

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**MUDr. Zuzana Ambrůzová**

**VYBRANÉ IMUNOGENETICKÉ ASPEKTY  
TRANSPLANTACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH  
BUNĚK**

**Dizertační práce**

**Olomouc 2014**

## OBSAH

<b>1. PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ÚVOD K DIZERTAČNÍ PRÁCI .....</b>	<b>7</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. TRANSPLANTACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK (TKB).....</b>	<b>8</b>
3.1.1. Definice .....	8
3.1.2. Historie TKB .....	8
3.1.3. Typy TKB .....	9
3.1.3.1. Dělení podle typu dárce .....	9
3.1.3.2. Dělení podle zdroje kmenových krvetvorných buněk .....	10
3.1.3.3. Dělení podle použitého přípravného režimu .....	10
3.1.4. Komplikace alogenní TKB .....	11
3.1.4.1. Toxicita přípravného režimu .....	11
3.1.4.2. Infekční komplikace .....	12
3.1.4.3. Selhání nebo rejekce štěpu .....	12
3.1.4.4. Reakce štěpu proti hostiteli .....	12
3.1.4.4.1. Imunobiologie akutní reakce štěpu proti hostiteli .....	13
3.1.4.4.2. Imunobiologie chronické reakce štěpu proti hostiteli .....	18
3.1.5. Faktory ovlivňující rozvoj komplikací po TKB .....	19
3.1.5.1. Faktory na straně příjemce .....	19
3.1.5.2. Faktory na straně dárce .....	19
3.1.5.3. Faktory společné páru dárce – příjemce .....	20
<b>3.2. SOUVISLOST VYBRANÝCH IMUNOGENETICKÝCH FAKTORŮ S ROZVOJEM KOMPLIKACÍ PO TRANSPLANTACI KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Úvod .....	20
3.2.2. HLA geny a jejich význam pro TKB .....	21
3.2.3. Non-HLA geny a jejich význam pro TKB .....	22
3.2.3.1. Geny pro cytokiny a chemokiny .....	24
3.2.3.1.1. Gen pro interleukin 6 .....	27
3.2.3.1.2. Gen pro interleukin 10 .....	28

3.2.3.1.3. Gen pro monocytární chemotaktický protein .....	29
3.2.3.2. Geny pro adhezivní molekuly .....	30
3.2.3.2.1. Gen pro molekulu MAdCAM-1 .....	30
3.2.3.2.2. Geny pro $\alpha 4\beta 7$ integrin .....	31
3.2.4. Genový polymorfismus .....	31
3.2.4.1. Metody detekce genového polymorfismu .....	33
3.2.4.2. Způsoby studia asociace polymorfismu imunitních genů s komplikacemi po TKB .....	35
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. CÍLE A METODICKÉ PŘÍSTUPY .....</b>	<b>37</b>
4.1.1. Vymezení cílů vlastních prací .....	37
4.1.2. Vyšetřované soubory .....	37
4.1.3. Metodické přístupy .....	39
4.1.4. Statistické vyhodnocení výsledků .....	39
<b>4.2. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1. POLYMORFISMUS VYBRANÝCH NON-HLA GENŮ A JEJICH         VÝZNAM PRO ROZVOJ KOMPLIKACÍ PO TRANSPLANTACI         KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK .....</b>	<b>40</b>
4.2.1.1. Rozbor práce č. 1 .....	40
4.2.1.2. Rozbor práce č. 2 .....	41
4.2.1.3. Rozbor práce č. 3 .....	42
4.2.1.4. Rozbor práce č. 4 .....	44
<b>4.2.2. POLYMORFISMUS HLA GENŮ A JEJICH VÝZNAM PRO TRANSPLAN-         TACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK .....</b>	<b>45</b>
4.2.2.1. Rozbor práce č. 5 .....	45
4.2.2.2. Rozbor práce č. 6 .....	46
4.2.2.3. Rozbor práce č. 7 .....	47
4.2.2.4. Rozbor práce č. 8 .....	48
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
<b>6. SOUHRN DIZERTACE .....</b>	<b>52</b>

<b>7. SUMMARY OF THE THESIS .....</b>	<b>55</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>58</b>
<b>9. PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>61</b>
<b>10. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK .....</b>	<b>77</b>
<b>10.1. Práce související s dizertační prací .....</b>	<b>77</b>
<b>10.1.1. Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF a předkládané v dizertační práci (separátní výtisky <i>in extenso</i>) .....</b>	<b>77</b>
<b>10.1.2. Publikovaná abstrakta .....</b>	<b>78</b>
<b>10.1.3. Seznam přednášek / posterů přednesených na veřejných odborných fórech ...</b>	<b>81</b>
<b>10.2. Přehled ostatních publikací .....</b>	<b>82</b>
<b>10.2.1. Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech .....</b>	<b>82</b>
<b>10.2.2. Publikovaná abstrakta .....</b>	<b>82</b>
<b>10.2.3. Seznam přednášek / posterů přednesených na veřejných odborných fórech ...</b>	<b>84</b>
<b>11. PŘÍLOHY – Publikace předkládané v dizertační práci .....</b>	<b>85</b>
<b>Práce č. 1</b>	
Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, <b>Ambruzova Z</b> , Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. <i>Int J Immunogenet</i> 2006;33(4):261-7.	
<b>Práce č. 2</b>	
<b>Ambruzova Z</b> , Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M. Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. <i>Int J Immunogenet</i> 2008;35(4-5):401-3.	
<b>Práce č. 3</b>	
<b>Ambruzova Z</b> , Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of IL-6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of	

allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;44(4):227-35.

#### **Práce č. 4**

**Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Stahelova A, Faber E, Indrak K, Petrek M. Possible impact of MADCAM1 gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2009;70(6):457-60.

#### **Práce č. 5**

Mrazek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Raida L, Indrak K, Petrek M, Fischer GF. A novel HLA-B\*420502 allele identified by PCR-SSO/SSP routine typing and confirmed by Sequencing-based typing. *Tissue Antigens* 2005;65(3):275-7.

#### **Práce č. 6**

Mrazek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Raida L, Kriegova E, Indrak K, Fischer GF, Petrek M. A single amino acid exchange shifts the serological reactivity of the novel HLA-B\*4442 allele product from HLA-B44 to HLA-B21. *Int J Immunogenet* 2006;33(3):197-200.

#### **Práce č. 7**

Mrazek F, Onderkova J, **Ambruzova Z**, Zachova S, Petrek M. A novel HLA-DRB1 allele, HLA-DRB1\*13:116, identified by sequencing-based typing in a member of the Czech national marrow donor registry. *Int J Immunogenet* 2013;41(2):149-50.

#### **Práce č. 8**

Mrazek F, Onderkova J, Sotkowski T, Konigova N, **Ambruzova Z**, Raida L. Somatic mutation in acute myelogenous leukemia cells imitated novel germline HLA-A allele: a case report. *Tissue Antigens* 2014, in press.

## 1. PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří mému školiteli, **Prof. Martinu Petřkovi**, za cenné rady, všestrannou pomoc, směřování a vedení mé dizertační práce.

Děkuji také svému školiteli-konzultantovi, **Doc. Františkovi Mrázkovi**, za neocenitelnou pomoc, kterou mě provázel v celém průběhu mého studia i za kritické čtení textu dizertační práce.

Tato práce by nemohla vzniknout bez spolupráce kolegů z HLA laboratoře a pracovní skupiny mého školitele na Ústavu imunologie LF UP v Olomouci; poděkování patří zejména **Mgr. Anně Sťahelové, Mgr. Janě Onderkové, Marii Dosoudilové, Marii Skotalové a Boženě Uhýrkové**. Za podporu děkuji **Prof. Evženu Weiglovi**, přednostovi Ústavu imunologie LF UP a zároveň předsedovi oborové rady doktorského studijního programu.

Publikace předkládané v této dizertační práci jsou rovněž výsledkem spolupráce s kolegy z jiných pracovišť; zvláštní dík náleží zejména pracovníkům Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN v Olomouci pod vedením **Prof. Karla Indráka** a kolegům z Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň pod vedením **Dr. Pavla Jindry**. Poděkování patří všem dalším spoluautorům prací předkládaných v této dizertační práci a mnoha jiným kolegům, jejichž laskavou pomoc jsem zde nezmínila.

Na závěr si dovoluji poděkovat také své rodině za všestrannou podporu a porozumění.

Tato práce byla částečně podpořena z následujících projektů: Výzkumný záměr MŠM 6198959205, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, granty IGA MZ ČR NR 9099 a NT12454.

## 2. ÚVOD K DIZERTAČNÍ PRÁCI

Tato dizertační práce vznikla na Ústavu imunologie LF UP a Fakultní nemocnici v Olomouci a zabývá se studiem vybraných imunogenetických faktorů u alogenních transplantací kmenových krvetvorných buněk. Dizertační práce je vedena ve formátu **komentovaného souboru publikovaných prací**. Základem dizertační práce je osm publikací, které vznikly v průběhu postgraduálního studia v doktorském studijním programu a ve kterých je dizertantka prvním autorem nebo spoluautorem. Tyto práce již byly publikovány (některé i citovány) v mezinárodních časopisech s impakt faktorem a jsou zde vloženy jako separátní výtisky v originálním anglickém znění.

Práce je členěna do tří základních oddílů. První část, literární přehled, shrnuje problematiku transplantací kmenových krvetvorných buněk, popisuje možné komplikace tohoto terapeutického přístupu i faktory, které rozvoj zmíněných komplikací ovlivňují. Dále se literární přehled zaměřuje na charakteristiku vybraných imunogenetických faktorů studovaných v souvislosti s transplantacemi kmenových krvetvorných buněk a krátce pojednává i o metodách jejich studia. Druhá část vymezuje cíle práce, popisuje studované soubory a použité metodické přístupy. Ve třetí části jsou pak předkládány výsledky práce, která se věnovala studiu genetických faktorů ovlivňujících výsledek alogenních transplantací kmenových krvetvorných buněk. V obou výsledkových podkapitolách experimentální části jsou shrnuty cíle provedených studií a použité metodické přístupy. Nejvýznamnější nálezy z vlastních prací jsou shrnuty a diskutovány s ohledem na aktuální úroveň znalostí.

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1. TRANSPLANTACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK

##### 3.1.1. Definice

Transplantace kmenových krvetvorných buněk (TKB) je léčebný postup indikovaný u závažných hematologických a nehematologických malignit, u těžkých vrozených imunodeficitů nebo u dědičných poruch metabolismu (Bensinger a spol. 2001). Přehled onemocnění nejčastěji indikovaných k léčbě transplantací kmenových krvetvorných buněk shrnuje Tabulka č. 1.

Principem léčby TKB je náhrada patologické krvetvorby přenosem štěpu kmenových krvetvorných buněk zdravého dárce příjemci formou nitrožilní infúze (Vaňásek a kol. 1996).

Tabulka č. 1: Přehled onemocnění nejčastěji indikovaných k léčbě transplantací kmenových krvetvorných buněk (upraveno podle Copelan 2006).

