

Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

О.В. Блау

РЕФЕРАТ

Chimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

O. V. Blau

ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is thought a potentially curative treatment for various hematological disorders. For transplant engraftment monitoring, prevention of the underlying disease relapse or graft rejection, and evaluation of the minimal residual disease, the various molecular genetics techniques are used. Cytogenetic studies, fluorescence *in situ* hybridization, PCR for chromosome breakage, lymphocyte-receptor gene rearrangement, and chimerism analysis are widely employed in clinical practice, although these methods possess different sensitivity. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic HSCT is an important method for evaluation of the transplant engraftment that allows differentiation between graft failure and relapse. This method is also useful after reduced-intensity conditioning (RIC) HSCT, when the graft-versus-tumor effect plays an important role in leukemia eradication. Lineage-specific chimerism analysis makes this chimerism study more informative. Long-term stable complete chimerism and absent karyotype changes, that have been registered at the onset of the disease, correlate with complete hematologic remission. Mixed chimerism is usually associated with relapse or graft failure. Lineage-specific chimerism analysis helps in differentiating these states. However, long-term mixed chimerism following allogeneic HSCT occurs in some patients with chronic lymphoproliferative disorders after RIC. This phenomenon can be important for understanding the role of the graft-versus-tumor effect in such patients. For evaluation of transplantation efficacy and early detection of relapse, repeated sequential analyses of chimerism are needed.

Keywords: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, chimerism.

Department of Hematology and Oncology, Charité-University Medicine Berlin, Berlin, Germany

Контакты: olga.blau@charite.de

Принято в печать: 18 февраля 2013 г.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) считается потенциально излечивающим методом при различных гематологических заболеваниях. Разнообразные молекулярно-генетические методы исследования используются для мониторинга приживления трансплантата, предупреждения рецидива основного заболевания или отторжения трансплантата, а также для анализа минимальной остаточной болезни. Цитогенетические исследования, флюоресцентная гибридизация *in situ*, ПЦР на хромосомные поломки, реаранжировка генов рецепторов лимфоцитов и исследование гемопоэтического химеризма широко применяются в клинике, несмотря на то что эти методы характеризуются разной чувствительностью. Количественное определение химеризма после аллоТГСК — важный метод оценки приживления трансплантата, позволяет отличить недостаточность трансплантата и рецидив опухоли. Этот метод применим и после аллоТГСК с кондиционированием редуцированной интенсивности, когда эффект «трансплантат против опухоли» играет важную роль в уничтожении болезни. Анализ химеризма, выполненный в отдельных клеточных фракциях, делает это исследование более информативным. Стабильный длительный полный химеризм и отсутствие изменений кариотипа, которые были зафиксированы в начале заболевания, коррелируют с полной гематологической ремиссией. Смешанный химеризм обычно сочетается с рецидивом заболевания или недостаточностью трансплантата. Исследование химеризма в отдельных клеточных фракциях позволяет дифференцировать эти состояния. Однако смешанный химеризм в течение длительного времени после аллоТГСК встречается у больных с хроническими лимфопролиферативными заболеваниями после кондиционирования с ограниченной интенсивностью. Этот феномен может быть важным для понимания роли эффекта «трансплантат против опухоли» у данной группы больных. Многократные последовательные исследования химеризма необходимы для оценки эффективности трансплантации и раннего выявления рецидива опухоли.

Ключевые слова:

аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, химеризм.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) — один из наиболее эффективных методов лечения заболеваний системы крови, а также многих злокачественных и

наследственных болезней. Однако успех аллоТГСК ограничивают посттрансплантационные осложнения, в т. ч. развивающиеся на фоне взаимодействий аллогенного трансплантата с организмом реципиента. К ним от-



Рис. 1. Химера в изобразительном искусстве и архитектуре:

А — химеры собора Парижской Богоматери; Б — химеры на мосту в центре Берлина; В — изображение химеры на краснофигурном блюде из Апулии (350–340 гг. до н. э., Лувр, Париж)

носятся реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), отторжение трансплантата, развитие рецидива опухоли после трансплантации и др. Изучение динамики приживления трансплантата и ее связи с осложнениями играет важную роль в правильной оценке состояния больного и проведении дальнейшего лечения.

