱۰، ۳۱۲، ۳۱۴، ۳۱۶، ۳۱۸، ۳۲۰، ۳۲۲، ۳۲۴، ۳۲۶، ۳۲۸، ۳۳۰، ۳۳۲، ۳۳۴، ۳۳۶، ۳۳۸، ۳۴۰، ۳۴۲، ۳۴۴، ۳۴۶، ۳۴۸، ۳۵۰، ۳۵۲، ۳۵۴، ۳۵۶، ۳۵۸، ۳۶۰، ۳۶۲، ۳۶۴، ۳۶۶، ۳۶۸، ۳۷۰، ۳۷۲، ۳۷۴، ۳۷۶، ۳۷۸، ۳۸۰، ۳۸۲، ۳۸۴، ۳۸۶، ۳۸۸، ۳۹۰، ۳۹۲، ۳۹۴، ۳۹۶، ۳۹۸، ۴۰۰، ۴۰۲، ۴۰۴، ۴۰۶، ۴۰۸، ۴۱۰، ۴۱۲، ۴۱۴، ۴۱۶، ۴۱۸، ۴۲۰، ۴۲۲، ۴۲۴، ۴۲۶، ۴۲۸، ۴۳۰، ۴۳۲، ۴۳۴، ۴۳۶، ۴۳۸، ۴۴۰، ۴۴۲، ۴۴۴، ۴۴۶، ۴۴۸، ۴۵۰، ۴۵۲، ۴۵۴، ۴۵۶، ۴۵۸، ۴۶۰، ۴۶۲، ۴۶۴، ۴۶۶، ۴۶۸، ۴۷۰، ۴۷۲، ۴۷۴، ۴۷۶، ۴۷۸، ۴۸۰، ۴۸۲، ۴۸۴، ۴۸۶، ۴۸۸، ۴۹۰، ۴۹۲، ۴۹۴، ۴۹۶، ۴۹۸، ۵۰۰، ۵۰۲، ۵۰۴، ۵۰۶، ۵۰۸، ۵۱۰، ۵۱۲، ۵۱۴، ۵۱۶، ۵۱۸، ۵۲۰، ۵۲۲، ۵۲۴، ۵۲۶، ۵۲۸، ۵۳۰، ۵۳۲، ۵۳۴، ۵۳۶، ۵۳۸، ۵۴۰، ۵۴۲، ۵۴۴، ۵۴۶، ۵۴۸، ۵۵۰، ۵۵۲، ۵۵۴، ۵۵۶، ۵۵۸، ۵۶۰، ۵۶۲، ۵۶۴، ۵۶۶، ۵۶۸، ۵۷۰، ۵۷۲، ۵۷۴، ۵۷۶، ۵۷۸، ۵۸۰، ۵۸۲، ۵۸۴، ۵۸۶، ۵۸۸، ۵۹۰، ۵۹۲، ۵۹۴، ۵۹۶، ۵۹۸، ۶۰۰، ۶۰۲، ۶۰۴، ۶۰۶، ۶۰۸، ۶۱۰، ۶۱۲، ۶۱۴، ۶۱۶، ۶۱۸، ۶۲۰، ۶۲۲، ۶۲۴، ۶۲۶، ۶۲۸، ۶۳۰، ۶۳۲، ۶۳۴، ۶۳۶، ۶۳۸، ۶۴۰، ۶۴۲، ۶۴۴، ۶۴۶، ۶۴۸، ۶۵۰، ۶۵۲، ۶۵۴، ۶۵۶، ۶۵۸، ۶۶۰، ۶۶۲، ۶۶۴، ۶۶۶، ۶۶۸، ۶۷۰، ۶۷۲، ۶۷۴، ۶۷۶، ۶۷۸، ۶۸۰، ۶۸۲، ۶۸۴، ۶۸۶، ۶۸۸، ۶۹۰، ۶۹۲، ۶۹۴، ۶۹۶، ۶۹۸، ۷۰۰، ۷۰۲، ۷۰۴، ۷۰۶، ۷۰۸، ۷۱۰، ۷۱۲، ۷۱۴، ۷۱۶، ۷۱۸، ۷۲۰، ۷۲۲، ۷۲۴، ۷۲۶، ۷۲۸، ۷۳۰، ۷۳۲، ۷۳۴، ۷۳۶، ۷۳۸، ۷۴۰، ۷۴۲، ۷۴۴، ۷۴۶، ۷۴۸، ۷۵۰، ۷۵۲، ۷۵۴، ۷۵۶، ۷۵۸، ۷۶۰، ۷۶۲، ۷۶۴، ۷۶۶، ۷۶۸، ۷۷۰، ۷۷۲، ۷۷۴، ۷۷۶، ۷۷۸، ۷۸۰، ۷۸۲، ۷۸۴، ۷۸۶، ۷۸۸، ۷۹۰، ۷۹۲، ۷۹۴، ۷۹۶، ۷۹۸، ۸۰۰، ۸۰۲، ۸۰۴، ۸۰۶، ۸۰۸، ۸۱۰، ۸۱۲، ۸۱۴، ۸۱۶، ۸۱۸، ۸۲۰، ۸۲۲، ۸۲۴، ۸۲۶، ۸۲۸، ۸۳۰، ۸۳۲، ۸۳۴، ۸۳۶، ۸۳۸، ۸۴۰، ۸۴۲، ۸۴۴، ۸۴۶، ۸۴۸، ۸۵۰، ۸۵۲، ۸۵۴، ۸۵۶، ۸۵۸، ۸۶۰، ۸۶۲، ۸۶۴، ۸۶۶، ۸۶۸، ۸۷۰، ۸۷۲، ۸۷۴، ۸۷۶، ۸۷۸، ۸۸۰، ۸۸۲، ۸۸۴، ۸۸۶، ۸۸۸، ۸۹۰، ۸۹۲، ۸۹۴، ۸۹۶، ۸۹۸، ۹۰۰، ۹۰۲، ۹۰۴، ۹۰۶، ۹۰۸، ۹۱۰، ۹۱۲، ۹۱۴، ۹۱۶، ۹۱۸، ۹۲۰، ۹۲۲، ۹۲۴، ۹۲۶، ۹۲۸، ۹۳۰، ۹۳۲، ۹۳۴، ۹۳۶، ۹۳۸، ۹۴۰، ۹۴۲، ۹۴۴، ۹۴۶، ۹۴۸، ۹۵۰، ۹۵۲، ۹۵۴، ۹۵۶، ۹۵۸، ۹۶۰، ۹۶۲، ۹۶۴، ۹۶۶، ۹۶۸، ۹۷۰، ۹۷۲، ۹۷۴، ۹۷۶، ۹۷۸، ۹۸۰، ۹۸۲، ۹۸۴، ۹۸۶، ۹۸۸، ۹۹۰، ۹۹۲، ۹۹۴، ۹۹۶، ۹۹۸، ۱۰۰۰، ۱۰۰۲، ۱۰۰۴، ۱۰۰۶، ۱۰۰۸، ۱۰۱۰، ۱۰۱۲، ۱۰۱۴، ۱۰۱۶، ۱۰۱۸، ۱۰۲۰، ۱۰۲۲، ۱۰۲۴، ۱۰۲۶، ۱۰۲۸، ۱۰۳۰، ۱۰۳۲، ۱۰۳۴، ۱۰۳۶، ۱۰۳۸، ۱۰۴۰، ۱۰۴۲، ۱۰۴۴، ۱۰۴۶، ۱۰۴۸، ۱۰۵۰، ۱۰۵۲، ۱۰۵۴، ۱۰۵۶، ۱۰۵۸، ۱۰۶۰، ۱۰۶۲، ۱۰۶۴، ۱۰۶۶، ۱۰۶۸، ۱۰۷۰، ۱۰۷۲، ۱۰۷۴، ۱۰۷۶، ۱۰۷۸، ۱۰۸۰، ۱۰۸۲، ۱۰۸۴، ۱۰۸۶، ۱۰۸۸، ۱۰۹۰، ۱۰۹۲، ۱۰۹۴، ۱۰۹۶، ۱۰۹۸، ۱۱۰۰، ۱۱۰۲، ۱۱۰۴، ۱۱۰۶، ۱۱۰۸، ۱۱۱۰، ۱۱۱۲، ۱۱۱۴، ۱۱۱۶، ۱۱۱۸، ۱۱۲۰، ۱۱۲۲، ۱۱۲۴، ۱۱۲۶، ۱۱۲۸، ۱۱۳۰، ۱۱۳۲، ۱۱۳۴، ۱۱۳۶، ۱۱۳۸، ۱۱۴۰، ۱۱۴۲، ۱۱۴۴، ۱۱۴۶، ۱۱۴۸، ۱۱۵۰، ۱۱۵۲، ۱۱۵۴، ۱۱۵۶، ۱۱۵۸، ۱۱۶۰، ۱۱۶۲، ۱۱۶۴، ۱۱۶۶، ۱۱۶۸، ۱۱۷۰، ۱۱۷۲، ۱۱۷۴، ۱۱۷۶، ۱۱۷۸، ۱۱۸۰، ۱۱۸۲، ۱۱۸۴، ۱۱۸۶، ۱۱۸۸، ۱۱۹۰، ۱۱۹۲، ۱۱۹۴، ۱۱۹۶، ۱۱۹۸، ۱۲۰۰، ۱۲۰۲، ۱۲۰۴، ۱۲۰۶، ۱۲۰۸، ۱۲۱۰، ۱۲۱۲، ۱۲۱۴، ۱۲۱۶، ۱۲۱۸، ۱۲۲۰، ۱۲۲۲، ۱۲۲۴، ۱۲۲۶، ۱۲۲۸، ۱۲۳۰، ۱۲۳۲، ۱۲۳۴، ۱۲۳۶، ۱۲۳۸، ۱۲۴۰، ۱۲۴۲، ۱۲۴۴، ۱۲۴۶، ۱۲۴۸، ۱۲۵۰، ۱۲۵۲، ۱۲۵۴، ۱۲۵۶، ۱۲۵۸، ۱۲۶۰، ۱۲۶۲، ۱۲۶۴، ۱۲۶۶، ۱۲۶۸، ۱۲۷۰، ۱۲۷۲، ۱۲۷۴، ۱۲۷۶، ۱۲۷۸، ۱۲۸۰، ۱۲۸۲، ۱۲۸۴، ۱۲۸۶، ۱۲۸۸، ۱۲۹۰، ۱۲۹۲، ۱۲۹۴، ۱۲۹۶، ۱۲۹۸، ۱۳۰۰، ۱۳۰۲، ۱۳۰۴، ۱۳۰۶، ۱۳۰۸، ۱۳۱۰، ۱۳۱۲، ۱۳۱۴، ۱۳۱۶، ۱۳۱۸، ۱۳۲۰، ۱۳۲۲، ۱۳۲۴، ۱۳۲۶، ۱۳۲۸، ۱۳۳۰، ۱۳۳۲، ۱۳۳۴، ۱۳۳۶، ۱۳۳۸، ۱۳۴۰، ۱۳۴۲، ۱۳۴۴، ۱۳۴۶، ۱۳۴۸، ۱۳۵۰، ۱۳۵۲، ۱۳۵۴، ۱۳۵۶، ۱۳۵۸، ۱۳۶۰، ۱۳۶۲، ۱۳۶۴، ۱۳۶۶، ۱۳۶۸، ۱۳۷۰، ۱۳۷۲، ۱۳۷۴، ۱۳۷۶، ۱۳۷۸، ۱۳۸۰، ۱۳۸۲، ۱۳۸۴، ۱۳۸۶، ۱۳۸۸، ۱۳۹۰، ۱۳۹۲، ۱۳۹۴، ۱۳۹۶، ۱۳۹۸، ۱۴۰۰، ۱۴۰۲، ۱۴۰۴، ۱۴۰۶، ۱۴۰۸، ۱۴۱۰، ۱۴۱۲، ۱۴۱۴، ۱۴۱۶، ۱۴۱۸، ۱۴۲۰، ۱۴۲۲، ۱۴۲۴، ۱۴۲۶، ۱۴۲۸، ۱۴۳۰، ۱۴۳۲، ۱۴۳۴، ۱۴۳۶، ۱۴۳۸، ۱۴۴۰