<b>Maligní onemocnění</b>	<b>Ostatní choroby</b>
Akutní myeloidní leukémie	Aplastická anémie
Akutní lymfoblastická leukémie	Primární polycytémie
Chronická myeloidní leukémie	Talasémie
Myelodysplastický syndrom	Srpkovitá anémie
Non-hodgkinské lymfomy	Paroxysmální noční hemoglobinurie
Hodgkinova choroba	Fanconiho anémie
Chronická lymfatická leukémie	Blackfan-Diamondova anémie
Mnohočetný myelom	Těžký kombinovaný imunodeficit
Juvenilní chronická myeloidní leukémie	Wiskott-Aldrichův syndrom
Neuroblastom	Autoimunitní choroby
Ovariální karcinom	Vrozené choroby metabolismu
Testikulární karcinom ze zárodečných buněk	Amyloidóza

##### 3.1.2. Historie TKB

Transplantace kmenových krvetvorných buněk je v klinické praxi používána již více než 50 let. Ač byla TKB původně zvažována jako léčebný postup nemoci z ozáření, později se její využití rozšířilo především do oblasti léčby maligních onemocnění. Provedení první transplantace kostní dřeně od identického dvojčete u nemocného s pokročilou leukémií popsal v roce 1959 E. Donnall Thomas (Thomas a spol. 1959), který byl v roce 1990 za svou práci v oblasti transplantací kostní dřeně oceněn Nobelovou cenou



za medicínu. Důležitým mezníkem v rozvoji TKB se stal objev hlavního histokompatibilního komplexu člověka (HLA systému) na počátku 60. let. První transplantace kostní dřeně od HLA-identického sourozence byla provedena stejnou pracovní skupinou v roce 1968 v Seattlu (Thomas a spol. 1977). V současné době je TKB zavedeným léčebným postupem, jehož výzkum se nyní směřuje ke studiu neoptimálnějších přípravných režimů a prevence závažných komplikací TKB (Rafeah a spol. 2009).

### **3.1.3. Typy TKB**

Transplantace kmenových krvetvorných buněk můžeme rozdělit podle celé řady faktorů – typu dárce, zdroje kmenových krvetvorných buněk nebo přípravného režimu.

#### **3.1.3.1. Dělení podle typu dárce**

**Autologní** TKB je převod vlastních kmenových krvetvorných buněk odebraných nemocnému, většinou v období kompletní remise nebo minimální aktivity základní nemoci.

**Syngenní** TKB je převod kmenových krvetvorných buněk od jednovaječného dvojčete.

U obou typů transplantací dochází k převodu geneticky identických buněk a nedochází tak k vyvolání imunologických reakcí typu štěp proti hostiteli (graft-versus-host disease, GVHD) ani k reakci štěp proti leukémii (graft versus leukemia effect, GVL) – protinádorový účinek je zajištěn pouze předtransplantační vysokodávkovanou chemoterapií. Riziko relapsu základního onemocnění u těchto typů transplantací je proto větší než u alogenních transplantací.

**Alogenní** TKB je převod kmenových krvetvorných buněk mezi jedinci téhož živočišného druhu. V případě příbuzenských transplantací dochází k darování kmenových krvetvorných buněk nejčastěji mezi sourozenci, eventuálně pak mezi dalšími příbuznými členy rodiny. U nepříbuzenských transplantací poskytuje kmenové krvetvorné buňky k transplantaci člen národního nebo mezinárodního registru dárců kmenových krvetvorných buněk či kostní dřeně.

### 3.1.3.2. Dělení podle zdroje kmenových krvetvorných buněk

Kmenové krvetvorné buňky lze získat z několika zdrojů - z kostní dřeně, z periferní nebo pupečnickové krve. Jednotlivé zdroje se navzájem liší způsobem odběru, spektrem a množstvím odebraných buněk a promítají se i do výsledku TKB (Haspel a spol. 2008).

**Odběr kostní dřeně** je historicky nejstarším způsobem získávání kmenových krvetvorných buněk. Kostní dřeň je odebírána dárci v celkové anestézii, a to opakovanými vpichy a aspirací kostní dřeně z dutin v zadních hrbolech pánevních kostí. Objem odebrané dřeně u dospělého se pohybuje kolem 1000 – 1500 ml. Kostní dřeň se většinou dále zpracovává pomocí separátoru, kde se z ní získává suspenze mononukleárních buněk.

**Odběr periferních kmenových buněk** po stimulaci růstovým faktorem granulocytů (G-CSF, z angl. granulocyte-colony stimulating factor) se provádí pomocí separátorů krevních buněk. Centrifugací dochází k rozdělení jednotlivých krevních složek podle jejich hustoty. Konečným produktem je 200-300 ml suspenze mononukleárních buněk.

**Odběr pupečnickové krve** je prováděn bezprostředně po porodu z pupečnicku a placenty. Konečný objem pupečnickové krve se pohybuje kolem 100 ml (Krejčí a spol. 2009). Periferní kmenové buňky se přihojují rychleji než kmenové buňky kostní dřeně, ale vzhledem k tomu, že obsahují větší podíl T lymfocytů než kostní dřeň, dochází u jejich příjemců častěji k rozvoji chronické reakce štěpu proti hostiteli. Pupečnicková krev, jejíž odběr je nejjednodušší a nejbezpečnější, navíc klade menší důraz na HLA shodu mezi dárcem a příjemcem. Pupečnicková krev však obsahuje méně kmenových krvetvorných buněk, její přihojení je ve srovnání s ostatními zdroji nejpomalejší a příjemci jsou často ohroženi infekčními komplikacemi. Další limitace použití pupečnickové krve je dána jejím celkovým odebraným objemem a její použití je tak vyhrazeno především pro léčbu dětských pacientů (Copelan 2006).

### 3.1.3.3. Dělení podle použitého přípravného režimu

Předtransplantační přípravné režimy jsou z hlediska jejich účinku děleny na myeloablativní a režimy s redukovanou intenzitou – nemyeloablativní (Lekakis a spol. 2008).

Principem **myeloablativního režimu** je eradikace nádorových buněk a indukce imunosuprese příjemce, která má umožnit přihojení štěpu a zamezit jeho rejekci. Většinou je podávána kombinace cytostatik (např. busulfan+cyklofosfamid) nebo kombinace cytostatik (cyklofosfamid) a celotělového ozáření ve vysokých dávkách. Nevýhodou

tohoto režimu je jeho vysoká toxicita k širokému spektru tkání, a to především u pacientů starších 50 let.

Účinek **režimu s redukovanou intenzitou** (RIC, z angl. reduced-intensity conditioning) spočívá ve výrazné imunosupresi příjemce, která umožní připojení štěpu, ale současně významně redukuje výskyt komplikací souvisejících s toxicitou myeloablativního režimu. Výhodou tohoto režimu je významné snížení toxicity a možnost provedení alogenní transplantace i u starších nemocných nebo u pacientů s přidruženým onemocněním (Copelan 2006, Krejčí a spol. 2009). Nevýhodou je vyšší incidence relapsů po RIC režimech ve srovnání s myeloablativními režimy, proto nejsou vhodné u pacientů s pokročilou nádorovou chorobou (Levine a spol. 2003).

### **3.1.4. Komplikace alogenní TKB**

V časném i pozdním období po alogenní TKB se mohou u příjemce vyskytnout závažné komplikace různého charakteru. Mezi nejčastější patří komplikace spojené s toxicitou přípravného režimu, infekční komplikace, selhání či rejekce štěpu a reakce štěpu proti hostiteli (GVHD).

#### **3.1.4.1. Toxicita přípravného režimu**

Podávání vysokodávkované chemoterapie v rámci přípravného režimu je provázeno výraznou orgánovou a slizniční toxicitou. **Mukositida** je závažné poškození sliznice různých úseků zažívacího traktu, od dutiny ústní až po tlusté střevo. Může se projevovat silnými bolestmi, ulceracemi, zvracením a průjmem. Je nejčastější komplikací časného období po TKB a vyvolána především myeloablativním přípravným režimem a užíváním metotrexátu pro prevenci GVHD (Copelan 2006). Druhou nejzávažnější časnou komplikací je **veno-okluzivní choroba jater**, charakterizovaná bolestivou hepatomegalií, ikterem a retencí tekutin vedoucí někdy až k renálnímu či respiračnímu selhání. Toto onemocnění bývá následkem celotělového ozáření, podávání busulfanu, cyklofosfamidu a dalších léčiv přípravného režimu. V pozdním období po TKB se toxicita přípravného režimu může projevit zvýšením rizika vzniku sekundárních malignit nebo trvalými poruchami reprodukčních schopností (Krejčí a spol. 2009).

### 3.1.4.2. Infekční komplikace

Pacienti po TKB jsou ohroženi širokou škálou primárních bakteriálních (*Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*), virových (Herpesviry, respirační viry, HHV-6) i houbových infekcí (rody *Candida* a *Aspergillus*), včetně infekcí oportunními patogeny (rody *Pneumocystis*, *Listeria*, *Toxoplasma*), ale i reaktivací latentních virů (HSV, VZV, EBV, CMV) (Hiemenez a spol. 2009). Individuální vnímavost k infekci je ovlivněna celou řadou faktorů: vlastním primárním onemocněním a jeho léčbou, poškozením sliznice trávicího traktu a kůže použitým přípravným režimem, typem dárce, úrovni HLA shody, zdrojem a počtem převedených kmenových krvetvorných buněk, manipulací se štěpem, dlouhodobým používáním kanyl a katetrů, neutropenií a imunodeficiencí příjemce po TKB (Junghanass a spol. 2002).

### 3.1.4.3. Selhání nebo rejekce štěpu

Stav, kdy po TKB nedojde k přihojení štěpu vůbec, se označuje jako primární selhání štěpu. Situace, kdy po původním přihojení štěpu dojde k jeho rejekci, označujeme za selhání sekundární. Příčinou těchto stavů je především nedostatečná kvalita štěpu, nedostatečné uchycení krvetvorných buněk v kostní dřeni a imunologické faktory (Krejčí a spol. 2009).

### 3.1.4.4. Reakce štěpu proti hostiteli

Nejzávažnější imunologickou komplikací, která významným způsobem zvyšuje morbiditu a mortalitu po alogenní TKB, je reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Tato závažná reakce je definována jako rychle se rozvíjející systémové onemocnění doprovázené poškozením tkání různých orgánů (Ferrara 1993). Je charakterizovaná diferenciací aloreaktivních T buněk dárce na efektorové buňky, které vedou k poškození tkání příjemce, vyplavení dalších populací zánětlivých buněk a následné dysregulaci cytokinů. K aktivaci alogenních T buněk dárce dochází na základě rozpoznání rozdílů v genetických polymorfismech HLA a non-HLA systémů (Welniak a spol. 2006).

Podle klinického obrazu a doby vzniku GVHD se rozlišují dvě formy. **Akutní GVHD**, která vzniká do dne 100 po alogenní TKB, postihuje kůži, sliznici trávicího ústrojí a játra. Klinicky se projevuje různými kombinacemi následujících příznaků: erytém, exantém, hyperbilirubinémie, elevace jaterních enzymů, nechutenství, zvracení nebo průjem. Podle intenzity postižení těchto terčových orgánů se akutní GVHD klasifikuje na

stupně I. – IV. (Przepiorka a spol. 1995). **Chronická GVHD** vzniká po dni 100 po alogenní TKB, postihuje mnoho orgánových systémů, především však kůže, játra, oči, ústa, jícn a plíce. Její projevy jsou podobné chronickým autoimunitním chorobám typu sklerodermie nebo Sjögrenova syndromu a často končí fibrózou postiženého orgánu. Na základě zhodnocení stupně funkčního poškození jednotlivých orgánů je klasifikována do dvou forem – limitovaná a extenzivní chronická GVHD (Sullivan a spol. 1999).

