

GRAFT FONKSİYONU VE KİMERİZM

Deniz Sargın

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi , Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul

Allogeneik Kök Hücre Nakillerinde (Allo-KHN) hazırlık rejimini izleyen aplazi sonrası donör lenfohematopoietik hücrelerinin alıcıda yerleşmesi ve yeni kan hücrelerinin oluşması “engrafman” (yamanma) olarak isimlendirilir.

Engrafman sağlanması, nakil sonrası erken dönemde greft fonksiyonunun değerlendirilmesi için göstergedir ve aşağıdaki kriterlerin oluşması ile gerçekleşir:

- Nötrofil engrafmanı: Parçalı nötrofil sayısının ardışık 3 gün $>500/\text{mm}^3$ olduğu ilk gün.
- Trombosit engrafmanı: 7 gün trombosit desteği olmadan trombosit sayısının ardışık 3 gün $>20\ 000/\text{mm}^3$ ve bunu izleyen günlerde $>50\ 000/\text{mm}^3$ olduğu ilk gün.

Enrafman süresi; nakil sonrası 7-21 gün arasında değişir. 21 gününü aştığında “engrafman gecikmesi” 40 gününü aştığında ise “engrafman başarısızlığı” söz konusudur.

Engrafman yetersizliği; erken (primer) yada geç (sekonder) olabilir. Nakil sonrası engrafman olduktan sonra greftin kaybedilmesi; geç greft yetersizliği (greft reddi) olarak isimlendirilir. Greft reddi olog geri dönüşüm ile düzelebildiği gibi, aplazi ve pansitopeni ile de sonlanabilir.

Erken greft fonksiyonuna (engrafman) etki eden faktörler

1. Hazırlık Rejimi (HR): Nakil öncesi verilen tedavilerin dozları engrafman oluşumunda rol oynar. Miyeloablatif HR'ler ile yapılan nakillerde non-miyeloablatif (NMA) yada yoğunluğu azaltılmış HR'li nakillere göre engrafman süresi daha uzundur.

2. Kök Hücre Kayn. ağı (KHK) Günümüzde KHK olarak kemik iliği, çevre kanı ve kordon kanı kullanılmaktadır. Çevre kanından yapılan nakillerde nötrofil ve trombosit engrafmanı diğer KHK larına göre daha erken (sırasıyla 2-6 gün ve 5-8 gün) olmaktadır. Bu durum çevre kanına mobilize edilmiş kök hücre yada öncül hücre sayısının diğer KHK daki hücrelerden daha fazla olması ile açıklanır (1).

3. Greft'teki kök hücre (CD34+) sayısının hastanın kilosuna göre yeterli olmaması. Allo-KHN de verilen donör kaynaklı kök hücre sayısı hastanın kilosuna göre hesaplanır. Tablo 1'de engrafman olmasını sağlamaya yetecek hücre sayıları belirtilmiştir.

4. Graft versus Host Hastalığı (GVHH) ve profilaksisinde kullanılan ilaçlar: GVHH, Allo-KHN'lerinin başarısını engelleyen başlıca faktördür. GVHH'nin etkilediği başlıca organlar; deri, karaciğer, gastrointestinal sistem ve akciğerlerdir. Bununla beraber GVHH'nın kemik iliğini de etkilediğini düşündüren bir miyelosüpresyon gelişebilir. GVHH'a bağlı hematopoiezis bozulması çok erken olur ve sistemik GVHH'nın etkisi yoktur.

Shono ve ark. tarafından yapılan çalışmada GVHH'nın hematopoietik öncül hücreleri etkilemediği, ancak engrafmanı destekleyen kemik iliği mikroçevresinde değişiklikler oluşturduğu ileri sürüldü (2). Bu çalışmada GVHH ile ilişkili hematopoezdeki duraklamanın alloreaktif CD4+ T hücrelerinin kemik iliğindeki osteoblastik hücre kompartmanlarına (nişlere) saldırısı ile olduğu gösterildi. Fas-Fas ligand etkileşimleri ile oluşan bu osteoblast harabiyeti hematopoiezi destekleyen

Tablo1. Engrafman sağlayacak donör kaynaklı hücre sayıları.