، ۱۴۴۲، ۱۴۴۴، ۱۴۴۶، ۱۴۴۸، ۱۴۵۰، ۱۴۵۲، ۱۴۵۴، ۱۴۵۶، ۱۴۵۸، ۱۴۶۰، ۱۴۶۲، ۱۴۶۴، ۱۴۶۶، ۱۴۶۸، ۱۴۷۰، ۱۴۷۲، ۱۴۷۴، ۱۴۷۶، ۱۴۷۸، ۱۴۸۰، ۱۴۸۲، ۱۴۸۴، ۱۴۸۶، ۱۴۸۸، ۱۴۹۰، ۱۴۹۲، ۱۴۹۴، ۱۴۹۶، ۱۴۹۸، ۱۵۰۰، ۱۵۰۲، ۱۵۰۴، ۱۵۰۶، ۱۵۰۸، ۱۵۱۰، ۱۵۱۲، ۱۵۱۴، ۱۵۱۶، ۱۵۱۸، ۱۵۲۰، ۱۵۲۲، ۱۵۲۴، ۱۵۲۶، ۱۵۲۸، ۱۵۳۰، ۱۵۳۲، ۱۵۳۴، ۱۵۳۶، ۱۵۳۸، ۱۵۴۰، ۱۵۴۲، ۱۵۴۴، ۱۵۴۶، ۱۵۴۸، ۱۵۵۰، ۱۵۵۲، ۱۵۵۴، ۱۵۵۶، ۱۵۵۸، ۱۵۶۰، ۱۵۶۲، ۱۵۶۴، ۱۵۶۶، ۱۵۶۸، ۱۵۷۰، ۱۵۷۲، ۱۵۷۴، ۱۵۷۶، ۱۵۷۸، ۱۵۸۰، ۱۵۸۲، ۱۵۸۴، ۱۵۸۶، ۱۵۸۸، ۱۵۹۰، ۱۵۹۲، ۱۵۹۴، ۱۵۹۶، ۱۵۹۸، ۱۶۰۰، ۱۶۰۲، ۱۶۰۴، ۱۶۰۶، ۱۶۰۸، ۱۶۱۰، ۱۶۱۲، ۱۶۱۴، ۱۶۱۶، ۱۶۱۸، ۱۶۲۰، ۱۶۲۲، ۱۶۲۴، ۱۶۲۶، ۱۶۲۸، ۱۶۳۰، ۱۶۳۲، ۱۶۳۴، ۱۶۳۶، ۱۶۳۸، ۱۶۴۰، ۱۶۴۲، ۱۶۴۴، ۱۶۴۶، ۱۶۴۸، ۱۶۵۰، ۱۶۵۲، ۱۶۵۴، ۱۶۵۶، ۱۶۵۸، ۱۶۶۰، ۱۶۶۲، ۱۶۶۴، ۱۶۶۶، ۱۶۶۸، ۱۶۷۰، ۱۶۷۲، ۱۶۷۴، ۱۶۷۶، ۱۶۷۸، ۱۶۸۰، ۱۶۸۲، ۱۶۸۴، ۱۶۸۶، ۱۶۸۸، ۱۶۹۰، ۱۶۹۲، ۱۶۹۴، ۱۶۹۶، ۱۶۹۸، ۱۷۰۰، ۱۷۰۲، ۱۷۰۴، ۱۷۰۶، ۱۷۰۸، ۱۷۱۰، ۱۷۱۲، ۱۷۱۴، ۱۷۱۶، ۱۷۱۸، ۱۷۲۰، ۱۷۲۲، ۱۷۲۴، ۱۷۲۶، ۱۷۲۸، ۱۷۳۰، ۱۷۳۲، ۱۷۳۴، ۱۷۳۶، ۱۷۳۸، ۱۷۴۰، ۱۷۴۲، ۱۷۴۴، ۱۷۴۶، ۱۷۴۸، ۱۷۵۰، ۱۷۵۲، ۱۷۵۴، ۱۷۵۶، ۱۷۵۸، ۱۷۶۰، ۱۷۶۲، ۱۷۶۴، ۱۷۶۶، ۱۷۶۸، ۱۷۷۰، ۱۷۷۲، ۱۷۷۴، ۱۷۷۶، ۱۷۷۸، ۱۷۸۰، ۱۷۸۲، ۱۷۸۴، ۱۷۸۶، ۱۷۸۸، ۱۷۹۰، ۱۷۹۲، ۱۷۹۴، ۱۷۹۶، ۱۷۹۸، ۱۸۰۰، ۱۸۰۲، ۱۸۰۴، ۱۸۰۶، ۱۸۰۸، ۱۸۱۰، ۱۸۱۲، ۱۸۱۴، ۱۸۱۶، ۱۸۱۸، ۱۸۲۰، ۱۸۲۲، ۱۸۲۴، ۱۸۲۶، ۱۸۲۸، ۱۸۳۰، ۱۸۳۲، ۱۸۳۴، ۱۸۳۶، ۱۸۳۸، ۱۸۴۰، ۱۸۴۲، ۱۸۴۴، ۱۸۴۶، ۱۸۴۸، ۱۸۵۰، ۱۸۵۲، ۱۸۵۴، ۱۸۵۶، ۱۸۵۸، ۱۸۶۰، ۱۸۶۲، ۱۸۶۴، ۱۸۶۶، ۱۸۶۸، ۱۸۷۰، ۱۸۷۲، ۱۸۷۴، ۱۸۷۶، ۱۸۷۸، ۱۸۸۰، ۱۸۸۲، ۱۸۸۴، ۱۸۸۶، ۱۸۸۸، ۱۸۹۰، ۱۸۹۲، ۱۸۹۴، ۱۸۹۶، ۱۸۹۸، ۱۹۰۰، ۱۹۰۲، ۱۹۰۴، ۱۹۰۶، ۱۹۰۸، ۱۹۱۰، ۱۹۱۲، ۱۹۱۴، ۱۹۱۶، ۱۹۱۸، ۱۹۲۰، ۱۹۲۲، ۱۹۲۴، ۱۹۲۶، ۱۹۲۸، ۱۹۳۰، ۱۹۳۲، ۱۹۳۴، ۱۹۳۶، ۱۹۳۸، ۱۹۴۰، ۱۹۴۲، ۱۹۴۴، ۱۹۴۶، ۱۹۴