Rozdíly mezi akutní a chronickou GVHD v době vzniku, lokalizaci a typu postižení orgánů, klinických projevech a jejich dynamice naznačují, že jsou založeny na rozdílném imunopatologickém mechanismu (Toubai a spol. 2008).

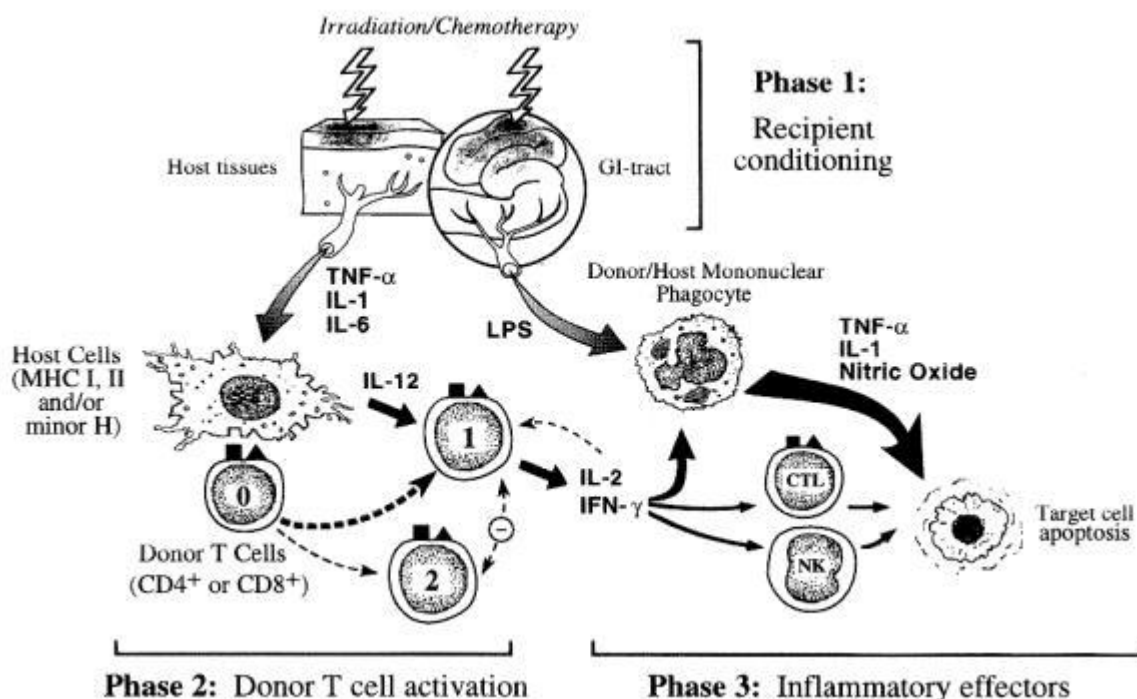
#### **3.1.4.4.1. Imunobiologie akutní reakce štěpu proti hostiteli**

Patofyziologie akutní GVHD je složitý a komplexní proces (viz Obrázek č. 1). Pro vznik GVHD je však nezbytné, aby byly splněny 3 základní předpoklady, které v roce 1966 zformuloval Billingham (Billingham 1966):

- štěp musí obsahovat imunokompetentní buňky,
- příjemce musí exprimovat tkáňové antigeny, které nejsou přítomny u dárce štěpu,
- příjemce musí být schopen stimulovat buňky dárce, ale zároveň jeho imunitní systém nesmí být schopen vyvolávat imunitní odpověď.

V současné době je všeobecně přijato, že mnohastupňový proces rozvoje akutní GVHD je dělen do tří různých fází (Ferrara a spol. 2003). První dvě fáze představují aferentní větve GVHD, třetí fáze pak větve eferentní.

Obrázek č. 1: Imunopatofyziologie GVHD - schematické znázornění interakce zúčastněných buněk a cytokinů produkovaných T-buňkami a mononukleárními fagocyty. Akutní GVHD se postupně rozvíjí do třístupňového procesu, ve kterém mononukleární fagocyty spolu s dalšími typy buněk – po komplexní interakci s cytokiny – jsou zodpovědné jak za spuštění reakce štěpu proti hostiteli, tak za následné poškození tkání příjemce. Převzato od W. Krengera (Transplantation 1997).



V první fázi akutní GVHD dochází k aktivaci buněk prezentujících antigen (APC). Nastává ještě před převodem dárcovských buněk do organismu příjemce a je dána především postižením tkání způsobeným jeho základním onemocněním, předchozí léčbou, infekcí a intenzitou přípravného režimu. Použitý přípravný režim, který zahrnuje ozáření a chemoterapii, je pro příjemce značně toxický a v poškozených tkáních indukuje produkci celé řady cytokinů a chemokinů (Ferrara 1993). Tyto komplexní pochody jsou v literatuře často označovány jako „cytokinová bouře“ (Sun a spol. 2007). Nejčastěji produkované pro-zánětlivé cytokiny, vylučované aktivovanými buňkami příjemce, jsou tumor nekrotizující faktor (TNF)- $\alpha$  a interleukin (IL)-1 (Xun a spol. 1994). Přítomnost těchto cytokinů zvyšuje expresi adhezivních molekul, kostimulačních molekul a MHC antigenů (Chang a spol. 1986). Dochází k aktivaci dendritických buněk (APC) příjemce a k rozpoznávání MHC a/nebo vedlejších („minor“) histokompatibilních antigenů (miHA)

zralými T buňkami dárce (Matzinger 2002). Přípravný režim a navíc i přímé působení TNF- $\alpha$  v trávicím traktu vedou k poškození integrity střevní sliznice. Přes poškozenou sliznici dochází k úniku lipopolysacharidu, součásti buněčné stěny gram-negativních bakterií, který ve střevních lymfocytech a makrofázích indukuje další sekreci TNF- $\alpha$  a IL-1 (Nestel a spol. 1992). Tím dochází jak k většímu lokálnímu poškození tkáně, tak i k dalšímu zesílení celkové zánětlivé odpovědi, včetně další aktivace příjemcových buněk prezentujících antigen (Cook a spol. 1998).

**Ve druhé fázi akutní GVHD** jsou klíčové následující děje: prezentace antigenů příjemce T buňkám dárce, aktivace T buněk dárce, jejich proliferace, diferenciaci a migrace. Po infúzi štěpu rozeznávají T buňky dárce rozdílné antigeny příjemce prostřednictvím aktivovaných buněk prezentujících antigen (APC). Ačkoli alogenní antigeny mohou být prezentovány přímo APC příjemce nebo nepřímo APC dárce (Shlomchik 2003), zdá se, že přítomnost APC příjemce je pro vyvolání GVHD proti MHC nebo miHA neshodám klíčová (Duffner a spol. 2004). Na zpracování a prezentaci antigenů naivním T buňkám se podílí především dendritické buňky (Banchereau a spol. 1998). V nezralé formě jsou rozmístěny ve tkáních, především bariérových orgánech, jako jsou kůže a střevo. Vyžívání dendritických buněk je primárně indukováno působením prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$  a IL-1) a produktů patogenů (lipopolysacharid) uvolněných během první fáze akutní GVHD (Janeway a spol. 2002). Rozmístění APC ve tkáních tak může vysvětlovat neobvyklou lokalizaci akutní GVHD v cílových orgánech. Pro úplnou aktivaci T buněk nestačí pouze vazba receptoru T lymfocytu (TCR) s alogenním peptidem příjemce prezentovaným ve vazbě na MHC molekulu. Je nezbytný ještě druhý, tzv. kostimulační signál (Sharpe a spol. 2002). Nejdůležitější úloha v iniciaci GVHD je přisuzována interakcím kostimulačních molekul CD28/CTLA-4:B7 (Yu a spol. 1998), která zahrnuje pozitivní (CD28:B7) i inhibiční (CTLA-4:B7) signál, a CD40:CD40L (CD154).

Povaha aloantigenů příjemce rozhoduje o tom, která ze subpopulací T buněk dárce bude proliferovat a diferencovat (Sun a spol. 2007). Čím větší je rozdíl mezi HLA dárce a příjemce, tím větší je odpověď T buněk. Rozdíly v HLA antigenech I. třídy stimulují CD8<sup>+</sup> T buňky a rozdíly v HLA antigenech II. třídy stimulují CD4<sup>+</sup> buňky. U HLA identických párů T buňky dárce rozeznávají rozdíly v non-HLA antigenech a ty mohou indukovat akutní GVHD prostřednictvím CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T buněk dárce (Wu a spol. 2006). Na poškození tkáně v efektorové fázi GVHD se mohou kromě cytotoxických T buněk podílet i NK buňky. NK buňky jsou negativně regulovány specifickými inhibičními

receptory (např. pro HLA antigeny I. třídy). Proto v případě HLA-neshodné transplantace může dojít ke spuštění aloreaktivity zprostředkované NK buňkami dárce. Tyto buňky se stávají hlavními producenty IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a NO, a tím přispívají k poškození tkání (Filep a spol. 1996). Naopak, bylo také prokázáno, že NK buňky potlačují GVH reakci a přispívají ke GVL účinku. Pravděpodobně se tak děje prostřednictvím odstranění APC hostitele a/nebo uvolněním imunosupresivního cytokinu TGF- $\beta$  (Asai a spol. 1998). V praxi je tento princip aplikován u haploidentických transplantací, kdy rozdíly v HLA I. třídy mezi dárce a příjemcem, které řídí aloreaktivitu zprostředkovanou NK buňkami dárce směrem ke GVH reakci, způsobí silný GVL účinek a zvýší šanci přihojení štěpu bez vyvolání akutní GVHD (Ruggeri a spol. 2002).

Důležitou populací buněk jsou CD4+CD25+Foxp3+ regulační T lymfocyty (Tregs), které hrají důležitou roli v potlačení imunitní odpovědi na vlastní nebo alogenní antigeny (Sakaguchi a spol. 1995). Studie *in vitro* prokázaly, že tyto buňky potlačují aktivaci jak CD4+, tak CD8+ běžných CD25- T buněk, a to působením buď na cílových buňkách nebo na buňkách prezentujících antigen (Cederbom a spol. 2000). Navíc potlačují schopnost aloreaktivních T buněk dárce indukovat akutní GVHD bez potlačení GVL efektu (Edinger a spol. 2003). Další kandidátní populací T buněk, které by mohly být pro rozvoj akutní GVHD významné, jsou Th17 lymfocyty. Jejich potenciální role v patogenezi GVHD je však zatím neznámá a je předmětem řady studií (Socié a spol. 2009).

