



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Bakalářská práce

AB0 inkompatibilita u transplantace kmenových krvetvorných buněk

Vypracoval: Alena Pechmanová
Vedoucí práce: MUDr. Eva Fronková

České Budějovice 2016

Abstrakt

AB0 inkompatibilita mezi příjemcem a dárce není překážkou úspěšného provedení transplantace kmenových krvetvorných buněk. Na přihojení štěpu má zásadní vliv shoda v HLA systému, AB0 inkompatibilita však může způsobit řadu komplikací, jako je akutní i pozdní hemolytická reakce, čistá aplazie červené řady, vyšší stupeň GvHD aj. Ve své bakalářské práci jsem zjišťovala vliv AB0 inkompatibility a výšky vstupního titru aglutininů na dobu přihojení erytroidní linie, na dobu úplného přechodu na erytropoezu dárce a na počet podaných erytrocytových transfuzních přípravků.

Sledovala jsem 104 pacientů, u kterých byla provedena transplantace kmenových krvetvorných buněk. Pacienty jsem rozdělila do čtyř skupin podle druhu neshody (velká, malá, kombinovaná) nebo shody s dárce v AB0 systému. U pacientů po transplantaci byla opakovaně vyšetřována krevní skupina metodou sloupcové aglutinace v gelu, která umožňuje odlišit dvojí populaci erytrocytů pocházející z původní krvetvorby příjemce a nově vznikající krvetvorby dárce, pokud se liší v antigenech AB0 nebo RhD.

Při hodnocení výsledků jsem zjistila statisticky významné prodloužení doby přihojení erytroidní linie u pacientů s velkou neshodou způsobené destrukcí nově vznikajících prekurzorů erytrocytů dárce protilátkami anti-A, anti-B v krvi příjemce. Prodloužení doby úplného přechodu na erytropoezu dárce ani zvýšení spotřeby erytrocytových transfuzních přípravků za toto období nebylo u velké neshody statisticky významné. U sledovaných pacientů jsem neprokázala vliv výšky vstupního titru aglutininů na sledované parametry.

Při studiu zahraniční odborné literatury jsem našla nové poznatky, na základě kterých bylo na Transfuzním oddělení po konzultaci s lékaři přistoupeno ke změně AB0 skupiny podávaných plazem pacientům s malou a kombinovanou neshodou v období po přechodu na erytropoezu dárce.

Klíčová slova: transplantace kmenových krvetvorných buněk, krevní skupiny, AB0 inkompatibilita, přihojení erytrocytů

Abstract

ABO incompatibility between the recipient and the donor is not a barrier for successful haematopoietic stem cell transplantation. Even though it is the HLA compatibility that has a major impact on engraftment, ABO incompatibility may cause a number of complications, e.g. both immediate and delayed haemolytic reaction, pure red cell aplasia and a higher level of GvHD. In my Bachelor's thesis, I investigated the influence of ABO incompatibility and the level of the initial titer of isoagglutinins on the red blood cell engraftment time, on the time of the complete transition to the donor erythropoiesis and on the number of transfused red blood cell products.

I followed 104 patients who underwent haematopoietic stem cell transplantation. I divided the patients into four groups according to the ABO mismatch type (major, minor, bidirectional) or ABO match with the donor. In patients after transplantation, the blood group was repeatedly examined using the micro-column gel technique, which enables us to distinguish the dual population of donor and recipient derived erythrocytes, if they differ in the ABO or RhD antigens.

The analysis revealed a statistically significant delayed red blood cell engraftment in patients with major mismatch caused by the destruction of newly forming precursors of the erythrocytes of the donor by anti-A, anti-B antibodies in the blood of the recipient. Neither prolongation of the time to complete transition to the erythropoiesis of the donor nor increased requirement of red blood cell products in this period of time were statistically significant in the case of major mismatch. There was no impact of the level of the initial titer of isoagglutinins on the monitored parameters in the examined patients.

Foreign medical literature provides new findings based on which, after a consultation with physicians at the Transfusion Department, we agreed to change the ABO group of plasma products transfused to patients with minor and bidirectional mismatch after the transition to the erythropoiesis of the donor.

Key words: haematopoietic stem cell transplantation, blood groups, ABO incompatibility, red blood cell engraftment

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2016

.....

Alena Pechmanová

Poděkování

Ráda bych poděkovala MUDr. Evě Fronkové, vedoucí mé bakalářské práce, za odborné konzultace a podnětné připomínky, dále primárce MUDr. Jarmile Hrubé za umožnění zpracovávat moji bakalářskou práci na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Plzeň a Bc. Marinu Lebovi z katedry kybernetiky ZČU Plzeň za pomoc s testováním statistické významnosti získaných dat. Rovněž děkuji svým kolegyním a kolegům a také své rodině za podporu a toleranci.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	10
1 Teoretická část	11
1.1 Krvetvorba	11
1.3 Imunohematologie	12
1.3.1 Antigeny erytrocytů	12
1.3.2 Protilátky proti erytrocytům	13
1.3.4 Systémy krevních skupin	14
1.3.4.1 AB0 systém	14
1.3.4.2 Rh systém	16
1.3.4.3 Ostatní systémy krevních skupin	18
1.3.5 Imunitní hemolýza	19
1.4 Transplantace kmenových krvetvorných buněk	19
1.4.1 Autologní transplantace	20
1.4.2 Alogenní transplantace krvetvorných buněk	20
1.4.3 Výběr vhodného dárce pro alogenní transplantaci	21
1.4.3.1 Příbuzný dárce	21
1.4.3.2 Registry dobrovolných dárců	22
1.4.4 Zdroje kmenových krvetvorných buněk	23
1.4.4.1 Kostní dřeň	23
1.4.4.2 Periferní kmenové buňky krvetvorby	23
1.4.4.3 Pupečnicková krev	24
1.4.5 Reakce štěpu proti hostiteli - GvHD	25
1.4.6 Selhání a rejekce štěpu	25
1.4.7 Reakce štěpu proti leukemii - GvL	25
1.4.8 Přihojení	26
1.4.9 Neshody v systému krevních skupin u HSCT	26
1.4.9.1 Neshody v systému AB0	27

1.4.9.2 Neshody v ostatních antigenních systémech erytrocytů.....	29
1.4.9.3 Podávání transfuzních přípravků po HSCT.....	30
2 Cíle práce	31
3 Hypotézy.....	32
4 Metodika	33
4.1 Vyšetření krevních skupin AB0 a RhD antigenu	34
4.1.1 Vyšetření pacientů před HSCT.....	34
4.1.1.1 Metoda sklíčková	34
4.1.1.2 Metoda zkumavková	35
4.1.2 Vyšetření pacientů po HSCT.....	38
4.1.2.1 Sklíčková metoda.....	38
4.1.2.2 Metoda sloupcové aglutinace v gelu	38
4.2 Vyšetření titru aglutininů anti-A a anti-B	42
4.3 Kontrola kvality.....	43
4.4 Kalibrace a validace.....	44
4.5 Statistické zpracování dat.....	44
4.6 Určení doby přihojení erytroidní linie	44
4.7 Určení doby úplné změny erytropoezy	45
5 Výsledky	46
5.1 Přihojení erytroidní linie	46
5.2 Úplný přechod na erytropoezu dárce.....	48
5.3 Podané erytrocytové TP do změny erytropoezy.....	50
5.4 Podané erytrocytové TP prvních 6. měsíců po HSCT	51
5.5 Vliv titru aglutininů	51
6 Diskuze	54
7 Závěr.....	57
8 Seznam použité literatury	58
9 Přílohy	64

Seznam použitých zkratk

BFU-E	Burst forming unit-erythroid (časný erytroidní prekurzor)
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide (mezinárodní databáze dárců dřeně)
CD	Cluster of differentiation / designation (označení povrchových molekul buněk)
CFU-E	Colony forming unit-erythroid (pozdní erytroidní prekurzor)
CFU-G	Colony forming unit-granulocyte (prekurzor pro granulocyty)
CFU-GEMM	Colony forming unit - granulocytes, erythrocytes, monocytes/ macrophages, megakaryocytes (multipotentní kmenová buňka pro granulocyty, erytrocyty, monocyty/makrofágy a megakaryocyty)
CFU-GM	Colony forming unit - granulocyte – macrophage (společný progenitor pro granulocyty a makrofágy)
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina etylendiamintetraoctová)
EMDIS	European Marrow Donor Information System (Evropský informační systém dárců dřeně)
FN	Fakultní nemocnice
GM-CSF	Granulocyte - macrophage - colony stimulating factor (růstový faktor pro granulocyty a makrofágy)
G-CSF	Granulocyte - colony stimulating factor (růstový faktor pro granulocyty)
GvHD	Graft versus host disease (reakce štěpu proti hostiteli)
GvL	Graft versus leukemia (reakce štěpu proti leukemii)
HLA	Human leukocyte antigen (lidský histokompatibilní antigen)
HSC	Hematopoietic stem cell (kmenová krvetvorná buňka)

HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (transplantace kmenových krvetvorných buněk)
HTR	Hemolytická potransfuzní reakce
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
KS	Krevní skupina
PLS	Passenger lymphocyte syndrome
PRCA	Pure red cell aplasia (čistá aplazie červené řady)
RIC	Reduced intensity conditioning (přípravný režim s redukovanou intenzitou)
SCF	Stem cell factor (růstový faktor kmenových buněk)
SOP	Standardní operační postup
TA-GvHD	Transfusion-Associated GvHD (s transfuzí spojená reakce štěpu proti hostiteli)
TO	Transfuzní oddělení
TP	Transfuzní přípravek

Úvod

Transplantace kmenových krvetvorných buněk jsou v současné době součástí léčby některých hematologických chorob, solidních nádorů, ev. i metabolických poruch a autoimunitních onemocnění. Její počátky sahají do 50. let dvacátého století, kdy byla hlavním cílem léčba poruch krvetvorby po masivním ozáření. Byly zkoumány účinky radioaktivity na organismus, popsána nemoc z ozáření, zároveň byl zjištěn imunosupresivní i protinádorový účinek celotělového ozáření a jeho destrukční vliv na krvetvorbu. (1)

První pokusy o obnovení krvetvorby byly prováděny na zvířatech. Výsledky prvních transplantací kostní dřeně u lidí nebyly dobré, přežívání pacientů po transplantaci bylo v řádu týdnů. Bylo to způsobeno neznalostí HLA systému, imunitního systému, nedostupností širší nabídky antibiotik, antimykotik, imunosupresiv, růstových faktorů a kvalitní podpůrné terapie. Jako zdroj hematopoetických buněk byla využívána kostní dřeň odebraná z lopat kyčelních kostí příbuzných dárců. Po objevení HLA systému v roce 1968 se začalo s typováním HLA antigenů u pacientů a dárců. Díky tomu se zlepšila úspěšnost prováděných transplantací, bylo možné provádět alogenní transplantace kostní dřeně od nepříbuzných dárců, u kterých byla zjištěna shoda v HLA znacích s pacienty. V 70. letech 20. století byly založeny první registry dárců kostní dřeně. Byla vypracována technika zamrazování kmenových krvetvorných buněk, což umožnilo rozvoj autologních transplantací. (2) V devadesátých letech 20. století se začaly používat pro transplantace kmenové krvetvorné buňky získané z periferní krve, v současné době tento zdroj převažuje nad odběry kostní dřeně. (3)

Při výběru vhodného dárce kmenových krvetvorných buněk je nejdůležitější shoda v HLA systému. Neshoda v antigenních systémech erytrocytů příjemce a dárce není překážkou provedení transplantace, přestože může způsobovat i závažné komplikace. Sledování vlivu neshody v ABO systému a výšky vstupního titru aglutininů na dobu přihojení štěpu (erytroidní linie), na dobu potřebnou k úplnému přechodu na erytropoezu dárce i na množství podaných transfuzních přípravků je předmětem mé bakalářské práce.

1 Teoretická část

1.1 Krvetvorba

Krevní buňky se začínají vyvíjet ve žlutkovém váčku ve 2. až 3. týdnu embryonálního vývoje, po 6. týdnu začíná embryonální krvetvorba v játrech, později i ve slezině. Od 20. týdne nastává medulární období, krvetvorba se objevuje v kostní dřeni, která je definitivním krvetvorným orgánem. Současně postupně ustává hematopoéza v játrech a slezině a zcela zaniká ve 2. - 3. týdnu po porodu. Může se tam však znovu obnovit za určitých podmínek i v dospělosti. (2)

Krvetvorba zdravých lidí probíhá v tzv. červené kostní dřeni, která se vyskytuje u dětí v dlouhých a plochých kostech, později je v dlouhých kostech nahrazována žlutou hematopoeticky neaktivní kostní dřeni, ve které převládají tukové buňky. U dospělého člověka zůstává medulární hematopoéza zachována v hrudní kosti, pánevní kosti a v tělech obratlů. (4)

Kmenové krvetvorné buňky (hematopoietic stem cells - HSC) se v kostní dřeni uchovávají jako zdroj krvetvorby po celý život. Jsou to malé jaderné multipotentní buňky, které nelze odlišit morfologicky, jsou značně heterogenní a dokonce i mobilní. Většinou se vyskytují v G_0 (klidové) fázi buněčného cyklu. (4) Mají schopnost sebeobnovy (self-renewal), tím je udržován jejich stálý počet v kostní dřeni, a zároveň se mohou diferencovat do zralejších kmenových buněk (committed cells), ze kterých pak vycházejí jednotlivé krvetvorné řady. (2, 4)

Všechny linie lymfoidní i nelymfoidní se odvíjí od společné kmenové buňky krvetvorby, z té dále vzniká kmenová buňka pro lymfoidní řadu a multipotentní kmenová buňka CFU-GEMM pro nelymfoidní řady - granulocytovou, erytrocytovou, monocyto-makrofágovou a megakaryocytovou. Z CFU-GEMM se dále odděluje společný progenitor pro erytroidní a megakaryocytární řadu a CFU-GM (progenitor pro granulocytární/monocytární řadu). Vývoj erytroidní řady pokračuje přes BFU-E a CFU-E k proerytroblastům, dále přes bazofilní, polychromatofilní a ortochromní erytroblasty, retikulocyty a končí u erytrocytů. (2, 4) Megakaryocytární linie se vyvíjí

v BFU-Meg, CFU-Meg, přes promegakaryoblasty až k megakaryocytům, ze kterých vznikají trombocyty odštěpováním útržků jejich cytoplazmy. Z CFU-GM se odděluje monodendritický prekurzor, který dává vzniknout samostatnému prekurzoru pro dendritické buňky a prekurzoru pro monocyty. Dále se CFU-GM vyvíjí v CFU-G, ze kterého se diferencuje prekurzor pro neutrofilní granulocyty a prekurzor pro bazofilní a eosinofilní granulocyty a mastocyty. (2)

Hematopoezu ovlivňují růstové faktory erythropoetin, trombopoetin, GM-CSF, G-CSF, stem cell faktor (SCF), řada interleukinů a další. Růstové faktory působí specificky na jednotlivé druhy kmenových buněk vazbou na receptory na jejich povrchu. (2, 4)

1.3 Imunohematologie

1.3.1 Antigeny erytrocytů

Antigeny krevních skupin mají strukturu glykoproteinů, lipoproteinů nebo glykolipidů zabudovaných do membrány erytrocytů, ev. i jiných buněk. Přítomnost těchto antigenů lze určit protilátkou, kterou si tvoří jedinci po kontaktu s erytrocyty nesoucími antigen, který se nevyskytuje na jejich vlastních buňkách. (5, 6)

Antigeny jsou geneticky kódované, každý antigen je určován jedním párem genů (alelickým párem), jeden gen pochází od otce, druhý od matky. Varianta genu se označuje jako alela. Pokud jsou v páru dvě shodné alely, jedná se o homozygotní kombinaci, pokud jsou kvalitativně odlišné, jedná se o kombinaci heterozygotní. Dominantní alela se prosadí při vytváření antigenu na erytrocytech proti alele recesivní, alely kodominantní se prosadí stejnou měrou, na červených krvinkách jsou pak přítomny oba antigeny kódované těmito alelami. Kombinace alel je označována jako genotyp, výsledné antigeny na povrchu erytrocytů jako fenotyp. Některé alely jsou amorfní, nekódují tvorbu žádného antigenu, který by bylo možné prokázat standardními metodami. Přítomnost amorfní alely lze prokázat, pouze pokud se vyskytuje v homozygotní formě. Jedná se např. o krevní skupinu 0. (6)

1.3.2 Protilátky proti erytrocytům

Protilátky proti erytrocytovým antigenům patří do skupiny imunoglobulinů, jsou nejčastěji třídy IgG, IgM, ev. i IgA. Základní jednotka imunoglobulinu je tvořena dvěma těžkými řetězci (H), ke každému je disulfidickou vazbou připojen jeden lehký řetězec (L). Těžké řetězce jsou v tzv. pantové oblasti spojeny dalšími disulfidickými vazbami. Lehké řetězce jsou tvořeny dvěma imunoglobulinovými doménami, těžké řetězce čtyřmi až pěti dle typu řetězce. Na N-konci těžkých i lehkých řetězců jsou umístěny variabilní domény, dohromady vytvářejí vazebné místo pro antigen. Ostatní domény mají u řetězců stejného typu shodnou strukturu, označují se jako konstantní.