Термин «химера» происходит из древнегреческой мифологии. Химера — чудовище с головой и шеей льва, туловищем козы и хвостом дракона, порождение Тифона и Ехидны (рис. 1). В медицине понятие химеризма используется для характеристики организма, содержащего клеточные популяции другого индивидуума того же или другого вида [1]. Спонтанный химеризм возникает у dizygotic близнецов вследствие обмена гемопоэтическими клетками в эмбриональный период [2]. В области трансплантологии термин «химера» был впервые использован К. Фордом и соавт. в 1956 г. при описании мышей, которым после облучения были введены гемопоэтические клетки другого животного [3]. Термин «смешанный химеризм» (СХ) используется для описания ситуаций после аллоТГСК, когда обнаруживаются клетки реципиента и донора одновременно. СХ был впервые описан у человека в 1972 г. по результатам цитогенетического исследования у больных острыми лейкозами [4].

Развитие донорского химеризма является важным прогностическим показателем, позволяющим оценить эффективность проведенной аллоТГСК и адекватно планировать дальнейшее лечение пациентов в посттрансплантационный период. Более того, определение типа кроветворения у больного после аллоТГСК имеет большое значение для изучения механизмов приживления и отторжения, а также таких феноменов, как развитие посттрансплантационной толерантности, реакций «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и «трансплантат против

лейкоза» (РТПЛ). Важно обнаружить не только наличие или отсутствие клеток донорского происхождения, но и оценить их количество по отношению к клеткам реципиента. Постепенное нарастание доли клеток донора в периферической крови (ПК) или костном мозге (КМ) дает возможность говорить об эффективности проведенной аллоТГСК. И наоборот, снижение количества клеток донорского происхождения свидетельствует о возможности рецидива заболевания или отторжения трансплантата. Пример анализа химеризма представлен на рис. 2.

В последние годы разработано много методов для изучения химеризма у больных после аллоТГСК (табл. 1). Основная цель всех методических разработок — добиться чувствительности и воспроизводимости, достаточных для эффективного разделения клеток донора и реципиента. Одним из первых методов, используемых для верификации химеризма после аллоТГСК, был цитогенетический. Однако он не обладает достаточной чувствительностью и может быть использован только в тех ситуациях, когда между донором и реципиентом есть различия по полу или другие индивидуальные особенности хромосом. Кроме того, в ранний срок после аллоТГСК, когда клеточность КМ крайне мала, трудно получить метафазные пластинки хромосом путем культивирования клеток. Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) имеет ряд преимуществ перед стандартной цитогенетикой, поскольку нет необходимости в культивировании клеток. Однако оба этих метода могут применяться для определения химеризма только в тех ситуациях, когда донор и реципиент разного пола. Для этих целей может быть использован также высокочувствительный метод определения химеризма по Y-хромосоме, основанный на количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5].