Aktivace a proliferace T buněk dárce je následována uvolněním řady cytokinů a chemokinů, především je aktivována transkripce genů pro Th1 cytokiny jako jsou interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$  a jejich receptory (Tseng a spol. 2002). Pod vlivem IL-2 a dalších imunních mediátorů dochází ke klonální expanzi aloreaktivních T buněk a diferenciaci v cytotoxické T lymfocyty (CTL). Bylo však také prokázáno, že dlouhodobé působení IL-2 vede v organismu příjemce k zvýšené tvorbě CD4+CD25+Foxp3+ regulačních T lymfocytů a rozvoji dlouhodobé tolerance po alogenní TKB (Sykes a spol. 1990). IFN- $\gamma$ , společně s IL-2, způsobuje další expanzi T buněk, indukuje odpověď CTL a NK buněk a vyvolává produkci IL-1 a TNF- $\alpha$  mononukleárními fagocyty. Tento klíčový mediátor působí i na dalších úrovních patogeneze akutní GVHD: zvyšuje expresi adhezivních molekul, chemokinů a HLA molekul, bylo popsáno i přímé poškození tkání způsobené IFN- $\gamma$  (Dickinson a spol. 1991). Po stimulaci prozánětlivými cytokiny (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) nebo dalšími podněty (lipopolysacharid) dochází k zvýšení exprese chemokinů v buňkách infiltrujících zánětlivou tkáň, tj. v monocitech nebo makrofázích, buňkách epiteliálních nebo endoteliálních a fibroblastech. Chemokiny mají zásadní



význam pro migraci efektorových imunitních buněk (monocytů, granulocytů a efektorových T buněk) do sekundárních lymfatických orgánů a do tkání (Cyster 2005). Studie na myších modelech akutní GVHD prokázaly rozhodující roli několika chemokinů a jejich receptorů (zejména MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, MCP-1, MCP-3 a CCR5), a to směřováním T buněk dárce do cílových tkání akutní GVHD (New a spol. 2002). Zvýšená exprese chemokinů CCL2-5, CXCL2, CXCL9-11, CCL17 a CCL27 v průběhu akutní GVHD naznačuje jejich možnou klíčovou roli při migraci buněk do jater, sleziny, kůže a plic (Mapara a spol. 2006). Kromě chemokinů a jejich receptorů je „homing“ T lymfocytů do specifických míst GVHD zánětu regulován i interakcí mezi vybranými selektiny, integriny a jejich ligandy (Wysocki a spol. 2005). Například pro rozvoj střevní formy GVHD je důležité směřování T lymfocytů dárce do Peyerských plaků prostřednictvím interakce  $\alpha 4\beta 7$  integrinu a jeho ligandu MAdCAM-1 (Waldman a spol. 2006).

**Třetí – efektorová fáze akutní GVHD**, která vede ke konečnému poškození terčových orgánů GVHD, je složitá kaskáda různých buněčných a zánětlivých efektorů, které se vzájemně současně nebo stupňovitě ovlivňují.

Hlavním buněčným efektozem GVHD jsou cytotoxické T lymfocyty (CTL), které se na konečném poškození tkáně při akutní GVHD podílí mechanismy založenými na kontaktu: perforin/granzym B, Fas/Fas ligand a TNF/TNFR (van den Brink a spol. 2002). Perforin je skladován v cytotoxických granulech CTL a NK buněk společně s granzymem a dalšími proteiny. Po rozpoznání cílové buňky (na základě TCR-MHC interakce) se z granulí uvolňuje, v buněčné membráně formuje póry, kterými do cílové buňky vstupuje granzym a aktivací kaspáz indukuje její apoptózu (Voskoboinik a spol. 2006). Stejně tak interakce FasL s Fas receptorem na membráně cílové buňky vede prostřednictvím aktivace kaspáz a formaci signálního komplexu indukujícího buněčnou smrt k Fas zprostředkované apoptóze (Nagata a spol. 1995). Předpokládá se, že CD4<sup>+</sup> CTL upřednostňují mechanismus Fas/FasL, zatímco CD8<sup>+</sup> CTL primárně využívají mechanismus perforin-granzym. I pro jednotlivé formy akutní GVHD byly prokázány dominantní mechanismy poškození tkáně: jaterní GVHD je zprostředkována převážně mechanismem Fas/FasL, střevní GVHD je zprostředkována hlavně přímým působením TNF- $\alpha$  a kožní GVHD je zprostředkována jak Fas/FasL, tak TNF- $\alpha$  (Hattori a spol. 1998). Z experimentálních dat vyplývá, že signální dráha TNF/TNFR by se mohla uplatňovat v rozvoji gastrointestinální formy GVHD, ale může hrát roli i při CD8<sup>+</sup> T buňkami zprostředkovaném GVL efektu (Schmaltz a spol. 2002).

Spolu s cytotoxickou aktivitou T buněk dochází v průběhu třetí fáze akutní GVHD také k přímému poškození tkání zprostředkovanému zánětlivými mediátory uvolňovanými aktivovanými makrofágy (TNF- $\alpha$ , IL-1, oxid dusnatý) (Schmaltz a spol. 2001). TNF- $\alpha$  se v patogenezi akutní GVHD uplatňuje na celé řadě úrovní: stimuluje vyžívání dendritických buněk, a tím podporuje prezentaci aloantigenů; prostřednictvím indukce tvorby zánětlivých chemokinů přitahuje efektorové T buňky, neutrofile a monocyty do cílových tkání GVHD; indukcí apoptózy a nekrózy způsobuje přímé poškození tkání; prostřednictvím signální dráhy TNF/TNFR1, TNFR2 se podílí na přímé aktivaci T buněk dárce (Wall a spol. 1994). IL-1, druhý nejdůležitější prozánětlivý cytokin efektorové fáze GVHD, je v jejím průběhu predominantně secernován ve dvou cílových orgánech GVHD - slezině a kůži (Abhyankar a spol. 1993). Oxid dusnatý, produkován aktivovanými makrofágy, indukuje imunopresi a prostřednictvím inhibice proliferace zárodečných epiteliálních buněk potlačuje reparační pochody v poškozených tkáních, především ve střevech a kůži (Nestel a spol. 2000).

#### **3.1.4.4.2. Imunobiologie chronické reakce štěpu proti hostiteli**

Biologický mechanismus chronické GVHD nebyl doposud zcela jednoznačně definován. Nicméně z experimentálních dat na zvířecích modelech bylo vytvořeno několik teorií, které by mohly patofyziologii chronické GVHD vysvětlovat. Tyto teorie zahrnují: poškození thymu předchází akutní GVHD s následnou defektní negativní selekcí T buněk, aberantní produkci TGF- $\beta$ , produkci autoprotiátok nebo deficit T regulačních buněk (Martin 2008).

Prodělaná akutní GVHD je největším rizikovým faktorem vzniku chronické GVHD. Poškození tkání a zánětlivá reakce vyvolaná akutní GVHD spolu s její léčbou mohou hrát při vzniku chronické GVHD podstatnou roli. Nicméně cílové antigeny, cytokinové a buněčné efekторы, které se uplatňují v rozvoji akutní nebo chronické formy GVHD, mohou být rozdílné. Zatímco rozvoj akutní GVHD je podmíněn přímou prezentací aloantigenů APC příjemce, chronická GVHD, která se rozvíjí až po kompletním přihojení krvetvorby dárce, je iniciována nepřímou prezentací aloantigenů dárcovskými APC (Sakoda a spol. 2007). Studie Andersona na myším modelu také prokázala klíčovou roli CD80/86 kostimulace pro aktivaci T buněk dárce a indukci chronické GVHD a jejich jednotlivých forem (Anderson a spol. 2005). Pokud porovnáme subpopulace Th buněk dárce zúčastněné u jednotlivých typů GVHD, pak pro indukci akutní GVHD jsou klíčové Th1 buňky a jimi uvolňované cytokiny, zatímco chronická GVHD je charakterizována

aktivací lymfocytů dárce s Th2 fenotypem (Okamoto a spol. 2000). Stupeň závažnosti chronické GVHD ovlivňují také T regulační lymfocyty. Bylo prokázáno, že CD4+CD25+ T buňky příjemce i dárce redukuje intenzitu onemocnění (Zorn a spol. 2005). Na rozdíl od akutní GVHD, v jejíž patogenezi se uplatňují T buňky dárce, několik posledních studií potvrdilo, že v patogenezi chronické GVHD se uplatňují navíc také B lymfocyty dárce. Toto tvrzení podporuje nález protilátek proti Y-vázaným histokompatibilním antigenům (Miklos a spol. 2005), zvýšené hladiny faktoru aktivujícího B buňky (Sarantopoulos a spol. 2007), zvýšeného počtu B buněk a hladin autoprotiátek (Zhang a spol. 2006).

### **3.1.5. Faktory ovlivňující rozvoj komplikací po TKB**

Riziko rozvoje závažných komplikací po TKB, stejně jako celkové přežívání a úmrtnost spojená s transplantací (TRM), mohou být ovlivněny celou řadou klinicko-biologických a genetických faktorů. Tyto faktory mohou být vázány na příjemce nebo na dárce samotné, anebo může být rozhodující vzájemná kombinace vybraných charakteristik mezi dárce a příjemcem.

#### **3.1.5.1. Faktory na straně příjemce**

Mezi hlavní rizikové faktory, které ovlivňují výsledek TKB ze strany příjemce a byly zahrnuty do výpočtu klinického skóre rizika Evropskou skupinou pro transplantace periferních kmenových buněk a kostní dřeně, patří:

- základní onemocnění, pro které je TKB indikována, a jeho stádium,
- věk pacienta,
- časový interval mezi stanovením diagnózy a transplantací (Gratwohl a spol. 2009).

Nicméně lze předpokládat, že celá řada dalších klinických proměnných na straně příjemce může být pro výsledek transplantace rozhodující a je v posledních letech předmětem studia. Mezi tyto parametry patří CMV sérostatus příjemce, index komorbidit (Sorrow a spol. 2009), biologický stav příjemce vyjádřený indexem Karnofsky, použitý přípravný režim, event. typ GVHD profylaxe.

#### **3.1.5.2. Faktory na straně dárce**

Mezi rizikové faktory, které ovlivňují výsledek TKB ze strany dárce můžeme zařadit:

- typ dárce (příbuzný x nepříbuzný) – rovněž zahrnutý do výpočtu klinického skóre rizika,
- věk dárce,
- zdroj zárodečných krvetvorných buněk (periferní kmenové buňky, kostní dřev, pupečnicková krev),
- množství CD34+ buněk (Pulsipher a spol. 2009).

### **3.1.5.3. Faktory společné páru dárce-příjemce**

Úroveň shody mezi dárce a příjemcem v určitých biologických nebo genetických parametrech definuje třetí skupinu rizikových faktorů TKB. Z biologických faktorů je pro výsledek TKB velmi důležitá kombinace pohlaví dárce a příjemce (poslední z parametrů výpočtu klinického skóre rizika). Pokud jde o genetické faktory, úroveň HLA shody mezi dárce a příjemcem je základním kritériem pro výběr konkrétního páru pro TKB a její význam je doložen celou řadou studií (Shaw a spol. 2010, Petersdorf 2008). Nicméně v posledním desetiletí se do popředí dostává zájem o studium významu polymorfismu dalších genetických systémů, označovaných obecně jako non-HLA geny (Dickinson a spol. 2010).