Pokud bychom za použití enzymu papainu rozštěpili molekulu imunoglobulinu v pantové oblasti, vznikly by z lehkých a těžkých řetězců dva fragmenty Fab se specifitou k antigenu a jeden fragment Fc tvořený těžkými řetězci, který je zodpovědný za vazbu na Fc receptor fagocytů a komplementový protein C. (8)

Rozeznáváme lehké řetězce κ a λ , a pět typů těžkých řetězců μ , γ , α , ϵ a δ . Imunoglobuliny rozdělujeme do pěti tříd podle toho, jaký druh těžkého řetězce se nachází v jejich molekule. Imunoglobuliny třídy IgM obsahují řetězce μ , IgG řetězce γ , IgA α , IgE ϵ a IgD δ . (8)

Protilátky typu IgG jsou monomery. (5) Po vazbě Fab fragmentu na antigen mohou vázat komplement. Nejlépe aktivují komplement podtřídy IgG1 a IgG3, IgG2 méně a IgG4 vůbec. Aktivace pokračuje většinou pouze ke složce C3 a proto málokdy dojde až k hemolýze. (5, 6) Fc fragment IgG se však navazuje na buňky, které mají pro něj přítomen receptor (monocyty, makrofágy, leukocyty) a tím usnadní fagocytózu antigenu navázaného na Fab část imunoglobulinu. (5)

Protilátky typu IgM mají velkou molekulu, pět molekul imunoglobulinu je vázáno spojovacím řetězcem. Při imunitní odpovědi organismu na kontakt s antigenem vzniká IgM jako první ze všech tříd imunoglobulinů, až s určitým opožděním nastává tvorba imunoglobulinu IgG. (5, 6) Díky své pentamerní struktuře obsahuje jedna molekula IgM deset Fab fragmentů, které se mohou navázat na antigeny. Vazbou Fc části na složku

komplementu C1 spouští aktivační kaskádu komplementu, která vede až k intravaskulární hemolýze navázaných erytrocytů. (7)

Bylo popsáno i přímé působení protilátek navázaných na erytrocyty vedoucí ke změně uspořádání membrány, vzniku lipidových pórů prostupných pro kationt (Ca^{2+}), což vede k narušení struktury membrány a následné lýze erytrocytů. (7)

Přirozené protilátky proti antigenům, které se nevyskytují na vlastních erytrocytech, mohou vznikat kontaktem s antigeny z životního prostředí, které mají podobnou strukturu jako erytrocytární antigeny. Přirozené protilátky mohou být pravidelné (aglutininy anti-A, anti-B) nebo nepravidelné (např. protilátka anti-Le(a), anti-Le(b), anti-M) a jsou většinou třídy IgM. (5, 7)

Imunní (nepravidelné) protilátky vznikají po kontaktu imunitního systému jedince s cizorodými erytrocyty po transfuzích nebo v těhotenství. Jsou nejčastěji třídy IgG,

Protilátky, které vznikají proti antigenu, který se nevyskytuje na vlastních erytrocytech, označujeme jako aloprotilátky a ty, které se vytváří proti vlastním antigenům, jako autoprotilátky. Jejich přítomnost je známkou autoimunitního onemocnění. (5)

1.3.4 Systémy krevních skupin

1.3.4.1 AB0 systém

AB0 systém je z hlediska transfuzí nejdůležitějším systémem krevních skupin, protože se u lidí vyskytují přirozené pravidelné protilátky proti antigenu, který není přítomen na vlastních erytrocytech. Pokud by nebyla dodržena kompatibilita transfuze v AB0 systému, způsobily by tyto protilátky (aglutininy) závažnou akutní hemolytickou potransfuzní reakci. (7)

AB0 gen má tři základní alely: A, B a 0 uložené na 9. chromozomu. Alely A a B jsou kodominantní, alela 0 je vůči nim recesivní. Alely A a B kódují syntézu enzymu glykosyltransferázy, která katalyzuje připojení imunodominantního monosacharidu k prekurzorové substanci H. Transferáza řízená genem A připojuje na H antigen

N-acetylgalaktosamin, transferáza řízená genem B navazuje na H antigen D-galaktózu. Alela 0 nekóduje syntézu žádného enzymu (tichá alela) a proto se na prekurzorovou substanci H nenavazuje žádný monosacharid. (5) Na 19. chromosomu je lokalizován gen H, který řídí syntézu enzymu H-transferázy, katalyzující přenos a navázání fukózy k oligosacharidovému řetězci a vedoucí ke vzniku prekurzoru H. (5, 7)

U AB0 systému se vyskytují pravidelné protilátky anti-A (u osob krevní skupiny B a 0), anti-B (u osob krevní skupiny A a 0), ev. bispecifická protilátka anti-A,B (u osob krevní skupiny 0). Protilátky (aglutininy) anti-A a anti-B se vytváří přirozeně bez předchozí imunizace cizími erytrocyty na základě kontaktu organismu jedince s antigeny obsaženými ve stravě, v membráně bakterií, které mají podobnou strukturu jako antigeny AB0 systému. Organismus si vytváří protilátku proti antigenu, který se nenachází na vlastních erytrocytech. (5, 7) Nevyskytují se u novorozenců, jejich titer se postupně zvyšuje až do 5. roku života, kdy dosahuje normálních hodnot. (5) Protilátky anti-A a anti-B jsou třídy IgM. Vzácně se vyskytují ve třídě IgG nebo IgA, zejména po předchozí imunizaci nestejnoskupinovými erytrocyty (např. při imunizaci matky erytrocyty plodu během těhotenství). U osob skupiny 0 se může vyskytovat bispecifická protilátka anti-A,B třídy IgG. (7)

Vylučování AB0 antigenů do tělních tekutin a sekretů řídí gen pro sekretorství s dominantní alelou *Se* a recesivní alelou *se*. Tento gen je nezávislý na genech pro AB0 antigeny. 80% jedinců má alespoň jednu alelu *Se*, jejich sekrety tak obsahují AB0 antigeny, u ostatních 20% jedinců s homozygotní kombinací alel *sese* nedochází k vylučování AB0 antigenů do tělních tekutin. (5)

U fenotypů A i B se vyskytují podskupiny odlišující se kvalitativně i kvantitativně. Jejich vznik je podmíněn přítomností mutací alel na lokusu pro AB0 systém. Nejčastěji se vyskytuje podskupina A_1 a A_2 , vzácně podskupiny A_3 , A_x , A_m , u kterých je antigen A na erytrocytech velmi slabě vyjádřen U některých osob se slabými podskupinami A se může vyskytovat nepravidelná protilátka anti- A_1 (čím slabší podskupina, tím častější výskyt anti- A_1). U osob podskupiny A_1 se může zřídka vyskytovat protilátka anti-H. Tyto nepravidelné protilátky nebývají klinicky významné (na rozdíl od pravidelně se vyskytujících protilátek anti-A a anti-B). (5, 7)

Získané změny AB0 systému mohou nastat vlivem některých onemocnění (např. akutní myeloidní leukemie), kdy může dojít k zeslabení antigenu A. U bakteriálních infekcí trávicího traktu osob krevní skupiny A může naopak dojít k tvorbě získaného antigenu B působením bakteriálních enzymů. Dočasné změny v antigenech krevních skupin pozorujeme u pacientů po masivních nestejnokupinových transfuzích. K trvalé změně krevní skupiny dochází u pacientů po úspěšné alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. (5, 7)

Výskyt jednotlivých antigenů AB0 systému se liší v různých populacích. Rozdílnost v zastoupení krevních skupin ve světě je zřejmě dána odlišnou citlivostí nositelů jednotlivých antigenů na infekce během vývoje populací. (5, 7) Celosvětově je nejvyšší frekvence výskytu krevní skupiny 0, v České Republice se nejčastěji vyskytuje skupina A (40% populace), pak krevní skupina 0 (34%), B (18%) a nejméně skupina AB (8% populace). (7)

1.3.4.2 Rh systém

Rh systém je velice polymorfní a po AB0 systému je to nejdůležitější antigenní systém pro krevní transfuzi. Rh antigeny můžeme na krvetvorných buňkách detekovat již v počátku jejich diferenciaci. Rh antigeny se zřejmě podílejí na transmembránovém transportu a účastní se přenosu O_2 a CO_2 . (5)

Geny kódující tvorbu Rh antigenů jsou umístěny na 1. chromozomu. Gen RHD řídí tvorbu antigenu D a gen RHCE kóduje antigeny C, c, E, e. (5, 7) Do dnešní doby bylo identifikováno pomocí polyklonálních protilátek celkem 53 antigenů Rh systému. Při označování Rh antigenů se používají různé nomenklatury: ISTB numerická klasifikace, Wienerův Rh/Hr systém a nejčastěji používaný Fisherův CDE systém. (7) Nejvýznamnější je antigen D, podle jeho přítomnosti dělíme erythrocyty na RhD pozitivní a RhD negativní.

Protilátky proti antigenům Rh systému jsou imunní, vznikají po transfuzích nebo v těhotenství, jsou zejména typu IgG a většinou neaktivují komplement. Vzácně se vytvářejí přirozeně (např. protilátka anti-E po některých infekcích). (6, 7)

- **Antigen D**

Antigen D je velice imunogenní, po transfuzi RhD pozitivních erytrocytů RhD negativnímu příjemci dochází až v 80% případů ke vzniku imunní protilátky anti-D. Při dalších transfuzích RhD pozitivních erytrocytů by tato protilátka vyvolala hemolytickou potransfuzní reakci. (7) Protilátka anti-D může rovněž vznikat v těhotenství u RhD negativní matky, která si vytváří imunní protilátky proti RhD pozitivním erytrocytům plodu, a způsobit tak hemolytické onemocnění novorozence. (5, 7)

D antigen se vyskytuje u 85% kavkazské populace, zbývajících 15% populace je RhD negativních. Na povrchu RhD proteinu lze pomocí monoklonálních protilátek prokázat více jak 30 epitopů D antigenu. Chyběním jednoho nebo několika epitopů (ať už je to způsobeno bodovou mutací či hybridní formou proteinu) vzniká variantní forma D antigenu (D^{variant}), sníženou expresi D antigenu bez fenotypových odlišností označujeme jako slabý D antigen (D^{weak}). (7)

- **Antigeny C, c, E, e**

Antigeny C/c, E/e jsou kódovány RHCE genem. Frekvence C+ v kavkazské populaci je 65-70%, c+ 80-85%, E+ 25-30%, e+ 98%. (26, str. 169) Protilátky proti těmto antigenům jsou klinicky významné, mohou se vyskytovat samostatně nebo v kombinaci s protilátkou anti-D. (5)

- **Antigen Cw**

Antigen Cw se vytváří změnou proteinu, obvykle vzniká u haplotypu DCE. U kavkazské populace je zastoupen v 1-2%, v naší populaci se vyskytuje častěji, cca v 5-6%. Imunní protilátky proti antigenu Cw jsou klinicky významné. (5, 7)

1.3.4.3 Ostatní systémy krevních skupin

- **Kell systém**

Z genetického hlediska je Kell systém podobně složitý jako Rh systém, v současnosti je identifikováno 33 antigenů tohoto systému, nejvýznamnějším je antigen K. (6) V kavkazské populaci se vyskytuje v 9%, je silně imunogenní. (7) Protilátky proti antigenu K jsou typu IgG, vyvolávají vážné hemolytické potransfuzní reakce (HTR).(5)

- **Duffy systém**

Hlavními antigeny tohoto systému jsou Fy^a a Fy^b se zastoupením fenotypů v populaci: $Fy(a+b-)$ 17%, $Fy(a+b+)$ 49% a $Fy(a-b+)$ 34%. (8) Protilátky proti těmto antigenům jsou imunní, typu IgG, mohou vyvolat aktivaci komplementu a způsobit HTR. (7)

- **Kidd systém**

Systém Kidd je tvořen antigeny $Jk(a)$ s výskytem v populaci 76% a $Jk(b)$ s výskytem 72%. Významné jsou protilátky proti antigenům tohoto systému. Po imunizaci velmi rychle klesá titer protilátek, proto jsou obtížně detekovatelné při předtransfuzním vyšetření. Vyskytují se často jako směs IgG s IgM, které aktivují komplement a proto může dojít i k závažným potransfuzním reakcím. (7)

- **MNSs systém**

Geny kódující MNSs antigeny se nacházejí v komplexu dvou lokusů, jeden lokus pro alely MN, druhý pro Ss. Protilátky anti-M i anti-N jsou často přirozené, chladové, ale mohou být i tepelné typu IgG a pak způsobují potransfuzní reakce.

Protilátky anti-S a anti-s jsou většinou imunní, tepelné typu IgG a mohou způsobovat těžké potransfuzní reakce. (6)

Existuje ještě mnohem více antigenních systémů erytrocytů (např. systém Lewis, Lutheran, P systém, Diego, Cartwright, Colton a další), jejich výčet a charakteristika však není tématem této práce.

1.3.5 Imunitní hemolýza

Při prvním kontaktu s antigenem se protilátky vytvářejí postupně, až za několik týdnů. Po opakovaném setkání se stejným antigenem je sekundární imunitní odpověď rychlá a během několika dnů se vytváří vysoký titer protilátek. Reakce protilátky s antigenem erytrocytů vyvolá hemolytickou reakci. Její intenzita a průběh závisí na vlastnostech protilátky a antigenu a na stavu imunitního systému jedince.

Při krevní transfuzi je nejnebezpečnější inkompatibilita v AB0 systému, protože antigeny A a B jsou na povrchu erytrocytů silně vyjádřené a aglutininy anti-A a anti-B jsou třídy IgM, schopné aktivovat komplement, způsobit intravaskulární hemolýzu a tím akutní hemolytickou potransfuzní reakci. (6) Ve výjimečných případech (při vysokém titru protilátek typu IgM) může být intravaskulární hemolýza způsobena protilátkami proti antigenům v jiném systému krevních skupin erytrocytů. (7)

Protilátky typu IgG (zejména podtřídy IgG3 a IgG1) např. proti antigenům Rh systému, Kell nebo Duffy se navazují na transfundované erytrocyty nesoucí daný antigen, Fc části navázaných imunoglobulinů jsou rozpoznány monocyty a makrofágy, dochází k fagocytóze erytrocytů s navázanou protilátkou, jejich extravaskulárnímu rozpadu a tím k pozdní hemolytické potransfuzní reakci.