۸، ۱۹۵۰، ۱۹۵۲، ۱۹۵۴، ۱۹۵۶، ۱۹۵۸، ۱۹۶۰، ۱۹۶۲، ۱۹۶۴، ۱۹۶۶، ۱۹۶۸، ۱۹۷۰، ۱۹۷۲، ۱۹۷۴، ۱۹۷۶، ۱۹۷۸، ۱۹۸۰، ۱۹۸۲، ۱۹۸۴، ۱۹۸۶، ۱۹۸۸، ۱۹۹۰، ۱۹۹۲، ۱۹۹۴، ۱۹۹۶، ۱۹۹۸، ۲۰۰۰، ۲۰۰۲، ۲۰۰۴، ۲۰۰۶، ۲۰۰۸، ۲۰۱۰، ۲۰۱۲، ۲۰۱۴، ۲۰۱۶، ۲۰۱۸، ۲۰۲۰، ۲۰۲۲، ۲۰۲۴، ۲۰۲۶، ۲۰۲۸، ۲۰۳۰، ۲۰۳۲، ۲۰۳۴، ۲۰۳۶، ۲۰۳۸، ۲۰۴۰، ۲۰۴۲، ۲۰۴۴، ۲۰۴۶، ۲۰۴۸، ۲۰۵۰، ۲۰۵۲، ۲۰۵۴، ۲۰۵۶، ۲۰۵۸، ۲۰۶۰، ۲۰۶۲، ۲۰۶۴، ۲۰۶۶، ۲۰۶۸، ۲۰۷۰، ۲۰۷۲، ۲۰۷۴، ۲۰۷۶، ۲۰۷۸، ۲۰۸۰، ۲۰۸۲، ۲۰۸۴، ۲۰۸۶، ۲۰۸۸، ۲۰۹۰، ۲۰۹۲، ۲۰۹۴، ۲۰۹۶، ۲۰۹۸، ۲۱۰۰، ۲۱۰۲، ۲۱۰۴، ۲۱۰۶، ۲۱۰۸، ۲۱۱۰، ۲۱۱۲، ۲۱۱۴، ۲۱۱۶، ۲۱۱۸، ۲۱۲۰، ۲۱۲۲، ۲۱۲۴، ۲۱۲۶، ۲۱۲۸، ۲۱۳۰، ۲۱۳۲، ۲۱۳۴، ۲۱۳۶، ۲۱۳۸، ۲۱۴۰، ۲۱۴۲، ۲۱۴۴، ۲۱۴۶، ۲۱۴۸، ۲۱۵۰، ۲۱۵۲، ۲۱۵۴، ۲۱۵۶، ۲۱۵۸، ۲۱۶۰، ۲۱۶۲، ۲۱۶۴، ۲۱۶۶، ۲۱۶۸، ۲۱۷۰، ۲۱۷۲، ۲۱۷۴، ۲۱۷۶، ۲۱۷۸، ۲۱۸۰، ۲۱۸۲، ۲۱۸۴، ۲۱۸۶، ۲۱۸۸، ۲۱۹۰، ۲۱۹۲، ۲۱۹۴، ۲۱۹۶، ۲۱۹۸، ۲۲۰۰، ۲۲۰۲، ۲۲۰۴، ۲۲۰۶، ۲۲۰۸، ۲۲۱۰، ۲۲۱۲، ۲۲۱۴، ۲۲۱۶، ۲۲۱۸، ۲۲۲۰، ۲۲۲۲، ۲۲۲۴، ۲۲۲۶، ۲۲۲۸، ۲۲۳۰، ۲۲۳۲، ۲۲۳۴، ۲۲۳۶، ۲۲۳۸، ۲۲۴۰، ۲۲۴۲، ۲۲۴۴، ۲۲۴۶، ۲۲۴۸، ۲۲۵۰، ۲۲۵۲، ۲۲۵۴، ۲۲۵۶، ۲۲۵۸، ۲۲۶۰، ۲۲۶۲، ۲۲۶۴، ۲۲۶۶، ۲۲۶۸، ۲۲۷۰، ۲۲۷۲، ۲۲۷۴، ۲۲۷۶، ۲۲۷۸، ۲۲۸۰، ۲۲۸۲، ۲۲۸۴، ۲۲۸۶، ۲۲۸۸، ۲۲۹۰، ۲۲۹۲، ۲۲۹۴، ۲۲۹۶، ۲۲۹۸، ۲۳۰۰، ۲۳۰۲، ۲۳۰۴، ۲۳۰۶، ۲۳۰۸، ۲۳۱۰، ۲۳۱۲، ۲۳۱۴، ۲۳۱۶، ۲۳۱۸، ۲۳۲۰، ۲۳۲۲، ۲۳۲۴، ۲۳۲۶، ۲۳۲۸، ۲۳۳۰، ۲۳۳۲، ۲۳۳۴، ۲۳۳۶، ۲۳۳۸، ۲۳۴۰، ۲۳۴۲، ۲۳۴۴، ۲۳۴۶، ۲۳۴۸، ۲۳۵۰، ۲۳۵۲، ۲۳۵۴، ۲۳۵۶، ۲۳۵۸، ۲۳۶۰، ۲۳۶۲، ۲۳۶۴، ۲۳۶۶، ۲۳۶۸، ۲۳۷۰، ۲۳۷۲، ۲۳۷۴، ۲۳۷۶، ۲۳۷۸، ۲۳۸۰، ۲۳۸۲، ۲۳۸۴، ۲۳۸۶، ۲۳۸۸، ۲۳۹۰، ۲۳۹۲، ۲۳۹۴، ۲۳۹۶، ۲۳۹۸، ۲۴۰۰، ۲۴۰۲، ۲۴۰۴، ۲۴۰۶، ۲۴۰۸، ۲۴۱۰، ۲۴۱۲، ۲۴۱۴، ۲۴۱۶، ۲۴۱۸، ۲۴۲۰، ۲۴۲۲، ۲۴۲۴، ۲۴۲۶، ۲۴۲۸، ۲۴۳۰، ۲۴۳۲، ۲۴۳۴، ۲۴۳۶، ۲۴۳۸، ۲۴۴۰، ۲۴۴۲، ۲۴۴۴، ۲۴۴۶، ۲۴۴۸، ۲۴۵۰، ۲۴۵۲، ۲۴۵۴، ۲

