



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Vyšetření antigenů HLA systému u příjemců a dárců  
kostní dřeně v HLA laboratoři**

**Determination of HLA antigens in recipients and donors  
of bone marrow in HLA laboratory**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Milena Vraná

**Lucie Fryntová**

---

Kladno 2017

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Lucie Fryntová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Vyšetření antigenů HLA systému u příjemců a dárců kostní dřeně v HLA laboratoři**  
Téma anglicky: Determination of HLA antigens in recipients and donors bone marrow in HLA laboratory

### Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude vyšetření antigenů HLA systému u příjemců a dárců kostní dřeně v HLA laboratoři.

Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na obecnou charakteristiku HLA systému, strukturu jejich molekul, nomenklaturu, dědičnost, polymorfismus a zásadní postavení při transplantaci. Bude se také zabývat typizací HLA systému konkrétně stanovením metodami sérologickými a genotypizačními v HLA laboratořích. Bude v ní pojednáno o specifitě kostní dřeně, jejich před transpantačních vyšetřeních, významu typizace HLA systému v rámci toho biologického materiálu, způsobu vyhledávání dárců, českém registru dárců a průběhu transplantace.

V praktické část bakalářské práce bude uveden způsob a proces stanovení HLA antigenů pomocí molekulárně-genetických neboli genotypizačních metod pracujících na úrovni DNA na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). Budou zde uvedeny i statistiky týkající se dárcovství kostní dřeně a výskytu HLA antigenů, popřípadě vzájemných shod s pacientů s dárci.

### Seznam odborné literatury:

- [1] ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, Transfuzní lékařství, ed. Transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2013, ISBN 978-80-247-4534-3
- [2] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Základy imunologie, ed. 4. vyd., Praha: Triton, 2009, ISBN 978-80-7387-280-9
- [3] MALASKA, Zdeněk, Základy imuno hematologie a krevní transfuse: příručka pro zdravotnické pracovníky, ed. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1957
- [4] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ, Klinická imunologie, Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, ISBN 80-86225-50-X

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Ing. Milena Vraná

  
vedoucí katedry / pracoviště

  
děkan

V Kladně dne 31.10.2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vyšetření antigenů HLA systému u příjemců a dárců kostní dřeně v HLA laboratoři, vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 18.05.2017

.....  
Lucie Fryntová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí této bakalářské práce Ing. Mileně Vrané, za věnovaný čas a cenné rady, udělené v průběhu odborných konzultací. Poděkování rovněž patří všem pracovníkům Oddělení HLA, Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, kteří mi poskytnuli materiální podklady a umožnili provedení praktické části práce, především laborantce Šárce Půbalové, podílející se na dozoru a výpomoci při laboratorních vyšetřeních.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce s názvem Vyšetření antigenů HLA systému u příjemců a dárců kostní dřeně v HLA laboratoři se zabývá problematikou dárcovství kostní dřeně, která je založena na vzájemné komplementaritě HLA antigenů obou jedinců.

V teoretické části je popsán HLA systém člověka, jenž je rozčleněn na dané třídy a komplexy, označované mezinárodní nomenklaturou. Jsou zde rovněž nastíněny základní principy HLA typizace, stanovující se sérologickými a především molekulárně-genetickými metodami. Druhá část se zaměřuje na proces transplantace kostní dřeně, který je zde specifikován přesným popisem průběhu, zahrnujícím indikaci pacienta, vyhledání vhodného dárce, předtranspantační vyšetření, samotný zákrok i komplikace spojené s odhojením.

Praktická část se zabývá typizací HLA systému na úrovni low a high resolution, konkrétně přítomnosti HLA antigenů a KIR genů. Pozornost je zde věnována stanovení komplementární dvojice recipient-donor a následnému monitorování průběhu transplantace, které se zaměřuje na začlenění štěpu kostní dřeně. V rámci metodiky práce jsou zpracována data, poskytnutá Oddělením HLA Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, umožňující zhodnocení HLA genotypizací a příbuzných i nepříbuzných transplantací kostní dřeně v průběhu uplynulého roku.

## **Klíčová slova**

Kostní dřeň; transplantace; HLA antigeny; genotypizace; PCR; dárcovství

## **Abstract**

Investigation of HLA antigens in recipients and donors of bone marrow in the HLA laboratory deals with bone marrow donation which is based on HLA match of both individuals.

The theoretical part describes human HLA system which is divided into classes and complexes named by International Nomenclature. There are also described basic principles of HLA typing, determined by serological and especially molecular-genetic methods. The second part is focused on the process of bone marrow transplantation, which is specified by accurate description of the process, including indication of the patient, searching for suitable donor, pre-transplant screening, as well as intervention and complications associated with rejection.

The practical part is devoted to typing of HLA system at the level of low and high resolution, especially the presence of HLA antigens, KIR genes and immunogenicity prediction. Also, the determination of match between recipient and donor and subsequent monitoring of transplantation is described, focusing on incorporation of bone marrow graft. Within the work methodology are compiled data which are provided by HLA department of Institute of Hematology Blood Transfusion in Prague which enable us to evaluate genotyping of HLA and related and unrelated bone marrow transplantation during the past year.

## **Keywords**

Bone marrow; transplantation; HLA antigens; genotyping; PCR; donation

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav .....	11
2.1	Hlavní histokompatibilní systém člověka .....	11
2.1.1	Struktura a dělení HLA antigenů .....	12
2.1.2	Nomenklatura HLA systému .....	16
2.1.3	Polymorfismus HLA antigenů .....	17
2.2	Sérologická typizace .....	18
2.3	Molekulárně-genetická typizace .....	19
2.3.1	PCR .....	20
2.3.2	Metody analýzy produktů PCR .....	23
2.3.3	NGS .....	23
2.4	Transplanace .....	26
2.4.1	Rejekce .....	26
2.4.2	Vliv HLA antigenů na průběh transplantace .....	27
2.5	Transplanace kostní dřeně .....	28
2.5.1	Historie .....	28
2.5.2	Registry dobrovolných dárců kostní dřeně .....	29
2.5.3	Předtransplantační proces .....	30
2.5.4	Zdroje hematopoetických buněk .....	31
2.5.5	Reakce štěpu proti hostiteli.....	32
3	Cíl práce.....	33
4	Metodika.....	34
4.1	Stanovení HLA antigenů pacienta a vyhledání komplementárního dárce.....	35

4.1.1	Stanovení HLA antigenů pacienta .....	36
4.1.2	Vyhledání komplementárního dárce .....	42
4.2	Statistický náhled HLA genotypizace na Oddělení HLA za rok 2016 ...	46
5	Výsledky .....	48
5.1	Stanovení HLA antigenů pacienta a vyhledání komplementárního dárce.....	48
5.1.1	Stanovení HLA antigenů pacienta .....	48
5.1.2	Vyhledání komplementárního dárce .....	50
5.2	Statistický náhled HLA genotypizace na Oddělení HLA za rok 2016 ...	56
6	Diskuze .....	64
7	Závěr .....	69
8	Seznam použitých zkratk .....	70
9	Seznam použité literatury .....	72
10	Seznam použitých obrázků .....	76
11	Seznamu použitých tabulek .....	77



# 1 ÚVOD

Hlavní histokompatibilní systém je soubor genů, který se významně podílí na rozlišení vlastních a cizorodých komponentů v organismu. Tyto antigeny, nacházející se v těle člověka, jsou specificky označovány jako HLA komplex. Aktivní účastí HLA komplexu na likvidaci cizích tkání, dochází k odstraňování nežádoucích částic z organismu. Mnohdy však nastane rovněž eliminace buněk člověku prospěšných. Shoda přítomných HLA antigenů dárce a příjemce je proto klíčovým aspektem umožňujícím realizaci transplantací kostní dřeně, i transplantací obecně.

To je jedním z důvodů, proč se v odvětvích imunologie, hematologie a transfuziologie rozvíjí stále nové, preciznější technologie. Cílem je dosáhnout, co nejvyšší ochrany zdraví jedince se současným vyloučením rizik, spjatých s potransplantačními reakcemi.

V současné době probíhá typizace HLA systému, na relativně vysoké úrovni, pomocí molekulárně genetických metod. Existuje celé spektrum rutinně využívaných i teprve testovaných analýz, poskytujících informace o konkrétních sekvencích přítomných v genomu jedince. Především nejnovější technologie sekvenování druhé a třetí generace, přispívají ke zkvalitnění výsledků a zvýšení bezpečnosti. Na základě stanovené nukleotidové sekvence pacienta následně probíhá vyhledání nejvhodnějšího dárce, splňujícího svými parametry, kritéria pro úspěšnou transplantaci.

Pravděpodobnost nalezení jedince se zcela komplementárními antigeny v dnešní době roste společně s množstvím dobrovolníků, evidovaných v národních registrech dárců kostní dřeně, kteří mají zastoupení po celém světě. Počet dobrovolných dárců, se za dobu své existence, vyšplhal až k 30 milionům,

což není zdaleka konečný výsledek. Nedílnou součástí tvoří i Český národní registr dárců dřeně a Český registr dárců krvetvorných buněk v pražském IKEMu

Hlavním cílem práce je, na základě teoretických znalostí o histokompatibilním systému člověka, molekulární typizaci lidského genomu, specifitě kostní dřeně a zákonitostech transplantace, uvedených v první části práce, provést laboratorní vyšetření HLA komplexu u vybrané pacientky, indikované k transplantaci kostní dřeně. Vstupem je volba nejvhodnějšího dárce, z genotypizovaných příbuzných a nepříbuzných jedinců, a konfrontace výsledku s lékařským rozhodnutím. Následně je třeba získat zpětnou vazbu a zhodnotit úspěšnost transplantace.

Dalším cílem je vytvořit rovněž statistický přehled množství typizovaných pacientů a jejich potenciálních dárců na oddělení HLA Ústavu hematologie a krevní transfuze za rok 2016.

Závěrem bakalářské práce je určení HLA antigenů pacientky metodou PCR-SSP, pomocí které bude ze seznamu potencionálních dárců stanoven jeden, jenž poskytne dárcovský štěp pro transplantaci kostní dřeně. Výsledkem statistického zkoumání je srovnání výskytu potenciálních příbuzných a nepříbuzných dárců kostní dřeně a potvrzení či vyvrácení polymorfismu HLA systému.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Hlavní histokompatibilní systém člověka

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC -Major Histocompatibility Complex) představuje genetický systém, odpovědný za rozeznávání cizorodých molekul u všech živočišných druhů. Lze ho tudíž nalézt nejen u člověka, ale například i u prasete domácího pod označením SLA systém nebo myši domácí jako H2 systém lokalizovaný na 17. chromozomu.[1] U lidského jedince se jedná o komplex zvaný HLA (Human Leucocyte Antigen). Název HLA byl původně odvozen od objevu histokompatibilních antigenů na buňkách imunitního systému. Dnes je známo, že HLA systém je tvořený specifickými membránovými glykoproteiny, tzv. histokompatibilními antigeny, determinujícími povrch buněk všech orgánů. Každý člověk tak nese na povrchu svých buněk unikátní sestavu molekul HLA I. a II. třídy. Všichni lidé, pouze s výjimkou monozygotních dvojčat nesoucích zcela totožné antigeny, jsou tedy v tomto systému naprosto ojedinělí. [2]

Hlavní histokompatibilní systém člověka zahrnuje více než 200 genů podílejících se na regulaci imunitní reakce organismu. Jedná se o soubor těsně vázaných genetických lokusů, vyznačující se svou komplexností a polymorfismem. V případě, že má systém více jak dva lokusy, označuje se za komplexní. Střídá-li se však dvě a více alel na určitém lokusu, hovoří se o charakteru polymorfním. [2] V rámci populace se jedná o různé varianty genů na daném lokusu u jednotlivých jedinců. Komplex HLA tvoří v lidském genomu unikátní oblast s vysokou koncentrací genů na relativně krátkém úseku DNA. Lokalizace HLA komplexu je na krátkém raménku 6. chromozomu a jeho velikost je odhadována na  $4,4$  až  $6 \times 10^6$ . Zmíněný úsek DNA tvoří pouze tisícinu celého genomu, i přesto však patří k nejprozkoumanějším. [1] Genový komplex HLA obsahuje kromě genů kódujících HLA I. a II. třídy i geny pro některé složky komplementu, cytokiny, podjednotky proteazomů a peptidových pump nebo stresové proteiny. [3]

### 2.1.1 Struktura a dělení HLA antigenů

Molekuly HLA systému jsou, na základě struktury a funkce, rozděleny do tří skupin. Kombinace I. a II. třídy vytváří unikátní sestavu HLA molekul specifickou pro každého jedince. Tyto třídy HLA glykoproteinů se svou strukturou řadí mezi heterodimery. Třída III. se od předchozích dvou vyčleňuje svou funkcí i morfologicky odlišnými produkty. Struktura HLA antigenů umožňuje vytvářet vazebné místo pro připojení antigenních polypeptidů cizorodých částic, za jejichž rozpoznání jsou zodpovědné T-lymfocyty, jimž jsou peptidy následně předkládány. Zmíněná schopnost se označuje jako restrikce. Endogenní částice jsou po navázání svých antigenních fragmentů na molekuly HLA I. třídy prezentovány cytotoxickými CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Ovšem antigenní peptidy exogenních částic mají, po zpracování tzv. APC buňkami, afinitu k molekulám HLA II. třídy a jsou zaznamenávány pomocnými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. [2]

#### Molekuly HLA I. třídy

Molekuly HLA I. třídy jsou přítomny na všech jaderných buňkách organismu. V největší míře, zhruba 40 genů, se vyskytují na buňkách imunitního systému, dále pak na epitelových buňkách, hepatocytech, buňkách ledvin a CNS.[5] HLA molekuly I. třídy mají schopnost vystavovat peptidy, vzniklé štěpením bílkovin z cytosolu. Intracelulární proteiny jsou svou degradací, za současného působení proteolytických enzymů, přeměněny na endogenní peptidové fragmenty, prezentující se jako peptidový komplex společně s HLA molekulou I. třídy na povrchu buňky. Cytokiny mají rovněž zásadní vliv na průběh exprese molekul HLA I. třídy. Ve výjimečných případech jejich působením k expresi v důsledku imunodeficience vůbec nedochází. [4] Díky široké tkáňové distribuci, se provádí na všech zmíněných buňkách zpracování antigenů, za současné aktivace cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. HLA I. třídou jsou prezentovány především virové antigeny, vytvořené v nitru buňky. [5]

Strukturně mají molekuly HLA I. třídy podobu heterodimeru tvořeného dvěma glykoproteinovými řetězci. Těžký řetězec  $\alpha$ , sestavený z 338 aminokyselinových zbytků, upevňuje celou molekulu v cytoplasmatické membráně, která jej rozčleňuje na tři funkční domény: extracelulární hydrofilní oblast, v níž se nachází aminoskupinový konec (-NH<sub>2</sub>) molekuly, prostřední transmembránová hydrofóbní oblast a poslední cytoplasmatická hydrofilní oblast, do níž je orientován konec karboxylový (-COOH). Část extracelulární je složena z domén:  $\alpha_1$  s oligosacharidových postranním řetězcem,  $\alpha_2$  a z konzervativní domény  $\alpha_3$ , ukotvující molekulu. [2,5] Vzájemným působením N-terminálních domén  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , se rozvíjí uzavřené vazebné místo pro antigenní peptid o délce 8-10 aminokyselin. Vazebné místo, které se nachází na povrchu proteinu, má tvar rýhy, jejíž dno je tvořeno níže situovanou třetí doménou  $\alpha_3$  společně s  $\beta_2$ -mikroglobulinem. [4] Doménová stavba molekuly vzniká pouze za předpokladu, že proteinový řetězec obsahuje 2 aminokyseliny cysteinu v určité vzdálenosti. Molekuly cysteinu propojením svých sulfanylových skupin vytvoří disulfidický můstek uzavírající cysteiny do kruhu. [6]

Druhým glykoproteinovým řetězcem je nekovalentně asociovaný lehký řetězec  $\beta$ , tvořený nepolymorfním proteinem  $\beta_2$ -mikroglobulinem ( $\beta_2m$ ), který zodpovídá za orientaci celé molekuly.  $\beta$  řetězec není trvale zafixován v cytoplasmatické membráně, pouze se na řetězec  $\alpha$  připojuje v místě domény  $\alpha_3$ . [4]  $\beta_2$ -mikroglobulin je, díky své struktuře, řazen mezi imunoglobuliny a v chemické terminologie se jedná o rozpustný protein tvořený 99 aminokyselinami. [5]

### **Geny kódující molekuly HLA I. třídy**

Nejvýznamnější geny HLA I. třídy, tzv. geny klasické, lze nalézt na lokusech HLA-A,-B,-C, lokalizovaných nejvzdáleněji od centromery chromozomu. Jedná se o geny s vysokou expresivitou a polymorfismem. Jejich produkty se vyskytují převážně v lymfatických orgánech imunitního systému a označují se za transplantační antigeny. [2] Geny neklasické jsou svou strukturou velmi podobné

genům klasickým. Jsou taktéž tvořeny podobným transmembránovým řetězcem  $\alpha$  spolu s  $\beta_2m$ , vykazující však oproti klasickým omezený polymorfismus. Vyskytují se na lokusech HLA-E,-F,-G, z nichž HLA-E váže signální peptidy biosyntetických prekurzorů HLA -A,-B,-C,-G a embryonální HLA-G chrání plod v průběhu gravidity. [3] HLA I. třídy zahrnuje přibližně 20 genů, z nichž 6 je tvořeno tzv. exony kódujícími  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  doménu. Pouze sekvence 2. a 3. exonu se však podílí na určení struktury vazebné rýhy. [4] Součástí třídy jsou i pseudogeny, neschopné přepisu do molekuly RNA (geny HLA-H,-J,-K,-L a -X). [2]

### **Molekuly HLA II. třídy**

Výskyt molekul HLA II. třídy je omezen pouze na vybrané buňky, které jsou schopny předkládat antigen. Takové buňky jsou nazývány jako antigen prezentující buňky (APC), mezi které se řadí B-lymfocyty, dendritické buňky, monocyty, makrofágy, případně Langerhansovy ostrůvky. Molekuly HLA II. třídy mají tudíž podstatně nižší tkáňovou distribuci oproti molekulám I. třídy.[6] Expresi antigenu a jeho zpracování vyvolávají aktivaci pomocných CD4+ T-lymfocytů, čímž zprostředkují regulaci funkce imunitního systému. [2]