1.4 Transplantace kmenových krvetvorných buněk

Transplantace kmenových krvetvorných buněk (hematopoietic stem cells transplantation - HSCT) je léčebnou metodou řady hematologických onemocnění,

využívá se však i při léčbě některých solidních nádorů a autoimunitních onemocnění. Zdrojem krvevorných buněk je buď sám pacient nebo příbuzný či nepříbuzný dárce. Pacient musí před transplantací podstoupit přípravný režim, převod krvevorných buněk se provádí nitrožilní infuzí. V období po transplantaci je pacient ohrožen řadou komplikací. (9)

1.4.1 Autologní transplantace

Autologní transplantace se používá především při léčbě lymfomů a myelomů, některých typů akutních leukemií i solidních tumorů (karcinom prsu, ovaria). Zdrojem krvevorných buněk je sám pacient. Krvevorné buňky se pacientovi odebírají cyaferézou několik týdnů až měsíců před vlastní transplantací ve fázi remise onemocnění, jsou konzervovány a zmrazeny v tekutém dusíku při -196°C . Následně je pacientovi aplikována vysokodávková chemoterapie, která může být kombinovaná s ozářením. Tato léčba má vysoce efektivní protinádorový účinek, ale je zároveň toxická pro krvevornbu. Proto se po chemoterapii pacientovi vrací jeho hematopoetické buňky, které zajistí obnovu krvevornby.

Hlavním rizikem pro pacienta v posttransplantačním období, kdy je dřeňová aplazie, jsou především bakteriální infekce. Ostatní závažné komplikace nenastávají často, a proto jsou autologní transplantace vhodné i pro starší pacienty. Obnova krvevornby nastává za 2 až 3 týdny po transplantaci. (7)

1.4.2 Alogenní transplantace krvevorných buněk

Alogenní transplantace je indikována zejména u pacientů s akutní myeloidní leukemií, akutní lymfatickou leukemií, non-Hodkinovým lymfomem, myelofibrózou, chronickou myeloidní leukemií, chronickou lymfatickou leukemií, mnohočetným myelomem, u těžkých aplastických anemií, některých typů myelodysplastického syndromu, vrozených poruch krvevornby a vrozených metabolických onemocnění. (3, 10)

Protinádorový účinek alogenní transplantace je zajištěn nejen terapií před vlastní transplantací, ale i protinádorovým působením převedených imunokompetentních buněk dárce. (9) Aby bylo dosaženo co největšího účinku tohoto procesu, měl by být pacient v době transplantace v remisi, protože tak jeho organismus obsahuje nejmenší množství nádorových buněk. (2, 9)

Při výběru přípravného režimu před transplantací je zohledňován klinický stav příjemce a druh základního onemocnění. Přípravný režim může být myeloablativní, který má za následek radikální odstranění kostní dřeně, vytvoření prostoru pro uchycení dárcovské krvetvorby, maximální protinádorový účinek a účinnou imunosupresi. (9, 11) Nevýhodou myeloablativního režimu je jeho vysoká celková toxicita, což s sebou přináší život ohrožující komplikace v období po transplantaci. Proto jsou v současné době čím dál více používané přípravné režimy s redukovanou intenzitou (reduced intensity conditioning – RIC), které jsou méně cytotoxické a jsou zaměřené především na úplnou imunosupresi u příjemce. (2, 9) Jejich nevýhodou je vyšší výskyt relapsů nádoru. (11) Vzhledem k náročnosti celé léčby, i přes použití RIC, mohou alogenní transplantaci jen výjimečně podstoupit pacienti starší 55 - 65 let. (2)

Pacienta po alogenní transplantaci ohrožují všechny druhy oportunních infekcí, bakteriální, virové, mykotické. Pomocí imunosupresiv je tlumena i imunitní odpověď dárce proti příjemci. Přesto se u pacientů rozvíjí reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), která je spojena s mnoha komplikacemi. (2, 7) Pro velká rizika spojená s transplantací hematopoetických buněk je tato léčba využívána pouze u pacientů, kteří jinak nemají šanci na vyléčení nebo prodloužení života. (3)

1.4.3 Výběr vhodného dárce pro alogenní transplantaci

1.4.3.1 Příbuzný dárce

Pro provedení alogenní transplantace je zapotřebí získat vhodného dárce krvetvorných buněk. Dárce může být příbuzný nebo nepříbuzný. S vyhledáváním se začíná přímo v rodině pacienta. U syngenní transplantace je dárce jednovaječné

dvojče pacienta se shodnou genetickou výbavou. Dárce může být i HLA identický sourozenec (shodný ve všech HLA znacích). Vzhledem k tomu, že HLA geny se vzhledem ke své těsné lokalizaci dědí po haplotypech, je pravděpodobnost shody v HLA antigenech I. a II. třídy u sourozenců 25%, u ostatních příbuzných ještě mnohem nižší. Pokud se nenajde vhodný dárce v rodině pacienta, vyhledává se nepřibuzný dárce v registru dobrovolných dárců. V poslední době je možnost transplantovat hematopoetické buňky od haploidentického dárce, kterým je např. rodič darující pro své dítě ev. naopak. U těchto transplantací je shoda pouze v polovině HLA antigenů (5/10). Je nutný kvalitní štěp s dostatečným množstvím krvetvorných buněk a jeho úprava deplecí T-lymfocytů. (2, 9) U příjemců haploidentického štěpu později vyžívá imunita, což s sebou nese mnoho komplikací. (9)

1.4.3.2 Registry dobrovolných dárců

V České republice existují 2 registry: Český národní registr dárců dřeně se sídlem v Plzni a Český registr dárců krvetvorných buněk se sídlem v Praze. Nepodaří-li se vybrat vhodného dárce v ČR, vyhledává se HLA kompatibilní dárce v několika desítkách světových registrů, jejichž databáze jsou navzájem propojené a nahlížení do nich zprostředkovávají organizace BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide) a EMDIS (European Marrow Donors Information System). (12) Evidováno je více než 24 000 000 dobrovolných dárců a jejich počet stále roste. (13) Na základě vyšetření DNA je u dárce a příjemce požadována shoda ideálně 10/10 (v některých případech i 9/10) pro HLA geny I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C) a II. třídy (HLA-DRB1, HLA-DQB1). Každá neshoda ve vyšetřovaných genech negativně ovlivňuje přežívání pacientů po transplantaci v důsledku zhoršeného připojení štěpu a vyššího rizika GvHD. (9, 12) U pokročilých maligních, ev. relabujících onemocnění může však tato neshoda zvýšením GvHD a tím i GvL (reakce štěpu proti leukemii) mít silnější protinádorový efekt a tak snižovat riziko relapsu. (12, 4) Velmi důležitá je i rychlost nalezení vhodného dárce, při prodlení nemusí k transplantaci už vůbec dojít kvůli zhoršenému klinickému stavu pacienta. (9, 12)

Inkompatibility v systémech krevních skupin erytrocytů (ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd aj.) s sebou mohou přinést komplikace při převodu štěpu i v posttransplantačním období, ale při dodržení účinných opatření, které snižují rizika plynoucích z těchto neshod, nejsou překážkou provedení transplantace. (7)

1.4.4 Zdroje kmenových krvetvorných buněk

Existují tři zdroje kmenových krvetvorných buněk. Patří mezi ně kostní dřeň, kmenové buňky krvetvorby získané z periferní krve a pupečnicková krev.

1.4.4.1 Kostní dřeň

Fyziologicky se vyskytují kmenové buňky krvetvorby především v kostní dřeni. Odběr kostní dřene se provádí v celkové anestezii (popř. v epidurální či spinální anestezii). Punkční jehlou se potřebné množství kostní dřene odsaje bilaterálně z lopat kostí kyčelních. Objem odebrané dřene závisí na váze příjemce. (14) Obvykle se odsává cca 15ml na 1kg hmotnosti dárce, což je 800 – 1500 ml, 40% objemu štěpu tvoří erytrocyty. (6) Krevní ztráta dárce při odběru se hradí transfuzí autologní krve, která byla dárci odebrána v době přípravy na odběr. (15) Za minimální množství se považuje více než $2 \cdot 10^8$ jaderných buněk získaných z odběru kostní dřene na 1 kg hmotnosti příjemce. (6)

1.4.4.2 Periferní kmenové buňky krvetvorby

Dříve byl odběr periferních kmenových buněk krvetvorby (PBSC - peripheral blood stem cells) používán pouze jako alternativa odběru kostní dřene, pokud byly problémy s odběrem (hypocelulární nebo fibrotická dřeň) nebo pro ABO inkompatibilitu mezi dárcem a příjemcem z důvodu vysokého obsahu erytrocytů v odebrané kostní dřeni. Odběr periferních kmenových buněk krvetvorby čím dál víc nahrazuje odběry kostní dřene, v současnosti jsou PBSC používány pro téměř všechny autologní a většinu alogenních transplantací. (3) Krvetvorné buňky nesou na svém povrchu znak CD34+.

Za normálních okolností se v periferní krvi vyskytuje velmi malé množství těchto buněk. (6)

Odběr (aferéza) PBSC se provádí na separátoru po předchozí stimulaci krvetvorby aplikací hematopoetických stimulačních faktorů (G-CSF, GM-CSF aj.), které způsobí krátkodobé namnožení krvetvorných buněk a jejich vyplavení do krevního oběhu. Pomocí flowcytometru je sledován vzestup koncentrace buněk CD34+ v krvi před odběrem i počet buněk CD34+ a CD3+ (T lymfocyty) získaných aferézou. Hodnocen je i celkový počet nukleárních buněk. (9) Za minimální počet CD34+ buněk získaných z periferní krve se považuje $2,0 \times 10^6/\text{kg}$ hmotnosti příjemce pro autologní transplantace a pro alogenní transplantace v rozmezí $2,5\text{-}5,0 \times 10^6/\text{kg}$ hmotnosti příjemce. (6)

U pacientů před autologní HSCT se podává chemoterapie, která vyvolá útlum kostní dřeně a pancytopenii v periferní krvi, ale začne stoupat počet buněk CD34+. Za několik dní po chemoterapii se pacientům aplikují růstové faktory. (6, 7)

PBSC získané ze separátoru jsou charakteristické nízkým obsahem erytrocytů, ale mnohem vyšším množstvím lymfocytů než v odebrané kostní dřeni, což zvyšuje riziko pozdní hemolytické reakce a GvHD u alogenních transplantací. (16)

1.4.4.3 Pupečnicková krev

Pupečnicková krev (cord blood - CB) je bohatá na kmenové buňky a proto ji lze využít pro transplantace hematopoetických kmenových buněk. Pupečnicková krev se odebírá ze zbytků pupečníku po porodu a její odběr nepředstavuje riziko pro matku ani pro novorozence. Uchovává se zmražená v tekutém dusíku ve speciálních kontejnerech v bankách pupečnickové krve. (17) Nevýhodou pupečnickové krve je její malé množství (typicky 100ml), které lze získat při odběru, a tím i menší množství kmenových buněk (průměrně 1×10^9 jaderných buněk na jednu jednotku pupečnickové krve) Z tohoto důvodu se pupečnicková krev používá především pro transplantace u dětí. Transplantace pupečnickovou krví tvoří proto pouze cca 1% všech HSCT. (17, 18)

1.4.5 Reakce štěpu proti hostiteli - GvHD

Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD - graft versus host disease) je způsobena imunokompetentními buňkami dárce, především T lymfocyty, které se do organismu příjemce dostanou převodem štěpu při alogenní transplantaci krvetvorných buněk nebo po orgánové transplantaci, pokud je v transplantovaném orgánu obsažen dostatek imunokompetentních buněk dárce. T-lymfocyty dárce identifikují buňky a tkáně příjemce jako cizí a navozují jejich degradaci. Vznik a stupeň rozvoje GvHD je ovlivněn především mírou shody v HLA antigenech – čím větší shoda, tím nižší stupeň GvHD. (7, 9)

GvHD je příčinou zvýšené posttransplantační morbidity a mortality. (10, 19) Vyšší riziko chronické GvHD je po alogenních transplantacích, u kterých jsou použity krvetvorné buňky z periferní krve, protože ve štěpu je obsaženo větší množství T lymfocytů. (7)

GvHD se může rozvinout i po transfuzi krve imunodeficientnímu příjemci (Transfusion-Associated GvHD). Je způsobena imunokompetentními buňkami dárce, především T lymfocyty, které se do organismu příjemce dostanou v transfuzním přípravku a reagují s rozdílnými antigeny příjemce. Účinnou prevencí je v tomto případě ozáření transfuzního přípravku. (8, 10)

1.4.6 Selhání a rejekce štěpu

K selhání štěpu (nedojde vůbec k přihojení) nebo k rejekci štěpu (po předchozím přihojení) může dojít z důvodu nedostatečného množství převedených krvetvorných buněk, jejich špatnému uchycení v kostní dřeni nebo z imunologických příčin, včetně aloimunizace příjemce. (9)

1.4.7 Reakce štěpu proti leukemii - GvL

GvL (graft versus leukemia) je založena na stejném principu jako akutní GvHD a je bohužel vždy spojena s určitým stupněm reakce štěpu proti hostiteli. Převedené

imunokompetentní buňky dárce, především T-lymfocyty, rozpoznají nádorové buňky pacienta a zahájí proti nim imunitní reakci. GvL tak funguje jako vysoce účinná protinádorová terapie. (2, 19) U autologních transplantací a alogenních syngenních transplantací, kdy je naprostá shoda v genetické výbavě štěpu a příjemce, nedochází ke GvL a z toho důvodu je u nich vyšší riziko relapsů. (2, 11)

1.4.8 Přihojení

Termín přihojení (engraftment) leukocytů je definován jako první ze 3 po sobě následujících dnů, kdy je absolutní počet neutrofilů větší než $0,5 \times 10^9/l$. (20)

Termín přihojení trombocytů je definován jako první ze 7 po sobě následujících dnů, kdy počet trombocytů je větší než $20 \times 10^9/l$ bez podání trombocytových TP. (20)

Termín přihojení erytrocytů je definován dnem, kdy počet retikulocytů stoupne nad $30 \times 10^9/l$. (20) Může být také hodnocen dle spotřeby erytrocytových TP. U pacientů, kteří nepotřebují transfuze, je přihojení erytrocytů určeno jako 30. den po transplantaci. U pacientů závislých na transfuzích je přihojení určeno dnem detekce erytrocytů krevní skupiny dárce při vyšetřování aglutinogenů nebo dnem poslední transfuze u pacientů, u kterých nenásledovalo další vyšetření krevní skupiny. (21, 22)

1.4.9 Neshody v systému krevních skupin u HSCT

Z důvodu rozdílné lokalizace HLA genů a genů kódujících antigeny erytrocytů nastávají neshody v AB0 a jiných systémech i u HLA kompatibilních dárců a příjemců. Neshody je možné rozdělit do dvou hlavních kategorií: velké a malé. U velké neshody (major incompatibility) má příjemce protilátky proti antigenům dárce, u malé neshody (minor incompatibility) má dárce protilátky proti antigenům příjemce. Dále se může vyskytnout stav, kdy dochází ke kombinaci obojího, tzn. že příjemce má protilátky proti antigenům dárce a dárce má protilátky proti antigenům příjemce. Tato neshoda se označuje jako kombinovaná (bilateral incompatibility). (16)

1.4.9.1 Neshody v systému AB0

Největší význam má inkompatibilita v AB0 systému, nastává u více než 30% alogenních transplantací od příbuzných dárců a více než 50% transplantací od nepříbuzných dárců. Alogenní transplantace hematopoetickými buňkami dárce, který je s příjemcem inkompatibilní v AB0 antigenech je proveditelná, ale nese s sebou riziko komplikací. (16)

- **Velká neshoda (major AB0 incompatibility)**

Jako velká neshoda v AB0 systému je označován stav, kdy příjemce má protilátky proti antigenům dárce. Nejčastěji tato situace nastává při převodu erytrocytů dárce skupiny A, B nebo AB do krevního oběhu příjemce krevní skupiny 0, u kterého jsou v plazmě přítomny aglutininy anti-A i anti-B. Méně často se vyskytuje major AB0 inkompatibilita, kdy je příjemci skupiny A s přirozeně se vyskytujícími aglutininy anti-B nebo příjemci skupiny B s aglutininy anti-A transplantován štěp od dárce skupiny AB. (25)

Hlavními komplikacemi, které se mohou vyskytnout při velké neshodě dárce a příjemce, je akutní hemolýza erytrocytů dárce během převodu štěpu, pozdní hemolýza, opožděná erytropoéza, která může vyústit až v čistou aplazii červené řady (pure red cell aplasia – PRCA). (23, 26)

Akutní hemolýza je závislá na celkovém množství a typu erytrocytů a jejich progenitorů ve štěpu a na množství a druhu specifických protilátek proti erytrocytům dárce. U některých příjemců může být titr aglutininů velice nízký, ev. mohou aglutininy chybět v důsledku intenzivní chemoterapie před transplantací. Akutní hemolýze lze zabránit deplecí erytrocytů ze štěpu získaného odběrem kostní dřeně (následkem je ale určitá ztráta buněk CD34+) nebo použitím PBSC, kde je jich malé množství.