دوم (F_۲)، ماه سوم (F_۳) و تا ماه پنجم (F_۵) الگوی کایمریسم مخلوط را نشان می دهد.

در بیمار شماره ۸ که از رژیم آماده سازی کم شدت برای او استفاده شده بود، آلل اختصاصی بیمار تا روز ۲۴+ مشاهده شد و سپس بیمار الگوی کایمریسم مخلوط را نشان داد و در نهایت در ماه پنجم به کایمریسم کامل دست یافت.

در این مطالعه موفقیت هماتولوژیکی پیوند در فاصله بین روزهای ۹ تا ۱۴ به دست آمد. تقریباً در همه بیماران در روزهای ابتدایی، شمارش اولیه گلبول های سفید بیمار شروع به افت می کرد و تا چند روز در این افت سلولی باقی می ماند (متوسط ۵ روز) و سپس شروع به افزایش سلولی می نمود. موفقیت پلاکتی پیوند در فاصله روزهای ۹ تا ۲۵ به دست آمد (جدول ۱).

بیشتر گیرندگان پیوند ۱ تا ۳ روز بعد از موفقیت هماتولوژیکی پیوند یا به طور هم زمان، که در فاصله بین روزهای ۸ تا ۱۹ صورت می گرفت، کایمریسم کامل را به دست آوردند.