Obdobně jako u molekul HLA I. třídy vytváří i molekuly HLA II. třídy svou strukturou heterodimer, složený ze dvou glykoproteinových řetězců spojených nekovalentní vazbou. [2] Těžký řetězec  $\alpha$ , sestavený 229 aminokyselinami, je rozlišen na doménu  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a obsahuje dva postranní oligosacharidové řetězce. Lehký řetězec  $\beta$ , složený z 237 aminokyselin, je rovněž tvořen dvěma doménami  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , avšak pouze s jedním oligosacharidem. [5] Vazebný žlábek, určený pro antigenní peptid, je zajištěn interakcí vždy prvních domén od každého řetězce, tedy N-terminálních domén  $\alpha_1$  a  $\beta_1$ . Slouží jako vazebné místo otevřené, které umožňuje napojení antigenních fragmentů až o délce 15-35 aminokyselin. [2] Ve zmíněném žlábků, je lokalizován polymorfismus molekul II. třídy, který specifikuje vazbu různých antigenů. Zbylé transmembránové kotvící sekvence  $\alpha_2$

a  $\beta_2$  jsou považovány za domény konstantní, které slouží jako opora pro vzdálenější domény  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ , a k celkovému upevnění molekuly. [4]

### Geny kódující molekuly HLA II. třídy

Geny kódující HLA antigeny II. třídy lze nalézt v tzv. -D regionu, jenž je umístěn nejbližší k centromere chromozomu. Ten je tvořen třemi podoblastmi, lokusy HLA -DR, -DQ, -DP. Nejvýznamnější HLA-DR zahrnuje 10 HLA genů. Molekuly HLA II. třídy se skládají z dvou polymorfních řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ , kódovaných geny HLA II. třídy A a B (tedy DRA1 a DRB1; DQA1 a DQB1, ...). Geny tudíž obsahují 5 exonů, z nichž jen 2. exon kóduje oblast vazebného žlábků. [4]

Tabulka 1: Porovnání molekul HLA I. a II. [7]

	Třída I.	Třída II.
<b>Lokus</b>	HLA -A,-B,-C	HLA-DR, -DQ, -DP
<b>Struktura</b>	Heterodimer 44 kDa těžký řetězec 12 kDa $\beta_2m$	Heterodimer 32 kDa $\alpha$ řetězec 28 kDa $\beta$ řetězec
<b>Distribuce</b>	Prakticky všechny buňky	B buňky, makrofágy, aktivované T buňky
<b>Funkce</b>	Navázání antigenních peptidů a prezenze T buňkami CD8 <sup>+</sup>	Navázání antigenních peptidů a prezenze T buňkami CD4 <sup>+</sup>
<b>Délka peptidu</b>	8-10 AMK zbytků	10-25 AMK zbytků

### Molekuly HLA III. třídy

Oblast HLA III. třídy se nachází na pomezí HLA I. a HLA II. třídy, konkrétně mezi HLA-B a -DR. Zahrnuje především geny kódující solubilní faktory, proto je někdy označována za oblast komplementovou. [1] Obsahuje tedy geny pro složky komplementu (C2, C4, faktor B), cytokiny, stresové proteiny Hsp a další. [2]

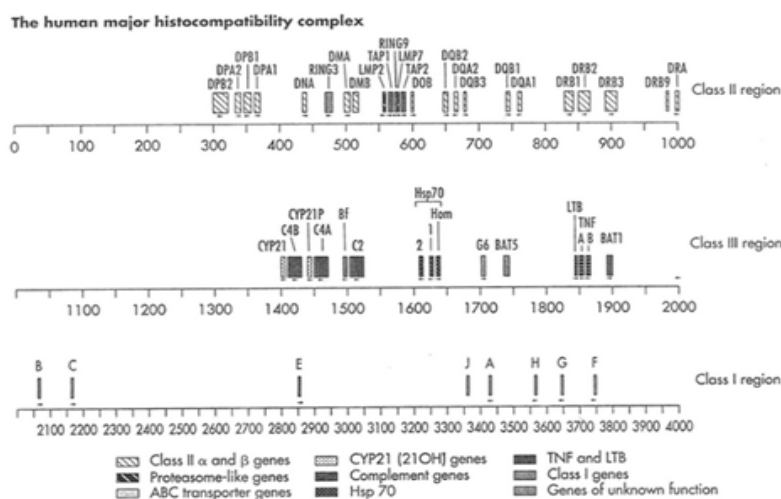


Figure 31-3 Map of the HLA complex. The three regions of the HLA complex, class II, class III, and class I, were named for the class of genes first mapped to each region. The numbers below the line denote kilobases of DNA within the 4000-kb HLA complex.

Obrázek 1: Lidský hlavní histokompatibilní komplex [7]

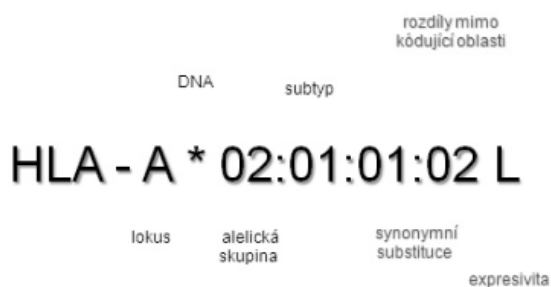
### 2.1.2 Nomenklatura HLA systému

Názvosloví HLA systému stanovuje Nomenklaturní komise Světové zdravotnické organizace (WHO). Tato organizace byla v roce 1968 založena za účelem tvorby přehledného a uceleného pojmenování HLA systému. V roce 2010 byl zaveden nový rozšířenější systém zařazování alel dle sekvenční podobnosti. Aktuální informace ohledně HLA názvosloví poskytuje: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>. [4]

HLA systém je v současné době značen dle dvou zavedených způsobů pojmenování. Sérologický typ nomenklatury, založený na názvu genových produktů, neboli antigenů, a molekulárně-genetický typ, zavedený později na základě rozvoje polymerázové řetězové reakce. Genotypizační nomenklatura spočívá v pojmenování alelových nukleotidových sekvencí. Ty lze rozdělit dle počtu míst na obecnější Low resolution a specifitější High resolution, poskytující hlubší informace o nukleotidech DNA. Genotypizační názvosloví umožňuje, oproti sérologickému vícemístné značení alel. Příkladem je HLA-A\*02:01, kde jsou lokusy vyjádřeny velkými písmeny, sérologická specifita prvními dvěma číslicemi po \* a konkrétní alely skrývající se pod číslicemi oddělenými dvojtečkou. [2]



## HLA nomenklatura – označení alely



Obrázek 2: Ukázka tvorby názvu HLA alel podle současného názvosloví [4]

### 2.1.3 Polymorfismus HLA antigenů

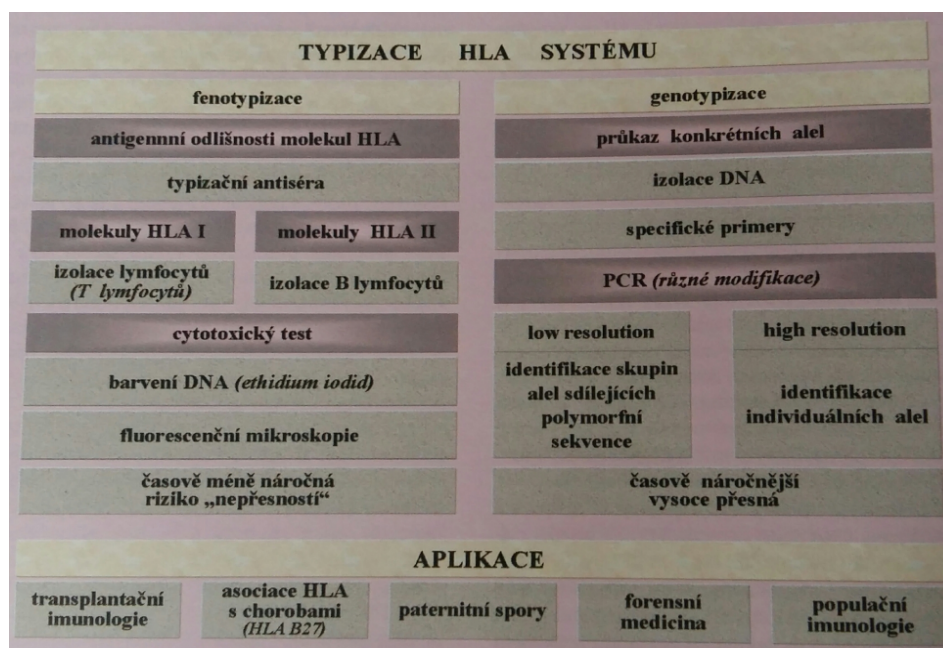
HLA systém člověka je nejpolymorfnější genovou sekvencí lidského genomu.[9] Polymorfismus je způsoben vysokým počtem kombinací různých alel v určitém genovém lokusu. Všechny lokusy zahrnují některé z mnoha alel, pouze lokus kódující  $\alpha$  řetězec molekul HLA-DR je monomorfní. [1] Řetězce molekul HLA I. a II. třídy se od sebe často razantně liší. Rozdíl je možné pozorovat až u dvaceti aminokyselin, což má zásadní vliv na jejich antigenní vlastnosti. [2] Každý jedinec zplozený z genetického hlediska náhodným pohlavním rozmnožováním, nese na povrchu svých buněk unikátní sestavu molekul HLA. I a II. třídy, jež je určena spojením alel matky a otce. [1] Nejvíce polymorfní jsou molekuly HLA I. třídy, konkrétně ty klasické, u nichž je známo, že HLA-A má 2747 variant, HLA-B 3465 variant a HLA-C 2450 variant. Polymorfismus je prokázán i u molekul HLA II. třídy, kde HLA-DR má 1711 variant, HLA-DP 627 variant a HLA-DQ 751 variant. [36] Celkový počet individuálních variant antigenů je odhadován na 20 miliard. Pravděpodobnost, že by se dva jedinci náhodně shodovali až ve dvanácti alelách, je tudíž přibližně 1:150 miliardám. Dle těchto statistických analýz je téměř nereálné nalézt jedince s úplně identickými HLA antigeny. Výjimku tvoří pouze již zmíněná monozygotní dvojčata. [10] Polymorfismy jsou založeny na uspořádání DNA. Na vzniku nových alel se tudíž současně podílí některé genetické mechanismy, zasahující do sekvence nukleotidů, jako jsou například bodové mutace, rekombinace a genové konverze. Hlavní metodou pro detekci

HLA polymorfismu je tedy užívána polymerázová řetězová reakce (PCR). Lokalizací jednotlivých polymorfismů lze poté sestavovat tzv. genetické mapy. [5]

## 2.2. Sérologická typizace

Rozvoj v rozpoznávání lidských leukocytárních antigenů započal zásluhou transfuzní medicíny, ve spojitosti s transplantacemi. Vyšetření HLA antigenů se rovněž využívá v oblastech forenzní medicíny, při určování paternity či jiných stavech asociovaných s různými skupinami antigenů. [11]

Stanovení HLA fenotypu vyšetřovaného jedince se označuje termínem HLA typizace. Metody jejího určování lze rozdělit obdobně jako při tvorbě nomenklatury HLA systému. Historicky starší, sérologická typizace, se zabývá konkrétními HLA antigeny vyjádřenými na povrchu buněčných membrán. Inovativní metoda, molekulárně-genetické typizace, identifikuje HLA alely na úrovni DNA dle dané sekvence nukleotidů kódujících HLA antigeny. [5]



Obrázek 3: Laboratorní postupy používané pro typizaci HLA systému [1]

Sérologické metody umožňují poměrně velmi rychlé vyhodnocení s celkově nižšími náklady a nenáročným lehce dostupným vybavením laboratoře. Avšak výsledky nejsou, za každých okolností, zcela přesné. [4] Určité antigeny, při nedostatečném vyjádření na povrchu buněk, zapříčiňují falešnou negativitu. Oproti tomu antigeny křížově reagujících skupin způsobují falešnou pozitivitu. Metodou nelze identifikovat ani antigeny buněk s pozměněnou morfologií či zaznamenat změny v HLA lokusech na úrovni DNA. [2]

### **Lymfocytotoxický test**

Průkaz HLA molekul se realizuje na destičkách s předem navázanými diagnostickými séry. Tyto tzv. Tarasakiho desky poskytují široké spektrum protilátek proti většině známých HLA antigenů. Pacientovi jsou tedy z krve izolovány T- a B-lymfocyty HLA I. třídy a B-lymfocyty HLA II. třídy, které se nechají reagovat s typizačními séry. Následnou inkubací a navázáním, nejčastěji králičího komplementu, lze pomocí fázového kontrastu, test vyhodnotit. [2]

### **Mikrocytotoxický test**

Sérologicky lze také stanovit molekuly HLA II. třídy, konkrétně HLA DR a DQ, pomocí mikrocytotoxického testu pracujícího výhradně s B-lymfocyty zkoumaného pacienta. Ty jsou imunomagneticky selektovány z periferní krve, díky čemuž poměrně snadno poskytují dostačující množství molekul HLA II. třídy nesoucích na svém povrchu. [1]

## **2.3 Molekulárně-genetická typizace**

V důsledku omezené úrovně rozlišitelnosti sérologické metody byla vyvinuta přesnější, reprodukovatelnější a rozšířenější molekulárně-genetická metoda. Největším rozvojem prošly genotypizační techniky od 80. let 20. století,

díky čemuž je dnes možné zvolit si tu nejvhodnější dle požadovaného stupně rozlišení genotypu. [4]

Podle úrovně identifikace se metody rozlišují na low resolution, umožňující přiřazení alely k určité alelické skupině a specifičtější high resolution, zabývající se určováním konkrétní HLA alely.[12] Obě varianty pracují s předem izolovanou DNA z leukocytů periferní krve. DNA je možné případně získat i stěrem ze sliznic, slin či jiných tkání. [4]

## **RFLP**

První metodou aplikovanou k typizaci HLA alel, na úrovni DNA, byla RFLP, neboli určování polymorfismu délky restrikčních fragmentů. Tato technologie funguje na podstatě enzymatického štěpení specifických restrikčních míst DNA. Bakteriální endonukleázy rozdělují molekulu DNA na různě dlouhé úseky. Často se jedná pouze o několik párů bází, které jsou následně rozděleny a vizualizovány na elektroforetickém gelu. [13] RFLP se s rostoucím polymorfismem HLA alel již tak hojně nepoužívá. Někdy však ještě může sloužit v nepřímé diagnostice k určování otcovství, identifikaci osob v kriminalistice, studiích polymorfismu či prenatálnímu vyšetření na srpkovitou anemii. [5]

### **2.3.1 PCR**

Zmnožení úseku DNA bylo téměř do konce minulého století prováděno pomocí vkládání fragmentů do bakterií, kvasinek či buněk jiných organismů. Pro úspěšnou replikaci však bylo třeba zajistit vhodných podmínek, zabraňujících rozkladu přijaté DNA, a současně umožňujících namnožení daného úseku příjemcovou buňkou. Průlom nastal v roce 1985, kdy byly postupy genetického inženýrství nahrazeny efektivnější metodou PCR. Za vznik polymerázové řetězové reakce se zasloužila kalifornská biotechnologická firma Cetus Corporation v Emeryville.

Následně byla jejímu hlavnímu protagonistovi Karymu Mullisovi udělena roku 1993 Nobelova cena. [14]

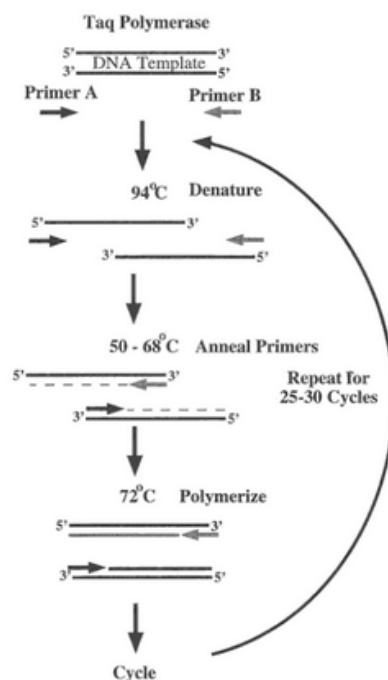
Během PCR dochází k enzymatické replikaci určitého fragmentu DNA, jenž pokračuje elektroforetickým dělením a případnou detekcí fluorescenčními činidly. Enzymatická syntéza nově vzniklých řetězců DNA se prostřednictvím DNA polymeráz neustále cyklicky opakuje. [4]

Nejčastěji používanou DNA polymerázou je, tzv. Taq polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Dalšími biologickými zdroji jsou *Pyrococcus woesei*, poskytující vysoce přesně amplifikující Pwo polymerázu, *Thermus thermophilus* obsahující Tth polymerázu s charakterem reverzní transkriptázi či *Bacillus stearothermophilus* zprostředkovávající Bst polymerázu. [13]

### **Princip metody PCR**

Principem metody PCR je reakce, využívající enzym DNA polymerázu, k syntéze nových řetězců DNA, podle předem připravených primerů, jejichž vyhotovení v dnešní době zprostředkovávají automatizované analyzátoři. Jedná se o řízenou, stále se střídající denaturaci DNA s následnou renaturací rozpletených řetězců, jejichž výsledkem je, geometrickou řadou kumulující se, produkt. Reakční cyklus zahajuje zahřátí dvouvláknové DNA na teplotu 95°C, což má za následek denaturující účinky v podobě rozrušených vodíkových můstků mezi komplementárními vlákny ds DNA, a vznik samostatných jednořetězcových DNA. V následné fázi, díky ochlazení směsi na 55°C, nasedají na 3' konce ss DNA nadbytečné specifické oligonukleotidové primery. Hybridizované primery představují základní stavební kameny pro syntézu nových vláken. Tyto oligonukleotidy jsou společně s templátovou DNA, Taq polymerázou, pufrů s ionty a vodou obsaženy v reakční směsi PCR, jinak nazývané master-mix. K navázání dochází na přesně definovaných místech, kde probíhá obnovení

vodíkových můstků tzv. hybridizaci DNA. V posledním kroku je stanoveno počáteční místo a směr, kterým termostabilní DNA polymeráza začne syntetizovat nové komplementární vlákno, dle již zmíněných oligonukleotidových primerů z předchozího kroku. Extenze, neboli prodlužování úseku DNA ohraničeného primery, je zahájena od obou primerů vždy ve směru od 5'→3' konci DNA, připojováním dalších nukleotidů. Finální fáze probíhá při teplotě 72°C a jejím výsledkem je prozatím pouze jedna jediná kopie. Počet řetězců se znásobí po uplynutí prvního cyklu PCR, kdy lze k syntéze použít již dva primery. Po dokončení každé syntézy, jsou nově vzniklé řetězce opět denaturovány, zvýšením teploty na výchozích 95°C, a celý proces se opakuje. Exponenciální nárůst produktu tedy zapříčiní cyklicky se opakující syntéza, vytvářející stále větší množství nových řetězců sloužících jako templáty pro následující cykly. [11]



**Figure 2-7** PCR reaction. DNA template, primers A and B, and DNA polymerase (*Taq*) are combined in a reaction that will cycle through denaturation, annealing, and extension temperatures, allowing the amplification of DNA between the primer pairs.