Pozdní hemolýza se může objevit několik dní po transplantaci. Je způsobená vyplavením zásob protilátek typu IgG namířených proti erytrocytům dárce z tkáňových zásob nebo jejich tvorbou přežívajícími plazmatickými buňkami příjemce. Krvetvorba dárce může být narušována aglutininy příjemce již na úrovni CFU-E, což jsou nejmladší

buňky erytropoezy, na kterých se objevují AB0 antigeny. (25) Důsledkem je opoždění erytropoezy, které vede ke zvýšené potřebě transfuzí erytrocytů. Z tohoto stavu se může vyvinout až čistá aplazie červené řady. (23) V kostní dřeni je přítomna populace buněk myeloidní, lymfoidní i megakaryocytární řady, ale zato zcela nebo téměř chybí erytroidní prekurzory. Při vyšetření krevní skupiny metodou sloupcové aglutinace v gelu neprokazujeme erytrocyty krevní skupiny dárce, ale pouze erytrocyty krevní skupiny příjemce, ev. erytrocyty transfundované. (22) Čistá aplazie červené řady může přetrvávat měsíce i roky po transplantaci a je příčinou zvýšené potřeby transfuzí ve srovnání s pacienty po AB0 kompatibilní transplantaci. (16) Jako další komplikace u velké neshody může vzácně nastat opožděné přihojení granulocytů a trombocytů, v důsledku přítomnosti AB0 antigenů na jejich membráně. (16, 23, 24)

- **Malá neshoda (minor AB0 incompatibility)**

K malé neshodě dochází, když má dárce protilátky proti antigenům příjemce, např. pokud je krevní skupině AB transplantován štěp krevní skupiny, která má přirozené aglutininy anti-A, anti-B nebo obojí. Tato situace nastává, je-li příjemce krevní skupina AB a dárce skupina B, A nebo 0. Další možností malé neshody je příjemce skupiny B nebo A a dárce skupiny 0 (s aglutininy anti-A i anti-B).

Všechny hlavní zdroje hematopoetických kmenových buněk obsahují určité množství plazmy dárce. Protilátky obsažené v plazmě štěpu se navazují na erytrocyty příjemce. Čím vyšší množství plazmy ve štěpu a čím vyšší titr aglutininů dárce namířených proti erytrocytům příjemce, tím je větší riziko pasivní hemolýzy. (25)

K další hemolýze erytrocytů příjemce může dojít po cca 7-14 dní od převodu štěpu. Pozdní hemolytická reakce je způsobena B-lymfocyty dárce (passenger lymphocytes), které reagují s AB0 antigeny na červených krvinkách příjemce, produkují proti nim namířené aglutininy, které následně způsobují hemolýzu erytrocytů příjemce. Jedná se o tzv. „passenger lymphocyte syndrome“ (PLS). (27) Hemolýza ustupuje většinou během 5-10 dní. (18) B-lymfocyty dárce mohou vytvářet protilátky nejen proti AB0 antigenům, ale i proti ostatním antigenům erytrocytů příjemce. (16, 27) Tyto případy

nejsou časté, dochází při nich k různé síle hemolýzy, která může být intravaskulární nebo extravaskulární v závislosti na typu protilátky. (18).

Aby se zabránilo akutní hemolytické reakci při převodu štěpu, způsobené vysokým titrem aglutininů v plazmě dárce, je možné provést redukci objemu plazmy v převáděném štěpu. Tato redukce však nesníží obsah B-lymfocytů a tak neovlivní výskyt PLS. (27)

- **Kombinovaná neshoda (bidirectional ABO incompatibility)**

U kombinované neshody se jedná o současný výskyt velké i malé neshody. Např. pokud příjemci skupiny A je transplantován štěp dárce skupiny B. V plazmě příjemce skupiny A se vyskytuje aglutinin anti-B, který reaguje s erytrocyty dárce skupiny B (velká neshoda). Zároveň je v plazmě štěpu skupiny B přítomen aglutinin anti-A, který je namířen proti červeným krvinkám příjemce (malá neshoda).

V případě kombinované neshody se mohou vyskytnout zároveň posttransplantační komplikace jak velké (akutní hemolýza, pozdní hemolýza s opožděnou funkcí erytropoézy, ev. i PRCA), tak malé neshody (akutní hemolýza, pozdní hemolýza způsobená PLS). Stejně tak se provádějí i preventivní opatření velké i malé neshody omezující výskyt těchto komplikací. (25)

1.4.9.2 Neshody v ostatních antigenních systémech erytrocytů

Stejně jako neshody v AB0 systému, vznikají často neshody v Rh systému a ostatních antigenních systémech erytrocytů (Kell, Kidd, MNSs aj.) i u příjemců štěpu identického ve všech 10 hlavních HLA antigenech. Je to způsobeno rozdílným umístěním genů kódujících tyto antigeny. (27) Avšak na rozdíl od AB0 systému se v plazmě jedinců nevyskytuje pravidelná protilátka proti chybějícímu antigenu. Aloprotilátka vzniká až po imunizaci erytrocyty nesoucími antigen, který se nevyskytuje na vlastních erytrocytech, transfuzí nebo u žen v těhotenství. Přírozeně se vyskytující nepravidelné protilátky jsou vzácné. Je-li protilátka přítomná v krvi

příjemce nebo dárce, jedná se o inkompatibilitu v daném antigenním systému. (28) Tyto protilátky mohou způsobit hemolýzu, ale většinou nebývají klinicky významné. (18, 23)

1.4.9.3 Podávání transfuzních přípravků po HSCT

Volba vhodné krevní skupiny transfuzního přípravku vychází v ČR z doporučených postupů České společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP, konkrétně Dop_STL2011_08 Předtransfuzní vyšetření. (29)

Pacientům s velkou neshodou je doporučeno podávat erytrocytové TP shodné s krevní skupinou AB0 příjemce, dokud prokazujeme původní erytrocyty příjemce a/nebo protilátky anti-A, anti-B proti A a B antigenům dárce. Transfuzní přípravky s plazmou se ode dne transplantace podávají shodné se skupinou dárce.

U pacientů s malou neshodou jsou doporučené erytrocytové transfuzní přípravky AB0 skupiny dárce, TP s plazmou shodné s původní AB0 skupinou do vymizení erytrocytů původní AB0 skupiny příjemce.

Pacientům s kombinovanou neshodou jsou doporučené erytrocytové TP krevní skupiny 0 a TP s plazmou skupiny AB, obojí do vymizení erytrocytů původní AB0 skupiny příjemce. (29)

Příjemcům RhD pozitivních, kteří dostali štěp RhD negativní, je doporučeno podávat RhD negativní erytrocyty i trombocyty.

Pacientům, u nichž se zvažuje transplantace, jsou podávány deleukotizované transfuzní přípravky, aby se předcházelo aloimunizaci a přenosu CMV infekce. Pokud si pacient před HSCT vytvoří protilátky proti histokompatibilním antigenům, zvyšuje se tím riziko rejekce štěpu. (7) Příjemci hematopoetických kmenových buněk dostávají ozářené transfuzní přípravky již od zahájení přípravného režimu před transplantací, z důvodu rizika Transfusion-Associated GvHD (TA-GvHD) a PLS. Ozáření transfuzních přípravků ionizujícím zářením (dávka 25-40 Gy) zachová lymfocyty, ale zabrání jejich proliferaci a tím i TA-GvHD a PLS. (7, 18)

2 Cíle práce

1. Vypracování literárního shrnutí problematiky krvetvorby, systémů krevních skupin a problematiky transplantací kmenových krvetvorných buněk se zaměřením na vztah ABO systému dárce a příjemce.
2. Provedení vyšetření krevních skupin u pacientů před a po transplantaci kmenových krvetvorných buněk a vyhledání ostatních výsledků krevních skupin, titru aglutininů a podaných erytrocytových transfuzních přípravků v LIS.
3. Osvojení metody titrace aglutininů.
4. Statistické zpracování výsledků vyšetření.
5. Vyhodnocení vlivu různých druhů inkompatibility nebo shody v ABO systému a výšky vstupního titru na dobu nutnou k přihojení štěpu (erytroidní linie), ke kompletnímu přechodu na erytropoezu dárce a na počet podaných erytrocytových transfuzních přípravků.

3 Hypotézy

1. U pacientů po HSCT s velkou a kombinovanou neshodou v AB0 systému je vlivem přítomnosti protilátek anti-A, anti-B proti A a B antigenům dárce nutná delší doba potřebná k přihojení erytrocytů ve srovnání s pacienty se shodou nebo malou neshodou.
2. U pacientů po HSCT s velkou a kombinovanou neshodou v AB0 systému je vlivem přítomnosti protilátek anti-A, anti-B proti A a B antigenům dárce potřebná delší doba pro úplný přechod na erytropoezu dárce ve srovnání s pacienty se shodou nebo malou neshodou.
3. Pacienti po HSCT s velkou a kombinovanou neshodou v AB0 systému mají v důsledku přítomnosti aglutininů anti-A, anti-B proti A a B antigenům dárce vyšší spotřebu erytrocytových transfuzních přípravků během přechodu na erytropoezu dárce ve srovnání s pacienty se shodou nebo malou neshodou.
4. Vyšší titry aglutininů anti-A, anti-B před HSCT mají u pacientů s velkou a kombinovanou neshodou v AB0 systému vliv na prodloužení doby přihojení erytrocytů, doby potřebné k úplnému přechodu na erytropoezu dárce a na zvýšení spotřeby erytrocytových transfuzních přípravků.

4 Metodika

Na hematologickém oddělení FN Plzeň byla v období od 1.1.2012 do 31.12.2014 provedena alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk u 148 pacientů. V laboratoři krevního skladu Lochotín Transfuzního oddělení FN Plzeň, ve které pracuji, byla u těchto pacientů před transplantací vyšetřena krevní skupina sklíčkovou a zkumavkovou metodou a po transplantaci opakovaně vyšetřována krevní skupina sklíčkovou metodou i metodou sloupcové aglutinace v gelu z důvodu sledování přihojování štěpu, konkrétně erytroidní řady.

Pacienty po transplantaci jsem zařadila do čtyř skupin podle vztahu krevní skupiny dárce a příjemce (pacienti s velkou, malou a kombinovanou neshodou a se shodou s dárce v ABO systému). Sledovala jsem čas, během kterého došlo k přihojení štěpu (červené řady), čas potřebný ke kompletní změně erytropoezy příjemce na erytropoezu dárce a počet podaných erytrocytových TP v období po transplantaci. Současně jsem zjišťovala vliv výšky vstupního titru aglutininů u velké a kombinované neshody na uvedené parametry.

Pacienty po transplantaci jsem sledovala minimálně rok, ev. déle, pokud byla potřebná delší doba na kompletní změnu erytropoezy. Za období od 1.1.2012 do 31.12.2015 bylo u tohoto souboru pacientů provedeno 1321 vyšetření krevních skupin metodou sloupcové aglutinace v gelu. Osobně jsem provedla 40% vyšetření krevních skupin u sledovaných pacientů před i po transplantaci a kontrolovala jsem výsledky všech vyšetření. Do mé práce jsem zařadila 104 pacientů, 44 pacientů jsem vyřadila z důvodu krátkého přežití po transplantaci nebo nedostatečnému počtu provedených vyšetření. Dále již budou zmiňováni pouze pacienti zařazení do mé práce.

V laboratoři speciální imunohematologie Transfuzního oddělení FN Plzeň, odkud jsem převzala výsledky vyšetření titru aglutininů u pacientů před HSCT, jsem si osvojila metodu vyšetření titru aglutininů zkumavkovou metodou.

4.1 Vyšetření krevních skupin AB0 a RhD antigenu

4.1.1 Vyšetření pacientů před HSCT

Při prvním vyšetření krevní skupiny AB0 a RhD antigenu pacienta se na Transfuzním oddělení FN Plzeň používá metoda sklíčková i metoda zkumavková, při opakovaném vyšetřování se krevní skupina pacienta pouze ověřuje sklíčkovou metodou. Vyšetření RhD antigenu je prováděno pomocí diagnostických sér s různými klony anti-D pro sklíčkovou a zkumavkovou metodu.

4.1.1.1 Metoda sklíčková

Princip:

Skličkovou metodou vyšetřujeme aglutinogeny AB0 a RhD antigen pomocí monoklonálních protilátek. Vazbou protilátky typu IgM z diagnostického séra na antigeny erytrocytů dochází ke vzniku aglutinace, kterou odečítáme makroskopicky.

Vyšetřovaný biologický materiál:

- Nejčastěji používaným materiálem je vzorek plné, srážlivé žilní krve, vyšetření však lze provést i z krve nesrážlivé, např. s přidavkem EDTA.

Přístroje a pomůcky:

- Pasteurovy pipety
- podložní skla

Reagencie:

- monoklonální diagnostické sérum anti-A (Sanquin)
- monoklonální diagnostické sérum anti-B (Sanquin)
- monoklonální diagnostické sérum anti-AB (Sanquin)
- diagnostické sérum anti-D IgM BIOSCOT (klon MS-201)

Pracovní postup:

Na předem označená podložní skla nakapeme po jedné kapce diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-AB a anti-D (klon MS-201), ke každé kapce přidáme 1 kapku plné krve. Rohem podložního skla promícháme jednotlivé kapky (každou kapku vždy čistým rohem podložního skla) a inkubujeme při pokojové teplotě max. 2 min. Odečítáme makroskopicky za kývavého pohybu podložním sklem. Tvorba shluků (aglutinací) znamená přítomnost vyšetřovaného antigenu. Reakce hodnotíme jako negativní, slabě pozitivní a pozitivní.

Metoda sklíčková je pouze orientační, při výskytu diskrepancí použijeme metodu zkumavkovou, ev. metodu sloupcové aglutinace i při vyšetřování pacientů s již známou krevní skupinou. (31, 32, 33)

4.1.1.2 Metoda zkumavková

Princip:

Zkumavkovou metodou vyšetřujeme aglutinogeny na erythrocytech i aglutininy v séru (ev. plazmě). Při vyšetření aglutinogenů reagují monoklonální protilátky typu IgM obsažené v diagnostických sérech s antigeny na povrchu vyšetřovaných erythrocytů za vzniku aglutinace. Při vyšetření aglutininů sledujeme vznik aglutinace způsobený vazbou přirozených protilátek anti-A, anti-B ve vyšetřovaném séru na antigeny diagnostických erythrocytů krevní skupiny 0, A₁, B.

Vyšetřovaný biologický materiál:

- Nejčastěji používaným materiálem je vzorek plné, srážlivé žilní krve, vyšetření však lze provést i z krve nestrážlivé, např. s přídavkem EDTA.