بحث

در این مطالعه نمونه های خون محیطی به دست آمده در ۲۴ ساعت اول بعد از پیوند اغلب وجود کایمریسم مخلوط را نشان داد که نشان گر حضور سلول های باقی مانده از میزبان و سلول های در حال گردش دهنده می باشد. در بیشتر بیماران کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول و دو هفته اول بعد از پیوند مشاهده شد.

گرفتن پیوند (Engraftment) اغلب توسط عوارض بعد از پیوند از قبیل رد پیوند، GVHD^۸ و عود بیماری، محدود می شود. رد پیوند هنگامی مشاهده می شود که سلول های ایمنی باقی مانده میزبان به سلول های ورودی حمله کنند و در بررسی مولکولی به صورت ناپدید شدن پیشرونده باند دی ان ا مرتبط به ال های دهنده بعد از پیوند مشخص

می شود. GVHD توسعه ای یک پاسخ ایمنی را توسط سلول های پیوندی بر علیه بافت های گیرنده منعکس می نماید. حتی هنگامی که دهنده و گیرنده بافت از نظر HLA مشابه باشند، رد پیوند و GVHD می تواند اتفاق بیافتد. اگر چه این عوارض در نهایت بعد از پیوند با علائم بالینی مشخص می شود، بررسی دی ان ا^۹ می تواند در تعیین اولیه ایمنی حوادث مفید باشد. در موارد عود، شکل گیری مجدد مجموعه سلول های لوکمیک را می توان در اغلب موارد با بررسی دی ان ا قبل از عود هماتولوژیکی که باعث شواهد بالینی می شود، تعیین کرد (۱۸).

روش ارزیابی وضعیت پیوند در مراحل اولیه پس از پیوند از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. تا به حال از روش های بسیاری برای بررسی کایمریسم استفاده شده است که در درجه ی حساسیت و اطلاعاتی که می دهند متفاوت هستند. روش هایی که برای کنترل پیوند مغز استخوان استفاده شده اند، شامل روش های سیتوژنتیک بررسی آنتی ژن های اریتروسیته^{۱۰}، بررسی آنتی ژن های لکوسیت انسانی و پلی مرفیسم سکانس دی ان ا می باشد. سیتوژنتیک زمانی مفید است که یک اختلاف کروموزوم جنسی یا اتوزوم وجود دارد. بررسی آنتی ژن های اریتروسیته به دلیل دریافت خون توسط گیرندگان پیوند معمولاً مفید نیستند. اما تکنیک های مولکولی برای کنترل پیوند، با استفاده از RFLP^{۱۱}، VNTR^{۱۲} یا ترکیبات مختلفی از VNTR، اس تی آر و سیتوژنتیک استفاده شده است. تکنیک های پی سی آر اختصاصی کروموزوم Y خیلی حساس هستند اما فقط برای جفت های دهنده و گیرنده از جنس های مخالف، قابل استفاده است. تعیین چند شکلی با قطعات متفاوت توسط ساترن بلات، دارای حساسیتی از ۱ تا ۱۰ درصد بوده و تقریباً به ۱۰^۶ سلول احتیاج دارد، که گرفتن این تعداد سلول از بیماران در مراحل اولیه