Obrázek 4: Průběh polymerázové řetězové reakce [7]

### 2.3.2 Metody analýzy produktů PCR

Analýzy se realizují pomocí oligonukleotidů, vyhotovených komplementárně k nukleotidovým sekvencím jednotlivých alel či skupin alel. Typizační soubor je složen dle použité metody ze specifických PCR-primerových párů nebo ze specifických oligonukleotidových sond. V obou případech se jedná o řádově desítky či stovky typizačních oligonukleotidů. Počet je odvozen dle konkrétního HLA lokusu a náročnosti rozlišení na úrovni low/high resolution. [12]

#### **PCR-SSP - Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery**

Metoda PCR-SSP pracuje s krátkými deoxyribonukleotidovými řetězci, tzv. primery, které jsou nezbytné k namnožení úseku DNA. Z krve pacienta je vyextrahována DNA, sloužící jako substrát PCR reakce a zároveň poskytující potřebný primerový pár. Vznik PCR produktu pro danou alelu je umožněn pouze při pozitivně probíhající reakci. Ta se uskuteční v případě, že sady párových primerů mají ve vyšetřované DNA přítomnou plně komplementární sekvenci po celé její délce. Většina vyšetřovaných DNA však takové sekvence neposkytuje. Nedochozí tedy k jejímu nalezení ani specifické amplifikaci a reakce je posouzena jako negativní. Výsledkem úspěšné amplifikace je již zmíněný PCR produkt, který je nejčastěji vyhodnocen pomocí elektroforetického rozdělení. Speciální barvivo v elektroforetickém gelu a přítomnost UV záření zviditelní pozitivní reakci vzniklými svítícími proužky. [2]

### 2.3.3 NGS

Next generation sequencing, neboli sekvenování nové generace, označuje soubor inovativních metod, které umožňují produkci velkého počtu oskvenovaných vzorků. Jedná se o rychlé, efektivní a cenově výhodné technologie, které jsou schopny zpracovat až miliony sekvencí najednou. Původně byly tyto metody zavedeny za účelem sekvenování celého genomu, kvantifikace virových

nákaz a genetických mutací přítomných v národové tkáni. Dnes, díky svému vysokému rozlišení slouží i k přesné HLA typizaci. Laboratoře při genotypizaci často uplatňují platformy, pracující na principu NGS, z nichž na trhu se nejběžněji vyskytují: Illumina, Solid a Ion Torrent. [16] Jednotlivé platformy se od sebe vzájemně liší především rychlostí sekvenace a množstvím vyhodnocených výstupních dat, tudíž je lze specificky aplikovat k různým stanovením. Všechny jsou však založeny téměř na shodném principu. Nejprve dochází k rozštěpení templátové DNA na krátké fragmenty, které jsou svými odštipnutými konci, za působení enzymů, připojeni k tzv. adaptérům. Následně jsou tyto fragmenty PCR reakcí amplifikovány a vhodným způsobem sekvenovány. Posledním krokem je třídění a analýza výstupních data, jejichž množství se pohybuje v řádech tisíců gigabitů. [17] Nově byla vyvinuta též druhá skupina technologií, jež se svým procesem podstatně liší. Jedná se o Technologie nanopórů a PacBio, jež při sekvenaci uplatňují tzv. single-molecule sequencing, kdy vlastnímu sekvenování nepředchází amplifikace DNA. Tato metoda, mnohdy označovaná jako sekvenování třetí generace, pomocí vypuštění kroku amplifikace, eliminuje počet chyb a zkracuje celkovou dobu zpracování. Současně jsou sníženy náklady spojené s PCR a umožňuje přesnou kvantifikaci DNA v reálném čase. [18]

## **Illumina**

Metoda Illumina byla v roce 1998 objevena Shankarem Balasubramanianem a Davidem Klenermanem, kteří vyvinuli technologii sekvenování, založenou na polymerázovém inženýrství a aplikaci koncových primerů tvořených terminačními bázemi (RT bází). Nejprve jsou primery navázány na molekulu DNA, s níž jsou působením DNA polymerázy amplifikovány. Pořadí jednotlivých sekvencí nukleotidů je následně umožněno stanovit na základě rozlišení čtyř různých typů RT bází na konci řetězců. Sekvence neoznačené vratnými terminačními bázemi jsou ze vzorku plaveny v průběhu promývání. Fluorescenčně značené primery jsou zachycovány detektorem, jenž současně vyvolává aktuální



fotografický snímek. Metoda tímto způsobem umožňuje sekvenovat velké množství DNA řetězců, se zpětným vyhodnocením, z jednotlivě po sobě jdoucích snímků. [17] Illumina sekvenovací systémy mohou tedy poskytovat výstupní data v rozsahu od 300 kilobází až po jednu terabázi v jednom běhu. [19]

## **Solid**

Technologie Solid, neboli Applied Biosystems, provádí sekvenaci na principu ligace oligonukleotidů DNA ligázou. Amplikony DNA vytvořené procesem emPCR, jsou rozštěpeny na fragmenty, k nimž jsou navázány krátké sondy tzv. adaptory. Pomocí nich jsou spojovány s magnetickými kuličkami, jejichž povrch je rovněž imobilizován adaptory, jež k nim vykazují vzájemnou komplementaritu. Po zmnožení DNA následuje přichycení magnetických kuliček na podložní sklíčko, umožňující vyhodnocení. Solid pracuje výhradně se sondami dlouhými osm nukleotidů. Každá z nich obsahuje specifickou sekvenci prvních dvou bází a současně jednu ze čtyř fluorescenčních značek, signalizujících přítomnost jednotlivých bází. [18]

## **PacBio**

Název metody PacBio je odvozen od biotechnologické společnosti Pacific Biosciences, zabývající se genovým sekvenováním a stanovením založenými na principu real-time. Tato organizace pracuje s platformou označovanou jako single molecule real time (SMRT), jejíž sekvenování je založeno na syntéze DNA v Zero-Mode Wave-guides (ZMWs). Jedná se o destičky s desítkami jamek o průměru 10 nm, ve kterých jako v jediném místě platformy, probíhá fluorescenční detekce. Při sekvenování se využívá DNA polymerázy, připojené na dně ZMW a fluorescenčně značených primerů, jež jsou volně přítomny v reakční směsi. Samostatně stojící primery jsou schopny, po začlenění do řetězce DNA, uvolnit fluorescenční barvivo, což umožňuje detekci nukleotidů. [18]

## 2.4 Transplantace

Terapeutický zákrok, při němž dochází k nahrazení nefunkční tkáně příjemce, příslušnou zdravou tkání či orgánem, je označován termínem transplantace. Klíč úspěšné transplantace tkví především v nalezení vhodného dárce, poskytujícího potřebnou tkáň. Během již zmíněného operativního procesu představují totiž stěžejní roli imunitní reakce výrazně ovlivňující celý průběh. [3]

### Typy transplantací

Existuje několik typů transplantací dle vzájemného vztahu donora (dárce) a recipienta (příjemce). Autotransplantace představuje přenos transplantátu uvnitř organismu jedné osoby. Při autologní transplantaci jsou tudíž dárce a příjemce tentýž jedinec a dochází tudíž pouze k přesunu tkáně na jiné místo v jeho těle. Alotransplantace, jakožto nejčastěji aplikovaný způsob transplantací, umožňuje přenos donorového štěpu v rámci stejného živočišného druhu, jež není geneticky identický. V případě, že se jedná o geneticky identické jedince, jakými jsou například dvojčata, je tento typ transplantace nazýván syngenní. Poslední jsou xenotransplantace, při nichž příjemce získává štěp od jiného živočišného druhu. Xenogenní transplantace se však vyskytují pouze zřídka, přičemž rozdíly mezi odlišnými živočišnými druhy jsou velmi markantní. [2]

#### 2.4.1 Rejekce

Nedílnou součástí transplantace jsou i rizika ohrožující život pacienta. Nastávají zde komplikace v podobě imunitních reakcí protilátkového typu, označované pojmem rejekce. Odhojení je založeno na reakci přirozených či dříve imunizovaných protilátek v příjemcově organismu s antigeny přítomnými v dárcovské tkáni, jež jsou rozpoznány jako cizorodé. Intenzitu rejekce lze částečně minimalizovat volbou adekvátního dárce. [3]

Průběh odhojení je vždy individuální. Liší se především mírou intenzity a různě dlouhou posttransplantační dobou nástupu. Hyperakutní rejekce nastává téměř ihned po nahrazení orgánu. Reakční projev se řádově pohybuje do několika minut až hodin, čímž se řadí ke vzácnějším případům. Dochází během ní k poničení transplantátu aktivovaným komplementem, což je současně podmíněno destrukcí endotelových buněk na povrchu štěpu. Akutní odhojení se projeví v průběhu několika dní až týdnu po transplantaci. Dochází při něm k aktivaci antigenně specifických cytotoxických lymfocytů příjemce, jež likvidují antigeny dárcovského štěpu považujícího za cizí. Nejdéle nastupující chronická rejekce přetrvává měsíce až roky, i přesto že její indikaci lze stanovit již v rané fázi. Na průběhu odezvy se zde podílejí obě složky buněčné imunity. Působení protilátek a T lymfocytů se projevuje poničením cév na povrchu štěpu, což vede k jeho ischemizaci. V důsledku toho transplantát snižuje činnost, případně zcela ztratí svou funkci. [3]

#### **2.4.2 Vliv HLA antigenů na průběh transplantace**

Nepříznivé posttransplantační reakce jsou úzce spjaty také s HLA komplexem jedince. Odlišné antigeny přítomné na povrchu buněk dárce a příjemce totiž způsobují tzv. tkáňovou neslučitelnost. Příjemcův imunitní systém se brání pojmout dárcovský transplantát za vlastní, nýbrž se jejich histokompatibilní antigeny neshodují. Zahájena je transplantační reakce proti dané tkáni, při níž se jí snaží eliminovat. Vyvíjí se proto veliká snaha nalézt donora s nejpodobnějším HLA komplexem. [10]

I přesto, že alelické formy HLA dárce i příjemce se zdají být v souladu, mohou se vyskytnout další polymorfní tkáňové antigeny, které budou imunitním systémem rozpoznány. Jedná se o tzv. minor histokompatibilní antigeny, které při imunitních odpovědích nemají dominantní postavení. Tyto vedlejší antigeny se však mohou podílet na transplantačních reakcích a poničení dárcovské tkáně. [10]

## 2.5 Transplantace kostní dřeně

Neshody HLA antigenů vytváří největší riziko při transplantaci kostní dřeně. V dnešní době se již častěji používá termín transplantace hematopoetických kmenových buněk, přičemž novodobé technologie umožňují vytěžit buňky krvetvorby nejen z kostní dřeně. Plnohodnotným zdrojem hematopoetických buněk je také pupečnicková krev či dárcovská periferní krev stimulovaná růstovými faktory. Princip, již zmiňované transplantace, tkví v nahrazení příjemcových kmenových buněk novými, plně funkčními buňkami, které po osídlení recipientovi kostní dřeně zapříčiní kompletní obnovu krvetvorby. [3]

Medulla ossium, neboli kostní dřeň, představuje měkkou tkáň rosolovité struktury, jež vyplňuje dutiny kostních diafýz, mezery spongióz i některé Haversovy kanálky. Dle morfologie ji lze rozlišit na dřeň červenou, žlutou a šedou. Červená kostní dřeň, jakožto hlavní orgán krvetvorby, je tvořena rozsáhlou sítí retikulárních vláken. Mezi jednotlivými vlákny se nacházejí propletené krevní vlasečnice současně s výchozími buňkami všech krevních elementů. [20]

### 2.5.1 Historie

V padesátých letech 19. století k rozvoji transplantací kostní dřeně přispěli svými studiemi Jacobson a Lorenz, díky experimentálním pokusům prováděným na myších a morčatech. V průběhu následujícího desetiletí však byly dosavadní poznatky ovlivněny objevem histokompatibilního systému. Na základě těchto informací, se roku 1968 uskutečnila první transplantace s HLA identickou sourozeneckou kostní dření. O tento revoluční převrat v medicíně se zasloužil lékařský tým profesora E. D. Thomase v Seattlu. O 8 let později byla provedena první transplantace i v České republice a to vzájemnou spoluprací Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze s Fakultní nemocnicí Hradec Králové. [21]

### 2.5.2 Registry dobrovolných dárců kostní dřeně

Klíčem úspěšné transplantace je vyhledání vhodného kompatibilního dárce. Výběr je zahájen vždy u rodinných příslušníků pacienta. Nejčastějšími adepty bývají rodiče, sourozenci či potomci pacienta. Genotypizací jedinců je určena míra shody, kterou lze označit příbuzného dárce za potenciálně přijatelného nebo za zcela nevyhovujícího. V případě, že se jedná o sourozenecké dárcovství lze akceptovat shodu pouze jednoho haplotypu. V ostatních situacích je tolerována odchylka pouze na jedné alele. Alternativu pro pacienty, kteří nemají vhodného příbuzného dárce, představují registry dobrovolných dárců kostní dřeně.

Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD) a Český registr dárců krvetvorných buněk v pražském IKEMu se více než dvacet let usilovně snaží o zajištění nejadekvátnějšího dárce. Registry umožňují poskytnutí krvetvorných buněk pacientovi, jenž je nemůže získat od rodinného příslušníka, což se vyskytuje až v 75% všech případů. Oba tyto registry jsou ve vzájemné kooperaci s Evropským informačním systémem dárců dřeně (EMDIS) a celosvětovou organizací Bone Marrow Donor Worldwide (BMDW). Spolupráce jim umožňuje selektivní výběr dárců z vlastní i mezinárodní databáze pro zajištění jedince s nejvíce identickými HLA antigeny. Institut klinické a experimentální medicíny v Praze má ve své databázi přibližně 27 000 českých dárců. ČNRDD s doposud deseti dárcovskými centry po celé České republice se může pyšnit více než 70 000 dobrovolnými dárci. Zmíněné registry svými dobrovolníky významně přispívají do světového registru, v němž se počet donorů blíží k 29 500 000. I přesto však téměř pro každého čtvrtého pacienta nelze nalézt patřičného dárce. [22,35]

Dárcovství je obecně prospěšná činnost umožňující záchranu života druhého člověka. Tento pojem byl přesně definován českým humanitárním sdružením Červený kříž, který ho označil za svévolné rozhodnutí jedince, nevyžadující jakoukoli finanční kompenzaci. [23] Dárcem kostní dřeně se může stát jakákoli

osoba ve věkovém rozhraní 18-35 let, jež neprodělala v minulosti žádné závažně choroby. Jedinec by do registru neměl vstupovat za předpokladu, že se podrobil léčbě zhoubného nádoru, transplantaci tkání nebo trpí krvácivými chorobami, diabetem, těžkými alergiemi, infekcemi přenosnými krví, onemocněními srdcem cév, plic, kloubů zažívacího traktu a chorobami snadno aktivovatelnými průběhem odběru. Do databáze nelze zařadit ani osoby závislé na alkoholu, drogách či s prokázanou HIV pozitivitou. Dárce je vždy udržován v anonymitě a v případě splňujících kritérií je součástí registru až do věku 60 let. [22]

### **2.5.3 Předtransplantační proces**

Výběr vhodného dárce probíhá na základě kompatibility výsledků získaných z předtransplantačního vyšetření. Donor, odpovídající podmínkám registru, je seznámen s průběhem zákroku i riziky spjatými s přenosem. Svůj souhlas se zákrokem stvrzuje složením dobrovolného slibu a podpisem příslušného formuláře. [8] Dobrovolníkovi je odebráno malé množství venózní krve, které je v centrální laboratoři testováno na přítomnost HLA antigenů. Výsledky jsou následně zaeviduje do české i mezinárodní databáze. [22]

V případě téměř identických antigenů s příjemcem, je dárce zařazen do užšího výběru, kdy je nezbytné provést jeho nový odběr krve, sloužící k analýze aktuálního zdravotního stavu. Stanovena je krevní skupina dárce a tzv. infekční markery, jež detekují krví přenosné infekce, například žloutenku typu B a C, syfilis, CMV nebo HIV.[8] Jsou také provedeny histokompatibilní zkoušky, potvrzující shodu HLA antigenů mezi dárce a pacientem. Prokáže-li se i posléze shoda mezi krví donora a recipienta, je zvolen nejvíce vyhovující adept, jež je podroben dalším předtranplantačním vyšetřením. [22]

Definitivní rozhodnutí dárce je nakonec stvrzeno podpisem, na jehož základě může být vyhotoven časový harmonogram transplantace. Kmenové buňky

je v dnešní době možné získat standardním odsátím dřene, vyplňující dutiny kostních diafýz a epifýz, nebo separací z periferní krve. [22]