## **3.2. SOUVISLOST VYBRANÝCH IMUNOGENETICKÝCH FAKTORŮ S ROZVOJEM KOMPLIKACÍ PO TRANSPLANTACI KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK**

### **3.2.1. Úvod**

Úspěšnost transplantace závisí nejen na klinických faktorech na straně pacienta a/nebo dárce, ale výsledek TKB může být významně ovlivněn i jejich genetickou variabilitou. Ta se může projevit jak na úrovni jejich vzájemné neshody v polymorfních proteinech - transplantačních antigenech, tak i na úrovni regulace genů imunitní odpovědi, ovlivnění rizika orgánové toxicity a ovlivnění rozvoje tolerance a rekonstituce imunity po alogenní TKB (Hansen a spol. 2008). Úloha hlavního komplexu tkáňové slučitelnosti (MHC, HLA u člověka) pro úspěšnost TKB je všeobecně uznávána a doložena řadou studií (např. Ottinger a spol. 2003). Není pochyb, že úroveň shody v HLA systému mezi dárce a příjemcem je základním klíčovým faktorem pro výběr optimálního dárce a pro úspěšnost alogenní TKB (Flomenberg a spol. 2004). V posledních 10 letech však byla publikována řada studií o možném vlivu dalších imunitních genů pro předpověď výsledku

alogenní TKB (tzv. „non-HLA“ geny), kterým by bylo možno vysvětlit komplikace alogenní TKB i u HLA-identických párů. Do této skupiny patří tzv. vedlejší („minor“) histokompatibilní antigeny, geny pro receptory NK buněk (KIR geny), geny pro cytokiny, chemokiny a jejich receptory, dále geny vrozené imunity a geny ovlivňující metabolismus léků (Mullighan a spol. 2007).

### **3.2.2. HLA geny a jejich význam pro TKB**

Objev HLA systému v 60. letech minulého století (Dausett 1954), stejně jako rozpoznání významu HLA shody mezi dárcem a příjemcem pro prevenci selhání štěpu a rozvoje reakce štěpu proti hostiteli, znamenaly zásadní převrat v úspěšnosti transplantací kmenových krvetvorných buněk.

Geny pro HLA systém jsou umístěny na krátkém raménku 6. chromozómu v oblasti 6p21 a vykazují značný polymorfismus (Marsh a spol. 2010). Jejich produkty – HLA antigeny jsou zodpovědné za aloimunní odpovědi typu hostitel proti štěpu a štěp proti hostiteli. Další imunologický efekt - štěp proti leukémii (GVL) - je asociován s mírou HLA neshod mezi dárcem a příjemcem, čehož může být využito pro snížení pravděpodobnosti recidivy onemocnění po TKB u pacientů s vysokým rizikem (Petersdorf 2007). Rozdíly v genetických variantách transplantačních antigenů mezi příjemcem a dárcem mohou významně ovlivnit rozvoj jak akutní, tak chronické GVHD a regulovat intenzitu imunitní odpovědi ovlivněním aktivace nebo funkce různých imunitních buněk.

Pro výsledek TKB je v současné transplantační praxi rozhodující shoda HLA alel mezi dárcem a příjemcem v 5 klasických HLA lokusech – HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, tj. ideální je shoda 10/10 (Shaw a spol. 2010). Shoda ve všech 5 lokusech snižuje riziko klinicky závažné akutní reakce štěpu proti hostiteli, úmrtnost po TKB a je spojena s lepším přežíváním ve srovnání s transplantacemi od HLA neshodných dárců. Rozsáhlá studie amerického národního registru dárců dřeně (NMDP) na 3 857 nepříbuzenských TKB prokázala, že 1 neshoda mezi dárcem a příjemcem (7/8) v jakémkoli z antigenů HLA-A, -B, -C, -DRB1 signifikantně zvyšuje, ve srovnání s použitím 8/8 shodného dárce, riziko akutní GVHD a zhoršuje celkové přežívání po TKB (1-leté celkové přežívání: 43% versus 52%,  $p < 0,001$ ). Stejně tak přežívání 6/8 shodného příjemce je ve srovnání se 7/8 shodným dárcem také signifikantně horší (1-leté celkové přežívání: 33% versus 43%,  $p < 0,001$ ). Navíc tato studie ukázala, že význam neshody v HLA-A nebo HLA-DRB1 (relativní riziko 1,36, resp. 1,48) je větší než neshoda lokusů HLA-B nebo HLA-C (relativní riziko 1,16, resp. 1,19). U většiny lokusů nebyly pozorovány rozdíly v celkovém

přežívání v závislosti na tom, zda se jednalo o neshodu alelickou nebo antigenní, s výjimkou HLA-C lokusu. Zde neshoda v HLA-Cw antigenu zvyšovala transplantační riziko, zatímco neshoda v HLA-C\* alele nikoliv. Několika studiemi bylo navíc potvrzeno, že neshoda mezi dárcem a příjemcem v HLA-DQB1 není asociována s horším přežíváním po TKB (Flomenberg a spol. 2004, Lee a spol. 2007). Avšak v případě, že HLA-DQB1 neshoda se přidává k další neshodě některého z HLA lokusů I. třídy (HLA-A,-B-C), pak u těchto 7/8 nebo 6/8 shodných párů tato kombinace neshod přežívání po TKB ovlivňuje (Petersdorf a spol. 2004, Lee a spol. 2007). Význam shody v HLA-DPB1 je méně jasný, a to především z důvodu, že u celé řady 10/10 shodných párů dárce/příjemce nelze dosáhnout kompatibility pro tento lokus. Nicméně poslední studie naznačují, že i neshoda v HLA-DPB1 lokusu je asociována se selháním štěpu a GVHD (Shaw a spol. 2007).

Studie japonského registru dárců na 1790 nepříbuzenských TKB potvrdila HLA-A, -B a -DQB1 neshody jako nezávislé rizikové faktory úmrtnosti po TKB, zjistila trend k vyšší úmrtnosti po TKB u HLA-C neshodných příjemců, ale naopak neprokázala žádný efekt HLA-DRB1 neshody (Kawase a spol. 2007). Z rozdílných výsledků studií vyplývá, že za určitých okolností (např. typ TKB, použitý přípravný režim a ošetření štěpu, stadium nemoci) některé typy HLA neshod mezi dárcem a příjemcem mohou být tolerovány, některé mohou být „přípustné“ (neovlivní negativně výsledek TKB), zatímco jiné HLA neshody jsou „nepřípustné“ (asociovány s horším přežíváním, Shaw a spol. 2010). Tato myšlenka byla aplikována například ve studiích zkoumajících význam HLA-DPB1 neshody. Data z těchto studií potvrzují význam zohlednění HLA-DPB1 „přípustných“ neshod při výběru 10/10 HLA shodných dárců, který se odráží v lepším přežívání příjemců než u pacientů transplantovaných 10/10 shodným dárcem s HLA-DPB1 „nepřípustnou“ neshodou (Shaw a spol. 2009). Klinické zkušenosti navíc ukazují, že vyšší míra HLA neshody je asociovaná s prospěšným imunologickým efektem štěp proti leukemii (GVL). Této skutečnosti může být využito především při léčbě vysoce rizikových hematologických malignit (Eapen a spol. 2007).

### **3.2.3. Non-HLA geny a jejich význam pro TKB**

Závažné komplikace, které se rozvíjejí po alogenní TKB, jsou hlavní překážkou její úspěšnosti. Relaps základního onemocnění stále zůstává hlavní příčinou smrti po TKB u pacientů transplantovaných HLA-identickým sourozencem (30-34% úmrtí). Nicméně i další závažné komplikace TKB, jako je GVHD (15-25%), infekce (10-17%) a toxicita léčby (35% úmrtí), jsou příčinou vysoké potransplantační úmrtnosti, a to i u příjemců

kmenových krvetvorných buněk od HLA identických dárců (Gratwohl a spol. 2005). Prevence těchto komplikací je v současné době zajištěna především intenzivní podpůrnou léčbou, včetně antimikrobiální profylaxe a imunosuprese, a maximální shodou mezi dárcem a příjemcem na úrovni jednotlivých HLA alel.

Jak již bylo popsáno v úvodní části této práce, GVHD je komplexní mnohastupňový proces, který zahrnuje jak mechanismus klasického rozpoznávání antigenů prostřednictvím HLA molekul, tak i další patofyziologické mechanismy - rozpoznávání antigenů přes neklasické HLA molekuly (např. receptory NK buněk), kooperaci vedlejších histokompatibilních antigenů a pro-zánětlivé prostředí. Uplatnění jednotlivých mechanismů při rozvoji GVHD je závislé na konkrétních klinicko/biologických charakteristikách příjemce, na typu dárce, zdroji kmenových krvetvorných buněk, intenzitě přípravného režimu a úrovni HLA shody.

Vzhledem k tomu, že celá řada imunoregulačních genů, které kódují mediátory těchto klíčových mechanismů GVHD, vykazuje vysoký polymorfismus, úsilí vědců se v posledním desetiletí upřelo směrem k definování takových non-HLA genetických determinant, které mohou významným způsobem ovlivňovat riziko rozvoje GVHD a dalších komplikací po TKB a mohly by být začleněny do rutinní typizační strategie při výběru ideálního dárce (Mullighan a spol. 2007, Ting a spol. 2013). Studium polymorfismu genů, které se účastní v patogenezi imunologických komplikací po alogenní TKB, je zaměřeno na několik skupin genů, jejichž jednotlivé genotypy mohou ovlivnit výskyt a závažnost GVHD, toxicitu léků použitých v přípravném režimu nebo při profylaxi GVHD, výskyt infekčních epizod i celkové přežívání po TKB. Jedná se o následující skupiny genů:

- geny pro cytokiny (viz kapitola 3.2.3.1.),
- geny pro chemokiny a jejich receptory (viz kapitola 3.2.3.1.),
- geny pro adhezivní molekuly (viz kapitola 3.2.3.2.),
- geny pro molekuly vrozené imunity (např. NOD2/CARD15, MBL, TLR)
- geny pro vedlejší histokompatibilní antigeny (např. HA-1, -2, -4, -5, HY),
- geny pro receptory NK buněk (KIR geny),
- geny ovlivňující metabolismus léků (např. geny pro MTHFR a GST).

Znalost non-HLA genotypu dárce a příjemce v polymorfismech relevantních pro TKB může být klíčová pro vytvoření nových preventivních a/nebo terapeutických přístupů definovaných na základě genotypů asociovaných s rizikem rozvoje závažných komplikací po TKB (Dickinson a spol. 2005).

### 3.2.3.1. Geny pro cytokiny a chemokiny

Cytokiny a chemokiny hrají důležitou roli v navození a regulaci imunitní odpovědi. Identifikace polymorfismu jejich genů, který ovlivňuje úroveň produkce nebo funkci jednotlivých mediátorů, nabízí možné vysvětlení variability imunitní odpovědi transplantovaného štěpu nebo jeho příjemce.

Cytokiny a další imunitní molekuly se významně uplatňují i v patogenezi komplikací spojených s alogenní TKB, ať už při akutní či chronické reakci štěpu proti hostiteli nebo při infekci. Rozdíly v incidenci, závažnosti a trvání těchto komplikací jsou dány klinickými i genetickými faktory na straně příjemce a/nebo dárce. Některé genové polymorfismy (non-HLA polymorfismy) mohou ovlivňovat produkci a regulaci imunitních molekul, čímž mohou predisponovat jedince k výskytu komplikací po alogenní TKB. Polymorfismy genů pro vybrané cytokiny/chemokiny jsou proto v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu, jehož výsledky by bylo možné využít pro předpověď transplantačních komplikací pro konkrétní dvojici dárce a příjemce štěpu (Dickinson a spol. 2001) a jako podklad k individuálnímu nastavení profylaxe a léčby po transplantaci (profylaxe „šitá na míru“).