^{۱۰}Erythrocyte Typing

^{۱۱}Restriction Fragment Length Polymorphisms

^{۱۲}Variable Number of Tandem Repeats

^۸Graft Versus Host Disease

^۹ DNA Typing

یافتند. باندهای دی آن آ به دست آمده که هر یک معرف یک آل از دهنده و یا گیرنده می باشند توسط نرم افزار مخصوص تعیین مقدار شده و درصد هر باند به صورت کمی محاسبه شد. با توجه به نتایج به دست آمده بررسی متوالی اس تی آر توسط پی سی آر افزایش تدریجی سیگنال آللیک اختصاصی دهنده را نشان می داد که در فاصله بین روزهای ۹ تا ۱۴ بر آل های اختصاصی گیرنده غالب می شدند.

در این مطالعه موفقیت پیوند از نظر هماتولوژیکی در فاصله بین روز های ۸ تا ۱۹ به دست آمد. تقریباً در همه بیماران، شمارش اولیه سلول های سفید شروع به افت می کرد و تا چند روز در این افت سلولی باقی می ماند که این حالت به علت اثر داروهای آماده سازی بود و سپس شروع به افزایش می نمود که این می تواند بیان گر این واقعیت باشد که سلول های پیوندی از شخص دهنده شروع به تکثیر و تمایز کرده و وارد خون محیطی شده اند (۱۴). در اکثر بیماران در همان آغاز موفقیت هماتولوژیکی پیوند و یا ۱ تا ۳ روز بعد از آن کایمریسم کامل را به دست آوردند، که نشان دهنده آن است که وقتی سلول های پیوندی تزریق می شوند، مدتی طول خواهد کشید تا سلول ها در مغز استخوان مستقر و شروع به تمایز و تکثیر نمایند (۱۴).

ارزیابی کایمریسم مخلوط در طول مراحل بعد از پیوند ممکن است شناسایی تغییراتی که علامت رد، یعنی افزایش نسبی یا عود سیگنال های آللیک اختصاصی گیرنده در نمونه های سلولی بررسی شده باشد را میسر سازد (۲۰). تعیین زودرس و به موقع رد آلوگرافت می تواند در تصمیم برای روش درمانی مناسب نقش مهمی داشته باشد و از جمله در تنظیم درمان ایمنوساپرسیو، تجویز تزریق لنفوسیت دهنده^{۱۴} یا یک پیوند آلوژنیک دوم اهمیت دارد (۲۱). بیمارانی که پیوند سلول بنیادی یا مغز استخوان را برای درمان اختلالات بدخیم هماتولوژیک دریافت می کنند، تعیین کایمریسم گیرنده در حال افزایش درون نمونه های لکوسیت مشتق شده از خون محیطی ممکن است نشان گر عود آغازین، رد پیوند یا برگشت

پیوند مشکل می باشد. از طرفی روش ساترن بلات روش وقت گیری بوده و نیازمند پروب های رادیو اکتیو می باشد (۹-۴). از چند شکلی های با طول قطعات متفاوت یا مینی ساتلایت ها نیز برای بررسی وضعیت کایمریسم بعد از پیوند استفاده می شود ولی تکثیر این نواحی همواره با مشکلاتی روبرو بوده است. در حال حاضر توالی های اس تی آر، بهترین شاخص های ژنتیکی در بررسی کایمریسم هستند. نزدیک به یک چهارم از لوکوس های اس تی آر انسان پلی مرفیک می باشند و یک منبع غنی از شاخص های ژنتیکی را فراهم می کنند. بررسی کردن نتایج اس تی آر سریع بوده و کاری مطمئن و دقیق را نسبت به دیگر روش های پی سی آر، از جمله قطعات طولانی مثل چند شکلی های با طول قطعات متفاوت فراهم می کند. حساسیت تکنیک اس تی آر وابسته به پروب های استفاده شده بین ۰/۰۵ تا ۱ درصد بوده و قابل مقایسه با چند شکلی های با طول قطعات متفاوت می باشد. از آنجایی که سکانس های اس تی آر نسبت به این چند شکلی ها کوتاه تر هستند بنابراین احتمال مداخله کمی یا تقویت ترجیحی^{۱۳} به وسیله دی آن آ شکسته شده وجود ندارد. بنابراین اس تی آر حساسیت مشابه و مشکلات پتانسیلی کمتری را نسبت به چند شکلی هایی با طول قطعات متفاوت دارد (۱۹). مالتیپلکس پی سی آر روشی از پی سی آر می باشد که امکان بررسی چند ژن را در یک واکنش پی سی آر فراهم می نماید. از آنجا که بررسی نتایج در این روش نسبت به پی سی آر معمولی خیلی سریع تر می باشد در مطالعه حاضر از روش مالتیپلکس پی سی آر استفاده شد.