Přístroje a pomůcky:

- laboratorní centrifuga Hettich universal 320
- promývací centrifuga DiaCent-CW
- Pasteurovy pipety

- aglutinační zkumavky
- stojánky na zkumavky

Reagencie:

- monoklonální diagnostické sérum anti-A (Sanquin)
- monoklonální diagnostické sérum anti-B (Sanquin)
- monoklonální diagnostické sérum anti-AB (Sanquin)
- diagnostické sérum anti-D IgM BIOSCOT (klon RUM-1)
- typové erytrocyty 0, A₁, B (získávané od dárců krve na TO FN Plzeň)
- fyziologický roztok

Vyšetření aglutinogenů

Pracovní postup:

Vzorek krve centrifugujeme při 1500 g 3 minuty. Do předem označené zkumavky oddělíme Pasteurovou pipetou sérum (nebo plazmu) pacienta. Do další označené zkumavky odebereme část erytrocytů, které 1x promyjeme v promývací centrifuze a následně naředíme fyziologickým roztokem na 3-5% suspenzi. Do označených zkumavek nakapeme po dvou kapkách diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-AB a anti-D (klon RUM-1). K diagnostickým sérum přidáme po dvou kapkách 3-5% suspenze vyšetřovaných erytrocytů. Protřepeme, aby se kapky promísily, a centrifugujeme 20 sekund při 1000 g. Odečítáme mírným poklepem na dno zkumavky a makroskopicky hodnotíme aglutinaci. Jednotlivé reakce vyšetřovaných erytrocytů s diagnostickými séry zapíšeme na žádanku pacienta. (31, 32, 33)

Vyšetření aglutininů

Pracovní postup:

Ve fyziologickém roztoku 3x promyjeme typové erytrocyty 0, A₁, B (získané od dárců krve na TO FN Plzeň) a naředíme je na 3-5% suspenzi ve fyziologickém

roztoku. Do předem označených zkumavek nakapeme Pasteurovou pipetou po dvou kapkách vyšetřovaného séra, ev. plazmy (oddělení od erytrocytů viz vyšetření aglutinogenů). Do všech zkumavek s vyšetřovaným sérem přidáme po dvou kapkách 3-5% suspenze typových erytrocytů 0, A₁ a B. Protřepeme, abychom promísili obsah zkumavek, a centrifugujeme 20 sekund při 1000 g. Odečítáme mírným poklepem na dno zkumavky a makroskopicky hodnotíme aglutinaci. Jednotlivé reakce vyšetřovaného séra s typovými erytrocyty zapíšeme na žádanku pacienta. (5, 31, 32, 33)

Hodnocení reakcí:

Výsledky vyšetření aglutinogenů i aglutininů hodnotíme společně dle Tabulky 1.

Tabulka 1: Hodnocení výsledků vyšetření aglutinogenů a aglutininů

Krevní skupina	Diagnostické sérum			Typové erytrocyty		
	anti-A	anti-B	anti-AB	0	A ₁	B
0	-	-	-	-	+	+
A	+	-	+	-	-	+
B	-	+	+	-	+	-
AB	+	+	+	-	-	-

Zdroj: SOP (31)

Výsledky vyšetření RhD antigenu sklíčkovou a zkumavkovou metodou hodnotíme dle následující Tabulky 2.

Tabulka 2: Hodnocení výsledků vyšetření RhD antigenu metodou sklíčkovou a zkumavkovou za použití rozdílných klonů anti-D pro tyto metody.

Vyšetřované erytrocyty	anti-D (sklo)	anti-D (zkum.)
RhD pozitivní	+	+
RhD negativní	-	-

Zdroj: SOP (31)

4.1.2 Vyšetření pacientů po HSCT

Na TO FN Plzeň je pro vyšetřování krevních skupin pacientů po HSCT používána současně metoda sklíčková i metoda sloupcové aglutinace v gelu.

4.1.2.1 Sklíčková metoda

Popsána výše v bodu 4.1.1.1

4.1.2.2 Metoda sloupcové aglutinace v gelu

Pro vyšetřování krevních skupin u pacientů po HSCT používá laboratoř krevního skladu TO FN Plzeň metodu sloupcové aglutinace v gelu od firmy Grifols.

Princip metody:

Gelová technika je využívána pro detekci aglutinačních reakcí erytrocytů. Pro vyšetřování krevních skupin u pacientů po transplantaci používáme karty DG Gel AB0/Rh+Kell (RT). Každá plastová karta obsahuje 8 mikrozkušavek, které mají dolní úzkou část naplněnou gelem a horní rozšířenou část - inkubační komůrku. Gel je tvořen polymerizovanými mikročásticemi dextransu v pufovaném médiu, které slouží jako filtr. V mikrozkušavkách pro vyšetření antigenů přítomných na erytrocytech jsou částice dextransu smíšeny s reagenty, která obsahuje jednotlivé specifické monoklonální protilátky (anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D^{VI-}, anti-Kell) a pufr. V mikrozkušavkách určených pro kontrolu (Ctl) a pro vyšetření aglutininů (N_{/A1}, N_{/B}) jsou polymerizované mikročástice dextransu pouze v roztoku pufru bez specifických protilátek. (34)

K aglutinaci dochází po navázání protilátky na antigen přítomný na povrchu erytrocytů. Jejich průchod gelovým sloupcem během centrifugace je závislý na velikosti aglutinátů, ve kterých jsou erytrocyty vázány. Platí, že čím větší aglutinát, tím hůře prochází gelem. Nejsilnější aglutinace vytváří proužek erytrocytů na povrchu gelu, erytrocyty, které nejsou vázány v aglutinaci, sedimentují na dno mikrozkušavky. (34)

Vyšetřovaný biologický materiál:

- Nejčastěji používaným materiálem je vzorek plné, srážlivé žilní krve, vyšetření však lze provést i z krve nesrážlivé, např. s přidavkem EDTA.

Přístroje a pomůcky:

- centrifuga Hettich universal 320
- promývací centrifuga DiaCent-CW
- centrifuga DG Spin
- aglutinační zkumavky, stojánky na zkumavky
- Pasteurovy pipety
- dávkovací pipeta (pro objemy 10 μ l, 25 μ l, 50 μ l)
- automatická pipeta (pro objem 5 μ l)
- špičky
- dávkovač roztoku DG GEL Sol (0,5ml)

Reagencie:

- karty DG Gel AB0/Rh+Kell (RT)
- diagnostické erytrocyty Serigrup Diana A₁/B
- roztok DG Gel Sol
- fyziologický roztok

Pracovní postup:

Vzorek centrifugujeme při 1500 g 3 minuty. Do předem označené zkumavky oddělíme Pasteurovou pipetou sérum (nebo plazmu) pacienta. Z krve pacienta odebereme Pasteurovou pipetou do další označené zkumavky část erytrocytů, které 1x promyjeme v promývací centrifuze, a připravíme 5% suspenzi vyšetřovaných erytrocytů v roztoku DG Gel Sol (roztok o nízké iontové síle usnadňující aglutinaci) - 25 μ l sedimentu 1x promytých erytrocytů v 0,5ml roztoku DG Gel Sol. Pro vyšetření aglutinogenů pipetujeme 10 μ l 5% suspenze erytrocytů do prvních 6 mikrozkušavek (A, B, AB, D^{VI-}, Kell, Ctl), pro vyšetření aglutininů pipetujeme do 7. a 8.

mikrozkumavky diagnostické erytrocyty (50 μ l diagnostických erytrocytů A1 do mikrozkumavky N_{/A1} a 50 μ l diagnostických erytrocytů B do mikrozkumavky N_{/B}). Do mikrozkumavek N_{/A1} a N_{/B} napipetujeme 50 μ l séra (ev.plazmy) pacienta a centrifugujeme v centrifuze pro karty DG Gel Spin. Výsledky reakcí odečítáme makroskopicky.

Hodnocení reakcí:

Sílu reakcí hodnotíme dle následující Tabulky 3 od negativní reakce, přes slabě pozitivní k pozitivní reakci na + až +++++. (31, 34)

Tabulka 3: Odečítání výsledků vyšetření krevní skupiny metodou sloupcové aglutinace v gelu na kartách DG Gel AB0/Rh+Kell (RT)

Síla reakce	Slovní hodnocení
negativní	Nedošlo k vytvoření aglutinace, všechny erytrocyty prošly v průběhu centrifugace gelem a jsou sedimentovány na dně mikrozkumavky.
slabě pozitivní	Ojediné drobné aglutinace v dolní části gelového sloupce.
pozitivní +	Drobné aglutinace v gelovém sloupci.
pozitivní ++	Malé až střední aglutinace v gelovém sloupci.
pozitivní +++	Střední aglutinace v horní polovině gelového sloupce.
pozitivní ++++	Všechny erytrocyty jsou vázány v aglutinaci a vytváří proužek na povrchu gelového sloupce.
dvojí populace	V mikrozkumavce přítomny erytrocyty různých skupin, rozdílně reagují s diagnostickým sérem a vytváří sediment erytrocytů na dně mikrozkumavky i proužek aglutinovaných erytrocytů na povrchu gelového sloupce.

Zdroj: Návod ke kartám DG Gel AB0/Rh+Kell (RT), Grifols (34)

Reakce v mikrozkušavce Ctl musí být vždy negativní, jinak nelze výsledky vyšetření hodnotit. Pozitivní reakce v mikrozkušavce Kell znamená přítomnost antigenu Kell na vyšetřovaných erythrocytech. Krevní skupinu určujeme porovnáním výsledků vyšetření aglutinogenů i aglutininů, viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Určování výsledků krevních skupin hodnocením jednotlivých reakcí při vyšetření aglutinogenů a aglutininů.

Výsledek Krevní skupiny	Vyšetření aglutinogenů				kontrola	Vyšetření aglutininů	
	Mikrozkušavka				mikrozšk.	mikrozkušavka	
	A	B	AB	D ^{VI-}	Ctl	N _{/A1}	N _{/B}
0 RhD poz.	-	-	-	+	-	+	+
0 RhD neg.	-	-	-	-	-	+	+
A RhD poz.	+	-	+	+	-	-	+
A RhD neg.	+	-	+	-	-	-	+
B RhD poz.	-	+	+	+	-	+	-
B RhD neg.	-	+	+	-	-	+	-
AB RhD poz.	+	+	+	+	-	-	-
AB RhD neg.	+	+	+	-	-	-	-

Zdroj: Návod ke kartám DG Gel AB0/Rh+Kell (RT), Grifols (34)

Při výskytu dvojí populace erythrocytů různých krevních skupin reaguje jedna populace s diagnostickým sérem přítomným ve zkumavce a vytvoří proužek erythrocytů vázaných v aglutinaci na povrchu gelového sloupce, druhá populace s diagnostickým sérem nereaguje a erythrocyty sedimentují během centrifugace na dno mikrozkušavky.

Při zachycení dvojí populace erythrocytů popisujeme, o jaké krevní skupiny se jedná, semikvantitativně hodnotíme jejich zastoupení ve vyšetřovaném vzorku, případně

pochází-li z krevních transfuzí (zjišťujeme posouzením krevní skupiny dárce a příjemce a anamnézy podaných transfuzních přípravků za poslední 4 měsíce). (31, 35)

V Příloze 1 je zachycena dvojí populace erytrocytů na kartách DG Gel AB0/Rh+Kell (RT) při velké neshodě, v Příloze 2 při malé a v Příloze 3 při kombinované neshodě.

4.2 Vyšetření titru aglutininů anti-A a anti-B

Princip:

Množství aglutininů v krvi pacienta lze stanovit provedením aglutinačního testu s postupným ředěním séra, ke kterému se přidá stejné množství suspenze erytrocytů nesoucích antigen, proti kterému je naměřena specifita titrované protilátky. Sledujeme vznik aglutinace. Pro vyšetření titru aglutininů anti-A a anti-B typu IgM se na TO FN Plzeň používá zkumavková metoda.

Vyšetřovaný biologický materiál:

- Nejčastěji používaným materiálem je vzorek plné, srážlivé žilní krve, vyšetření však lze provést i z krve nesrážlivé, např. s přídavkem EDTA.

Přístroje a pomůcky:

- laboratorní centrifuga Hettich universal 320
- automatická pipeta na 100 μ l
- špičky
- Pasteurovy pipety
- aglutinační zkumavky
- stojánky na zkumavky

Reagencie:

- 3-5% suspenze typových erytrocytů A₁ a B
- fyziologický roztok

Pracovní postup:

Ve fyziologickém roztoku 3x promyjeme typové erythrocyty A₁, B (získané od dárců krve na TO FN Plzeň) a naředíme je na 3-5% suspenzi ve fyziologickém roztoku. Vzorek krve centrifugujeme při 1500 g 3 minuty. Pasteurovou pipetou oddělíme sérum, ev. plazmu do předem označené zkumavky. Do stojánku připravíme zkumavky označené specifitou titrovaného aglutininu (anti-A, anti-B) a ředěním séra, ev. plazmy, tzn. 1:2, 1:4, 1:8 až do ředění 1:1024. Od 2. zkumavky napipetujeme do všech dalších zkumavek 100μl fyziologického roztoku. Do první a druhé zkumavky napipetujeme po 100μl vyšetřovaného séra. Druhou zkumavku se směsí vyšetřovaného séra s fyziologickým roztokem promícháme a přeneseme 100μl směsi do třetí zkumavky, kterou opět promícháme a přeneseme 100μl směsi do čtvrté zkumavky a stejným způsobem postupujeme až k poslední zkumavce s ředěním séra 1:1024, odkud oddělíme rovněž 100μl ředěného séra. Do každé zkumavky přidáme 100μl 3-5% suspenze typových erythrocytů A₁ pro titrování aglutininu anti-A a typových erythrocytů B pro titrování aglutininu anti-B. Protřepeme obsah zkumavek a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě. Centrifugujeme 20 sekund při 1000g. Odečítáme mírným poklepem na dno zkumavky a makroskopicky hodnotíme aglutinaci. (31, 36)

Hodnocení reakcí:

Sílu reakcí hodnotíme jako negativní, pozitivní na + až na +++++. Jako výsledný titr aglutininů anti-A a anti-B udáváme poslední ředění vyšetřovaného séra, ve kterém ještě došlo k vytvoření aglutinace, např. anti-A 1:256. (31, 36)

4.3 Kontrola kvality

Veškeré reagensie používané ke stanovení krevních skupin AB0 a RhD antigenu i k vyšetření titru aglutininů anti-A a anti-B jsou zahrnuty do systému vnitřní kontroly kvality. TO FN Plzeň se účastní i externí kontroly kvality SEKK, kdy jsou při vyšetřování kontrolních vzorků použita všechna diagnostika a reagensie využívaná v imunohematologických metodách na TO FN Plzeň.

4.4 Kalibrace a validace

Centrifugy na zkumavky, promývací centrifugy i centrifugy na karty jsou 1x ročně validovány servisními firmami, o validaci je vystaven protokol. Pipety (5 μ l) jsou 1x ročně kalibrovány určenou firmou, dávkovací pipety (10 μ l, 25 μ l, 50 μ l) jsou kalibrovány 1x ročně (1x za 2 roky firma, 1x za 2 roky kontrolní laboratoř TO FN Plzeň), o provedené kalibraci se rovněž vystavuje protokol.

4.5 Statistické zpracování dat

Získaná data jsem statisticky zpracovala v programu MS Excel. Výsledky byly podrobeny testování statistické signifikance s použitím Mann-Whitney U Testu softwarem STATISTICA (fa. StatSoft CR s.r.o.) ve spolupráci se ZČU (Bc. Marin Leba, katedra kybernetiky ZČU Plzeň). Všechny hodnoty $p < 0,05$ byly hodnoceny jako statisticky významné.

Posouzení vlivu vstupního titru aglutininů u velké a kombinované neshody na dobu přihojení erytroidní linie, na dobu změny erytropoezy a na počet podaných erytrocytových TP do změny erytropoezy jsem provedla pomocí regresní analýzy v programu MS Excel.