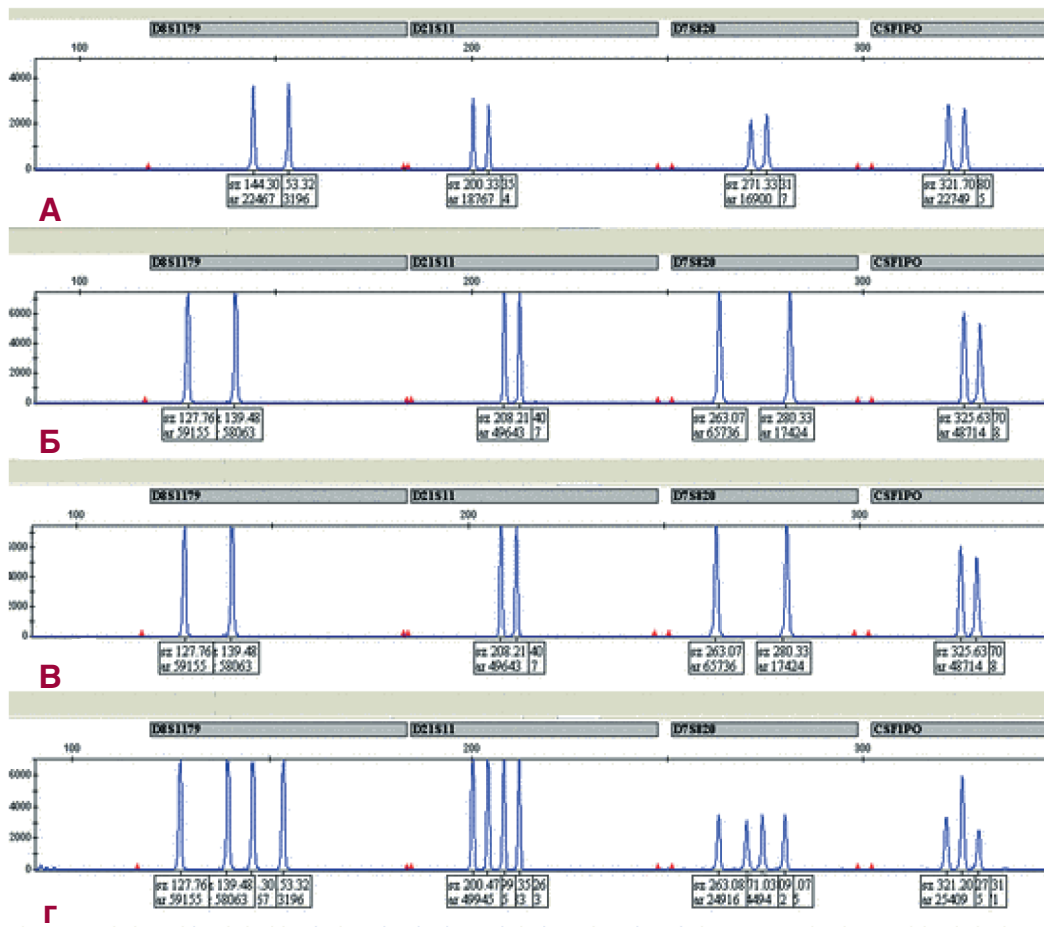


Рис. 2. Количественный анализ химеризма с помощью STR-фрагментов ДНК, выполненный на генетическом анализаторе ABI 310: А — пациент до трансплантации; Б — донор; В — пациент после трансплантации имеет только донорский тип; Г — пациент после трансплантации: смешанный химеризм с содержанием донорских клеток 50% свидетельствует о рецидиве заболевания

Другая методика, которая была использована ранее и которая тоже не отличалась высокой чувствительностью, — изучение аллотипов иммуноглобулинов. В тех ситуациях, когда донор и реципиент имеют различия по системе АВ0 и Rh-фактору, возможно исследование приживления донорских клеток по эритроцитарным антигенам. Однако практически данный метод может быть применен только через несколько месяцев после трансплантации [6]. В тех редких случаях, когда имеется неполное соответствие по системе HLA между донором и реципиентом, можно использовать данное различие как маркер для изучения химеризма после аллотГСК.

Все перечисленные выше методы имеют ряд преимуществ, а также существенные недостатки, ограничива-

ющие их применение для изучения химеризма у больных после аллотГСК [7]. В настоящее время широко используются молекулярно-генетические методы для выявления различий между донором и реципиентом на генетическом уровне. Одним из первых, адаптированных к мониторингу химеризма методов была технология рестрикции фрагментов линейного полиморфизма (restriction fragment length polymorphism, RFLP), предложенная в 1985 г. В. Blazar и соавт. [8]. В то время она уже отличалась высокой чувствительностью и широкой возможностью применения. В последующем было достигнуто еще большее увеличение чувствительности методики за счет использования в качестве мишени генетических последовательностей, отличающихся вариабельным числом тан-

Таблица 1. Методы исследования химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Метод	Преимущества	Недостатки	Чувствительность	Использование
Цитогенетика		Длительность исследования	5%	Редко
X/Y FISH	Высокая чувствительность, редко ложноположительные результаты	Только, когда донор и реципиент разного пола	До 0,001 %	Редко
RFLP	Высокая информативность	Длительность и трудоемкость исследования	5–10 %	Часто
Группа крови	Простота выполнения	Поздняя возможность применения	1–5 %	Часто
STR-ПЦР	Быстрый, простой, точный количественный метод	Средняя чувствительность	1 %	Очень часто
STR-ПЦР в отдельных популяциях клеток	Высокая чувствительность	Длительность и трудоемкость исследования	До 0,001 %	Очень часто
ПЦР в реальном времени	Высокая чувствительность, быстрота	Только разнополая ТГСК, нередко ложноположительные результаты	До 0,0001	Ограниченно

демных повторов (variable number tandem repeats, VNTR) [9]. Однако вследствие ряда лимитирующих моментов, таких как необходимость использовать автордиографию, блоттинг и другие дополнительные мероприятия, а также из-за некоторых технических проблем с ферментативной обработкой ПЦР-продукта анализ становился более длительным по времени и менее востребованным [10].