طبق یافته های این مطالعه کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول و دو هفته بعد از پیوند مشاهده شد که این یافته به طور آشکار نشان دهنده یک تداخل موقتی بین حضور سلول های باقی مانده یا به تازگی تولید شده دهنده در خون محیطی می باشد (۱۴). در ۷ بیمار کایمریسم مخلوط تا روز ۹+ ادامه داشت و بسته به بیمار، این بیماران در فاصله ی بین روزهای ۹+ تا ۱۴+ به کایمریسم کامل دست

¹⁴ Donor Lymphocyte Infusion¹³ Preferential amplification

مطالعه‌ی حاضر در این گونه موارد توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

برخود لازم می‌دانیم از کلیه‌ی بیمارانی که جهت این مطالعه نمونه‌ی مغز استخوان و یا خون محیطی در اختیار ما قرار دادند تشکر و سپاسگزاری نمائیم. هزینه این مطالعه توسط مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور تامین گردید. از این روی از مسئولین مربوطه کمال تشکر و قدردانی را داریم

اتولوگوس باشد. از آن جایی که بررسی ژنوتیپ، فقط شواهد غیر مستقیمی از حضور جمعیت سلولی لوکمیک را فراهم می‌کند، تکنیک‌های دیگری که اجازه شناسایی شاخص‌های اختصاصی بیمار از قبیل یک ژن بدخیم بیماری یا شاخص‌های کلونالیتی از قبیل ژن ایمونوگلوبولین یا باز آرایه گیرنده سلول T را می‌دهد، می‌بایست در هر زمان ممکن برای تایید منشاء لوکمیک سلول‌های گسترش یافته به کار رود (۲۱). از این رو استفاده از روش‌هایی مشابه

منابع

- 1 - Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001; 15: 293-302.
- 2 -Barta A, Batai A, Kelemen E, Lengyel L, Remenyi P, Sipos A. Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT the development of chimeric state. *Human Immunol* 2000; 61: 101-10.
- 3 - Antin JH, Cbils R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendation from a workshop at the 2001 tandem repeat meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473-85.
- 4 - Zehnbaure B, Griffin C, Santos G, Wagner J. Comparison of molecular and cytogenetic methods in the evaluation of engraftment following allogeneic bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 55: 181-190.
- 5 - Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescent in situ hybridization uses and limitations. *Semin Hematology* 2000; 37(4): 320-33.
- 6 - Rondon G, Giral S, Periera M, et al. Analysis of chimerism following allogeneic bone marrow transplantation by fluorescent in situ hybridization. *Leuk Lymphoma* 1997; 25(5-6): 463-7.
- 7 - Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, et al. Use of DNA restriction length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 399-407.
- 8 - Sreenan JJ, Pettay JD, Tbakhi A, et al. The use of amlifid variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation: a comparison with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by Southern Blotting. *Am J of Clin Pathol* 1997; 107: 292-8.
- 9 - LeClair B, Fregeau CJ, Aye MT, Fourney RM. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 43-55.
- 10 - Schichman SA, Suess P, Vertino AM, Gray PS. Comparison of short tandem repeat and variable number tandem repeat genetic markers for quantitative determination of allogeneic bone marrow transplant engraftment. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 243-8.
- 11 - Edwards AL, Civitello A, Hammnd HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric

tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49 :746-56.

12 - Thiede C, Florek M, Bornhauser M, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1055-60.

13 - Kolger G, Hernandez A, Heyll A, Wolf HH, Wernet P. Qualitative assessment of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with regard to leukemic relapse. *Cancer Detect Prev* 1996; 20(6): 601-9.

14 - Briones J, Urbano-Ispizua A, et al. Study of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using PCR amplification of short tandem repeats. *Ann hematol* 1996; 72 : 265-8.

15 - McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 91-7.

16 - Nakao S, Nakatsumi T, Chuhjo T, et al. Analysis of late graft failure after allogeneic bone marrow transplantation: detection of residual host cells using amplification of variable number of tandem repeats loci. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 107-11.

17 - Gleissner B, Blau IW, Sindram A, Reinhardt R, Knauf W, Thiel E. Analysis of chimerism during the period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2001; 23: 401-6.

18 - Scharf SJ, Smith AG, Hansen JH, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood* 1995; 85(7): 1954-63.

19 -Frankel W, Chan A, Corringham RET, Shepherd S, Rearden A, Wang-Rodriguez J. Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or transplantation by short tandem repeats. *Am J Hematol* 1996; 52: 281- 7.

20 - Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplantation period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders:implication for timely detection of engraftment,graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; 13 : 2060-9.

21 - DeWeger RA, Tilanus MJT, Scheidel KC, VanDen Tweel JG, Verdonck LF. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimerism analysis with Short Tandem Repeats. *Br J of Haematol* 2000; 110: 647-53.