4.6 Určení doby přihojení erytroidní linie

Přihojení erytroidní linie u příjemců s velkou a kombinovanou neshodou bylo prokázáno prvním záchytem erytrocytů krevní skupiny dárce metodou sloupcové aglutinace v gelu, kde byla zjištěna dvojitá populace erytrocytů. U malé neshody a shody krevní skupiny příjemce a dárce bylo rovněž prováděno opakované vyšetření krevní skupiny metodou sloupcové aglutinace v gelu. Pokud je stejná krevní skupina u dárce i příjemce, není možné touto metodou odlišit jejich erytrocyty. Při malé neshodě je většina dárců krevní skupiny 0 a téměř všem jsou po transplantaci podány erytrocytové přípravky rovněž krevní skupiny 0. Vyšetřením lze odlišit erytrocyty nově

vznikající od transfundovaných, pouze je-li příjemce RhD neg a dárce RhD poz. V ostatních případech jsem pro malou neshodu a shodu použila hodnocení dle Aung et al. (22) U příjemců se shodou, kteří nepotřebují transfuze, je přihojení 30 dnů po HSCT, u příjemců závislých na transfuzích je přihojení v den poslední transfuze.

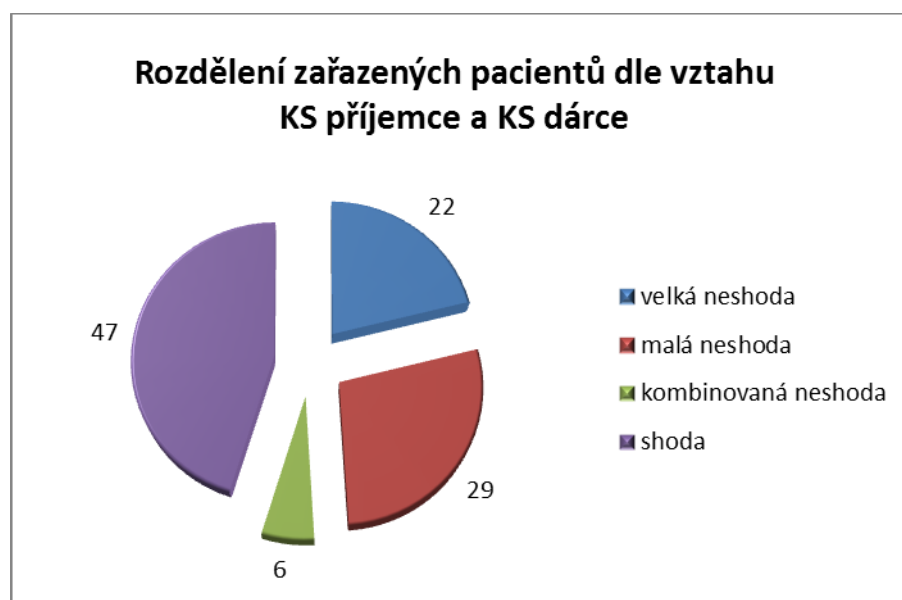
4.7 Určení doby úplné změny erytropoezy

Úplný přechod na erytropoezu dárce u velké a kombinované neshody jsem vyhodnotila nálezem erytrocytů pouze krevní skupiny dárce při vyšetření aglutinogenů a nepřítomností původních aglutininů příjemce proti erytrocytům dárce. Kompletní přechod na erytropoezu dárce u malé neshody a shody jsem určila 4 měsíce po poslední transfuzi, pokud nelze odlišit erytrocyty dárce, příjemce, ev. transfundované erytrocyty vyšetřením antigenů AB0 nebo RhD. Vzhledem k maximální délce života erytrocytů 120 dnů je po této době jistota, že při vyšetření KS nejsou přítomny transfundované erytrocyty. Ve většině případů nezachytáváme po transplantaci aglutininy proti původním antigenům příjemce. (21)

5 Výsledky

Sledované pacienty jsem rozdělila do čtyř skupin podle vztahu krevní skupiny dárce a příjemce štěpu. Největší skupinu tvořili příjemci shodní s dárce v ABO systému 47 (45%), méně bylo příjemců s malou neshodou 29 (28%), dále s velkou neshodou 22 (21%) a nejmenší skupinu tvořili příjemci s kombinovanou neshodou 6 (6%). Rozdělení pacientů podle vztahu KS příjemce a dárce zachycuje Obrázek 1.

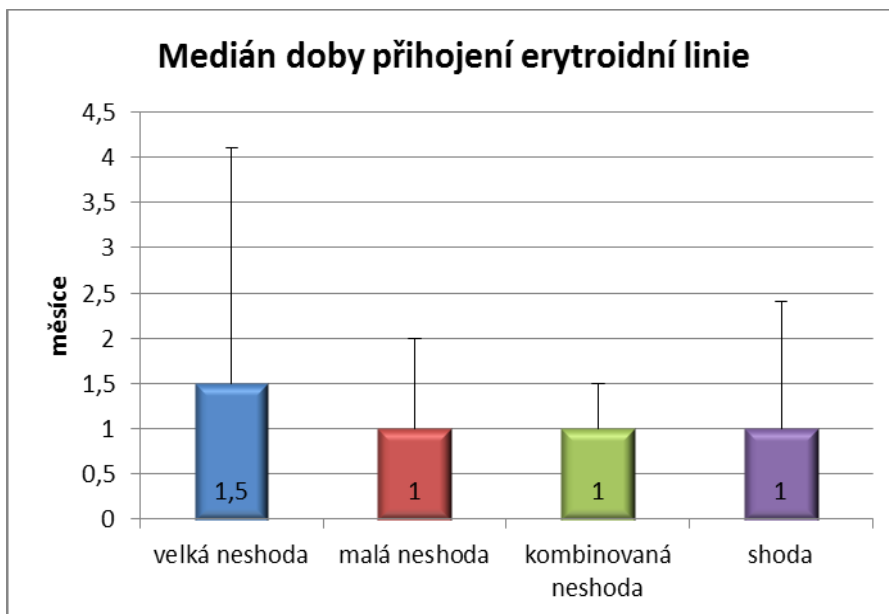
Obrázek 1: Rozdělení zařazených pacientů podle vztahu KS příjemce a KS dárce.



5.1 Přihojení erytroidní linie

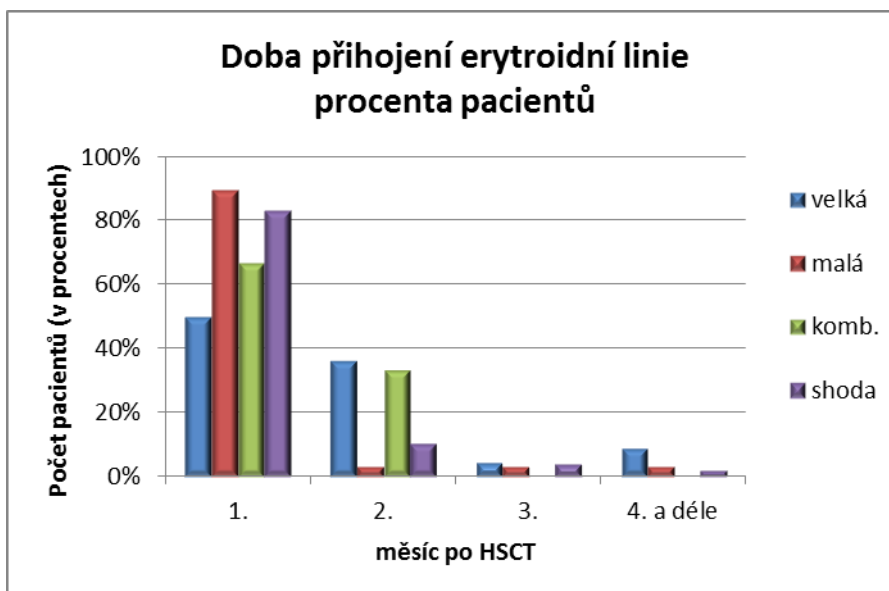
Přihojení u příjemců s velkou neshodou probíhalo v průběhu 1. až 12. měsíce po HSCT (medián 1,5), s malou neshodou v průběhu 1. až 6. měsíce (medián 1), s kombinovanou 1. až 2. měsíce (medián 1) a se shodou 1. až 10. měsíce po HSCT (medián 1). Rozdíly mezi velkou a malou neshodou, resp. mezi velkou neshodou a shodou, byly statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,05$. Pacienti s kombinovanou neshodou nebyli hodnoceni pro jejich nedostatečný počet. Medián doby přihojení erytroidní linie je zobrazen na Obrázku 2.

Obrázek 2: Medián doby přihojení erytroidní linie v měsících.



Procenta pacientů, u kterých probíhalo přihojení v jednotlivých měsících po HSCT, ukazuje Obrázek 3 a Tabulka 5.

Obrázek 3: Doba přihojení erytroidní linie – procenta pacientů



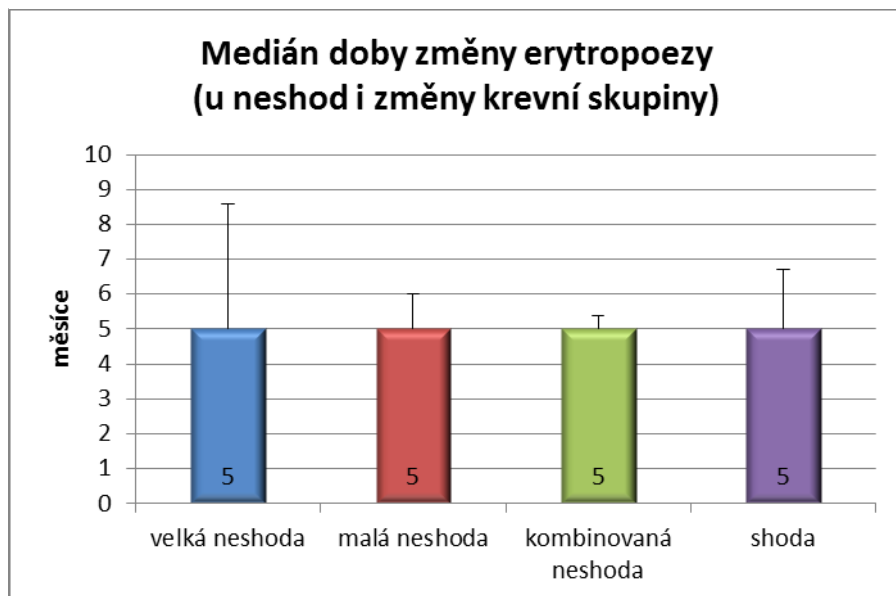
Tabulka 5: Přihojení erytroidní linie v procentech pacientů

Přihojení erytroidní linie - procenta pacientů				
Měsíc	Velká neshoda	Malá neshoda	Komb. neshoda	Shoda
1.	50,0%	89,7%	66,7%	83,0%
2.	36,4%	3,4%	33,3%	10,6%
3.	4,5%	3,4%	0,0%	4,3%
4. a déle	9,1%	3,4%	0,0%	2,1%

5.2 Úplný přechod na erytropoezu dárce

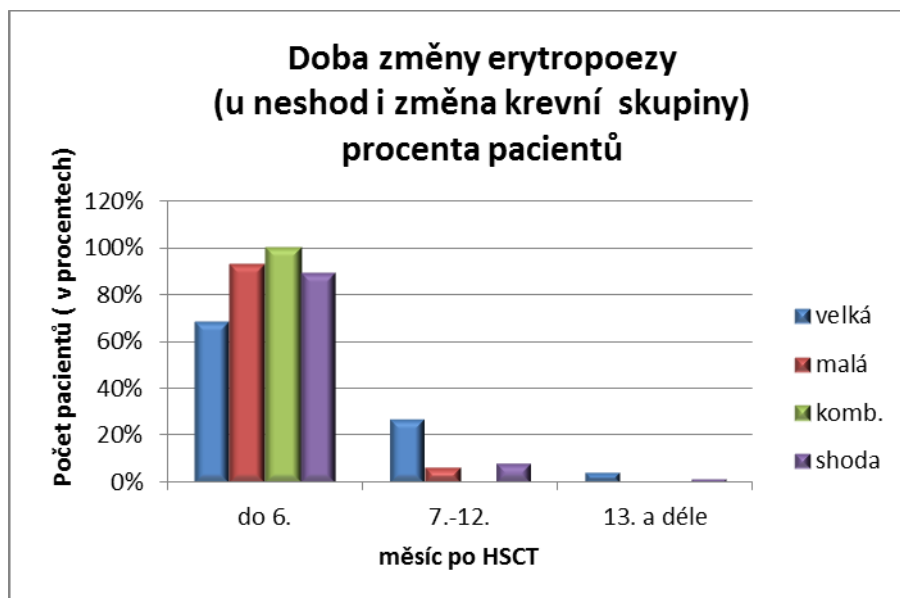
Medián doby změny erytropoezy byl u všech sledovaných skupin pacientů 5 měsíců. Ke změně došlo u příjemců s velkou neshodou v průběhu 3. až 19. měsíce po HSCT, u příjemců s malou neshodou v průběhu 4. až 10. měsíce, s kombinovanou během 4. až 5. měsíce a u příjemců se shodou během 2. až 14. měsíce po HSCT. U všech skupin pacientů došlo ve většině případů ke změně erytropoezy během prvních 6 měsíců po HSCT. U velké neshody se u 27% pacientů změna erytropoezy opozdila, nastala v 7.-12. měsíci po transplantaci, ve srovnání se 7% u malé neshody, 0% u kombinované a s 9% pacientů u shody za stejné období. U 5% pacientů s velkou neshodou a 2% pacientů se shodou byla doba změny erytropoezy delší než 12 měsíců. Rozdíly u jednotlivých skupin pacientů však nebyly statisticky významné ($p > 0.05$). Pacienty s kombinovanou neshodou nelze hodnotit pro jejich nedostatečný počet. Medián doby změny erytropoezy je zobrazen na Obrázku 4.

Obrázek 4: Medián doby změny erytropoezy



Procenta pacientů, u kterých docházelo ke změně erytropoezy v jednotlivých měsících po HSCT, ukazuje Obrázek 5 a Tabulka 6.

Obrázek 5: Doba změny erytropoezy – procenta pacientů



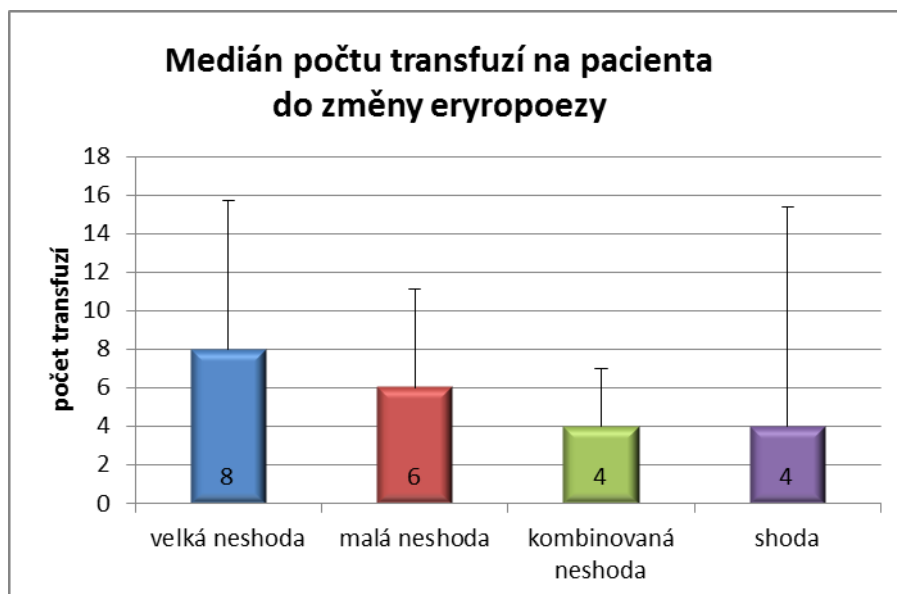
Tabulka 6: Změna erytropoezy v procentech pacientů

Změna erytropoezy – procenta pacientů				
měsíc	Velká neshoda	Malá neshoda	Komb. neshoda	Shoda
do 6.	68%	93%	100%	89%
7.-12.	27%	7%	0%	9%
13. a déle	5%	0%	0%	2%

5.3 Podané erytrocytové TP do změny erytropoezy

U všech skupin pacientů jsem sledovala i počet podaných erytrocytových TP na pacienta do změny erytropoezy. Nejvyšší počet byl podán pacientům s velkou neshodou (medián 8, rozsah 0-24), méně transfuzí bylo podáno u malé neshody (medián 6, rozsah 0-24) a u shody (medián 4, rozsah 0-69). Rozdíly však nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). Počet transfuzí u kombinované neshody byl sice nejnižší (medián 4, rozsah 2-10), ale vzhledem k malému počtu pacientů (celkem 6), nelze výsledky hodnotit. Medián počtu transfuzí do změny erytropoezy je znázorněn na Obrázku 6.