V kontextu alogenních TKB je studována široká škála genových polymorfismů cytokinů (viz Tabulka č. 2), především pak polymorfismy genů pro interleukin 6 (*IL6*), interleukin 10 (*IL10*), tumor nekrotizující faktor (*TNF*), interferon gama (*IFNG*) a interleukin 1 (*IL1*).

Tabulka č. 2: Přehled nejčastěji studovaných polymorfismů cytokinových genů a jejich asociace s komplikacemi po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk

GEN	POLYMORFISMUS	ASOCIACE S TKB	REFERENCE
<i>IL1A</i>	VNTR	alela 2 dárce – ↑ chronické GVHD	Cullup H (2003)
	-889 C/T SNP	alela 2 dárce – ↑ chronické GVHD	Cullup H (2003)
		T alela příjemce i dárce – lepší přežívání, ↓ TRM	MacMillan ML (2003)
		žádná asociace	Mehta PA (2007)
<i>IL1B</i>	-511 C/T SNP	žádná asociace	Cullup H (2001)



		T alela příjemce i dárce – lepší přežívání, ↓ TRM	MacMillan ML (2003)
		žádná asociace	Lin M (2003)
	+3953 C/T SNP	žádná asociace	Cullup H (2001)
		žádná asociace	Lin M (2003)
		T alela příjemce - ↑ akutní GVHD	Mullighan C (2004)
<i>IL1RA</i>	VNTR intron 1	alela 2 dárce – ↓ akutní GVHD	Cullup H (2001)
		absence <i>ILI</i> RN*2 u dárce - ↑ akutní GVHD	Rocha V (2002)
		<i>IL1RA</i> genotypy příjemce - ↑ chronické GVHD	Rocha V (2002)
	+9261 A/G SNP	žádná asociace	Lin M (2003)
<i>IL2</i>	-330 T/G SNP	G alela příjemce - ↑ akutní GVHD	MacMillan ML (2003)
		GT genotyp příjemce - ↑ chronické GVHD	Harkensee C (2012)
<i>IL6</i>	-174 G/C SNP	G alela příjemce - ↑ chronické GVHD	Cavet J (2001)
		G alela příjemce - ↑ chronické GVHD	Socié G (2001)
		G alela dárce - ↑ akutní GVHD	Mullighan C (2004)
		G alela dárce - ↑ akutní GVHD	Karabon L (2005)
		žádná asociace	Lin M (2003)
<i>IL7RA</i>	+1237 A/G SNP	G alela dárce - kratší přežívání, ↑ TRM	Shamim Z (2006)
<i>IL10</i>	-1064 VNTR	delší alela u příjemce - ↑ akutní GVHD	Middleton PG (1998) Cavet J (1999)
		alely 12,14,15 u příjemce – kratší přežívání	Bettens F (2006)
	IL10.G (CA) <sub>n</sub> VNTR	delší alela u příjemce - ↑ chronické GVHD	Takahashi H (2000)
	-592 A/C SNP	A alela příjemce - ↓ akutní GVHD, ↓ TRM	Lin M (2003)
		AA genotyp příjemce - ↑ akutní GVHD	Sivula J (2009)
		žádná asociace	Tseng LH (2009)
	-1082 G/A SNP	žádná asociace	Lin M (2003) Cavet J (1999) Tseng LH

			(2009) Resende RG (2010)
		GG příjemce - ↑ akutní GVHD	Rocha V (2002)
	<i>IL10</i> haplotyp (-1082, -819, -592)	GCC u příjemce - ↑ akutní GVHD	Socie G (2001)
		GCC u příjemce - ↓ akutní GVHD	Karabon L (2005)
		ATA u příjemce - ↑ chronické GVHD	Mullighan C (2004) Kim DH (2005)
		GCC u příjemce i dárce současně – ↑ akutní GVHD	Bertinetto FE (2006)
<i>IL10RB</i>	+238 A/G SNP	AA genotyp příjemce - ↑ akutní GVHD	Sivula J (2009)
		žádná asociace	Tseng LH (2009)
<i>IL18</i>	<i>IL18</i> haplotyp (-656,-607,-137)	GCG u příjemce – lepší přežívání, ↓ TRM	Cardoso SM (2004)
<i>IFNG</i>	VNTR intron 1	alela 3 u příjemce - ↑ akutní GVHD	Cavet J (2001)
		genotyp 3/3 u příjemce – ↑ chronické GVHD, ↑ reaktivace EBV	Bogunia Kubik (2005) Bogunia Kubik (2006)
	+874 T/A SNP	žádná asociace	Socie G (2001)
<i>TNF</i>	TNFd VNTR	d3/d3 genotyp příjemce - ↑ akutní GVHD	Middleton PG (1998)
		d3/d3 genotyp příjemce - ↑ TRM	Cavet J (1999)
		d3/d3 genotyp, alela d4 nebo d5 příjemce - kratší přežívání	Bettens F (2006)
		d4 alela příjemce i dárce - ↑ akutní GVHD	Nordlander A (2002)
		d4/d4 genotyp příjemce - ↑ akutní GVHD (stupeň III- IV)	Goyal RK (2010)
		žádná asociace	Socie G (2001)
	-238 A/G SNP	Alela A příjemce - ↑ akutní GVHD (stupeň III-IV)	Goyal RK (2010)
		žádná asociace	Socie G (2001)
		GA genotyp příjemce i dárce - ↑ chronické GVHD	Viel DO (2007)
	-308 A/G SNP	žádná asociace	Socie G (2001)

			Middleton PG (1998) Lin M (2003)
		genotyp 1,2 u příjemce - ↑ těžké toxické komplikace	Bogunia-Kubik (2003)
	+488 G/A SNP	A alela příjemce - ↑ akutní GVHD, kratší přežívání	Mullighan C (2004)
	<i>TNF</i> haplotyp (-1031,-863,-857)	TCC haplotyp příjemce i dárce – ↑ akutní GVHD, ↓ relapsu	Ishikawa Y (2002)
<i>TNFR</i>	<i>TNFR2</i> kodon 196 M/R	R alela příjemce - ↑ akutní GVHD, RR genotyp dárce - ↑ chronická GVHD	Stark GL (2003)
		R alela příjemce - ↑ relapsu, R alela dárce - ↑ akutní GVHD, ↓ relapsu	Ishikawa Y (2002)
<i>TGFB1</i>	+10 T/C SNP +25 G/C SNP	příjemci s vysokou produkcí TGFB1 - ↑ akutní GVHD	Tambur AR (2001)
		+25 GG genotyp příjemce - ↑ akutní GVHD	Rashidi-Nezhad A (2010)
		+10 CC genotyp příjemce – kratší přežívání, ↑ TRM	Berro M (2010)
	kodon 10 Leu/Pro	alela Pro u dárce - ↑ akutní GVHD	Hattori H (2002)
<i>TGFB1R</i>	1167 C/T SNP	T alela u příjemce - ↑ akutní GVHD	Hattori H (2002)

Vysvětlivky: ↑ - zvýšené riziko/lepší, ↓ - snížené riziko/horší, VNTR – repetiční polymorfismus (z angl. variable number of tandem repeats), SNP – jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism), GVHD – reakce štetu proti hostiteli, TRM – úmrtnost spojená s TKB (z angl. transplant-related mortality)

### 3.2.3.1.1. Gen pro interleukin 6

Gen pro interleukin 6 kóduje produkci prozánětlivého cytokinu s širokou škálou biologických funkcí. Interleukin 6 ovlivňuje konečnou fázi vyzrání B lymfocytů na plazmatické buňky produkující imunoglobuliny, diferenciaci lymfocytů a monocytů i dalších typů buněk (regulační a Th17 efektorové buňky). Řadí se mezi mediátory akutní fáze a působí také jako endogenní pyrogen u řady autoimunitních a zánětlivých onemocnění (Barton 1997).

Gen *IL6* je lokalizovaný na krátkém raménku 7.chromozomu (7p21). V současné době je popsáno více než 300 jednonukleotidových polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)), jejichž vybrané varianty se mohou uplatňovat v patogenezi

celé řady onemocnění asociovaných se zánětem. Nejvíce studovaným je však funkční polymorfismus v promotorové oblasti genu *IL6* -174 G/C (rs1800795). Bylo popsáno, že jedinci nesoucí v pozici -174 alelu C produkují nižší hladiny interleukinu 6. Tato skutečnost je tak jedním z důkazů pro teorii genetické determinace rozdílné imunitní odpovědi na stresové podněty (Fishman a spol. 1998).

Polymorfismus *IL6* genu byl studován u celé řady onemocnění, jako např. juvenilní systémová chronická artritida (Fishman a spol. 1998), Alzheimerova choroba (Flex a spol. 2013), kolorektální karcinom (Hu a spol. 2013), ale také v kontextu transplantací orgánů nebo kmenových krvetvorných buněk. Studie Marshalla a spol. prokázala silnou asociaci mezi polymorfismem *IL6* genu a incidencí a současně i závažností akutní rejekce ledvinného štěpu. Pacienti, kteří přijali ledvinu od dárce s genotypem *IL6* -174 C/C měli výrazně vyšší riziko výskytu akutní rejekce a navíc sklon k horšímu průběhu rejekčních epizod (Marshall a spol. 2001).

V souvislosti s transplantacemi kmenových krvetvorných buněk je polymorfismus *IL6* genu studován jako možný marker předpovědi rizika vzniku GVHD. V dřívějších studiích byla popsána asociace *IL6* SNP (rs1800795) s rozvojem akutní GVHD jak v genotypu pacienta, tak genotypu dárce a také v kontextu obou typů TKB - od příbuzného i nepříbuzného dárce (Chien a spol. 2012). *IL6* -174\*G alela byla asociována s akutní i chronickou GVHD (Dickinson a spol. 2007). Výsledky jednotlivých studií však popisují význam rozdílných genotypů. Zatímco první studie (Cavet a spol. 2001, Socie a spol. 2001) popsaly asociaci G alely příjemce s rozvojem chronické GVHD, další studie našly asociaci G alely dárce se zvýšeným rizikem rozvoje akutní GVHD stupně II-IV (Mullighan a spol. 2004, Karabon a spol. 2005).

I přes nekonzistentní výsledky uvedených studií se jeví *IL6* SNP (rs1800795) jako jeden z nejsilnějších genetických markerů pro předpověď rizika rozvoje GVHD. Analýza 14 kandidátních SNP (Chien a spol. 2012) ukázala, že u TKB od nepříbuzného dárce byl genotyp dárce asociován s 20-50% zvýšeným rizikem rozvoje akutní GVHD (stupeň IIb-IV). U TKB od HLA shodného příbuzného dárce bylo nalezeno o 60% zvýšené riziko rozvoje akutní GVHD (stupeň III-IV). Navíc, alela *IL6* -174\*C byla u TKB od příbuzného dárce asociována s 20-26% snížením rizika vzniku akutní GVHD (stupeň IIb-IV).