В настоящее время для определения химеризма у больных после аллоТГСК наиболее часто используются методы, основанные на выявлении индивидуальных отличий в структуре ДНК [7, 11–13]. В геноме человека есть последовательности, характеризующиеся высокой степенью полиморфизма. Они называются сателлитными фрагментами ДНК и локализованы, как правило, в гетерохроматиновых районах хромосом. Название «сателлиты» связано с тем, что впервые ДНК подобного типа была описана как маленький компонент, или «сателлит» [14]. Известно, что они обеспечивают в основном собственное самоподдержание, не участвуя в процессах клеточного выживания. Сателлитные последовательности ДНК отличаются высоким уровнем полиморфизма, число tandemных повторов широко варьирует от индивидуума к индивидууму. Поэтому данные последовательности используются для установления принадлежности ДНК определенному человеку [15].

Выделяют два варианта сателлитных последовательностей: мини-сателлиты и микросателлиты. Мини-сателлиты, или VNTR, — это повторяющиеся последовательности ДНК, содержащие от 10 до 70 пар оснований [16]. Микросателлиты, или короткие tandemные повторы (short tandem repeats, STR), содержат короткие повторяющиеся последовательности, от 2 до 5 пар оснований [15]. При исследовании химеризма с помощью VNTR и STR проводится ПЦР, затем определение продукта амплификации может быть выполнено различными путями: окраска этидиума бромидом, обработка серебром, флюоресцентная окраска или автордиография. Применение молекулярно-биологических методов исследования, основанных на анализе STR, остается в настоящее время наиболее частым методическим подходом, т. к. он отличается достаточно высокой чувствительностью (от 1 до 0,001 %), быстрый и простой в исполнении, позволяет количественно оценить химеризм и не требует большого количества исследуемого материала [11–13, 17]. Стандартные методы изучения химеризма характеризуются чувствительностью от 1 %, максимум до 0,1 %. Повысить чувствительность метода до 0,001 %, а также сделать его более информативным позволяет исследование химеризма в отдельных фракциях лейкоцитов.

Выделяют несколько состояний химеризма у пациентов после аллоТГСК (табл. 2). Полный донорский химеризм (ПХ) констатируется, когда в исследуемом материале выявляются только клетки донора. Временный или краткосрочный СХ соответствует состоянию, когда в первые месяцы после аллоТГСК выявляется СХ с преобладающим содержанием донорских клеток и постепенным переходом в ПХ. Стабильный СХ означает присутствие в исследуемом материале значительной пропорции клеток реципиента в течение длительного времени после аллоТГСК. При прогрессирующем СХ количество клеток реципиента постоянно возрастает при последовательных исследованиях.

Известно, что обязательный анализ гемопэтического химеризма необходимо проводить по определенной

Таблица 2. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Вид химеризма	Описание
Полный	В исследуемом материале все клетки донорского происхождения
Смешанный	Присутствуют клетки донора и реципиента
Временный СХ	СХ с содержанием донорских клеток > 95 %, постепенно переходит в ПХ
Стабильный СХ	СХ с содержанием донорских клеток < 80 %, сохраняется длительное время на постоянном уровне
Прогрессирующий СХ	СХ с исходным содержанием донорских клеток < 90 %, содержание клеток реципиента постепенно возрастает
Восстановление собственного кроветворения	В исследуемом материале все клетки только собственного происхождения

схеме: в 28, 56 и 100-й дни после аллоТГСК, затем через полгода и год, если не требуется дополнительных исследований по клиническим показаниям. Далее исследование можно выполнять 1–2 раза в год при отсутствии дополнительных показаний к внеплановому анализу. В первый год после аллоТГСК изучение химеризма проводится, как правило, в КМ, ПК и отдельных фракциях лейкоцитов, выделенных из КМ и/или ПК. Затем, при стабильной ситуации и для подтверждения ремиссии, достаточно исследования с использованием ПК. Данной схемы следует придерживаться в случае стабильной клинической ремиссии. При необходимости анализ химеризма можно выполнять так часто, как того требует клиническая ситуация, т. к. это быстрый, информативный и надежный метод оценки приживления трансплантата. Некоторые авторы предлагают исследовать химеризм в ранний срок после аллоТГСК еженедельно [7], но этот подход не является общепринятой практикой.