Obrázek 6: Medián počtu transfuzí na pacienta do změny erytropoezy



5.4 Podané erythrocytové TP prvních 6. měsíců po HSCT

U pacientů jsem sledovala rovněž počet erythrocytových TP podávaných v průběhu prvních 6 měsíců po transplantaci. Nejvíce transfuzí bylo podáváno u všech skupin pacientů během prvního měsíce po transplantaci. U velké neshody byl medián počtu transfuzí 4 (rozsah 0-16), u malé neshody 6 (rozsah 0-14), u kombinované neshody 4 (rozsah 2-10), u shody 4 (rozsah 0-25). V dalších měsících po transplantaci se počet transfuzí výrazně snížil u všech sledovaných skupin. Medián a rozsah počtu transfuzí na pacienta u jednotlivých skupin pacientů v období po HSCT ukazuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Počet transfuzí na pacienta (medián a rozsah)

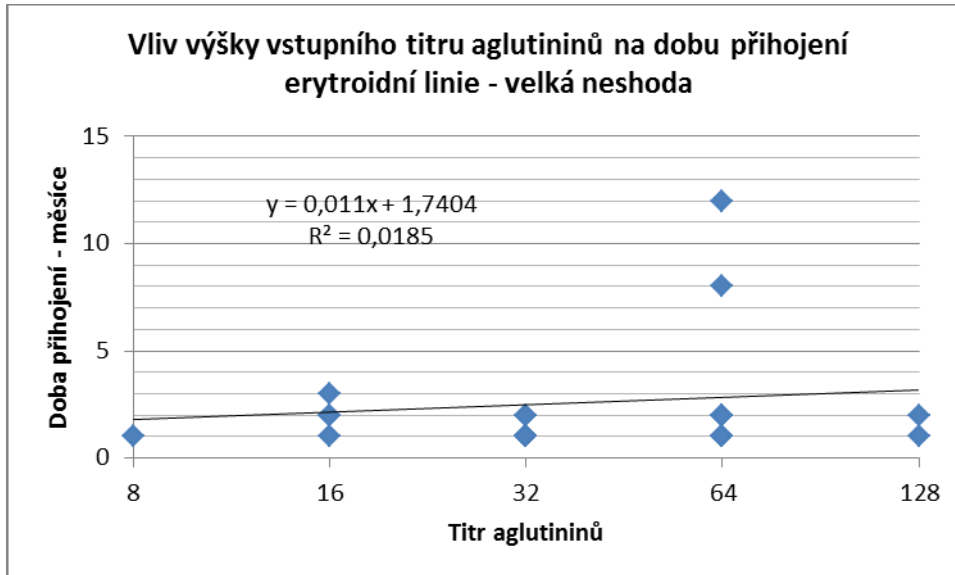
Počet transfuzí na pacienta po HSCT: medián a rozsah				
Měsíc	Velká neshoda	Malá neshoda	Komb. neshoda	Shoda
1.	4 (0-16)	6 (0-14)	4 (2-10)	4 (0-25)
2.	0 (0-8)	0 (0-8)	0 (0-2)	0 (0-10)
3.	0 (0-8)	0 (0-4)	0 (0)	0 (0-6)
4. - 6.	0 (0-20)	0 (0-10)	0 (0-2)	0 (0-36)

5.5 Vliv titru aglutininů

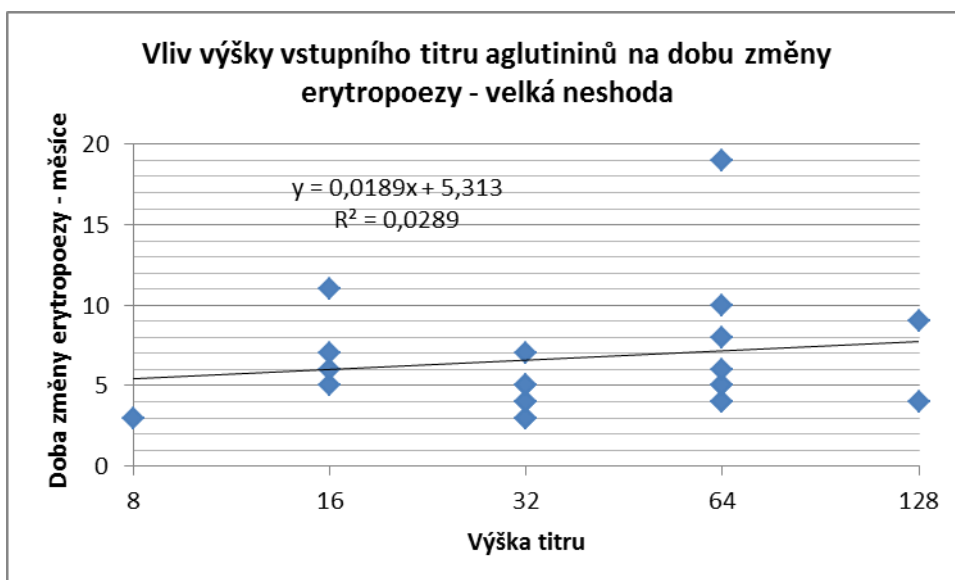
Výšky vstupních titrů se u velké neshody pohybovaly v rozsahu 1:8 až 1:128, u kombinované neshody v rozsahu 1:2 až 1:32. U kombinované neshody mohlo dojít ke zkreslení dat vzhledem k malému počtu pacientů, proto jsem u tohoto souboru nehodnotila ani vliv titru aglutininů.

Při sledování vlivu vstupního titru aglutininů na dobu přihojení byl při použití lineární regrese koeficient determinace $R^2=0,0185$ (Obrázek 7), při sledování vlivu titru na dobu změny erythropoezy $R^2=0,0289$ (Obrázek 8) a na počet transfuzí $R^2=0,0008$ (Obrázek 9).

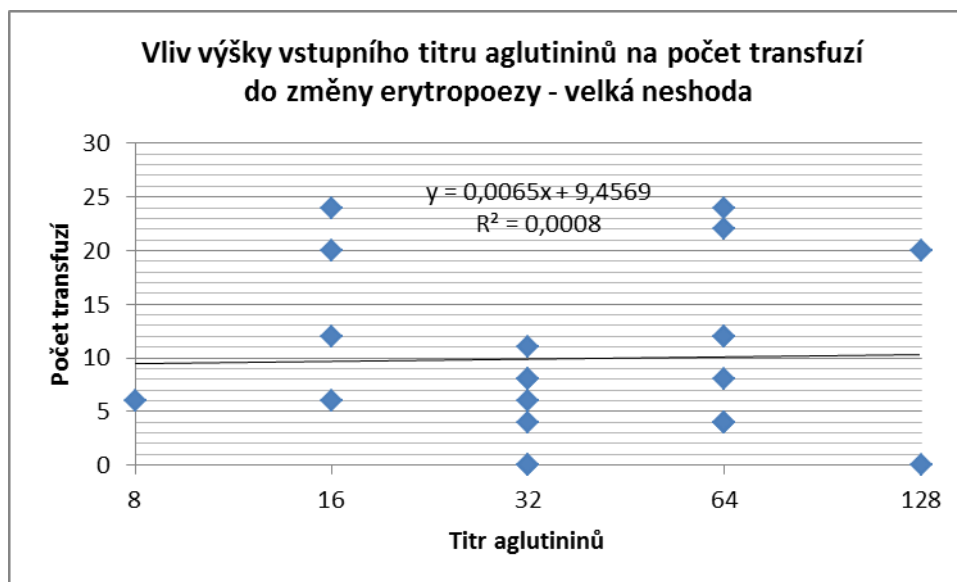
Obrázek 7: Vliv výšky vstupního titru aglutininů na dobu přihojení erytroidní linie u velké neshody



Obrázek 8: Vliv výšky vstupního titru aglutininů na dobu změny erytropoezy u velké neshody



Obrázek 9: Vliv výšky vstupního titru aglutininů na počet transfuzí do změny erythropoezy u velké neshody



6 Diskuze

Výsledky vyšetření jsem porovnávala se stanovenými hypotézami. U kombinované neshody jsem nehodnotila její vliv na dobu příhojení, dobu změny erytropoezy ani na počet podaných erytrocytových transfuzních přípravků, protože mohlo dojít ke zkreslení výsledků vzhledem k nízkému počtu zařazených pacientů (pouze 6).

U příjemců s velkou neshodou v AB0 systému jsem zjistila signifikantně významné prodloužení doby příhojení při porovnání s malou neshodou i s příjemci AB0 shodného štěpu. Tím byla potvrzena první hypotéza. K podobným výsledkům dospěl Ozkurt et al. (20) ve své studii, kde popisuje prodlouženou dobu příhojení erytroidní linie u velké neshody ve srovnání se skupinou příjemců AB0 shodného štěpu. Je to způsobeno protilátkami anti-A a/nebo anti-B v krvi příjemce proti antigenům A a/nebo B na erytrocytech dárce. Tyto antigeny jsou přítomny již na vývojových stádiích erytrocytů od CFU-E. Protilátky vazbou na antigeny prekurzorů erytrocytů dárce způsobují jejich odstraňování imunitním systémem příjemce a tím opoždění příhojení erytroidní řady. U některých pacientů může dojít až k čisté erytroidní aplazii.

Nebyla potvrzena druhá hypotéza, která předpokládá delší dobu nutnou pro úplný přechod na erytropoezu dárce u pacientů s velkou a kombinovanou neshodou ve srovnání s pacienty s malou neshodou nebo shodou v AB0 systému. U většiny pacientů došlo k úplné změně erytropoezy během prvních šesti měsíců po transplantaci. Pozorovala jsem sice opoždění u pacientů s velkou neshodou, rozdíly však nebyly statisticky významné. Prodloužení doby úplné změny erytropoezy vlivem protilátek anti-A, anti-B příjemce proti A a B antigenům na erytrocytech dárce jsem u sledované skupiny pacientů neprokázala. Nepodařilo se mi najít obdobnou studii, se kterou bych mohla svoje výsledky srovnat.

Třetí hypotézu o vlivu velké a kombinované neshody v AB0 systému na vyšší spotřebu erytrocytových transfuzních přípravků do přechodu na erytropoezu dárce v důsledku přítomnosti aglutininů anti-A, anti-B příjemce proti A a B antigenům na erytrocytech dárce podporují závěry studie Ozkurt et al. (20). Nenachází sice signifikantní rozdíly v počtu podaných erytrocytových TP mezi pacienty s velkou,

malou a kombinovanou neshodou a se shodou v období krátce po transplantaci (po dobu hospitalizace na transplantační jednotce), vyšší spotřebu erytrocytových TP však popisuje u příjemců s velkou neshodou ve srovnání s příjemci s AB0 shodnými dárce v období po propuštění z transplantační jednotky. (20)

Watz et al. (37) uvádí vyšší spotřebu erytrocytových TP u příjemců s velkou i malou neshodou v porovnání s příjemci s AB0 shodnými dárce. Nejvyšší množství podaných erytrocytových TP pozorovala krátce po transplantaci u příjemců s malou neshodou, rozdíly však nebyly statisticky významné.

V mé práci jsem sledovala spotřebu erytrocytových TP během prvních šesti měsíců po transplantaci a do změny erythropoezy. Nejvíce transfuzí bylo podáno během prvního měsíce po HSCT u všech skupin pacientů. Nejvyšší spotřebu erytrocytových TP v prvním měsíci po HSCT však měli příjemci s malou neshodou s dárce v AB0 systému (medián 6) ve srovnání s příjemci s velkou neshodou (medián 4) i se shodou (medián 4). Pravděpodobnou příčinou je destrukce erytrocytů příjemce aglutininy produkovanými převedenými B lymfocyty dárce (PLS). Od 2. do 6. měsíce po HSCT bylo podáno výrazně méně transfuzí, u všech skupin příjemců klesl medián na nulu. Porovnáním spotřeby erytrocytových TP ode dne transplantace do změny erythropoezy jsem zjistila nejvyšší spotřebu u příjemců s velkou neshodou v porovnání s příjemci s malou neshodou nebo shodou s dárce v AB0 systému. Vysvětlují to vlivem aglutininů anti-A, anti-B příjemce, které způsobují destrukci prekurzorů nově vznikajících erytrocytů dárce, tím se prodlužuje doba přihojení erytroidní linie a zvyšuje spotřeba erytrocytových TP. Rozdíly však nebyly statisticky významné, třetí hypotéza tak nebyla u sledované skupiny pacientů potvrzena.

Čtvrtá hypotéza předpokládá vliv výšky vstupních titrů aglutininů anti-A, anti-B u pacientů s velkou a kombinovanou neshodou v AB0 systému na prodloužení doby přihojení erytrocytů, doby potřebné k úplnému přechodu na erythropoezu dárce a na zvýšení spotřeby erytrocytových transfuzních přípravků. Ozkurt et al. (20) prokazuje ve své studii u pacientů s velkou neshodou vliv výšky vstupního titru aglutininů anti-A, anti-B na prodloužení doby přihojení erytrocytů i na zvýšení spotřeby erytrocytových TP v období po propuštění pacientů z transplantační jednotky. Výška

vstupních titrů u pacientů s čistou erytroidní aplazií se pohybovala v rozmezí 1:32 až 1:512 (medián 1:64), u pacientů, u kterých nedošlo k čisté erytroidní aplazii byla výška vstupních titrů v rozmezí 1:1 až 1:256 (medián 1:32). Vyšší titry aglutininů mohou způsobit prodloužení přihojení erytroidní linie působením již na prekurzory erytrocytů a tím i prodloužit závislost pacientů na erytrocytových TP.

V mé práci se výšky vstupních titrů aglutininů anti-A, anti-B u pacientů s velkou neshodou pohybovaly v rozmezí 1:8 až 1:128 (medián 1:32). Jelikož koeficienty determinace měly nízké hodnoty, nelze z analýzy souboru dat sledovaných pacientů usuzovat na vliv výšky vstupního titru na dobu přihojení erytrocytů, na dobu potřebnou k úplnému přechodu na erytropoezu dárce ani na zvýšenou spotřebu erytrocytových TP. Nedošlo tak k potvrzení čtvrté hypotézy. Zřejmě by se muselo jednat o větší skupinu pacientů a vyšší hodnoty vstupních titrů, aby se projevil jejich vliv na sledované parametry.

Odlišnosti ve výsledcích u pacientů sledovaných v mé práci od uváděných zahraničních studií i mezi studii mezi sebou mohou být způsobeny nestejnou velikostí souborů zařazených pacientů, odlišnými primárními diagnózami pacientů, druhem přípravného režimu před transplantací i rozdíly v léčbě na jednotlivých transplantačních centrech.