Kaynak	Volüm	T. Çekirdekli hücre sayısı	CD34+hücre sayısı	T hücre sayısı
Kemik iliği	10-20 ml/kg.	2-3x10 ⁸ /kg	2-3x10 ⁶ /kg	25x10 ⁶ /kg
Çevre kanı	150-400ml.	9-10x10 ⁸ /kg	5-10x10 ⁶ /kg median: 7x10 ⁶ /kg	27x10 ⁶ /kg
Kordon kanı	80-160ml.	0.3x10 ⁸ /kg	median 0.2x10 ⁶ /kg	4x10 ⁶ /kg

Haematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Hand book 5th Ed.2008 p.144 den uyarlanmıştır.

kemik iliği mikroçevresinin bütünlüğünün kaybolmasına yol açar (2,3).

Sekonder(geç)greft fonksiyonuna etkili faktörler

Allo-KHden sonra gelişen geç sitopeniler ciddi komplikasyonlardır. Etyolojisinde; Miyelotoksik ajanlar (gansiklovir, trimetoprim-sulfametaksazol, mikofenolat mofetil-MMF gibi), virus infeksiyonları, hazırlayıcı rejim, kök hücre kaynağı ve verilen CD34 (+) hücre sayısı gibi nakille ilişkili faktörler yer alır.

Nakamea ve ark. HKHN yapılan 1818 hastada nakil sonrası +28. günden sonra oluşan sitopeni nedenlerini araştırdılar (4). Bu hastaların %39'nda sitopeninin en az bir şekli oluştu. Sitopeni gelişen olguların %6'sında sadece trombositopeni, %7'sinde anemi, %7'inde ise pansitopeni görüldü. Nakil sonrası geç dönemde gelişen nötroponi için başlıca risk faktörleri; İleri hasta yaşı (>40 yaş), alıcıda CMV pozitifliği, CMV riski yüksek hastalar, akraba dışı nakiller, nonmieloablative HR ile nakil, GVHH profilaksisinde MMF kullanımı ve nakledilen CD34+ hücre sayısı (<6.4x10⁶/kg) olarak belirlendi.

Bruno ve ark.ise miyeloablative HR.li nakillerde; akraba dışı donörden nakil, II-IV. derece akut GVHH, böbrek yetmezliği, HR'de Busulfan+Siklofosamid veya total vücut ışınlanması kullanımı, nakledilen CD34+ kök hücre sayısı ve infeksiyonların sekonder trombositopeni oluşturabilen etmenler olduğunu gösterdiler (5).

Kimerizm

Kimerizm genetik olarak farklı olan iki hücre serisinin aynı organizmada bulunması durumunu ifade eder.

Kimerizm sözcüğü Yunan mitolojisinde yer alan ve Likya'da terör estiren, aslan başlı, keçi gövdeli, şeytan kuyruklu, ağzından ateş saçan kimera "Chimera" adlı bir canavardan köken almıştır.

Tıp literatüründe Kimera ilk kez 1951'de Anderson ve ark. tarafından 2 farklı zigot serisinden köken alan bir organizmayı tanımlamak için kullanılmıştır (6).

Transplantasyonda ise ilk kez 1956'da Ford ve ark. tarafından total vücut ışınlanmasından sonra hematopoietik KHN yapılan bir hayvanın taşıdığı yabancı hematopoietik sistemi tanımlamak için kullanılmıştır (7).

Kan transfüzyonları, kök hücre nakilleri, solid organ nakilleri, invitro fertilizasyon gibi tedavi seçeneklerinde edinsel kimerizm ortaya çıkabilir ve geçici yada kalıcı kimeraların oluşmasına sebep olabilir.

Hematopoietik KHN'de kimerizm, Allo-KHN den sonra donör kaynaklı lenfohematopoietik hücrelerin alıcıda bulunması şeklinde tanımlanır. Kimerizm allo-KHN'lerinden sonra greftin kabulü yada reddinin takibinde yol göstericidir.

Kimerizm Tipleri

Allo-KHN den sonra görülen kimerizm donör ve/veya alıcıdan köken alan hücrelerin varlığına göre değişik şekillerde gelişebilir;

Genel olarak alıcının hematopoietik dokularında donör kaynaklı hücrelerin >%95 bulunması *Tam Kimerizm (TK)* "Complete Chimerism/Full Chimerism"; %5-95 arasında bulunması ise *Karma Kimerizm(KK)* "Mixed chimerism" olarak ifade edilir. Nakil sonrası gelişen kimerizm dinamik bir olaydır. Tam kimerik bir olgu KK hale gelebilir veya bunun tersi olabilir.