#### **2.5.4 Zdroje hematopoetických buněk**

Transplantace dřene je prováděna v celkové anestezii, což ohrožuje především oslabené jedince vyššího věku. Kmenové buňky periferní krve lze odebírat bez anestezie. Úspěšnost transplantace hematopoetických buněk z obou zdrojů se u autologních i alogenních transplantací téměř shoduje. Vyrůstá počet alogenních transplantací periferních buněk, avšak konkrétně u kostní dřene, je nelze považovat za jednoznačně lepší. Obnova krvetvorby u kmenových buněk získaných z krve nastupuje výrazně rychleji, ale je současně doprovázena vyšším výskytem GvHD, což může být pro příjemce smrtelně nebezpečné. [24]

Alternativním zdrojem krvetvorných buněk je také krev pupečnicková. Ta je odebrána ihned po porodu z pupečnicku, jež spojuje plod s placentou. Krev, v něm přítomná, poskytuje relativně vysoký počet nezralých hematopoetických buněk, jež jsou následně identifikovány a HLA typizovány. Množství provedených zákroků v poslední době výrazně vzrostlo, protože pupečnicková krev umožňuje jednu až dvě HLA neshody mezi donorem a recipientem. T-lymfocyty a další pupečnickové elementy se zde nacházejí v imunologicky naivní formě, čímž vykazují podstatně nižší pravděpodobnost výskytu reakce štěpu proti hostiteli. Relevantní je však množství MNC a CD 34+ buněk ve štěpu, které je výrazně nižší. Příjemce tudíž musí získat buňky od dvou až tří odlišných dárců. [24]

Příjemci jsou nejprve eliminovány jeho vlastní poškozené kmenové buňky, čímž je vytvořen prostor pro dárcovský štěp. Eliminace probíhá formou nitrožilní chemoterapie, mnohdy spojenou s ozařováním. [24] Potlačení aktivity kmenových buněk se označuje termínem myeloablace. Zahájením tohoto kroku, recipient ztrácí téměř všechny periferní leukocyty, což má za následek jeho zvýšenou náchylnost

k infekcím. [3] Dárcovské buňky jsou pacientovi aplikovány intravenózně a během jejich cirkulace krví vyplňují vyprázdněné kostní dutiny a zahajují obnovu krvetvorby. [24]

### **2.5.5 Reakce štěpu proti hostiteli**

Reakce štěpu proti hostiteli se řadí k nejvíce života ohrožujícím potransplantačním reakcím. Často je značena zkratkou GvHD, anglického termínu Graft versus Host Disease. Vyskytuje se u velkého množství příjemců po alogenní transplantaci kostní dřeně. U každého z nich má však zcela individuální projevy a vzájemně se liší stupni závažnosti. [2]

Nemoc štěpu proti hostiteli je vyvolána v případě, že se jedná o příjemce s imunodeficiencí, jemuž je podán dárcovský štěp obsahující imunokompetentní buňky, které jsou uzpůsobeny k rozlišení buněk vlastních a cizích. Pokud jsou zmíněné aspekty splněny, dochází k imunitním reakcím signalizujícím nástup onemocnění. [24] Mechanismus GvHD je spuštěn nalezením komponentů imunitního systému, které jsou shledány jako cizí. Konkrétně T-lymfocyty přítomné v dárcovském štěpu rozpoznávají, po vložení transplantátu, HLA antigeny příjemce. Tím je aktivována obranná reakce, která působí destrukci buněk a orgánů pacienta. V průběhu procesu je vynakládána snaha zajistit nejšetrnější průběh odhojení štěpu. Toho lze částečně docílit vyhledáním histokompatibilně identického dárce se současnou profylaxí příjemce. Během hospitalizace jsou mu podávány léky potlačující tvorbu zánětlivých ložisek a tlumící činnost imunitního systému. [2]



### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce je přispět k informovanosti, spjaté s problematikou komplementarity HLA antigenů při transplantaci kostní dřeně a zdůraznit zásadní význam dobrovolného dárce. Na základě spolupráce s Oddělením HLA Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze objasnit laboratorní proces předcházející samotné transplantaci, jež zahrnuje práci s DNA pacienta, genotypizaci HLA antigenů a nalezení vhodného dárce.

Dosažení cíle bude realizováno pomocí laboratorního vyšetření biologického materiálu pacientky indikované k transplantaci kostní dřeně. Izolovaná DNA pacientky bude amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce metodou PCR-SSP. Současně bude zpracována predikce imunogenicity neshod DPB1 lokusu a stanovení vhodnosti sady KIR genů přítomných u dárce. Na základě získaných parametrů, bude provedena komparace se všemi potenciálními příbuznými i nepříbuznými dárce a určena míra vzájemné shody. S ohledem na případná rizika a po transplantační komplikace proběhne výběr nejvhodnějšího adepta. Volba dárce bude následně porovnána s lékařskou zprávou. Záměrem je rovněž získat zpětnou vazbu s pacientkou a zhodnotit úspěšnost transplantace.

Druhá část praktické práce bude zaměřena na náhled HLA vyšetření u pacientů a dárců kostní dřeně na půdě Ústavu hematologie a krevní transfuze za rok 2016. Úkolem bude vytvořit přehled genotypizovaných pacientů indikovaných k transplantaci kostní dřeně a jejich komplementárních dárců, včetně zastoupení jednotlivých pohlaví. Bude také porovnán výskyt příbuzných i nepříbuzných dárců, určena celková četnost dárců na jednoho pacienta a stanovena pravděpodobnost nalezení vhodného dárce. Pomocí grafů bude znázorněno množství pacientů indikovaných v jednotlivých měsících a zhodnocen loňský rok.

## 4 METODIKA

Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze je největším hematologickým centrem v celé České republice. Byl vybudován již před více než šedesáti lety a od té doby je řazen mezi nejprestižnější zdravotnické organizace. Transplantační aktivita ÚHKT započala alogenními transplantacemi od příbuzných dárců v roce 1986 a následně se rozšiřovala na úroveň autologních transplantací kostní dřeně a periferních buněk, transplantace od nepříbuzných dárců a v neposlední řadě i transplantace nemyeloablativní. Transplantační jednotka ÚHKT své postavení ve zdravotnické sféře prokazuje členstvím v mezinárodních registrech jako jsou IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry) a EBMT (European Group for Bone Marrow Transplantation) a NMDP (National Marrow Donor Program), což jim umožňuje vyhledávat vhodné nepříbuzné dárce po celém světě. Vyhledávání vhodných dárců a monitorování po transplantačního vývoje zajišťuje na ÚHKT samostatné Oddělení HLA. To je rovněž součástí organizací European Federation for Immunogenetics a Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku, poskytujících kontrolu kvality na mezinárodní úrovni. [25]

Transplantační tým je schopen na základě high resolution HLA typizace, testování KIR genů a stanovení buněčného chimerismu, zajistit pro pacienta co nejbezpečnější průběh transplantace se současnou minimalizací potransplantačních reakcí. Díky stále se zdokonalující genotypizaci, lze dnes dokonce tvrdit, že nepříbuzenské transplantace převyšují výskytem dárcovství v rámci rodiny. [25]

Při transplantaci hematopoetických buněk se na oddělení HLA vždy testují lokusy HLA I. a II. třídy. Konkrétně se jedná o HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DBQ1 a nově i HLA-DPB1, které jsou stanovovány pomocí metod polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a přímého sekvenování.

#### 4.1 Stanovení HLA antigenů pacienta a vyhledání komplementárního dárce

Oddělení HLA obdrží vždy řádně vyplněnou žádanku, současně s dvěma zkumavkami s krví pacienta, z nichž jsou stanoveny parametry nezbytné pro realizaci úspěšné transplantace. Obě krve jsou získány nezávisle, tudíž se liší datem nebo minimálně časem náběru. První náběr poskytuje výsledky stanovené daným vyšetřením a druhý náběr, který je podrobený identickému rozboru, slouží jako konfirmační vzorek. Ten zajišťuje porovnání a ověření správnosti stanovení.

V případě, že pacient není přímo indikován k transplantaci, je z krve pouze izolována DNA, která se dále archivuje. Izolace obou náběrů od jednoho jedince musí vždy probíhat odděleně. Nesmí být tedy spuštěny v jednom běhu. Proces je uskutečněn v plně automatizovaném analyzátoru MagCore Super, jenž separuje DNA s využitím specifických kitů s paramagnetickými částicemi. Tyto částice o velikosti několika nanometrů se mohou, na základě fyzikálních zákonů, shlukovat či oddělovat vlivem působení magnetického pole. Specifickou modifikací jejich povrchu lze realizovat separaci DNA z krevního náběru, která je posléze specificky označena a uskladněna pro další využití. Pokud je však pacient indikován k transplantaci kostní dřeně, je jeho izolovaná DNA ihned genotypizována. Genotypizace se zde provádí dvěma postupy. Metodou PCR-SSP poskytující informace o HLA antigenech na úrovni low resolution, zaštiťující vyšetření HLA-A, -B, -DRB1 a přímým sekvenováním testujícím lokusy HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i nově DPB1 na úrovni high resolution.

V rámci praktické části mi byla umožněna práce s předem izolovanou DNA konkrétního pacienta, který je z důvodu zachování lékařské mlčenlivosti ponechán v anonymitě. Vzorek byl mnou podroben analýze přítomných HLA antigenů, na jejichž základě byl zvolen vhodný komplementární dárce. Stanovené výsledky byly porovnány s již dříve vykonanou genotypizací vzorku pacienta, čímž byla ověřena ne/správnost typizace.

#### **4.1.1. Stanovení HLA antigenů pacienta**

PCR-SSP s elektroforetickým vyhodnocením

##### **Vyšetřovaný biologický materiál:**

Izolovaná DNA ženy středního věku, indikované k transplantaci kostní dřeně

##### **Princip metody:**

Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery je použita při detekci alelových skupin HLA systému člověka. Metoda neposkytuje informace o konkrétních alelách, tudíž je využívána k identifikaci HLA antigenů na nižší úrovni tzv. low resolution. Výstupem stanovení tohoto rozlišení je výsledek na úrovni alelických skupin lokusů HLA-A, -B a -DRB1. Stanovení je založeno na vzájemné komplementaritě hledaných alelických skupin se specifickými primery, umístěnými na komerčně vyráběných kitech švédské firmy Olerup SSP. V průběhu PCR nasedají tyto plně komplementární primery na odpovídající úseky DNA a vytváří PCR produkt, který vymezuje příslušnou HLA specifitu. Fragmenty DNA s navázanými primery jsou separovány gelovou elektroforézou, umožňující vyhodnocení na základě jejich pohybu elektroforetickým gelu vlivem průchodu konstantního elektrického proudu a napětí. Výsledky jsou zviditelněny v UV transiluminátoru působením UV paprsku na interkalační barvivo přítomné ve vzorku. Vizualizací PCR produktu lze určit jeho přibližnou polohu a velikost, na základě komparace s velikostním standardem. Výsledný gel je pod UV zářením vyfotografován za účelem jeho vyhodnocení a dokumentace. Pozitivní reakce jsou vyznačeny a zaneseny do počítačového softwaru, který je schopen, podle specifických pozitivních reakcí analyzovat HLA antigen přítomný ve vzorku.

### **Reagencie:**

- Primerový kit Olerup SSP™;
- Master Mix (MM) pro nelicencované kity Olerup SSP - obsahuje: 200μM každého ze čtyř dNTP; reakční pufr (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris 0,001% želatina); 5% glycerol; 100 μg/ml kresolová červeň;
- RecTaq™ polymeráza - 5U/μl; Top Bio;
- Sterilní voda pro chromatografii - Merck, Life Technologies Ambion;
- Agarózový gel - 100ml agarózy, interkalační činidlo (5 μl ethidium bromid/ 5 μl Serva DNA Stain Clear G), 0,5x TAE pufr;
- DNA Size marker.

### **Pomůcky:**

Ochranný plášť, jednorázové rukavice, automatické pipety, opakovací a multikanálové pipety, sterilní špičky, Eppendorf mikrozkušavky

### **Přístroje:**

Vortex, centrifuga, termální cycler C1000 Touch Bio Rad, elektroforetická vana Olerup SSP Horizontal Green System 96, zdroj napětí pro elektroforézu, Biometra - UV Transiluminátor, Helmborg SCORE™ firmy GenoVision

### **Pracovní postup:**

#### **Příprava pracovní směsi - v pre PCR zóně**

Při přípravě pracovní směsi pro PCR-SSP s použitím primerů Olerup se postupovalo dle zvoleného primerového kitu, jemuž odpovídá množství reagensů uvedených v tabulce ředění. (viz Tabulka 2)

1. Příprava pracovních pomůcek, vyhledání odpovídajících automatických pipet se sterilními špičkami a nasazení jednorázových rukavic.

2. Zvolení primerového kitu s 96 jamkami a k němu příslušného ředění 2\*(48+8).

Tabulka 2: Tabulka ředění pro PCR-SSP s použitím primerů Olerup SSP™ [26]

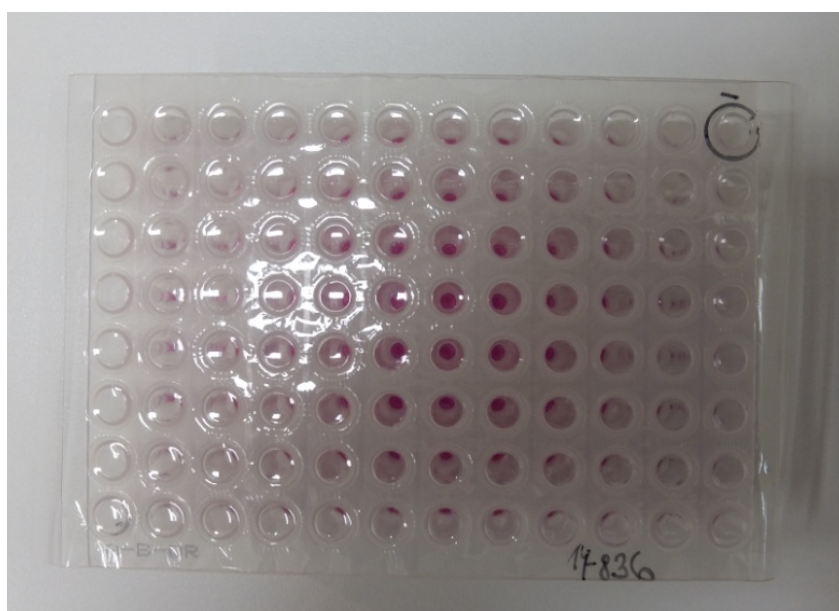
Počet primerů + přídavek na pipetování	H <sub>2</sub> O [μl]	MM [μl]	DNA [μl]	RecTaq <sup>TB</sup> polymeráza [μl]
4+2	40,9	18	0,6	0,5
5+2	47,7	21	0,7	0,6
6+2	54,6	24	0,8	0,6
8+2	68,2	30	1,0	0,8
12+3	102,3	45	1,5	1,2
16+3	129,5	57	2,0	1,5
24+4	191,5	84	2,8	2,2
32+6	259,2	114	3,8	3,0
48+8	381,9	168	5,6	4,5
2*(48+8)	763,8	336	11,2	9,0
3*(48+8)	1145,7	504	16,8	13,5
4*(48+8)	1527,6	672	22,4	18,0

3. Označení negativní kontroly značkou (-) v pravém horním rohu kitu identifikovaném číslem DNA pacientky.

4. Smísení a promíchání reagensů v Ependorff zkumavce označené číslem DNA:

- 764 μl sterilní vody;
- 336 μl Master mixu;
- 9 μl RecTaq<sup>TB</sup> polymerázy.

5. Nanesení 10  $\mu$ l směsi do jamky negativní kontroly.
6. Přidání 12  $\mu$ l promíchaného vzorku DNA pacientky do reakční směsi - krátká centrifugace.
7. Pipetování finální reakční směsi v množství 10  $\mu$ l, pomocí opakovací pipety, do všech jamek kitu, vyjma negativní kontroly.
8. Sklepnutí pipetovaných reagensů, zajišťující sloučení se specifickými primery na dně jamek a důkladné přelepení kitu folií.



Obrázek 5: Primerový kit Olerup SSP™ s reakční směsí [27]

### **Amplifikace - v post PCR zóně**

Amplifikace probíhá v termálním cycleru C1000 Touch BioRad dle navoleného programu za přesně definovaných podmínek.

1. Vložení uzavřeného kitu s reakční směsí do termálního cycleru.
2. Zvolení programu pro amplifikaci PCR-SSP:

Tabulka 3: Průběh amplifikačního programu PCR-SSP [26]

Průběh amplifikace	Teplota [°C]	Čas [s]	Proces
<b>Iničiační cyklus</b>	94	120	Denaturace
10 cyklů	94	10	Denaturace
	65	60	Annealing a extenze
20 cyklů	94	10	Denaturace
	61	50	Annealing
	72	30	Extenze
<b>Závěrečný cyklus</b>	15	Stále	Ukončovací teplota



Obrázek 6: Schematické znázornění průběhu amplifikačního programu PCR-SSP cyclerem C1000 Touch BioRad [27]

3. Vyjmutí kitu a jeho příprava na elektroforetickou separaci.

### Elektroforetická detekce PCR produktů

K dispozici byl již předem připravený 2% agarozový gel, obsahující interkalační barvivo a přesně stanovený počet jamek.