Při studiu zahraniční literatury jsem našla doporučení Booth et al. (25) a O'Donghaile (30) pro podávání TP s plazmou pacientům po HSCT s malou a kombinovanou neshodou v období po úplném přechodu na erytropoezu dárce. Původní ABO antigeny příjemce zůstávají přítomné na endotelu, ledvinách a ostatních tkáních a nemění se ani po provedené transplantaci. Protilátky anti-A, anti-B přítomné v TP s plazmou se mohou navazovat na tyto antigeny. Klinický význam není přesně znám, ale zřejmě může docházet k tvorbě imunokomplexů, ev. k poškození endotelií. U pacientů po HSCT (i po úplném přechodu na erytropoezu dárce) doporučují proto volit TP s plazmou, které neobsahují protilátky anti-A, anti-B proti ABO antigenům dárce ani původním antigenům příjemce. Na Transfuzním oddělení FN Plzeň byly dosud pacientům po úplném přechodu na erytropoezu dárce podávány jak erytrocytové TP, tak TP s plazmou ABO skupiny dárce.

7 Závěr

Neshoda v AB0 systému není překážkou provedení alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk, může však způsobit řadu komplikací, jako je akutní i pozdní hemolytická reakce, čistá aplazie červené řady, vyšší stupeň GvHD aj. Hlavní příčinou je přítomnost pravidelných protilátek anti-A (u krevní skupiny 0 a B) a anti-B (u krevní skupiny 0 a A) vyskytujících se v krvi příjemců i dárců.

Ve své bakalářské práci jsem prokázala statisticky významné prodloužení doby přihojení erytropoezy dárce u příjemců s velkou neshodou. Tím byla potvrzena první hypotéza o vlivu aglutininů anti-A, anti-B příjemce na prodloužení doby přihojení erytrocytů. Ostatní hypotézy o předpokládaném vlivu AB0 inkompatibility na prodloužení doby kompletní změny erytropoezy a na zvýšení počtu podaných erytrocytových transfuzních přípravků nebyly potvrzeny pro statisticky nevýznamné rozdíly ve výsledcích u sledovaných skupin pacientů. Z analýzy získaných dat jsem neprokázala vliv výšky vstupního titru na sledované parametry u tohoto souboru pacientů.

Při studiu odborné zahraniční literatury jsem našla doporučení, na základě kterých bylo na Transfuzním oddělení FN Plzeň po konzultaci s lékaři přistoupeno ke změně AB0 skupiny podávaných plazem pacientům s malou a kombinovanou neshodou v období po kompletním přechodu na erytropoezu dárce. Cílem je zabránit reakci protilátek anti-A, anti-B přítomných v převáděné plazmě s původními AB0 antigeny pacienta, které zůstávají na jeho tkáních, epiteliích a endotelu. Proto je nyní pacientům po AB0 inkompatibilní transplantaci i v období po úplném přechodu na erytropoezu dárce podávána plazma takové AB0 skupiny, která neobsahuje protilátky proti AB0 antigenům dárce ani příjemce.

Vzhledem ke komplikacím, které s sebou může přinést neshoda v AB0 systému, je přínosné vybírat pro HSCT AB0 kompatibilní dárce tam, kde je to možné. Při podávání transfuzních přípravků je nezbytné zohledňovat krevní skupinu příjemce i dárce, aby se předešlo potransfuzním reakcím. Z tohoto důvodu je velmi důležitá spolupráce s transfuzním oddělením.

8 Seznam použité literatury

- 1) DOUBEK, M. Transplantace krvetvorných buněk: Typy, dárci a indikace k transplantacím. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 2010 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/transplantace-krvetvornych-bunek/typy-darci-a-indikace-k-transplantacim/>
- 2) PENKA, M., E. TESAŘOVÁ a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 424 s. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 3) VÍTEK, A., M. LUKÁŠOVÁ, V. CHUDOMEL, A. MÁJSKÝ, J. SOUČEK, P. KOBYLKA, P. KOŘÍNKOVÁ, M. LOUDOVÁ, M. DOBROVOLNÁ, E. MATĚJKOVÁ, M. PÍSAČKA, Z. SIEGLOVÁ, M. VRANÁ, J. HRABÁNEK, J. SAJDLOVÁ, D. ŠPONEROVÁ, M. MARKOVÁ, V. VÁLKOVÁ, Z. GAŠOVÁ a P. CETKOVSKÝ. Transplantace krvetvorných buněk a její role v léčbě chorob krvetvorby během posledních 25 let. *Vnitřní lékařství* [online]. 2012, **58**(2), 46-55 [cit. 2015-12-14]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/transplantace-krvetvornych-bunek-a-jeji-role-v-lecbe-chorob-krvetvorby-behem-poslednich-25-let-38875>
- 4) POSPÍŠILOVÁ, Š., D. DVOŘÁKOVÁ, J. MAYER a kol. *Molekulární hematologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2013, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.
- 5) PENKA, M., E. TESAŘOVÁ a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.
- 6) FÁBRYOVÁ, V. a kol. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 224 s. ISBN 978-80-247-4391-2.

- 7) ŘEHÁČEK, V., J. MASOPUST a kol. *Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013, 240 s. ISBN 978-80-247-4534-3.
- 8) HOŘEJŠÍ, V., J. BARTŮŇKOVÁ, T. BRDIČKA a R. ŠPÍČEK. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013, 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- 9) ADAM, Z., M. KREJČÍ, J. VORLÍČEK a kol. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008, 392 s. ISBN 978-80-247-2502-4.
- 10) INDRÁK, K. a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Vyd. 1. V Praze: Triton, 2014, 610 s. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-722-4.
- 11) TOMÍŠKA, M., Z. KOŘÍSTEK, M. NAVRÁTIL a J. MAYER. Vysokodávková léčba a přípravné režimy před transplantací krvetvorných buněk. *Vnitřní lékařství* [online]. 2012, **58**(7 a 8), 175-180 [cit. 2015-11-03]. Dostupné z: <http://www.vnitrnilekarstvi.eu/vnitri-lekarstvi-clanek/vysokodavkova-lecba-a-pripravne-rezimy-pred-transplantaci-krvetvornych-bunek-38774>
- 12) JINDRA, P., P. SEDLÁČEK a P. ŽÁK. Optimální proces vyhledávání dospělého nepříbuzného dárce krvetvorných buněk. Doporučení transplantacní sekce české hematologické společnosti. *Transfuze a hematologie dnes* [online]. 2014, **20**(1), 6-12 [cit. 2016-01-07]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/transfuze-hematologie-dnes-clanek/optimalni-proces-vyhledavani-dospelého-nepribuzneho-darce-krvetvornych-bunek-doporuceni-transplantacni-sekce-ceske-49282>

- 13) STEINEROVÁ, K., L. HOUDOVÁ, P. JINDRA, D. LYSÁK, H. PITTOVÁ, J. NAVRÁTILOVÁ, M. HRABĚTOVÁ a S. VOKURKA. Indikátory kvality českého národního registru dárců dřeně za rok 2013 a srovnání s předchozími roky. *Transfúze a hematologie dnes* [online]. 2014, **20**(4), 136-140 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/transfuzie-hematologie-dnes-clanek/indikatory-kvality-ceskeho-narodniho-registru-darcu-drene-za-rok-2013-a-srovnani-s-predchozimi-roky-50810>
- 14) *Český registr dárců krvetvorných buněk* [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.darujzivot.cz/o-registru.php>
- 15) *Český národní registr dárců dřeně* [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.kostnidren.cz/registr2014/index.html>
- 16) ROWLEY, S. D., M. L. DONATO and P. BHATTACHARYYA. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2011, **46**, 1167-1185 [cit. 2015-10-27]. DOI: 10.1038/bmt.2011.135.
- 17) *Banka pupečnickové krve České republiky* [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <http://www.bpk.cz/>
- 18) COHN, C. S. Transfusion Support Issues in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancer Control* [online]. 2014, **22**(1), 52-59 [cit. 2015-08-14]. Dostupné z: <https://www.espanol.moffitt.org/media/1276/ccj221.pdf#page=54>
- 19) RAIDA, L. Nemyeloablativní alogenní transplantace krvetvorných buněk v léčbě hematologických malignit. *Interní medicína* [online]. 2007, **9**(7-8), 331-333 [cit. 2016-01-15]. Dostupné z: <http://www.internimedica.cz/pdfs/int/2007/07/07.pdf>

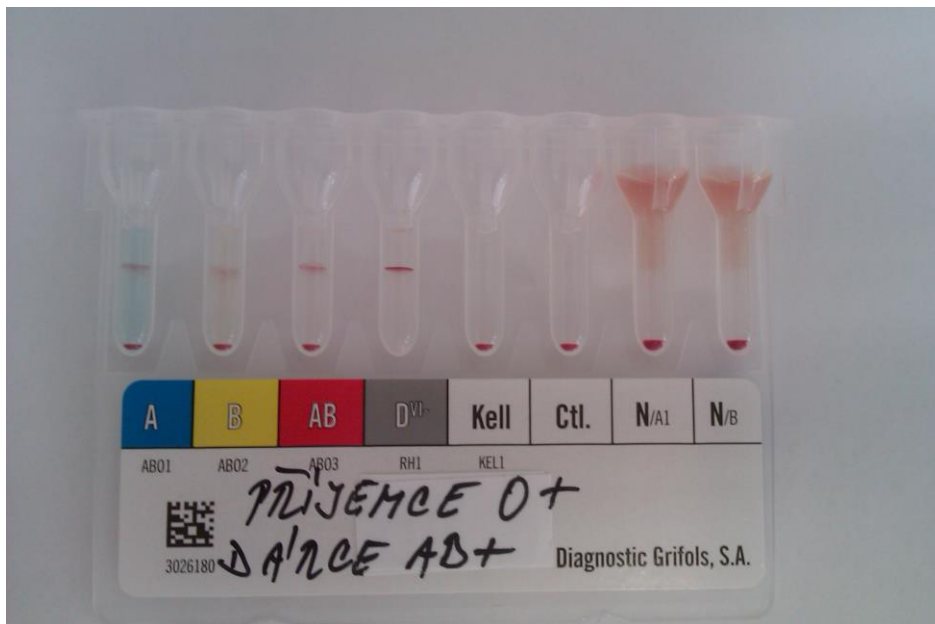
- 20) OZKURT, Z. N., Z. A. YEGIN, I. YENICESU, S. Z. AKI, M. YAGCI and G. T. SUCAK. Impact of ABO-Incompatible Donor on Early and Late Outcome of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplantation Proceedings* [online]. 2009, **41**(9), 3851-3858 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.06.189.
- 21) WOREL, N., S. PANZER, H. W. REESINK, W. LINKESCH, E. DICKMEISS, A. FISCHER-NIELSEN, K. HOLIG, D. STACHEL, R. ZIMMERMANN, W. HOLTER, P. COLUCCIA, D. BRILHANTE, E. WATZ, J. P. SIGLE et al. Transfusion policy in ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Vox Sanguinis* [online]. 2010, **98**(3p2), 455-467 [cit. 2015-07-23]. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01292.x.
- 22) AUNG, F. M., B. LICHTIGER, R. BASSETT, P. LIU, A. ALOUSI, Q. BASHIER, S. O. CIUERA, P. KEBRIAELI, Y. NIETO, B. ORAN, S. PARMAR, M. QAZILBASH, N. SHAH, I. KHOURI, R. E. CHAMPLIN and U. POPAT. Incidence and natural history of pure red cell aplasia in major ABO-mismatched haematopoietic cell transplantation. *British Journal of Haematology* [online]. 2013, **160**(6), 798-805 [cit. 2015-08-15]. DOI: 10.1111/bjh.12210.
- 23) CETKOVSKÝ, P. a kol. *Intenzivní péče v hematologii*. 1. vyd. Praha: Galén, 2004, 572 s. ISBN 80-7262-255-2.
- 24) BLIN, N., R. TRAINÉAU, S. HOUSSIN, R. PEFFAULT DE LATOUR, A. PETROPOULOU, M. ROBIN, J. LARGHERO, P. RIBAUD and G. SOCIÉ. Impact of Donor-Recipient Major ABO Mismatch on Allogeneic Transplantation Outcome According to Stem Cell Source. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2010, **16**(9), 1315-1323 [cit. 2015-09-07]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.03.021.

- 25) BOOTH, G. S., E. A. GEHRIE, CH. D. BOLAN and B. N. SAVANI. Clinical Guide to ABO-Incompatible Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2013, **19**(8), 1152-1158 [cit. 2015-11-16]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.03.018.
- 26) LOGAN, A. C., Z. WANG, K. ALIMOGHADDAM, R. M. WONG, T. LAI, R. S. NEGRIN, C. GRUMET, B. R. LOGAN, M.-J. ZHANG, S. R. SPELLMAN, S. J. LEE and D. B. MIKLOS. ABO Mismatch Is Associated with Increased Nonrelapse Mortality after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2014, **21**(4), 746-754 [cit. 2015-10-23]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.036.
- 27) SQUIRES, J. E. Passenger Lymphocyte Syndrome: A Case Report Involving Non-ABO Antibodies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2014, **41**(2), 153-155 [cit. 2015-10-16]. DOI: 10.1159/000357985.
- 28) CID, J., M. LOZANO, H. G. KLEIN and W. A. FLEGEL. Matching for the D antigen in haematopoietic progenitor cell transplantation: definition and clinical outcomes. *Blood Transfus* [online]. 2014, **12**, 301-306 [cit. 2015-10-23]. DOI: 10.2450/2014.0238-1.
- 29) Doporučené postupy: Dop_STL2011_08 Předtransfuzní vyšetření. *Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP* [online]. 2011 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY

- 30) O'DONGHAILE, D., W. KELLEY, H. G. KLEIN and W. A. FLEGEL. Recommendations for transfusion in ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* [online]. 2012, **52**(2), 456-458 [cit. 2015-08-13]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03465.x.
- 31) Standardní operační postupy Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Plzeň
- 32) Sanquin. Pelikloon (IgM) monoclonal anti-A, anti-B, anti-A, B. Návod. Poslední revize: leden 2012. Dostupné z: www.sanquinreagents.com
- 33) Bioscot. Lidská monoklonální IgM diagnostika anti-D. Návod. Poslední revize: říjen 2011. Dostupné z: www.millipore.com/bioscor_ifu
- 34) Grifols. DG Gel AB0/Rh+Kell (RT). Návod. Poslední revize: únor 2013
- 35) LI, M. F., L. FENG and M. ZHANG. Micro gel column technique is fit for detecting mixed fields post ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion and apheresis science* [online]. 2014, **52**(2), 222-225 [cit. 2015-07-16]. DOI: 10.1016/j.transci.2014.12.023.
- 36) SAKALOVÁ, A. a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Martin: Osveta, 1995. 527 s. ISBN 80-217-0444-6.
- 37) WATZ, E., M. REMBERGER, O. RINGDEN, J. LUNDAHL, P. LJUNGMAN, J. MATTSON, A. WIKMAN and M. UHLIN. Analysis of Donor and Recipient ABO Incompatibility and Antibody-Associated Complications after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Reduced-Intensity Conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2014, **20**(2), 264-271 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.11.011.

9 Přílohy

Příloha 1: Záchyt dvojí populace erytrocytů u velké neshody (příjemce KS 0 RhD pozitivní, dárce KS AB RhD pozitivní) na kartě DG Gel AB0/Rh+Kell (RT)



Zdroj: Autor

Příloha 2: Záchyt dvojí populace erytrocytů u malé neshody (příjemce A RhD pozitivní, dárce 0 RhD negativní) na kartě DG Gel AB0/Rh+Kell (RT)



Zdroj: Autor

Příloha 3: Záchyt dvojí populace erytrocytů u kombinované neshody (příjemce KS B RhD pozitivní, dárce A RhD negativní) na kartě DG Gel AB0/Rh+Kell (RT)



Zdroj: Autor