Большое значение для понимания динамики приживления стволовых клеток у больных после аллоТГСК представляет изучение химеризма в различных клеточных популяциях. Это особенно важно для больных, получивших аллоТГСК с немиелоаблативными режимами кондиционирования или с редуцированной интенсивностью (РИК). Идея РИК аллоТГСК состоит в уменьшении токсичности и снижении миелоабляции, что теоретически может привести к периоду СХ разной длительности. СХ, постепенно переходя в ПХ, стимулирует развитие РТПЛ. Выявление стабильного СХ в данной ситуации не связано с риском рецидива, а как правило, коррелирует с хорошим прогнозом и отсутствием тяжелой РТПХ. Развитие же прогрессирующего СХ обычно свидетельствует о рецидиве заболевания или отторжении трансплантата. Было показано, что наиболее информативным в плане корреляции с рецидивом заболевания является показатель химеризма на 56-й день после РИК аллоТГСК [18].

В ранний срок после аллогенной трансплантации обычно бывает сложно разграничить два состояния: недостаточность приживления трансплантата или его отторжение и слабая его функция, которая может возникнуть вследствие ряда причин, например цитомегаловирусной или герпетической инфекции. Многие исследования четко продемонстрировали пользу изучения химеризма в данных ситуациях [6]. Риск отторжения встречается в среднем у 1 % больных после родственной HLA-идентичной аллоТГСК, несколько чаще — после

неродственной трансплантации и у пациентов с тяжелой апластической анемией. В ряде исследований было показано, что увеличение содержания Т-клеток собственного происхождения служит фактором риска отторжения трансплантата [6, 19]. Процесс отторжения может происходить очень быстро, однако обнаружение увеличения Т-клеточного химеризма дает возможность принять меры к его предупреждению. Сходные данные получены и в отношении пациентов, перенесших аллотГСК с применением немиелоаблативных режимов кондиционирования.

Известно, что больные после РИК аллотГСК имеют повышенный риск рецидива заболевания или отторжения трансплантата [20]. Химеризм в таких ситуациях лучше анализировать в отдельных клеточных популяциях. Повышенная частота СХ может наблюдаться как в миелоидной, так и в лимфоидной популяции лейкоцитов. Проведение аллотГСК с Т-клеточной деплецией строго коррелирует с присутствием СХ в Т-клетках (CD3+) и НК-клетках (CD56+). Достижение ПХ в Т-клетках у больных после РИК аллотГСК особенно важно для оценки долгосрочного эффекта трансплантации. Известно, что степень супрессии собственного иммунитета отражается в развитии СХ. Детекция СХ в лимфоидной популяции лейкоцитов, как правило, ассоциируется с повышенным риском отторжения трансплантата. Показана корреляция между обнаружением СХ в НК-клетках, Т-хелперах (CD3+/CD4+) и Т-супрессорах (CD3+/CD8+) и риском отторжения трансплантата [20, 21]. Кинетика клеток CD3+ и Т-клеточного химеризма четко связана с развитием тяжелой РТПХ [22].

Изучение химеризма в отдельных клеточных линиях помогает выяснить вопрос о способности остаточных опухолевых клеток реципиента к самоподдержанию и дифференцировке в различных направлениях, что будет проявляться в виде мультилинейного СХ. В одном из исследований было показано, что у $1/3$ пациентов в течение 32 мес. наблюдения выявлялся СХ в различных клеточных линиях. Это позволило авторам сделать вывод о том, что клетки реципиентов выжили и сохранили способность к самоподдержанию, несмотря на проведение миелоаблативных режимов кондиционирования [19].

Обнаружение СХ, как правило, связано с развитием рецидива заболевания. Выявление СХ, таким образом, является важным показателем для начала или усиления химиотерапии, уменьшения иммуносупрессии, назначения инфузии донорских клеток. Последовательные исследования химеризма в КМ, ПК и отдельных клеточных линиях позволяют в некоторых случаях предсказать развитие рецидива до появления тяжелых клинических симптомов. У таких больных наблюдается, как правило, персистенция либо появление СХ в клеточных популяциях, соответствующих типу заболевания. Исследования же химеризма в цельной крови позволяют чаще всего констатировать уже имеющийся рецидив заболевания. Встречаются ситуации, когда наличие СХ не всегда однозначно связано с рецидивом заболевания. Например, у больных с хроническими лимфопролиферативными заболеваниями часто отмечается СХ как в ПК, так и в КМ, который постепенно, в течение 1 года после аллотГСК переходит в ПХ. Важным показателем в данной ситуации считается наличие четкой тенденции к увеличению доли донорских клеток.