1. Vložení gelu do elektroforetické vany naplněné 0,5x roztokem TAE pufru.



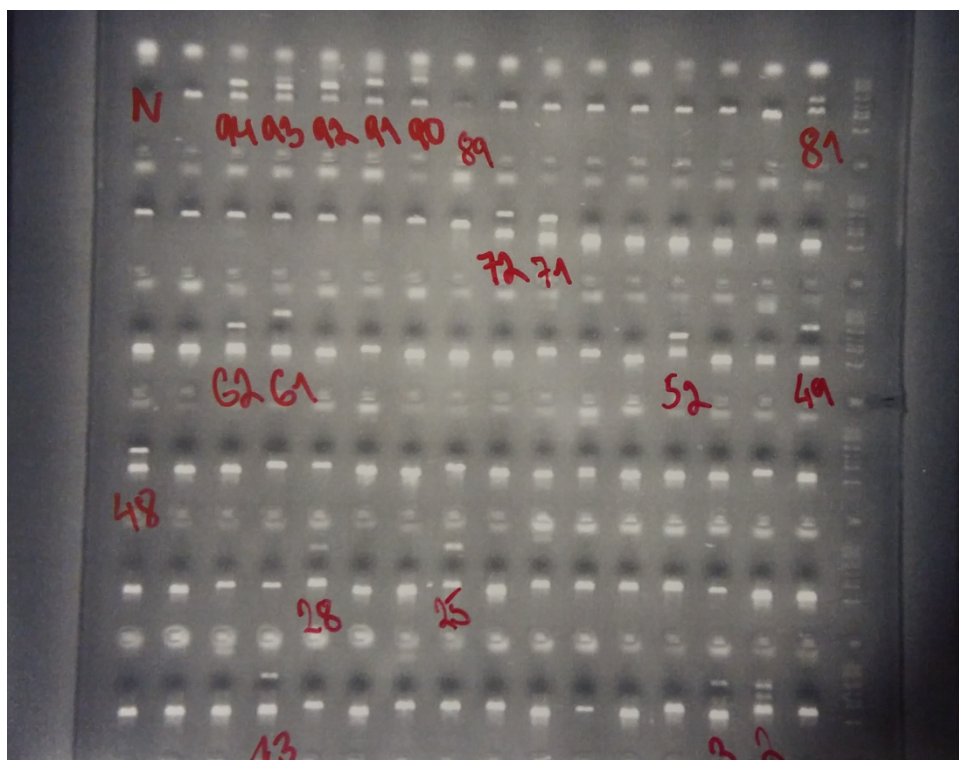
2. Nanesení 10  $\mu$ l standardu DNA Size marker do první jamky každé řady gelu.
3. Odlepení ochranné folie z primerového kitu s namnoženou DNA pacientky.
4. Postupné nanášení veškerého obsahu primerového kitu multikanálovou pipetou do jamek agarozového gelu, tzn. 96krát 10  $\mu$ l amplifikované DNA, včetně negativní kontroly.
5. Uzavření elektroforetické vany a spuštění patnácti minutového procesu elektroforézy připojením 200 V konstantního napětí a 170 mA stejnosměrného elektrického proudu.
6. Po uplynutí časového intervalu, ukončení elektroforézy a vyjmutí gelu z vany, následuje vizualizace PCR produktů v Biometra UV Transiluminátoru při vlnové délce 260 nm.
7. Vyhotovení fotografického snímku a jeho evidence pod číslem DNA.

### **Vyhodnocení elektroforetické separace**

Vyhodnocení probíhá v místnostech s příslušným počítačovým softwarem mimo pracovní PCR zóny laboratoře.

1. Vyhledání a červené zvýraznění PCR reaktivity na fotografickém snímku, dle srovnání s negativní kontrolou a velikostním standardem na začátku každé řady jamek gelu.
2. Očíslování pozitivních reakcí v pořadí 1-96 (96. negativní kontrola; viz Obrázek 7) a jejich následné zanesení do softwaru Helmborg SCORE™ pod odpovídajícím označením DNA pacientky.

3. Kontrola zapsaných pozitivně reagujících fragmentů, porovnání jejich velikosti se skutečnými polohami na fotografii a ověření preciznosti práce.
4. Spuštění analýzy programem Helmberg SCORE™, jež stanoví alelické skupiny přítomné v HLA systému pacientky.
5. Ukládání výsledků do databáze HLA genotypizace.



Obrázek 7: Fotografický snímek elektroforetického gelu vizualizovaného v UV Transiluminátoru s červeně označenými pozitivně reagujícími fragmenty DNA [27]

#### 4.1.2. Vyhledání vhodného komplementárního dárce

Na základě stanovených HLA antigenů pacientky je možné se pokusit vyhledat komplementárního dárce, adekvátního pro úspěšnou transplantaci kostní dřeně. Genotypizací příbuzných osob a vyhledáním odpovídajících nepříbuzných jedinců z Českého národního registru dárců kostní dřeně lze pro pacientku vytvořit seznam teoreticky přijatelných adeptů. Z něho je, dle míry komplementarity,

přítomnosti KIR genů, predikce imunogenicity DPB1, krevní skupiny, pohlaví, věku a tělesné konstituce zvolen ten nejvhodnější.

### **Vyšetřovaný biologický materiál:**

Vzorek izolované DNA ženy středního věku, indikované k transplantaci kostní dřeně, jež byl genotypizován přímým sekvenováním na úrovni high resolution a ověřen metodou PCR-SSP.

### **Stanovení komplementarity**

#### **Princip metody:**

Shoda HLA antigenů je zásadním aspektem zajišťujícím úspěšnost transplantace krvetvorných buněk. Čím je vyšší shoda, tím je vyšší i pravděpodobnost příznivého přijetí štěpu a současně nižší riziko výskytu komplikací spojených s odhojením. Nepodkročitelné minimum na požadovanou míru komplementarity dárce-příjemce se liší v závislosti na věku pacienta. Shoda (či případné neshody) musí být prokázána na HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 vždy v obou alelách. Volba definitivního dárce se taktéž odvíjí od vnějších okolností, mezi něž je řazeno stádium onemocnění pacienta, akutnost situace, aktuální zdravotní stav dárce, současně s jeho souhlasem k transplantaci.

#### **Pracovní postup:**

Posouzení míry shody antigenů na obou alelách mezi pacientkou a příbuznými i nepříbuznými dárci na základě přecházející high resolution genotypizace.

## Stanovení KIR-genů

### Princip metody:

KIR geny (Killer-cell immunoglobulin-like receptor) se vyskytuje na povrchu NK buněk, tzn. Natural Killer Cells a svou činností se podílejí na řízení jejich aktivity. Jedná se o regulační geny vyznačující se různými stupni polymorfismu a svou lokalizaci na chromozomu 19q 13.4. Samostatná nomenklatura KIR genů byla vytvořena v květnu roku 2002 ve Victorii v Kanadě, kde probíhala zasedání výboru WHO. V současné době je známo a pojmenováno sedmnáct KIR genu (viz Tabulka 4) a více než 180 KIR genotypů. Název je vždy tvořen dle struktury molekul, které kódují povahy imunoglobulinové domény a počtu genů kódujících protein s touto strukturou.[28]

Tabulka 4: Nomenklatura KIR genů [28]

Gene symbol	Protein symbol	Description	Aliases	Reference or submitting author
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1	cl-42, nkat1, 47.11, p58.1, CD158a	(Colonna and Samaridis 1995; Wagtmann et al. 1995a)
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	cl-43, nkat6, CD158b1	(Colonna and Samaridis 1995; Wagtmann et al. 1995a)
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2	(Colonna and Samaridis 1995; Wagtmann et al. 1995a)
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	103AS, 15.212, CD158d	(Selvakumar et al. 1996)
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5A	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5A	KIR2DL5.1, CD158f	(Vilches et al. 2000c)
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5B	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	(Vilches et al. 2000c)
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158 h	(Biassoni et al. 1996)
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j	(Colonna and Samaridis 1995; Wagtmann et al. 1995a)
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3	nkat7	(Dohring et al. 1996)
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i	(Dohring et al. 1996; Wagtmann et al. 1995a)
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5	nkat9, CD158 g	(Dohring et al. 1996)
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, pseudogene 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	(Vilches et al. 2000c)
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1	(Colonna and Samaridis 1995)
<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158 k	(Colonna and Samaridis 1995)
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	(Torkar et al. 1998)
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1	nkat10, CD158e2	(Dohring et al. 1996)
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, pseudogene 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c	(Vilches et al. 2000c)

Uvedením přítomných dárcovských KIR genů do programu Donor KIR B-content group calculator je posouzen stupeň způsobilosti. Kalkulačka umožňuje

současné zadávání až pěti potenciálních dárců, jež jsou na základě obsahu KIR genů rozřazeni do tří skupin. Každý z dárců je programem vyhodnocen termínem "neutral", "better" nebo "best". Odhalení nejlepšího potenciálního dárce po stránce KIR genů zabraňuje relapsu či dalším nežádoucím potransplantačním reakcím. [29]

#### **Počítačový program:**

Donor KIR B-content group calculator

Dostupné z: [https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor\\_b\\_content.html](https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html)

#### **Pracovní postup:**

Zanesení přítomných KIR genů od všech potenciálních dárců do programu Donor KIR B-content group calculation dle provedené typizace.

#### **Stanovení predikce DPB1 imunogenicity**

##### **Princip metody:**

DPB1 spadá svou strukturou mezi geny HLA II. třídy a společně s HLA-Cw a HLA-DQB1 se řadí k faktorům podílejícím se na nežádoucích potransplantačních reakcích. Inkompatibilita v genu HLA-DPB1 neblaze přispívá k rozvoji reakce štěpu proti hostiteli a současně působí u hematologických onemocnění. Studie, která se zabývá testováním nepříbuzenských dvojic dárce-příjemce, podala klíčové aspekty objasňující přítomnost neshod u genů HLA II. třídy, které byly z 75% vyvolány inkompatibilitami na HLA-DPB1. V současné době byla proto zavedena typizace DPB1 genů, jež je realizována pomocí PCR-SSP, čímž byla zvýšena míra shody na 12/12. [30]

Klasifikace neshod HLA-DPB1 je založena na přítomnosti TCE Groups, neboli T-cell-epitope Groups. Ty umožňují identifikaci a selekci neshod do dvou skupin:

permisivní a non-permisivní. Neshody, jež mohou být tolerovány, jsou označovány jako permisivní. Neshody zvyšující riziko GvHD, nemohou být tolerovány, tudíž jsou řazeny mezi non-permisivní. [31]

DPB1 T-Cell Epitope Algorithm představuje obdobnou kalkulačku, která byla využívána při zhodnocení KIR genové výbavy. Zanesením údajů o typizaci genu DPB1 dárce a příjemce do tohoto programu jsou identifikovány jejich epitopy T-buněk. Algoritmus generující predikci DPB1 imunogenicity je znám ve dvou verzích: DPB1 T-Cell Epitope Algorithm v1.0 z roku 2012 a novější DPB1 T-Cell Epitope Algorithm v2.0 z roku 2016. [31]

#### **Počítačový program:**

DPB1 T-Cell Epitope Algorithm v2.0

Dostupné z: [http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb\\_v2.html](http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb_v2.html)

#### **Pracovní postup:**

Na základě předcházející genotypizace dárce a příjemce, bude uskutečněno zanesení konkrétních alel DPB1 genu pacientky společně se všemi potenciálními dárce do programu DPB1 T-Cell Epitope Algorithm v2.0.

### **4.2 Statistický náhled HLA genotypizace na Oddělení HLA ÚHKT za rok 2016**

#### **Pracovní postup:**

Sestavení náhledu genotypizovaných osob v roce 2016 na základě dat poskytnutých Oddělením HLA na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Vytvoření uceleného přehledu užitím tabulek, schémat, koláčových a sloupcových grafů. Rozčlenění souboru všech typizovaných jedinců na indikované pacienty a jejich potenciální dárce, včetně genderového dělení. Klasifikace potenciálních

dárců do kategorie nepříbuzenské či příbuzenské, v níž jsou zahrnuti konkrétní rodinní příslušníci příjemce. Uplatnění statistických metod k prezenci numerického zastoupení dílčích kategorií. Stanovení maximálních, minimálních a průměrných hodnot. Uvedení referenčního rozmezí a jednotlivých četností potenciálních dárců na jednoho pacienta se současnou bilancí jejich příbuznosti a nepříbuznosti. Stanovení pravděpodobnosti výskytu dárce a průměrného počtu HLA typizací dárců u indikovaného pacienta. Provedení analýzy, poskytující informace o množství testovaných jedinců v jednotlivých měsících loňského roku. Výpočet průměrné měsíční hodnoty genotypizací.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení HLA antigenů pacienta a vyhledání komplementárního dárce

#### 5.1.1 Stanovené HLA antigenů pacienta

**HLA-A** (approval pending)  
SSP typing

Tested SSO/SSP Kits:

A-B-DR Combi Tray/0D8

1  2  3  4  5  6  7  8   
9  10  11  12  13  14  15  16   
17  18  19  20  21  22  23  24

OLERUP SSP

entered: 8.2.2017  
modified: 8.2.2017  
source: typingkit olerup 20170101.07.vda  
alleleDb allele marsh HLADB 3.26.0

**HLA-B** (approval pending)  
SSP typing

Tested SSO/SSP Kits:

A-B-DR Combi Tray/0D8

25  26  27  28  29  30  31  32   
33  34  35  36  37  38  39  40   
41  42  43  44  45  46  47  48   
49  50  51  52  53  54  55  56   
57  58  59  60  61  62  63  64   
65  66  67  68  69  70  71  72

OLERUP SSP

entered: 8.2.2017  
modified: 8.2.2017  
source: typingkit olerup 20170101.07.vda  
alleleDb allele marsh HLADB 3.26.0

**HLA-DRB** (approval pending)  
SSP typing

Tested SSO/SSP Kits:

A-B-DR Combi Tray/0D8

73  74  75  76  77  78  79  80   
81  82  83  84  85  86  87  88   
89w 90  91  92  93  94  95

OLERUP SSP

entered: 8.2.2017  
modified: 8.2.2017  
source: typingkit olerup 20170101.07.vda  
alleleDb allele marsh HLADB 3.26.0

Due to sharing of sequence motifs in codon 38 and 47, DRB3\*0114 will also be amplified in primer mixes 77, 78, 89 and DRB3\*0123 in mix 77, in addition to primer mix 93.

Obrázek 8: Pozitivně reagující fragmenty DNA zapsané do softwaru Helmborg SCORE™ [27]



Analýza HLA systému pacientky na úrovni low resolution softwarem Helmborg SCORE™, tzn. určení přítomnosti alelických skupin na lokusech HLA-A,-B, -DRB1.

Ústav hematologie a krevní transfuze									
Oddělení HLA analýzy									
Souhrn HLA genotypizace pacienta a jeho příbuzných dárců / příloha protokolu o akreditované zkoušce č. 17767 / 08.02.2017									
Pacient:								datum typizace: 08.02.2017	
HLA-A		HLA-B		HLA-C		DRB1		DQB1	
*02	*03	*07	*40			*07	*14		
DPB1									
Komentář:									

Obrázek 9: Výsledek HLA genotypizace pacientky na úrovni low resolution [27]

Již dříve provedená analýza HLA systému pacientky na úrovni high resolution softwarem ASSIGN™, tzn. určení přítomnosti konkrétních alel na lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1,-DQB1 a nově i DPB1.

Ústav hematologie a krevní transfuze									
Oddělení HLA analýzy									
Souhrn HLA genotypizace pacienta a jeho příbuzných dárců / příloha protokolu o akreditované zkoušce č. 17767 / 08.02.2017									
Pacient:								datum typizace: 08.11.2016	
HLA-A		HLA-B		HLA-C		DRB1		DQB1	
*02:01	*03:01	*07:02/07:261	*40:01/40:183	*03:04	*07:02	*07:01	*14:54 pozn.	*02:02	*05:03
DPB1									
*04:01	*17:01								
Komentář: Výsledek HLA ověřen ze dvou nezávislých náběrů. Typizace v lokusech HLA-A, -C a DRB1 byla provedena na úrovni vysokého rozlišení (high resolution). Přítomny KIR GENY: 2DL1*, 2DL2*, 2DL3*, 2DL4*, 2DS2*, 2DS4*, 3DL1*, 3DL2*, 3DL3*, 2DP1*, 3DP1*. DRB1*14:54 patří do funkční skupiny DRB1*14:01P.									

Obrázek 10: Výsledek HLA genotypizace pacientky na úrovni high resolution [27]

Byla provedena genotypizace DNA pacientky na úrovni low resolution pomocí metody PCR-SSP. Na základě specifických pozitivních reakcí byly programem Helmborg SCORE™ analyzovány alelické skupiny přítomné na lokusech HLA -A, -B a -DRB1. Pacientka tedy měla na lokusu HLA -A alelické skupiny A\*02 a 03, na HLA -B alelické skupiny B\*07 a 40 a na HLA-DRB1 alelické skupiny DRB1\*07 a 14. Výsledky stanovené PCR-SSP se shodovaly s již dříve získanými genotypizačními parametry pacientky, které byly získány metodou přímého sekvenování.

Jelikož byla pacientka indikována k transplantaci hematopoetických buněk, byla provedena nejprve genotypizace přímým sekvenováním a následně její ověření

metodou PCP-SSP. Výtěžek přímého sekvenování bylo odhalení konkrétních alel HLA systému pacientky. Jednalo se tudíž o rozlišení na úrovni high resolution, kde jsou jednotlivé konkrétní alely značeny dle mezinárodní nomenklatury čtyř a vícemístnými číslicemi, například HLA-A\*02:01. Uskutečněním PCR-SSP byla provedena konfirmace těchto údajů. Průkazem shody lze potvrdit přesnost analýzy a současně vyloučit jakékoli nejasnosti. Kombinací dvou metod je možné docílit vyšší bezpečnosti pacientky a zamezit distribuci zkreslených výsledků. Správnost identifikace HLA systému pacientky se významně podílí na úspěšnosti transplantace kostní dřeně.

### 5.1.2. Vyhledání vhodného komplementárního dárce

#### Stanovení komplementarity

Tabulka 5: Přehled HLA genotypizace pacientky

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1	
*02:01	*03:01	*07:02	*40:01	*03:04	*07:02	*07:01	*14:54	*02:02	*05:03

Výsledek HLA ověřen ze dvou nezávislých náběrů. Typizace v lokusech HLA-A, -B, -C a -DRB1 byla provedena na úrovni vysokého rozlišení (high resolution).

#### a) Vyšetření osob příbuzných

Stanovení antigenů přítomných u rodičů poskytuje zásadní informace o zděděných maternálních a paternálních znacích pacienta. V tomto případě však nebyla genotypizace DNA matky ani otce možná, rodiče nejsou pro testování dostupní. Proto byl odebrán sourozenec a potomci pacientky, u nichž bylo provedeno vyšetření HLA systému. U osob příbuzných probíhá nejprve stanovení na nižší úrovni a teprve při průkazu shody je dodělána sekvenace, určující přítomnost konkrétních alel.

Tabulka 6: Přehled HLA genotypizace sourozence (bratr)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	HLA-DRB1		HLA-DQB1	
*02:01	*03:01	*07:02	*18:01	*07:02	*07:01	*14:54	*02:02	*05:03

Typizace v lokusech HLA-A, -B, -C a -DRB1 byla provedena na úrovni vysokého rozlišení (high resolution). Výsledek HLA ověřen ze dvou nezávislých náběrů. Shoda mezi pacientem a tímto dárcem v jednom HLA haplotypu a v druhé alelické skupině HLA-A, HLA-DRB1, HLA-DQB1 lokusu.