Karışık kimerizimli olgularda ise hastaya (alıcıya) ait otolog kök hücre miktarı artabilir yada azalabilir (*Artan KK, azalan KK*) ya da stabil (*sabit*) kalabilir (8).

Artan KK bazen sadece alıcı tipi hücrelerin oluşması ile sonlanabilir (*Otolog geri dönüşüm*).

Bir hücre tipinde (örn;T-hücreleri) verici tipi (TK), diğerlerinde ise total yada kısmen alıcı tipi kimerizm olması *Split kimerizm* olarak isimlendirilir.

Tablo 2. Kimerizm ölçüm yöntemleri

Teknik	Olumlu yönler	Olumsuz yönler	Duyarlılık(%)	Kullanılabilme özelliği
RFLP	Bilgilendirme oranı yüksek	Zaman alıcı, zor	5-10	iyi
Sitogenetik		Zaman alıcı	5-10	az
Eritrosit antijenleri	Basit güvenli	Eritrositler sınırlı	1-6	iyi
Eritrositlerde genotipleme	mRNA kullanımı ile güncel bilgi sağlar	DNA kullanılırsa yeterince dinamik değil	değişken	iyi
Akım sitometrisi ile yapılan ölçümler	Basit, güvenli	HLA uyumsuzluğu varsa uygulanabilir, mevcut antikorlarla sınırlı	0.1	iyi
X/Y FISH	Hücre sayısı artırılarak duyarlılık artırılabilir	Cinsiyet farkı gerekli	0-1-1	az
Floresan bazlı STR-PCR	Hızlı, güvenli, otomasyon mümkün, mitokondrial DNA ile duyarlılık artırılabilir	Duyarlılık orta düzeyde	1-5	iyi
STR-PCR Hücre alt gruplarında	Duyarlılığı yüksek	Zor, pahalı	0.1-0.001	iyi
RT-PCR	Hızlı, duyarlılık yüksek	SNP ile yalancı pozitiflikler sık Y krom ile duyarlılık	0.001-0.0001	orta-iyi Giderek artıyor

Mikrokimerizm ise %0.1-0.3 arasında verici tipi hücrelerin görülmesi ile gelişen bir KK durumudur. GVHH üzerine etkili olabilir.

Kimerizm tayininde kullanılan yöntemler

Birçok yöntem geliştirilmiştir. Ancak kullanılan yöntemler aynı temel kurala dayanır; bu kural, polimorfik genetik belirteçler ve onların ürünlerindeki farklılıkların tayinidir. Kimerizm tayininde kullanılan yöntemler ve özellikleri Tablo 2’de yer almaktadır.

Günümüzde Polimeraz zincir reaksiyonlarının (PCR)kullanıma girmesi ile insan genomlarında bulunan kısa tekrar bölgeleri “short tandem repeats-STR” veya değişen sayıda tekrar bölgelelerinin “variable number of tandem repeats-VNTR” çoğaltılması mümkün olmuştur. Alıcı ve vericide yer alan STR lokuslarındaki allel farklılıklarına göre nakil sonrası kimerizm takibi yapılabilmektedir. Bu nedenle birçok merkez ticari olarak hazırlanmış kitler kullanılmaktadır.

Yakın zamanda RT-PCR”Real-time PCR” (Gerçek zamanlı-PCR) ile Y kromozomunda yer alan SRY geninin tespiti ile cinsiyet farklı nakillerde donör hücrelerinin 1/100 000 duyarlılıkta ölçümü mümkün olmuştur (9).

Daha sonra RT-PCR ile SNP ”Single nucleotide polymorphism” adı verilen genomdaki allellerin tespiti kimerizm analizinde kullanılmaya başlanmıştır (10).

Bütün bu teknikler arasında halen altın standart PCR ile STR tayinidir.

Kök Hücre nakillerinde kimerizm testleri için örnek seçilmesi ve ölçümlerin sıklığı

Kök hücre nakillerinde kimerizm testleri için çevre kanı yada kemik iliği örnekleri kullanılabilir. Kimerizm takiplerinde genellikle önerilen çevre kanı kullanımıdır. Ancak akut lösemilerde hastalık kinektiklerinin çok hızlı değişebilmesi nedeniyle kemik iliği örneklerinin de kullanılması önerilmektedir.