Другой особый аспект — это изучение химеризма после аллотГСК у больных с тяжелой апластической

анемией и анемией Фанкони. У данной группы пациентов чаще всего используют немиелоаблативные режимы кондиционирования, известен высокий риск отторжения трансплантата как в ранний, так и отдаленный период после аллотГСК. Выявление СХ в подобных случаях также не всегда связано с рецидивом заболевания, тем не менее служит маркером для изучения приживления трансплантата [23]. Последовательный и многократный анализ химеризма показан при проведении иммуносупрессивной терапии как важный показатель состояния кроветворения.

У больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом появление СХ, как правило, более определенно связано с развитием рецидива заболевания. У больных острыми миелоидными лейкозами определение химеризма в клетках CD34+ представляется более информативным и позволяет раньше предсказать развитие рецидива. Однако очень часто вследствие быстрого развития рецидива анализ химеризма позволяет лишь констатировать его наличие. Анализ химеризма нельзя рассматривать как метод оценки минимального остаточного лейкозного клона. С этой целью следует проводить молекулярно-генетические исследования минимальной остаточной болезни (МОБ). Маркерами МОБ могут быть хромосомные транслокации, мутации, реаранжировка генов тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Как правило, методы для выявления МОБ базируются на количественной ПЦР и отличаются высокой чувствительностью (10^{-5} – 10^{-6}). Анализ гемопоэтического химеризма и МОБ должен осуществляться одновременно, и одно исследование не может заменять другое. Изучение химеризма и МОБ решает разные задачи: приживление трансплантата при исследовании химеризма и состояние остаточного лейкозного клона при исследовании МОБ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Автор подтверждает отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCann S., Lawler M. Mixed chimerism; detection and significance following BMT. Bone Marrow Transplant. 1993; 11: 91–4.
2. Tippet P. Blood group chimeras: A review. Vox Sang. 1983; 44: 333–59.
3. Ford C., Hamerton J., Barnes D., Loutit J. Cytological identification of radiation-chimeras. Nature 1956; 177: 452–4.
4. Santos G., Sensenbrenner P., Burke P. et al. The use of cyclophosphamide for clinical marrow transplantation. Transplant. Proc. 1972; 4: 559–64.
5. Fehse B., Chukhlovina 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(3): 419–25.
6. Mattsson J. Molecular monitoring of engraftment and leukaemia relapse after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Stockholm, 2001.
7. 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.
8. Blazar B., Orr H., Arthur D. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. Blood 1985; 66: 1436–44.
9. Min G., Hibbin J., Arthur C. et al. Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. Br. J. Haematol. 1988; 68: 195–201.
10. Socie G., Lawler M., Gluckman E. et al. Studies on hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. Leuk. Res. 1995; 19: 497–504.
11. Thiede C., Bornhaeuser M., Oeschlagel 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; 7: 958–65.

12. Thiede C., Bornhauser M., Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 2004; 112: 16–23.
13. Lion T., Daxberger H., Dubovsky J. et al. Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001; 15: 307–10.
14. Craig-Holmes A., Shaw M. Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 1971; 174: 702–4.
15. Weber J., May P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 44: 388–96.
16. Jeffreys A., Wilson V., Neumann R. et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 10953–71.
17. Kreyenberg H., Holle W., Mohrle S. et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia* 2003; 17: 237–40.
18. Blau I.W., Schmidt-Hieber M., Leschinger N. et al. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 2007; 86(8): 583–9.
19. Jaksch M., Mattsson J., Uzunel M. et al. Multi-lineage mixed chimerism is common in patients with metabolic disorders after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 196.
20. Matthes-Martin S., Lion T., Haas O.A. et al. Lineage-specific chimerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimerism for late graft rejection. *Leukemia* 2003; 17(10): 1934–42.
21. Baron F., Baker J.E., Storb R. et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after non-myeloablative conditioning. *Blood* 2004; 104(8): 2254–62.
22. Mohy M., Avinens O., Faucher C. et al. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007; 92(7): 1004–6.
23. Lawler M., McCann S.R., Marsh J.C. et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indications for routine assessment of chimerism post SCT for SAA: Severe Aplastic Working Party of the European blood and Marrow Transplant group. *Br. J. Haematol.* 2009; 144: 933–45.