Tabulka 7: Přehled HLA genotypizace potomka 1 (dcera)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	HLA-DRB1		HLA-DQB1
*01	*03	*40	*52	netestováno	*07	*15	Netestováno

Neshoda mezi pacientem a tímto jeho dárcem v jednom HLA haplotypu.

Tabulka 8: Přehled HLA genotypizace potomka 2 (dcera)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	HLA-DRB1		HLA-DQB1
*02	*11	*40	*55	netestováno	*07	*11	Netestováno

Neshoda mezi pacientem a tímto jeho dárcem v jednom HLA haplotypu.

#### b) Vyšetření osob nepříbuzných

Počet transplantací od nepříbuzenských dárců se neustále zvyšuje. Pro transplantaci kostní dřeně je vyžadována co nejvyšší míra shody, proto se lékař mnohdy uchýlí k volbě dárce z národního či celosvětového registru, na úkor ne zcela komplementárního rodinného příslušníka. Existuje-li tedy odpovídající jedinec v registru dárců kostní dřeně, je rovněž zařazen do seznamu adeptů. Dobrovolným dárcům jsou HLA antigeny stanoveny již při vstupu do registru, tudíž se následně provádí pouze jejich ověření či upřesnění. Zkoumána je též zdravotní způsobilost a ochota vystavit se zákroku.

Tabulka 9: Přehled HLA genotypizace nepříbuzného dárce z registru č.1 - žena

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1	
*02:01	*03:01	*07:02	*40:01	*03:04	*07:02	*07:01	*14:54	*02:02	*05:03

Tento dárce je s pacientem se vši pravděpodobností shodný 10/10. Typizace v lokusech HLA-A, -C a -DRB1 byla provedena na úrovni vysokého rozlišení.

Tabulka 10: Přehled HLA genotypizace nepříbuzného dárce z registru č.2 - muž

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1	
*02:01	*03:01	*07:02	*40:01	*03:04	*07:02	*07:01	*14:54	*02:02	*05:03

Tento dárce je s pacientem se vši pravděpodobností shodný 10/10. Typizace v lokusech HLA-A, -C a -DRB1 byla provedena na úrovni vysokého rozlišení.

Všichni příbuzní dárce se s pacientkou shodovali pouze v jednom HLA haplotypu. Potomci by měli mít vždy s rodičem (v tomto případě matkou) jeden identický haplotyp. Zbylá polovina genetické výbavy bude odpovídat druhému rodiči (otci). Bratrův genotyp byl totožný také pouze z poloviny. Oba nepříbuzní dárce byli nalezeni v mezinárodních registrech nepříbuzných dárců vykazovali míru shody 10/10, tudíž jsou na úrovni high resolution identičtí ve všech testovaných znacích.

### Stanovení KIR-genů

Tabulka 11: Přítomné KIR geny sourozence

2DL1*	2DL3*	2DL4*	2DS4*	3DL1*	3DL2*	3DL3*	2DP1*	3DP1*
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Prognóza KIR B-content group pro potenciálního dárce je: NEUTRAL

Tabulka 12: Přítomné KIR geny potomka 1

2DL1*	2DL2*	2DL3*	2DL4*	2DS2*	2DS4*	3DL1*	3DL2*	3DL3*	2DP1*	3DP1*
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Prognóza KIR B-content group pro potenciálního dárce je: NEUTRAL

Tabulka 13: Přítomné KIR geny potomka 2

2DL1*	2DL2*	2DL3*	2DL4*	2DS2*	2DS4*	3DL1*	3DL2*	3DL3*	2DP1*	3DP1*
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Prognóza KIR B-content group pro potenciálního dárce je: NEUTRAL

Tabulka 14: Přítomné KIR geny nepříbuzného dárce z registru č.1

2DL1*	2DL2*	2DL4*	2DL5*	2DS1*	2DS2*	2DS3*	2DS5*	3DL2*	2DL3*	3DS1*
2DP1*	3DP1									

Prognóza KIR B-content group pro potenciálního dárce je: BEST

Tabulka 15: Přítomné KIR geny nepříbuzného dárce z registru č.2

2DL1*	2DL3*	2DL4*	2DS4*	3DL1*	3DL2*	3DL3*	2DP1*	3DP1
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

Prognóza KIR B-content group pro potenciálního dárce je: NEUTRAL

Potenciální dárce byli KIR kalkulačkou rozděleni pouze do dvou skupin. Nepříbuzný dárce z registru č.1 byl zařazen do třídy "best", tudíž byl svou KIR genovou výbavou zhodnocen jako nejvhodnější adept. Volbou tohoto dárce lze očekávat nejnižší pravděpodobnost výskytu potransplantačního relapsu. Zbylí testovaní dárce neodpovídali přítomnými KIR geny požadovaným kritériím, byli proto označeni termínem "neutral". I přesto, že KIR genová výbava obou potomků se zcela shodovala s výbavou pacientky, byli kalkulačkou vyhodnoceni za nevhodné, s vyšším rizikem výskytu komplikací.

### Stanovení predikce DPB1 imunogenicity

Tabulka 16: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 pacientky

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *04:01	3	Low
DBP1 *17:01	1	High

Tabulka 17: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 sourozence a jeho predikce imunogenicity

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *04:01	3	Low
DBP1 *04:01	3	Low

Predikce imunogenicity DPB1 pro sourozence je: NON-PERMISIVNÍ GvHD.

Tabulka 18: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 potomka 1 a jeho predikce imunogenicity

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *04:01	3	Low
DBP1 *17:01	1	High

Predikce imunogenicity DPB1 pro potomka 1 je: PERMISIVNÍ.

Tabulka 19: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 potomka 2 a jeho predikce imunogenicity

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *04:01	3	Low
DBP1 *17:01	1	High

Predikce imunogenicity DPB1 pro potomka 2 je: PERMISIVNÍ.

Tabulka 20: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 nepřibuzného dárce z registru č.1 a jeho predikce imunogenicity

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *02:01	3	Low
DBP1 *16:01	3	Low

Predikce imunogenicity DPB1 pro nepřibuzného dárce z registru č.1 je: NON-PERMISIVNÍ GvHD.

Tabulka 21: Přehled alel lokusu HLA-DPB1 nepříbuzného dárce z registru č.2 a jeho predikce imunogenicity

Alela	TCE Group	Predikce imunogenicity
DPB1 *04:01	3	Low
DBP1 *04:01	3	Low

Predikce imunogenicity DPB1 pro nepříbuzného dárce z registru č.2 je: NON-PERMISSIVNÍ GvHD.

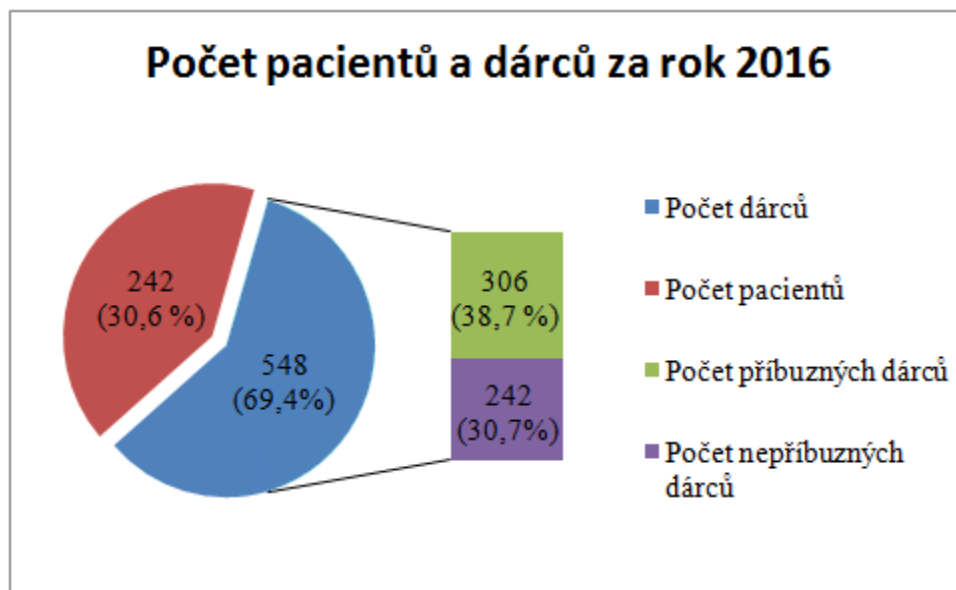
Dcera pacientky má obě DPB1 obě alely identické s pacientkou. Druhá dcera se jednou alelou zcela shoduje a druhou mírně odlišuje, avšak rozdílné alely jsou zahrnuty do stejné TCE Group, tudíž míra neshody byla rovněž posouzena za přijatelnou. Non-permisivní predikce neshod byly analyzovány u sourozence i obou nepříbuzných dárců z registru. V těchto případech neshody je možné očekávat vyšší riziko výskytu reakce štěpu proti hostiteli.

Na základě údajů získaných výše uvedeným testováním, byl pro transplantaci kostní dřeně zvolen nepříbuzný dárce z registru č.1. Tento dárce splňuje míru shody 10/10, je tedy v těchto znacích na úrovni high resolution zcela komplementární s HLA genotypem pacientky. Programem Donor KIR B-content group calculator, analyzujícím vliv přítomnosti určitých KIR genů, byl zařazen do skupiny "best", čímž je snížena pravděpodobnosti rizika po transplantačních reakcích. Predikcí imunogenicity DPB1 byly shledány non-permisivní neshody, nicméně tento nedostatek byl převážen výše uvedenými výhodami toho dárce. Při výběru nejvhodnějšího dárce krvetvorných buněk byly samozřejmě zohledněny i aspekty, eliminující rizika výskytu komplikací vyvolaných zákrokem. Vybraný dárce splňuje podmínku dobrého aktuálního zdravotního stavu a nese s pacientkou shodné krevní antigeny skupiny A.

Po předložení všech parametrů je definitivní rozhodnutí o volbě nejvhodnějšího dárce provedeno lékařem. V popsaném případě byl pro transplantaci vybrán nepříbuzný dárce z registru č.1 na základě výše uvedeného rozboru.

## 5.2 Statistický náhled HLA genotypizace na Oddělení HLA ÚHKH za rok 2016

V průběhu uplynulého roku 2016 bylo na Oddělení HLA v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze genotypizováno celkem 790 osob. V této skupině bylo testováno 242 pacientů indikovaných k transplantaci kostní dřeně, což odpovídá podílu 30,6%. Jednalo se o 130 mužů a 112 žen. Dvě třetiny z celkového počtu osob připadalo na dárce. HLA komplex byl stanoven 548 potenciálním dárčům, 306 tvořili rodinní příslušníci a 242 vybraní jedinci z registru. Frekvence mužů a žen v kategoriích příbuzných i nepříbuzných dárců se téměř shodovala, přičemž počty mužů byly nepatrně vyšší.



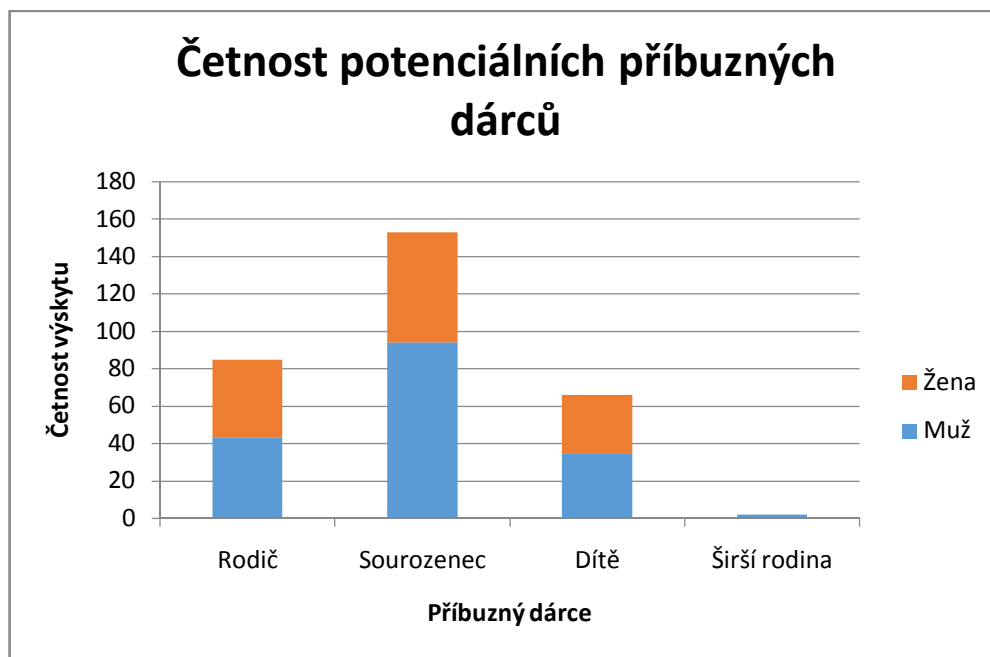
Obrázek 11: Počet pacientů a dárců za rok 2016

Tabulka 22: Zastoupení jednotlivých pohlaví pacientů a dárců

Pohlaví	Pacient	Dárce	
		Příbuzný	Nepříbuzný
Muž	130	174	124
Žena	112	132	96
Neuvedeno	-	-	22



Vyhledání vhodného dárce je vždy zahájeno genotypizací členů rodiny indikovaného pacienta. V loňském roce bylo provedeno stanovení HLA systému u 306 příbuzných dárců, pouze dvakrát se však jednalo o příslušníky širší rodiny. Nejvyšší pravděpodobnost shodných HLA antigenů pro transplantaci kostní dřeně vždy vykazují sourozenci. Ani v roce 2016 tomu nebylo jinak. Typizace byla celkem provedena u 153 sourozenců, 85 rodičů a 66 potomků pacienta.



Obrázek 12: Četnost potenciálních příbuzných dárců

Tabulka 23: Zastoupení jednotlivých pohlaví potenciálních příbuzných dárců

Pohlaví příbuzného	Rodič (otec/matka)	Sourozenec (bratr/sestra)	Dítě (syn/dcera)	Širší rodina (bratrance/sestřenice)
Muž	43	94	35	2
Žena	42	59	31	0

Vysoký polymorfismus HLA systému člověka odlišuje jednotlivé pacienty počtem potenciálních dárců. Některý pacient se může shodovat rovnou s několika dárce, avšak nositel vzácně se vyskytujících alel nemusí vhodného dárce nikdy

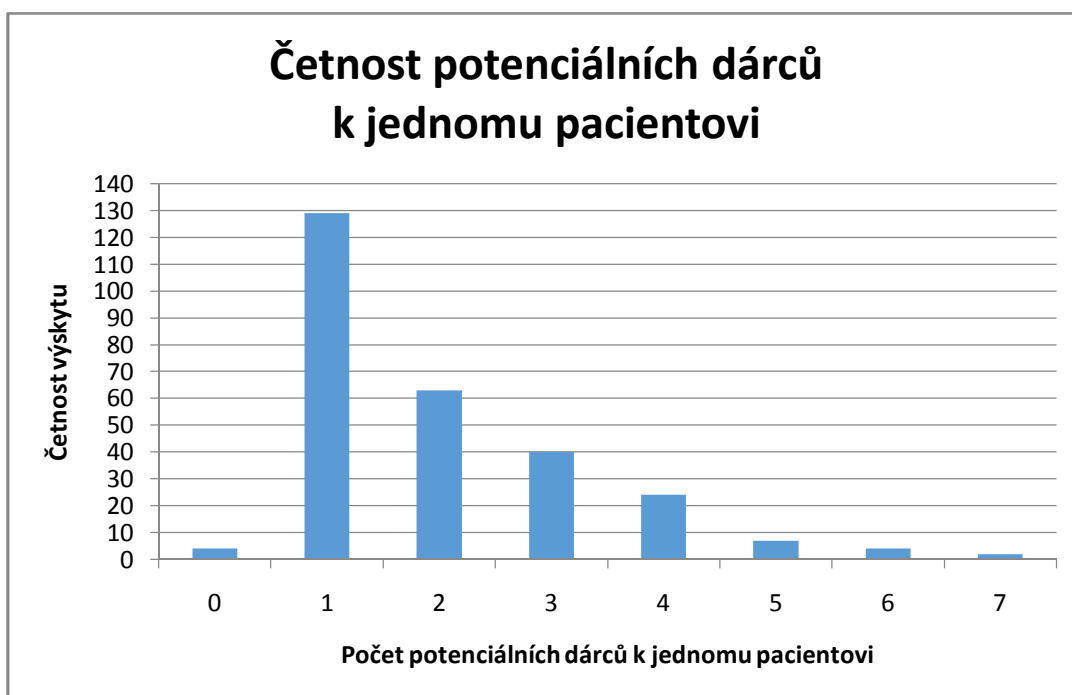
nalézt. Během roku 2016 se v ÚHKT počty příbuzných a nepříbuzných dárců testovaných pro jednoho pacienta pohybovaly mezi 0-7. Nejčastěji (pro 129 pacientů) byl testován pouze jeden potenciální dárc. S téměř poloviční četností se objevili také pacienti se dvěma testovanými dárci. Ojediněle bylo na výběr až ze sedmi možných příbuzných i nepříbuzných adeptů. S přibývajícím počtem donorů a tím větší možností výběru nejvhodnějšího dárce je současně sníženo riziko transplantačních komplikací. Lze totiž zohlednit kromě HLA komplementarity i přítomnost KIR genů, predikci imunogenicity, krevní skupinu či pohlaví. V uplynulém roce pouze čtyři pacienti nenalezli odpovídajícího dárce pro testování. Průměrně byli testováni téměř 2 (1,993) potenciální dárci na jednoho pacienta.