Bu örneklerde kimerizm analizi genellikle total çekirdekli hücrelerde yapılmakla beraber ayrıştırılmış hücrelerde (T lenfosit, NK hücreleri, CD34+ hücreler, miyeloid hücreler, dentritik hücreler gibi) çalışma yapılarak hücre serilerine özgü sonuçlar elde edilebilmektedir (8,11,12).

Kimerizm takibi için allo-KHN’den önce alıcının çevre kanı örneklerinden DNA izolasyonu yapılmalıdır. Nakil öncesine ait örneklerin bulunmadığı durumlarda GVHH yok ise yanak içi mukozasından, GVHH olması halinde saç yada kıl kökünden elde edilecek DNA kullanılmalıdır.

Habis kan hastalıklarında yoğunluğu azaltılmış HR’li KHN yapıldığında kimerizm tipi GVHH veya greft kaybının erken göstergesi olabilir. Bu olgularda kimerizm ölçümlerinin daha sık aralarla(her 2-4 haftada bir) yapılması önerilmektedir. Çünkü bu olgularda KK saptandığında immünoşüpressif tedavi sonlandırılarak Donör Lökosit İnfüzyonuna (DLI)başlanmalıdır.

Habis olmayan kan hastalıklarında ise kimerizm genellikle nakilden sonraki 1,2 ve 3. aylarda tayin edilmelidir.

Kimerizm tayininin Allo-KHN de kullanılan hazırlık rejimine göre önemi

1) Miyeloablatif Allo-KHN den sonra kimerizm tayini:

Eğer T-hücre uzaklaştırılmadan KHN yapılmış ise hastaların çoğu nakil sonrası TK olarak bulunur. Greftin içerdiği T-hücreleri Graft versus Lenfohematopoiezis etkisi oluşturarak TK gelişimini sağlar. Bu olgularda nakil sonrası erken dönemde rutin kimerizm ölçümü önerilmemektedir (13,14,15).

Bununla beraber Lamba ve ark.larının (16) çalışmasında 80 hastada ayrıştırılmamış kök hücrelerle yapılan miyeloablatif KHN den sonra +30., +90. günler ve 12. ayda kimerizm ölçümleri yapılmış, 30. günde olguların %23'de, 90. günde %28'de ve 12. ayda %14'de KK saptanmıştır. +30. günde yapılan kimerizm ölçümleri prognoza yönelik herhangi bir bilgi vermemesine karşın +90. günde bulunan KK durumunun yüksek nüks oranları ve tüm yaşam süresinde kısalma ile bağlantılı olduğu gösterildi. Bu çalışmada miyeloablatif Allo-KHN den sonra +30. günde engrafman olmadığı takdirde kimerizm ölçümünün yapılması gerektiği önerildi.

T-hücre uzaklaştırıldığında ise sıklıkla nakil sonrası KK bulunur.

2) Miyeloablatif olmayan(yoğunluğu azaltılmış)HR ile yapılan Allo-KHN den sonra kimerizm tayini

Yoğunluğu azaltılmış HR ile yapılan nakillerde alıcı hematopoiezi ve immunitesi tamamen ortadan kaldırılmaz. Ancak bu tip nakillerde verici hücrelerinin reddini önleyecek ve engrafmanı sağlayacak kadar immünosupresyon oluşur ve karma hematopoietik kimerizm sağlanması hedeflenir. Miyeloablatif olmayan nakillerden sonra kimerizm takibi standart bir yaklaşımdır. Bu olgularda kimerizm takibi ile greft reddi, nüks, akut ve kronik GVHH riski taşıyan hastaların belirlenmesi ve DLI için gerekliliğin ve doğru zamanlamanın yapılması mümkün olmaktadır.

Yoğunluğu azaltılmış HR li nakillerde TK elde edilmesi kalıcı engrafman sağlanması ve uzun süreli hastalık kontrolü için gereklidir.