### **3.2.3.1.2. Gen pro interleukin 10**

Interleukin 10 hraje důležitou úlohu v regulaci imunity, a to především cestou inhibice produkce prozánětlivých mediátorů (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF, GM-CSF). Řada

studií prokázala variabilitu syntézy tohoto cytokinu mezi jedinci, což vedlo k hypotéze, že rozdíly v produkovaném množství IL-10 jsou determinovány genetickým polymorfismem (Smith a spol. 2009). Porovnání produkce IL-10 u jednovaječných a dvojvaječných dvojčat umožnilo odhadnout podíl dědičnosti úrovně sekrece IL-10 na 74% (Westendorp a spol. 1997).

Gen pro interleukin 10 se nachází na dlouhém raménku chromozomu 1, konkrétně v oblasti 1q31-q32. V rámci genu *IL10* je popsáno více než 180 jednonukleotidových polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)), z nichž několik bylo identifikováno v promotorové oblasti genu. Promotorové SNP -1082 G/A (rs1800896), -819 C/T (rs1800871) a -592 C/A (rs1800872) vytvářejí v kavkazské populaci 3 haplotypy (GCC, ACC a ATA), které se liší úrovní produkce cytokinu – homozygotní forma GCC haplotypu je asociována s vysokou produkcí IL-10 *in vivo* (Turner a spol. 1997).

U pacientů, kteří podstoupili transplantaci srdce nebo ledviny, bylo prokázáno, že nosičství *IL10* ACC haplotypu (spojeného s nízkou produkcí cytokinu) je asociováno se zvýšeným rizikem rejekce a selhání transplantovaného orgánu (Girnitá a spol. 2008, Thakkinstian a spol. 2008).

Význam jednonukleotidových polymorfismů genu *IL10* je široce studován i v kontextu transplantací kmenových krvetvorných buněk. Bylo publikováno několik studií popisujících asociaci jednotlivých *IL10* SNP nebo *IL10* haplotypu (-1082/-819/-592) s rizikem vzniku GVHD, jejichž výsledky ne vždy korelovaly. Například studie Lin a spol. (2003) prokázala asociaci alely *IL10* -592\*A příjemce se snížením rizika akutní GVHD stupně III-IV, zatímco studie Sivuly a spol. (2009) popsala *IL10* -592 AA genotyp jako rizikový pro rozvoj akutní GVHD. Studie Karabon a spol. (2005) naopak popisuje protektivní efekt *IL10* GCC/GCC haplotypu příjemce na vznik akutní GVHD.

### **3.2.3.1.3. Gen pro monocytární chemotaktický protein 1**

MCP-1 (systematický název CCL2) náleží do podrodiny CC chemotaktických cytokinů - chemokinů (Zlotnik a spol. 2006). Původně byl identifikován jako chemoatraktant specifický pro monocyty, později byla zjištěna jeho schopnost atrahovat i T lymfocyty, dendritické buňky a bazofily. Je vytvářen převážně makrofágy, v menší míře také aktivovanými endoteliálními buňkami a buňkami hladké svaloviny (Nelken a spol. 1991).

Gen pro MCP-1 (*CCL2*) je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromozomu v oblasti 17q11. V genu *CCL2* je v současné době identifikováno 100 jednonukleotidových

polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov./SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov./SNP)). U čtyř SNP (-2136 A/T, -2518 A/G, -2835 C/A a 764 C/G) byla popsána asociace se zvýšenou hladinou produkce MCP-1 proteinu (Rovin a spol. 1999). Promotorový polymorfismus *CCL2* -2518 A/G (rs1024611) je nejčastěji studovaným v souvislosti s patofyziologií různých typů onemocnění (Navratilova 2006).

V kontextu transplantací ledvin byla zvýšená produkce MCP-1 asociována se zhoršením funkce transplantovaného štěpu (Lacha a spol. 2005). Naopak, při dlouhodobém sledování výskytu akutní rejekce po transplantaci jater nebyla nalezena asociace s žádnou z *CCL2* -2518 alel (Schröppel a spol. 2002). U transplantací kmenových krvetvorných buněk je zvažováno, že MCP-1 může v průběhu aktivační fáze GVHD ovlivňovat migraci dárcovských T lymfocytů (Wysocki a spol. 2005).

### **3.2.3.2. Geny pro adhezivní molekuly**

Adhezivní molekuly, ve spolupráci s chemokiny, řídí orgánově-specifický „homing“ dárcovských lymfocytů do periferních a slizničních lymfatických uzlin prostřednictvím interakce s jejich ligandy exprimovanými na lymfocytech (Ager 1994).

#### **3.2.3.2.1. Gen pro molekulu MAdCAM-1**

Glykoprotein MAdCAM-1 (Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1) je membránový protein endoteliálních buněk, který je rozpoznáván ligandy na lymfocytech: L-selektinem a  $\alpha_4 \beta_7$  integrinem (Elangbarn a spol. 1997). MAdCAM-1 je vysoce exprimován ve střevním endotelu (v Peyerských placích a mezenterických lymfatických uzlinách) a je zodpovědný za adhezi lymfocytů na endoteliální buňky a jejich transport do slizničních tkání. Dřívější studie na zvířecích modelech potvrdily jeho důležitou roli v rozvoji akutní GVHD (Ueha a spol. 2007; Murai a spol. 2003).

Gen *MADCAM1* je uložen na 19. chromozomu, konkrétně v oblasti 19p13.3 a v současné době je v genu identifikováno přes 320 jednonukleotidových polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov./SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov./SNP)). Ve studii skandinávských autorů bylo u pacientů s primární sklerozující cholangitidou testováno 7 vybraných jednonukleotidových polymorfismů (rs1574520 C/T, rs758502 T/C, rs2302217 G/A, rs12982646 A/G, rs3745925 G/T, rs7246543 G/C a rs11085079 A/G), jejichž konkrétní varianty mohou ovlivňovat strukturu nebo expresi molekuly MAdCAM-1 (Bowlus a spol. 2006).

### 3.2.3.2.2. Geny pro $\alpha_4\beta_7$ integrin

$\alpha_4\beta_7$  integrin je heterodimerní receptor exprimovaný na T lymfocytech. Na základě interakce se svým ligandem MAdCAM-1 je zodpovědný za adhezi T lymfocytů na střevní endotel (Eksteen a spol. 2004).

Gen pro subjednotku integrinu  $\alpha_4$  - *ITGA4* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 2 (2q31). U člověka je popsáno více než 2200 jednonukleotidových polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). Vybrané polymorfismy *ITGA4* genu lokalizované do různých oblastí genu jsou předmětem studia u celé řady onemocnění, jako je např. autismus (Correia a spol. 2009), roztroušená skleróza (O'Doherty a spol., 2007), infarkt myokardu (Barboux a spol. 2007). V kontextu transplantací byla zatím publikována pouze studie asociace polymorfismů *ITGA4* genu s výskytem rejekce po transplantaci srdce (Mehra a spol. 2010).

Gen pro subjednotku integrinu  $\beta_7$  - *ITGB7* je uložen na dlouhém raménku chromozomu 12, konkrétně v oblasti 12q13, a je v něm v současnosti identifikováno téměř 530 jednonukleotidových polymorfismů (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). Polymorfismus *ITGB7* genu byl studován u vybraných hemato-onkologických onemocnění (mnohočetný myelom - Lombardi a spol. 2007, akutní lymfoblastová leukemie – Coustan-Smith a spol. 2011), ale i u takových klinických jednotek jako jsou astma (Vollmert a spol. 2004) nebo endometrióza (Sundquist a spol. 2012). Zatím nebyla publikována žádná práce studující význam polymorfismu *ITGB7* genu u transplantací orgánů nebo kmenových krvetvorných buněk.

### 3.2.4. Genový polymorfismus

Genový polymorfismus je definován jako přítomnost více než jedné alely (varianty) genu v populaci, přičemž jednotlivé alely se liší v sekvenci DNA. O genovém polymorfismu hovoříme, pokud je frekvence nejčastější alely genu v populaci menší než 99% (podíl vzácnějších variant přesahuje 1%) (Relichová 1997).

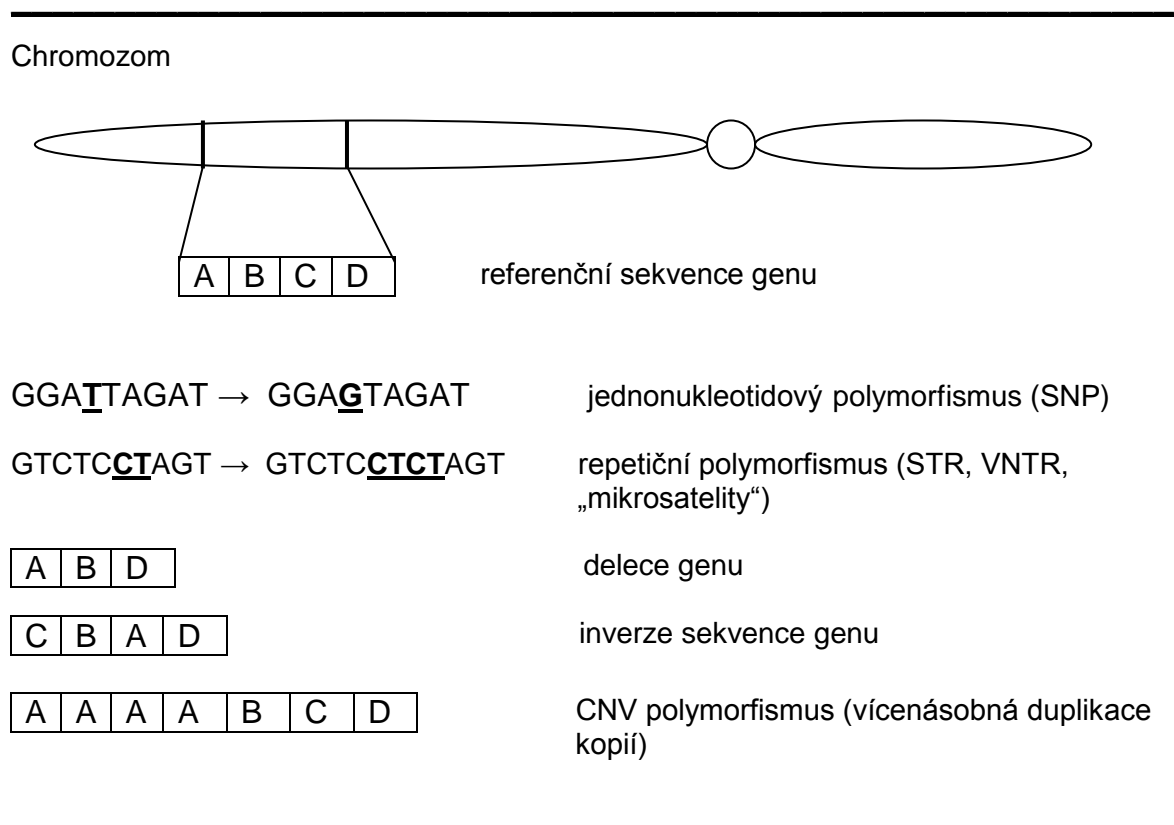
Nejčastějším typem genového polymorfismu je polymorfismus v jediném nukleotidu (z angl. "Single Nucleotide Polymorphism" - SNP). Další typy genových variant zahrnují repetiční polymorfismy, delece genu, inverze genové sekvence a varianty v počtu kopií genu (z angl. „Copy Number Variants“ – CNV) (Obrázek č. 2).