Tabulka 24: Počet potenciálních dárců na jednoho konkrétního pacienta

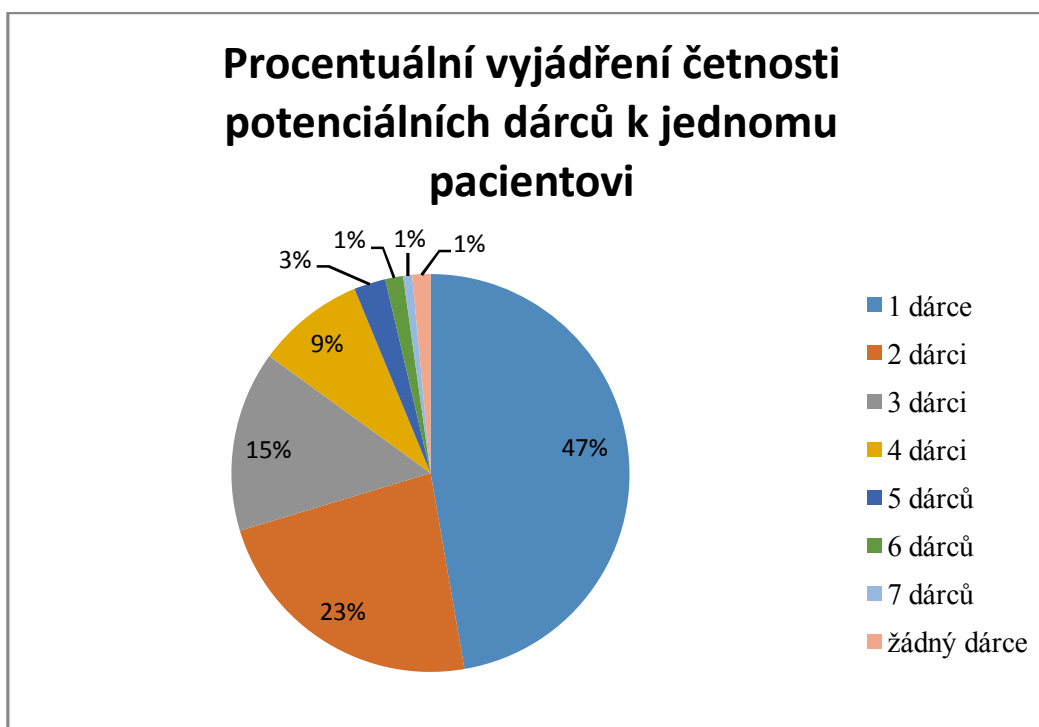
Počet potenciálních dárců	Četnosti výskytu
0	4
1	129
2	63
3	40
4	24
5	7
6	4
7	2

Průměrný výskyt komplementárních dárců na jednoho pacienta:

$$AR = \frac{(0 \cdot 4) + (1 \cdot 129) + (2 \cdot 63) + (3 \cdot 40) + (4 \cdot 24) + (5 \cdot 7) + (6 \cdot 4) + (7 \cdot 2)}{4 + 129 + 63 + 40 + 24 + 7 + 4 + 2} = \frac{544}{273} = 1,993$$



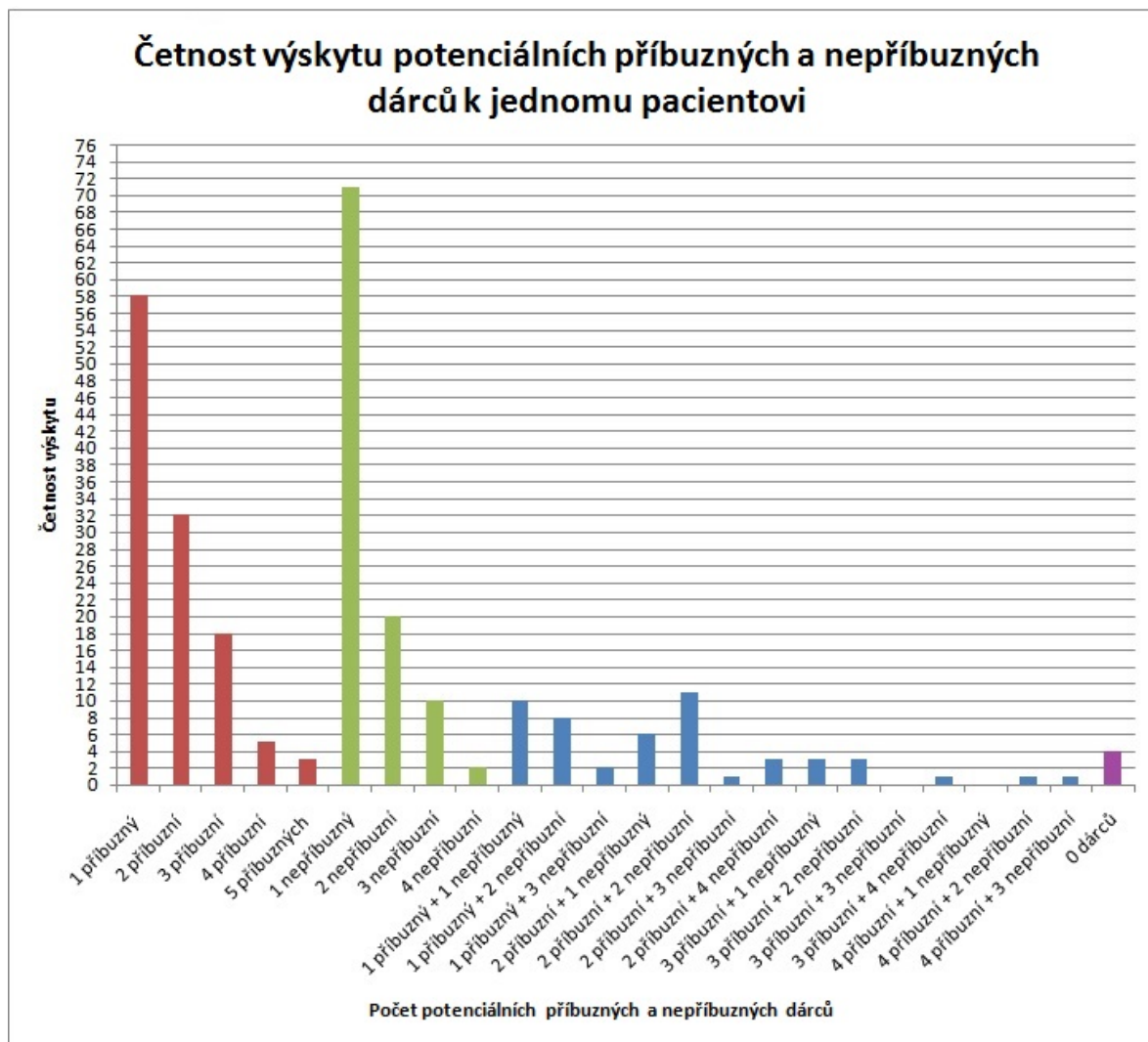
Obrázek 13: Četnost potenciálních dárců k jednomu pacientovi



Obrázek 14: Procentuální vyjádření četnosti potenciálních dárců k jednomu pacientovi

Podrobný přehled všech evidovaných kombinací příbuzných a nepříbuzných dárců na jednoho pacienta za rok 2016 je uveden v Obrázku 15. Nejčastěji se vyskytovali pacienti s jedním testovaným nepříbuzným dárcem. Druhou a třetí

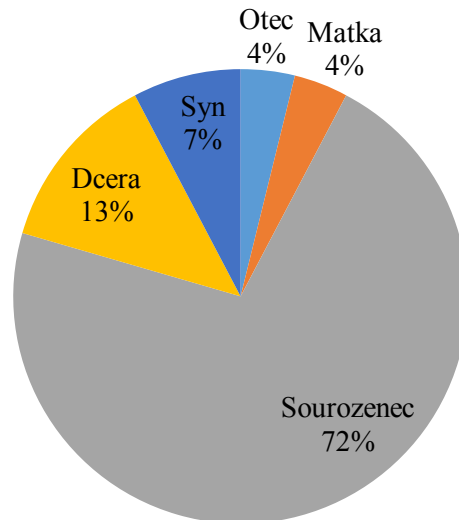
pozici obsadili příjemci s jedním a dvěma příbuznými dárci. Často se objevující variantou byli rovněž pacienti s právě jedním příbuzným a jedním nepříbuzným či právě dvěma příbuznými a dvěma nepříbuznými donory.



Obrázek 15: Přehled evidovaných kombinací příbuzných a nepříbuzných dárců k jednomu pacientovi

Pro skupinu pacientů s jedním testovaným příbuzným dárcem bylo genotypizováno přesně 56 sourozenců z celkového počtu 78 rodinných příslušníků, představujících právě jednoho příbuzného dárce. Procentuální zastoupení dárců v této skupině podle jejich příbuznosti k pacientovi je uvedeno na Obrázku 16.

## Procentuální vyjádření výskytu právě jednoho potenciálního rodinného příslušníka



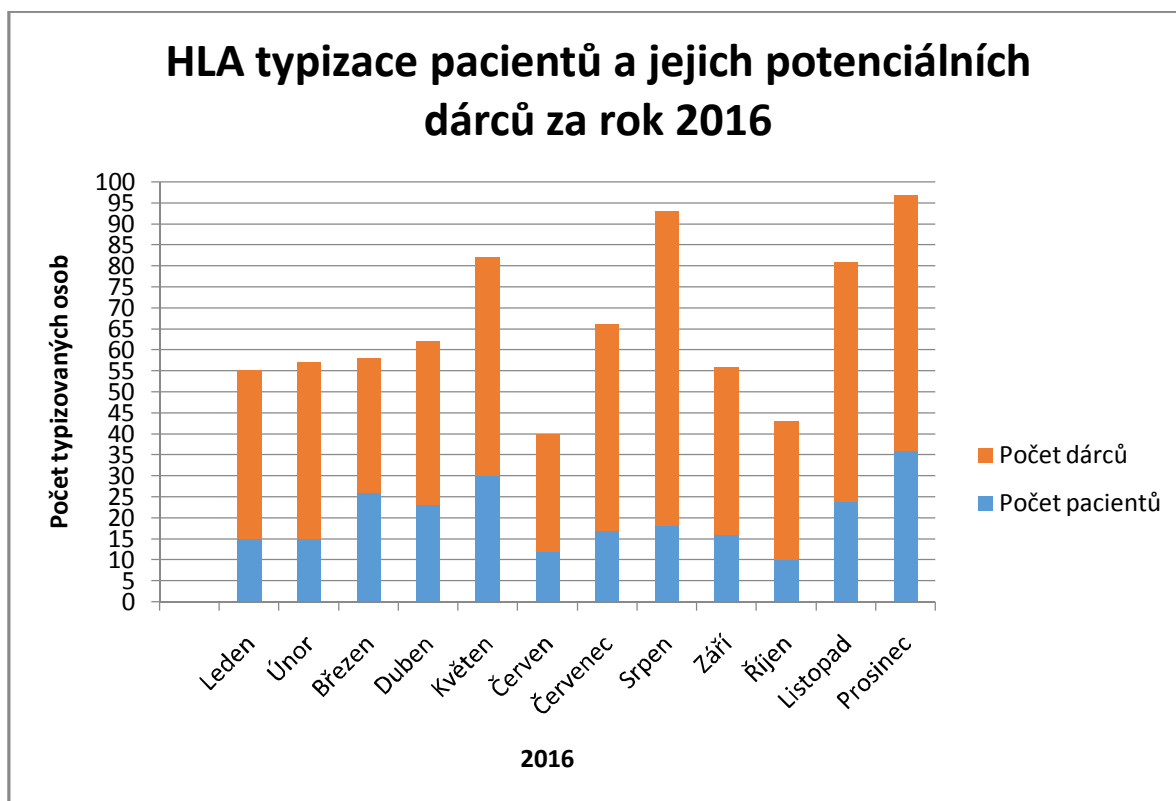
Obrázek 16: Procentuální vyjádření výskytu právě jednoho potenciálního rodinného příslušníka

Tabulka 25: Četnost výskytu právě jednoho potenciálního rodinného dárce

Rodinný příslušník	Četnost výskytu
Otec	3
Matka	3
Sourozenec	56
Dcera	10
Syn	6

V roce 2016 provedlo Oddělení HLA v ÚHKT celkově genotypizaci 790 osob. Průměrně byly HLA genotypy určeny 65 jedincům za měsíc. Měsíční referenční rozmezí se však pohybovalo od 43 do 79, kdy minimum osob bylo testováno v říjnu 2016 a maximum v prosinci 2016. Indikovaní pacienti tvořili přibližně třetinu celkového počtu jedinců za rok. Podobně tomu bylo i v rámci měsíčního zastoupení, které stanovovalo průměrně 20 pacientů za jeden měsíc. Spodní

a horní hranice v počtu testovaných pacientů korelovala s celkovým množstvím všech typizovaných osob v jednotlivých obdobích. Zásadní rozdíl byl pozorován v srpnu 2016, kdy ze souborného počtu 93 jedinců zaujímali příjemci pouze necelou pětinu.



Obrázek 17: HLA typizace pacientů a jejich dárců za rok 2016

Tabulka 26: Čestnost HLA typizací v jednotlivých měsících za rok 2016

Měsíc	Počet typizovaných osob (pacienti + potenciální dárce)	Počet pacientů
Leden	55	15
Únor	57	15
Březen	58	26
Duben	62	23
Květen	82	30
Červen	40	12
Červenec	66	17
Srpen	93	18
Září	56	16
Říjen	43	10
Listopad	81	24
Prosinec	97	36

Průměrný počet typizovaných osob za jeden měsíc:

$$AR = \frac{55 + 57 + 58 + 62 + 82 + 40 + 66 + 93 + 56 + 43 + 81 + 97}{12}$$

$$AR = \frac{790}{12} = 65,83$$

Průměrný počet pacientů za jeden měsíc:

$$AR = \frac{15 + 15 + 26 + 23 + 30 + 12 + 17 + 18 + 16 + 10 + 24 + 36}{12}$$

$$AR = \frac{242}{12} = 20,17$$

## 6 DISKUZE

Indikovaná pacientka byla v prosinci 2016 genotypizována metodou přímého sekvenování. Současně bylo provedeno ověření správnosti výsledků užitím metody PCR-SSP, jež je podrobně popsána v metodice práce. Obdobným postupem byli typizováni i příbuzní a nepříbuzní dárce, z nichž byl vybrán nejvhodnější na základě shodnosti HLA antigenů a souvisejících stanovení. Pacientka i vybraný dárcce podstoupili před transplantační vyšetření deklarující jejich aktuální zdravotní stav a schvalující realizaci zákroku. Již na začátku února 2017 se uskutečnila transplantace kostní dřeně. Pacientka přijala dárcovský štěp a celý proces proběhl bez komplikací. Nastalo úplné přihojení štěpu, což bylo detekováno kompletním chimerismem.

Přenesením hematopoetických buněk z kostní dřeně dárce došlo k jejich uchycení v hostitelském prostředí a převzetí dárcovské krvetvorby. Hematopoéza pacientky tím byla potlačena a zcela nahrazena. Důkazem byl výskyt pouze dárcovských krevních elementů v krvi. Kompletní chimerismus vytváří příznivé podmínky pro vznik nové krvetvorby a snižuje pravděpodobnost po transplantačních reakcích. Na rozdíl od smíšeného, kdy v těle jedince koexistují krvetvorné buňky vlastní i cizí. [32]

Transplantace byla provedena úspěšně pouze díky existenci dobrovolného dárcovství, na jehož myšlenku jsou vybudovány registry po celém světě. Nositelem dárcovského štěpu se stala žena identické krevní skupiny A+, která byla nalezena v zahraničním registru.

Oddělení HLA, patřící pod Ústav hematologie a krevní transfuze, úzce spolupracuje při vyhledávání nepříbuzenských dárců s Českým registrem dárců krvetvorných buněk Praha v Institutu klinické a experimentální medicíny. IKEMu je umožněno kooperovat s celosvětovou databází dobrovolných dárců, na základě



členství v organizaci BMDW a akreditaci světové asociace. V případě námi vyšetřované pacientky byla zvolena registrovaná dárkyně z německé databáze.

Německo, jakožto 80 milionová země, se může pyšnit více než 7 miliony dobrovolnými dárci. Jejich zastoupení činí přibližně 8,5% německé populace. Za rok 2016 zde proběhla registrace převyšující 800 tisíc dobrovolníků, tedy 1% obyvatel. [33]

Česká republika, osídlená 10 miliony obyvatel, v nedávné době překročila hranici 70 tisíc dárců v národních registrech. Podíl dobrovolníků představuje v přepočtu 0,7% české populace. V loňském roce bylo zapsáno přesně 7865 osob, tudíž necelých 0,08%. [22]

Stručný přehled vybízí k zamyšlení a současně objasňuje problematiku spjatou s nalezením vhodného dárce a zdařilou transplantací. V uplynulém roce se uskutečnilo na českém území 108 nepříbuzenských transplantací kostní dřeně, z čehož byl v 66 případech dárcovský štěp zprostředkován zahraniční databází. Největší zásluha patří právě Německu, které zajistilo 45 dárců, což tvoří více než třetinu. [22]

Přestože český registr kooperuje a významně se podílí na výstavbě světové databáze, ochota darovat je relativně nízká. Snaha o propagaci a rozšiřování seznamu potenciální dárců se přitom neustále zvyšuje. Hlavním cílem je urychlení procesu výběru vhodného dárce i vlastní transplantace, zefektivnění před transplantační terapií a snížení nákladů. Využití dárců ze zahraničních registrů vyžaduje podstatně komplikovanější postup při zajištění štěpu, doprovázený vyššími finančními výdaji. Přesto stále 60% transplantací krvetvorných buněk u nás je prováděno od dárců z mezinárodní databáze dárců. Největší zapojení lze evidovat v krajských městech na Moravě, trvale je však za sousedním Německem patrné značné zaostávání. Celoročně se koná nespočetné množství přednášek,

galavečerů a kampaní za účelem osvěty a rozšíření českého dárcovství. Nárůst dobrovolníků zajišťují především hromadné registrace uspořádané na půdách vysokých škol, firem, veletrhů či benefičních a sportovních akcí. Zaměření je kladeno na mladé jedince s dobrým zdravotním stavem. Podporu lze zaznamenat rovněž mezi státními orgány, bezpečnostními sbory i sportovními oddíly. Osvětě prostřednictvím rozhlasových a televizních medií, napomáhají také známé osobnosti. K nositelům titulu jsou řazeni například herec Ondřej Vetchý nebo zesnulý kardinál Miroslav Vlk. V posledních letech k šíření povědomí přispěly oslavy Světového dne dárců kostní dřeně, které připadají vždy na třetí víkend v září, na jehož počest bylo pořádáno mnoho exhibiční akcí.