Mickelson ve ark. yoğunluğu azaltılmış Allo-KHN den sonra erken engrafman (ort. 26. gün \pm 14) ve T-hücrelerinde KK gelişmesi (olguların %14'ü) bakımından miyeloablatif KHN sonuçları ile fark-

lılık olmadığını bildirdiler. >%90 T-hücre kimerizmi gösteren yoğunluğu azaltılmış HR'li nakillerde III-IV. derece akut GVHH ve yaygın kronik GVHH riskinin arttığını gösterdiler (17).

Habis olmayan hastalıklarda yapılan Allo-KHN'de kimerizm takibi

Talasemi, orak hücre hastalığı, immünyetmezlik durumları, depo hastalıkları, osteopetrozis, ağır aplastik anemi ve diğer kemik iliği yetmezliği sendromları gibi doğumsal yada kazanılmış habis olmayan hastalıklar Allo-KHN ile tedavi edilmektedir. Bu hastalıklarda KHN'nin amacı; kalıcı ve yeterli bir engrafman sağlamaktır. Bu nedenle alıcının hematopoietik sisteminin tamamen değişmesi gerekli değildir. Bu hastalıklarda genellikle toksik yan etkileri azaltmak için KK sağlayabilecek yoğunluğu azaltılmış HR ler kullanılır. Ancak nakil sonrası daha geç dönemlerde >%30 alıcı hücreleri gösteren KK durumlarında ise greft yetmezliği gelişebilir.

Habis hastalığı olmayan çocuklarda yapılan KHN lerinden sonra kimerizm takibi ile elde edilen sonuçlar Park ve ark.tarafından bildirilmiştir (18). Bu çalışmada, habis olmayan hastalıklarda yapılan KHN'lerinden sonra greft yetmezliği ve reddinin sık görüldüğü ve bu durumun KK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kimerizmi etkileyen faktörler olarak; verilen CD34+ ve CD3+ hücre sayıları, kök hücre kaynağı, donör tipi, HLA uyumluluğu, nakil öncesi ferritin düzeyi ve HR'in yoğunluğu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; verilen CD34+ ve CD3+ hücre sayıları yüksek ise TK gelişme olasılığının yüksek ve TK sağlayan CD34+ hücre sayısının eşik değerinin 8.35×10^6 /kg. olduğu bildirilmiştir. TK'li olgularda II-IV. derece akut ve kronik GVHH gelişme sıklığı KK olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur(sırasıyla; %56.5 vs %13 p<0.01 ve %47.8 vs %21.7 p=0.04).

Yüksek düzeyde KK (verici kimerizmi azalmış) gösteren olgularda greft yetmezliği anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.04). Nakil öncesi ferritin düzeyinin yüksek olması (p<0.01) ve infüze edilen CD34+ hücre sayısının düşük olması (p=0.01) greft yetmezliğini kolaylaştıran diğer faktörlerdir. Nakil sonrası yaşam süreleri bakımından TK grup ile KK grup arasında fark bulunmamıştır. Ancak KK grubunda yer alan olgular kimerizm derecelerine göre değerlendirildiklerinde; tüm yaşam ve hastalısız yaşam süreleri yüksek düzeyde KK olanlarda anlamlı derecede kısa bulundu. Bu olgularda ölüm nedenleri greft yetmezliği ve 2. nakilden sonra gelişen çoklu organ yetmezliği olarak bildirildi.

Özet olarak

All-KHN den sonra kimerizm ölçümleri engrafman takibi için yapılmaktadır. 2001 yılında toplanan IBMTR ve NMDP nin desteklediği ASBMT ve IBMTR/ABMTR tarafından gerçekleştirilen çalıştayda kimerizm ölçümleri ve klinikte kullanımı ile ilgili bir kılavuz önerildi (17). IBMTR/ABMTR kılavuzunda yer alan önerilere benzer şekilde başka çalışma grupları da önerilerde bulunmuşlardır (19-20).

Buna göre;

- Kimerizm analizleri için duyarlı ve bilgilendirici teknikler kullanılmalıdır. Günümüzde STR veya VNTR bazı PCR analizleri duyarlı ve bilgilendiricidir.
- Kimerizm ölçümü için çevre kanı hücreleri genellikle kemik iliğinden daha faydalıdır. Akut lösemili hastalarda nüksleri erken değerlendirmek ve takip için kemik iliği örnekleri kullanılabilir.
- Hücre serilerine (T hücreleri, NK hücreleri, Dendritik hücreler, miyeloid hücreler) özgü kimerizm ölçümleri, yoğunluğu azaltılmış HR'li nakillerde kimerizm tipinin değerlendirilmesi ve buna göre tedavinin yönlendirilmesi, akut lösemilerde ise nüks belirlemesi için yapılmaktadır.