Rozšiřování databází skýtá prozatím jedinou alternativu, která zvyšuje pravděpodobnost nalezení vhodného dárce a záchrany života pacienta. Ani světový registr, který je tvořen bezmála 30 miliony dárců, nezaručuje nalezení odpovídajícího dárce pro všechny pacienty indikované k transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Vysoký polymorfismus HLA systému člověka totiž představuje neopominutelnou komplikaci a specifičnost, zamezující uskutečnění transplantace kostní dřeně spousty pacientů.

Možná i to bylo důvodem, proč Český registr krvetvorných buněk v pražském IKEMu, posunul horní věkovou hranici zápisu dárců. Od podzimu 2016 je zde umožněna registrace až do završení čtyřiceti let. I přes možná rizika postoupil Institut klinické a experimentální medicíny tento krok, zvyšující mezník o 5 let, s vidinou zvýšení počtu dobrovolníků. [34]

Stejného cíle mělo být dosaženo projednávanými změnami Zákona o daních z příjmu, předpis č. 585/1992 Sb., které stanovovaly finanční ocenění dárcům hematopoetických buněk. Motivaci členství v registru měla představovat částka osm tisíc korun pro každého jedince s deklarováním potvrzením o zápisu. Odměnu by bylo možné čerpat pouze jednou za život, formou krácené daně

z příjmu. Návrh novely, podaný v polovině předešlého roku, nebyl však dostatečně podpořen, tudíž v roce 2017 nevešel v platnost. [35]

Nelze prokázat, zda bylo zamítnutí argumentováno definicí dárcovství, vymezující tuto činnost jako svobodnou vůli, nevyžadující jakoukoli peněžní kompenzaci, a nebo pravý důvod tkvěl v neposkytnutí finančních prostředků státem či v riziku zneužití odměny ve svůj prospěch a následném nedodržení slibu, doprovázeném neochotou poskytnout dárcovský štěp. Avšak i odškodnění již zmíněným bonusem, by bylo v mnohých situacích pro českého občana dostatečnou pohnutkou k dárcovství.

Nepříbuzenská transplantace v dnešní době převyšuje svým výskytem dárcovství v rámci rodiny. Je proto potřeba racionálně zvážit, zda je v lidských silách někomu pomoci. Jako každé „pro“, má i dárcovství svá „proti“. Odmítnutí registrace je v úzké vazbě s vystavením těla nebezpečí a bolesti, spjaté se zákrokem. Obava z celkové anestezie a bioptické jehly vyvolává v lidech hrůzu a pochybnosti o naplnění dárcovského slibu. V jednadvacátém století je však vynakládána snaha zajistit ochranu i určitý komfort dárci v podobě volby způsobu odběru. Rozhodnutí musí být nutně podloženo souhlasem zprostředkovatele štěpu, jenž má právo zvolit optimální postup odběru. Celosvětově se rozmáhající alternativou zdroje krvetvorných buněk je jejich separace z periferní a pupečnickové krve. Především izolace z pupečnickové krve se vyznačuje vysokou šetrností a minimálním rizikem pro dárce.

Nastavit pomocnou ruku je v kompetenci téměř každého zdravého mladého jedince bez ohledu na finanční situaci, inteligenční kvocient, etnický původ či pohlaví. Vždy je respektováno dárcovo soukromí, tudíž zůstává z etických důvodů ponechán v anonymitě. Opačná strana mince, s níž se někteří registrovaní nejsou schopni ztotožnit, se současně odvíjí od utajení příjemce. Neznámá identita pacienta pro někoho představuje bezvýznamný fakt, pro druhého však

nepřekročitelný blok. Anonymita může evokovat naprosto nereálnou představu, při níž je štěp věnován osobě nižší sociální vrstvy, odlišné barvy pleti nebo jiného náboženského vyznání. Rovněž tento argument je nutné respektovat a důkladně promyslet před samotným zápisem. Zaznamenány jsou především četné registrace zapříčiněné incidentem v blízkém okolí. Záchraně je v takových případech mnohdy přikládána větší váha než vlastnímu životu.

## 7 ZÁVĚR

Hlavním cílem bakalářské práce byla typizace HLA komplexu pacientky a stanovení vhodného dárce pro transplantaci kostní dřeně na půdě HLA laboratoře. Metodou přímého sekvenování byla určena přítomnost HLA antigenů na úrovni high resolution. Vyšetřená genová výbava byla ověřena konfirmací s výsledky aplikované technologie PCR-SSP. Pacientce bylo provedeno kompletní vyšetření přítomných HLA antigenů, umožňující posouzení kompatibility s potencionálními dárci. Na základě získaných parametrů byl zvolen nejadekvátnější transplantační dárce - Registrovaný dárce 1. Výběr byl lékařským posouzením schválen a pacientka se podrobila zákroku. Štěp přijala úspěšně a zcela převzala dárcovskou krevtvorbu, bez zjevných známek potransplantačních reakcí.

V druhé části práce byla zpracována statistika genotypizovaných osob v HLA laboratoři ÚHKT za rok 2016. Dvě třetiny ze souborného počtu typizovaných jedinců, představovali potenciální dárci. Příbuzní dárci nepatrně převyšovali nepříbuzné. Muži byli zastoupeni mírně početněji než ženy. Rozmezí četnosti potenciálních dárců pro jednoho pacienta se pohybovalo od 0 do 7, z čehož pouze pro čtyři indikované pacienty nebyl nalezen žádný vhodný dárce k testování HLA. Průměrně připadli na pacienta až dva potenciální dárci.

Bakalářskou prací byla objasněna problematika transplantace kostní dřeně a faktory ovlivňující její úspěšnost. Praktickou částí bylo podloženo stanovisko významnosti shody HLA antigenů u příjemců a dárců. Současně byl potvrzen vysoký polymorfismus HLA systému člověka, jenž lze pozorovat na četnostech výskytu potenciálních dárců k jednomu pacientovi. Důraz byl kladen na nepříbuzenské dárcovství, tvořící více než polovinu všech transplantací dřeně.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyselina
APC	antigen-presenting cell
ATP	adenosintrifosfát
bp	base pair
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide
CD 4+, CD 8+	diferenční skupiny glykoproteinů na povrchu T lymfocytů
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervový systém
ČNRDD	Český národní registr dárců kostní dřeně
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid
EBV	Epstein-Barr virus
FISH	fluorescent in situ hybridisation
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GvHD	graft versus host disease
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
kB	kilobaze (jednotka délky úseků nukleových kyselin)
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)

KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
MHC	major histocompatibility complex
MM	master mix
MNC	mononuklear cell
NGS	next generation sequencing
NK	natural killer
PCR	polymerase chain reaction
PCR-SSO	polymerase chain reaction -sequence specific oligonucleotide
PCR-SSP	polymerase chain reaction - sequence specific primer
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverse transcription
SMRT	single molecule real time
TAE	tris-acetát-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TCE	T-cell epitope groups
UV	ultrafialové záření
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
WHO	World health organization
ZMWs	zero-mode wave-guides
μl	mikrolitr (jednotka objemu)

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, 941 s. ISBN 80-86225-50-X.
- [2] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství. Praha: Grada, 2012, 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.
- [3] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. Základy imunologie. 5. vydání. Praha: Triton, 2013, 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [4] Chemické listy: Polymorphism of Major Histocompatibility System of Man Its Function, Indication, Detection and Interpretation. Praha, 2015, 109(1). ISSN 1213-7103. [online]. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_01\\_45-50.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_45-50.pdf).
- [5] STITES, Daniel P. a Abba I. TERR. Základní a klinická imunologie. Praha: Victoria Publishing, 1994, 744 s. ISBN 80-85605-37-6.
- [6] JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 4. vyd., V Grada 1. Praha: Grada, 2014, 96 s.. ISBN 978-80-247-4822-1.
- [7] JAMESON, J. Larry. Principles of Molecular Medicine. Ilustrované vydání. Springer Science & Business Media 1998, s 1127. ISBN 1592597262.
- [8] ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. Transfuzní lékařství. 1. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
- [9] NAIRN, Roderick. a Matthew. HELBERT. *Immunology for medical students*. 2nd ed. Philadelphia: Mosby, c2007, 308 s. ISBN 978-032-3043-311.
- [10] FERENČÍK, Miroslav. Imunitní systém: informace pro každého. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005, s 236. ISBN 80-247-1196-6.
- [11] BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., A KOL. Vyšetřovací metody v imunologii Praha: Grada Publishing, 2.vyd. 2011, 168 s. ISBN 978-80-247-7089-5.



- [12] LITZMAN, Jiří, Martin PETŘEK a Vojtěch THON. Vyšetřovací metody v klinické imunologii. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998, 45 s. ISBN 80-210-1807-0.
- [13] ZADÁK, Zdeněk a Jaroslav KVĚTINA. Metodologie předklinického a klinického výzkumu v metabolismu, výživě, imunologii a farmakologii. 1. vyd. Praha: Galén, c2011, s 333. ISBN 978-80-7262-748-6.
- [14] KOČÁREK, Eduard. Molekulární biologie v medicíně. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [15] LOCHMANOVÁ, Alexandra. Základy imunologie. Vyd. 1. Ostrava: Ostravská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, 2006, s 139. ISBN 80-7368-153-6.
- [16] GABRIEL, C., D. FÜRST, I. FAÉ, S. WENDA, C. ZOLLIKOFER, J. MYTILINEOS a G. F. FISCHER. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens*. 2014, 83(2), 65-75. DOI: 10.1111/tan.12298. ISSN 00012815. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/tan.12298>.
- [17] Sekvenování nové generace | LabGuide.cz – Průvodce laboratoří.  
*LabGuide.cz – Průvodce laboratoří* [online]. Copyright © 2014. Všechna práva vyhrazena. [cit. 05.01.2017]. Dostupné z: <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>.
- [18] KOUBKOVÁ, Lucie, Bořivoj VOJTĚŠEK, Rostislav VYZULA, S. WENDA, C. ZOLLIKOFER, J. MYTILINEOS a G. F. FISCHER. Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Tissue Antigens*. 2014, 83(2), 65-75. DOI: 10.14735/amko20141S61. ISBN 10.14735/amko20141S61. ISSN 00012815. Dostupné také z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4484/>.

- [19] Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology. *Illumina* | *Sequencing and array-based solutions for genetic research* [online]. Copyright © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved. [cit. 05.01.2017]. Dostupné z: <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>.
- [20] DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, s 544. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [21] VAŇÁSEK, Jaroslav. Transplantace kostní dřeně. Praha: Galén, 1996, s 191. Purkyňova sbírka. ISBN 80-85824-35-3.
- [22] Český národní registr dárců dřeně. [online]. Copyright © 2014 [cit. 09.01.2017]. Dostupné z: [http://www.kostnidren.cz/registr2014/0\\_registr.html](http://www.kostnidren.cz/registr2014/0_registr.html).
- [23] ČČK - Úvod . *Object moved* [online]. Copyright © Český červený kříž 1999 [cit. 12.01.2017]. Dostupné z: [http://www.cervenyriz.eu/cz/cz\\_root.aspx](http://www.cervenyriz.eu/cz/cz_root.aspx).
- [24] RAIDA, Luděk. Transplantace krvetvorných buněk - základní principy. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3393-6.
- [25] ÚHKT — . *ÚHKT —* [online]. Copyright © [cit. 14.01.2017]. Dostupné z: <https://www.uhkt.cz/uhkt>.
- [26] ÚHKT, Oddělení HLA, Vyšetření genotypu hlavního histokompatibilního systému člověka -HLA, NRL\_05\_SOP\_14\_01.
- [27] vlastní zdroj.
- [28] MARSH, Steven G. E., Peter PARHAM, Bo DUPONT, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*. 2003-7-1, 55(4), 220-226. DOI: 10.1007/s00251-003-0571-z. ISSN 0093-7711. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-003-0571-z>.
- [29] Robinson J, Waller MJ, Stoehr P, Marsh SGE, IPD-the Immuno Polymorphism Database, *Nucleic Acids Research* (2005), 331:D523-526.

- [30] VRANÁ, Milena, Ústav hematologie a krevní transfuze. Vliv inkompatibilit v DP genech na úspěch transplantací hematopoetických kmenových buněk: Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR. Praha: Iga MZ ČR, 2007, s 92.
- [31] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE, The IPD and IMGT/HLA Database: allele variant databases, *Nucleic Acids Research* (2015) 43:D423-431.
- [32] BRDIČKA, Radim, Z. SIEGLOVÁ a L. HONZÁTKOVÁ. DNA polymorfismy, alogenní transplantace kostní dřeně a periferní buněčný chimérismus. *Časopis lékařů českých. Ústav hematologie a krevní transfuze*, Praha, 1998, 137(4), 110-119. ISSN 0008-7335.
- [33] SCHLEGEL, Sonja. 2016 Ein Rekordjahr für die Stammzellspende. In: *ZKRD Zentrales Knochenmarkspender-Register Deutschland* [online]. Ulm, Deutschland: ZKRD, 2016 [cit. 11.04.2017]. Dostupné z: <https://www.zkrd.de/de/presse/detail/12215>.
- [34] Posun věkové hranice pro zápis do registru a mezinárodní akreditace. In: *Daruj život: Český registr dárců krevetorných buněk-Praha* [online]. Praha, 2016 [cit. 11.04.2017]. Dostupné z: <http://www.darujzivot.cz/novinky/posun-vekove-hranice-pro-zapis-do-registru-a-mezinarodni-akreditace#text>.
- [35] KUČEROVÁ, Dagmar. Daňově výhodnější darování krve a kostní dřeně od roku 2017. *Podnikatel.cz* [online]. Praha: Copyright © 2007 – 2017 Internet Info, s.r.o, 2016, (15.8.2016) [cit. 11.04.2017]. ISSN 1802-8012. Dostupné z: <http://www.podnikatel.cz/clanky/danove-vyhodnejsi-darovani-krve-a-kostni-drene-od-roku-2017/>.
- [36] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE; The IPD and IMGT/HLA Database: allele variant databases, *Nucleic Acids Research* (2015) 43:D423-431.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Lidský hlavní histokompatibilní komplex...	16
Obrázek 2 Ukázka tvorby názvu HLA alel podle současného názvosloví...	17
Obrázek 3 Laboratorní postupy používané pro typizaci HLA systému...	18
Obrázek 4 Průběh polymerázové řetězové reakce...	22
Obrázek 5 Primerový kit Olerup SSP™ s reakční směsí ...	39
Obrázek 6 Schematické znázornění průběhu amplifikačního programu PCR-SSP cyclerem C1000 Touch BioRad...	40
Obrázek 7 Fotografický snímek elektroforetického gelu vizualizovaného v UV Transiluminátoru s červeně označenými pozitivně reagujícími fragmenty DNA ...	42
Obrázek 8 Pozitivně reagující fragmenty DNA zapsané do softwaru Helmborg SKORE™ ...	48
Obrázek 9 Výsledek HLA genotypizace pacientky na úrovni low resolution ...	49
Obrázek 10 Výsledek HLA genotypizace pacientky na úrovni high resolution..	49
Obrázek 11 Počet pacientů a dárců za rok 2016...	56
Obrázek 12 Četnost potenciálních příbuzných dárců ...	57
Obrázek 13 Četnost potenciálních dárců k jednomu pacientovi ...	59
Obrázek 14 Procentuální vyjádření četnosti potenciálních dárců k jednomu pacientovi...	59
Obrázek 15 Přehled evidovaných kombinací příbuzných a nepříbuzných dárců k jednomu pacientovi...	60
Obrázek 16 Procentuální vyjádření výskytu právě jednoho potenciálního rodinného příslušníka ...	61
Obrázek 17 HLA typizace pacientů a jejich dárců za rok 2016 ...	62

## 11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Porovnání molekul HLA I. a II. ....	15
Tabulka 2 Tabulka ředění pro PCR-SSP s použitím primerů Olerup SSP™ .....	38
Tabulka 3 Průběh amplifikačního programu PCR-SSP .....	40
Tabulka 4 Nomenklatura KIR genů.....	44
Tabulka 5 Přehled HLA genotypizace pacientky .....	50
Tabulka 6 Přehled HLA genotypizace sourozence.....	51
Tabulka 7 Přehled HLA genotypizace potomka 1.....	51
Tabulka 8 Přehled HLA genotypizace potomka 2.....	51
Tabulka 9 Přehled HLA genotypizace nepříbuzného dárce z registru č.1.....	52
Tabulka 10 Přehled HLA genotypizace nepříbuzného dárce z registru č.2.....	52
Tabulka 11 Přítomné KIR geny sourozence .....	52
Tabulka 12 Přítomné KIR geny potomka 1 .....	52
Tabulka 13 Přítomné KIR geny potomka 2.....	53
Tabulka 14 Přítomné KIR geny nepříbuzného dárce z registru č.1 .....	53
Tabulka 15 Přítomné KIR geny nepříbuzného dárce z registru č. 2 .....	53
Tabulka 16 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 pacientky .....	53
Tabulka 17 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 sourozence a jeho predikce imunogenicity .....	54
Tabulka 18 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 potomka 1 a jeho predikce imunogenicity .....	54
Tabulka 19 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 potomka 2 a jeho predikce imunogenicity .....	54
Tabulka 20 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 nepříbuzného dárce z registru č. 1 a jeho predikce imunogenicity .....	54
Tabulka 21 Přehled alel lokusu HLA-DPB1 nepříbuzného dárce z registru č. 2 a jeho predikce imunogenicity .....	55
Tabulka 22 Zastoupení jednotlivých pohlaví pacientů a dárců .....	56

Tabulka 23 Zastoupení jednotlivých pohlaví potenciálních příbuzných dárců ..	57
Tabulka 24 Počet potenciálních dárců na jednoho konkrétního pacienta .....	58
Tabulka 25 Četnost výskytu právě jednoho potenciálního rodinného dárce .....	61
Tabulka 26 Četnost HLA typizací v jednotlivých měsících za rok 2016 .....	63