Kaynaklar

1. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of the bone marrow compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematological cancers. *New Engl.J.Med.* 2001;344:175-181.
2. Shono Y, Ueha S, Wang Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease; early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115(26):5401-5411.
3. Aguila HL. Hematopoietic niches: targets of GVHD. *Blood* 2010;115(26):5284-5285.
4. Nakamea H, Storer B, Sandmaier BM, et al. Cytopenias after day 28 in allogeneic hematopoietic cell transplantation; impact of recipient/donor factors, transplant conditions and myelotoxic drugs. *Haematologica* 2011;96:1838-1845.
5. Bruno b, Gooley T, Sullivan KM, et al. Secondary failure of platelet recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2001;7(3):154-162.
6. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, et al. The use of skin-grafting to distinguish between monzygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 1951;5:379.
7. Hamerton JL, Harnes DWH, Cytological identification of radiation chimeras. *Nature* 1956;177:239-247.
8. Bader P, Niethammer D, Willash A, et al. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:107-119.

- T-hücre uzaklaştırılmış nakillerde, yoğunluğu azaltılmış HR'li KHN'inde veya GVHH tedavisi için yeni profilaktik rejimlerin kullanıldığı durumlarda kimerizm ölçümleri nakil sonrası 1,3,6. ve 12. aylara yapılmalıdır. Bu sıklıkta yapılan kimerizm takibi DLI gibi tedavilerin zamanında ve yerinde uygulanmasını sağlar.
 - Nonmiyeloablatif KHN'inde kimerizmin erken dönemdeki özellikleri GVHH ve ya greft kaybının göstergesi olabilir. Bu nedenle daha sık (2-4 haftada bir) çevre kanından kimerizm ölçümleri önerilmektedir.
 - Habis olmayan hastalıklarda kimerizm tayini genellikle nakilden sonraki 1, 2. ve 3. aylarda yapılmalıdır. Bu grupta yer alan hastalıklarda verici tipi kimerizmi arttıracak girişimler altta yatan hastalığa göre yapılmalıdır. Çünkü, bazı hastalıklarda (örn.ağır aplastik anemi) nakilden sonra olog dönüşüm olduğu halde hastalık bulguları düzelebilir. Ayrıca bu girişimler sırasında GVHH gelişme olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır.
9. Thiede C, Kellermann T, Schwerdtfeger R, et al. Real-time PCR for the SRY gene allows sensitive and quantitative chimerism analysis after allogeneic blood stem cell transplantation: clinical results in 43 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:23.
 10. Hochberg EP, Miklos DB, Neuber D, et al. A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;101:363-369.
 11. Stumph J, Vnencek-Jones CL, Koyama T, et al. Comparison of peripheral blood and bone marrow samples for detection of post transplant mixed chimerism. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(6):589-590.
 12. Lion T. Detection of impending graft rejection and relapse by lineage-specific chimerism analysis. *Methods Mol Med.* 2007;134:197-216.
 13. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meeting of the IBMTR and ASH. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2001;7:473-485.
 14. Massallan GI, Kamel AM, Storer B, et al. Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009;15:352-359.
 15. Doney K, Loken M, Bryant E, et al. Lack of utility of chimerism studies obtained 2-3 months after myeloablative hematopoietic cell transplantation for ALL. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:271-274.

-
16. Lamba R,Abella E,Kukuruga D,et al.Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic meloablative stem cell transplantation is a ppredictor of relapse and survival. *Leukemia* 2004;18:1681-1686.
 17. Mickelson DM,Spnoat L,Dean R,et al.Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*2011;46:84-89.
 18. Park M,Koh KN,Seo JJ,et al.Clinical implications of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases.*Korean J Hematol.*20116(4):258-264.
 19. Gonzales M,Lopez-Perez M,Garcia-Sanz M,et al.Debate round-table:comments concerning chimerism studies.*Leukemia* 2001;15:1986-1988.
 20. Biondi A,Balduzzi A.,Questions on chimerismanalysisi after stem cell transplantation. *Leukema* 2001;15:1995.