SNP polymorfismus je pokládán za nejčastější genetickou variantu v lidském genomu, která se vyskytuje s průměrnou frekvencí 1/300 po sobě následujících nukleotidů a v celém lidském genomu jich najdeme přes 10 milionů (Hafler a spol. 2005).

Jednonukleotidový polymorfismus znamená záměnu jednoho nukleotidu v DNA sekvenci genu; gen se tedy vyskytuje ve dvou variantách – alelách. Mezi populacemi a jednotlivými etniky se četnosti alel v daném polymorfismu mohou významně lišit (Hoffmann a spol. 2002). Varianty, které mají vliv na expresi genů, označujeme obecně jako "funkční genové polymorfismy". Polymorfismus lokalizovaný v kódujících oblastech genu může zapříčinit změnu v primární struktuře proteinu (např. substituční SNP) nebo vznik defektního proteinu (např. inzerční nebo deleční polymorfismy) a následně tak ovlivnit i funkci mediátoru či receptoru (Dickinson a spol. 2004). Polymorfismus lokalizovaný v regulačních (nekódujících) oblastech genu může měnit úroveň jeho exprese (změna vazebného místa pro transkripční faktor může vyřadit gen z transkripce) a tím i množství produkovaného proteinu (nebo specializovaných RNA molekul).



Obrázek č. 2: Schéma nejčastějších typů DNA polymorfismů; alely polymorfismů typu SNP se liší v jediném nukleotidu, alely repetičních polymorfismů se liší v počtu opakování krátké nukleotidové sekvence. Delece znamená ztrátu/absenci DNA sekvence, při inverzi je DNA segment přítomen v reverzní orientaci. Varianta v počtu kopií – CNV polymorfismus – je segment DNA o délce 1 kb a více, který je v genomu přítomen v různém počtu kopií ve srovnání s referenčním genomem. CNV může existovat i ve variantě deleční (upraveno podle Mullally a spol. 2007).



### 3.2.4.1. Metody detekce genového polymorfismu

Genové polymorfismy jsou nejčastěji podmíněny rozdíly v primární struktuře DNA, tedy v pořadí nukleotidů. Cílem technik zaměřených na detekci polymorfismů je proto odlišit jednotlivé varianty DNA sekvence na daném lokusu. V současné době jsou k detekci genových polymorfismů k dispozici desítky metodik. Jejich podrobný přehled je shrnut v řadě přehledných prací (např. Kwok a spol. 2003, Oros a spol. 2013).

Výběr genotypizační techniky je podmíněn vlastní strategií studie. Můžeme vyšetřovat již známé polymorfismy u konkrétních jedinců, např. pro účely asociačních studií (Kwok a spol. 2003) nebo postupovat cestou vyhledávání nových polymorfismů u rozsáhlejší

populace. K tomu můžeme použít buď přístup globálního (celogenomového) screeningu (Ikegawa 2012), kdy se srovnávají celé genomy různých jedinců nebo cíleného vyhledávání, kdy se vyšetřují sekvence vybraných genů. Konečný výběr konkrétní genotypizační techniky ovlivňuje řada faktorů: spolehlivost metody (podíl správně určených genotypů), náročnost techniky na práci a čas, možnost automatizace, spotřeba DNA, kapacita metody (počet vzorků v sérii), ekonomické náklady (přístrojové vybavení, provozní reagentie, vložená práce apod.).

Následující text uvádí přehled a stručný princip technik, které jsou určeny ke genotypizaci již známých jednonukleotidových polymorfismů a které byly pro stanovení alel vybraných genů použity v této dizertační práci. Všechny zde uvedené metody jsou založeny na amplifikaci oblasti cílového lokusu pomocí polymerázové řetězové reakce.

#### **PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers)**

K odlišení alel dochází již v průběhu vlastní amplifikační reakce, kdy za přesně definovaných podmínek dojde k dokonalé hybridizaci mezi primery a cílovou sekvencí (Newton a spol. 1989). Nekomplementarita mezi primerem a sekvencí templátu naopak brání amplifikaci. Přítomnost amplikonu se prokazuje nejčastěji elektroforeticky. *Technika PCR-SSP byla použita ke genotypizacím v předkládaných pracích č. 1-8.*

#### **PCR-SSO (polymerase chain reaction followed by sequence-specific oligonucleotides)**

Cílový lokus nesoucí polymorfni pozice je amplifikován pomocí PCR reakce a následně fixován na vhodný povrch. S použitím specifických, značených hybridizačních sond, které zůstanou za přesně definovaných podmínek a pouze v případě úplné komplementarity navázány na amplikonu, jsou detekovány rozdíly v jeho sekvenci (Angelini a spol. 1986). Přítomnost sond je pak vizualizována. *Tato technika v modifikaci PCR-rSSO (reverzní SSO: fixované sondy namísto amplikonů) byla použita ke genotypizaci v předkládané práci č. 5 a č. 6.*

#### **Sekvenování (Sequencing-based typing, SBT)**

Metoda určuje přesné pořadí nukleotidů v primární struktuře DNA. Pro určování DNA sekvence je v současné době nejčastěji používáno sekvenování podle Sangera, které využívá náhodnou ddNTP terminaci DNA řetězců syntetizovaných nově podle vyšetřovaného templátu (Sanger a spol. 1977). Analýza těchto fragmentů při elektroforéze s vysokou separační účinností (polyakrylamidová elektroforéza) pak umožňuje určit pořadí nukleotidů. V poslední době se pro sekvenování stále více používají také pokročilé vysokokapacitní technologie, které se souborně označují jako „Next Generation

Sequencing“ (NGS). *Genotypizace pomocí sekvenování („Sangerovou“ technikou) byla využita k identifikaci nových alel HLA systému v předkládaných pracích č. 5-8.*

### **3.2.4.2. Způsoby studia asociace polymorfismu imunitních genů s komplikacemi po TKB**

V patogenezi převážné většiny komplikací po transplantaci kmenových krvetvorných buněk se v různé míře uplatňují imunologické mechanismy. Charakter a intenzitu imunitní odpovědi ovlivňuje řada faktorů, mezi nimiž jsou velmi významné faktory dědičné - variabilita v genech imunitní odpovědi (geny pro cytokiny, receptory, MHC atd.) (Buc a spol. 1994). Genetická vnímavost jedince je tedy dána jeho genetickou výbavou - přítomností konkrétních variant (alel) genů významných pro danou komplikaci TKB. Můžeme definovat varianty genů (alely) vnímavosti (susceptibility), které predisponují jedince ke vzniku potransplantačních komplikací a alely ochranné (protektivní), jejichž přítomnost riziko vzniku komplikací snižuje. Význam genetické varianty (alely nebo genotypu) pro predispozici k rozvoji komplikací po TKB je nejčastěji hodnocen odhadem relativního rizika (odds ratio, OR), které vyjadřuje poměr výskytu potransplantační komplikace u nosičů příslušné alely a u jedinců, kteří ji ve své genetické výbavě nemají. Pro alely vnímavosti (susceptibility) je tato hodnota větší než 1, ochranné (protektivní) alely jsou charakterizovány hodnotami OR v rozmezí  $0 \leq OR < 1$ .

Teorie "kandidátních genů" předpokládá, že funkční polymorfismy imunitních genů, jejichž produkty se uplatňují v patogenezi potransplantačních komplikací, mohou souviset s predispozicí k jejich manifestaci či s prognózou TKB. V současné době již existují desítky studií včetně jejich meta-analýz (např. Chien a spol. 2012), které našly souvislosti polymorfismů imunitních genů s predispozicí k rozvoji komplikací po TKB. Stejně tak ale existuje řada studií, které dříve popsané asociace polymorfismů imunitních genů nepotvrdily. Nekonzistentní výsledky mohou být zapříčiněny např. rozdíly ve velikosti testovaného souboru nebo jeho klinických charakteristikách (např. příbuzenská x nepříbuzenská TKB, základní diagnóza, použitý přípravný režim, typ štěpu apod.), nezanedbatelný vliv mohou mít i rozdíly v genetickém pozadí mezi odlišnými populacemi.

Jedním z nejčastějších způsobů používaných k identifikaci genových polymorfismů zodpovědných za genetickou vnímavost k určité komplexní chorobě jsou studie případů a kontrol, tzv. asociační studie. V těch se na základě poznatků o patogenezi choroby (v tomto případě konkrétní komplikaci po TKB, např. GVHD) vytipují tzv. kandidátní geny, jejichž produkty se uplatňují v patogenezi choroby (Silverman a spol. 2000). Studovaná

populace musí být tvořena dostatečně velkými skupinami pacientů a kontrolních jedinců, nebo podskupinami pacientů podle konkrétní klinické charakteristiky. Alelické a genotypové frekvence nebo podíl nosičů určité varianty se srovnává mezi pacienty a kontrolami, v tomto případě např. mezi pacienty s GVHD a pacienty bez GVHD.

Vzhledem k dostupnosti vysokokapacitních genotypizačních technik probíhají v posledních letech komplexní asociační studie vyšetřující současně stovky tisíc jednonukleotidových polymorfismů rozprostřených v celém genomu (se zaměřením na funkční polymorfismy). Příkladem systematického celogenomového mapování jednonukleotidových polymorfismů ve vztahu k transplantacím kmenových krvetvorných buněk a riziku GVHD jsou práce Ogawy a Chiena (Ogawa a spol. 2009, Chien a spol. 2009). Na základě výsledků některých novějších studií souvisí s výskytem GVHD také jiné polymorfismy než nejčastěji testované SNP, konkrétně polymorfismy typu CNV (McCarroll SA a spol. 2009).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. CÍLE A METODICKÉ PŘÍSTUPY

#### 4.1.1. Vymezení cílů vlastních prací

Obečným cílem této dizertační práce bylo přispět k „rozšíření znalostí o podílu polymorfismu vybraných genů pro cytokiny, chemokiny, adhezivní molekuly a jejich ligandy na rozvoji reakce štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci kmenových krvevorných buněk“. U polymorfismů cytokinových genů se jednalo o replikaci výsledků jiných autorů na české, resp. kavkazské populaci, polymorfismy genů pro chemokin MCP-1 a adhezivní molekulu MAdCAM-1, resp. její ligand integrin  $\alpha_4\beta_7$  byly v kontextu transplantací kmenových krvevorných buněk studovány poprvé.

Paralelním cílem bylo sledování polymorfismu genů hlavního histokompatibilního komplexu – HLA systému se zaměřením na identifikaci nových HLA alel.

Konkrétní úkoly:

- provést genotypizaci vybraných non-HLA polymorfismů na dobře charakterizovaném souboru pacientů podstupujících alogenní TKB, jejich dárců a vzorku normální zdravé populace (práce 1-4)
- na podkladě asociační studie na souboru pacientů po alogenní TKB určit vztah vybraných non-HLA polymorfismů k výskytu GVHD, relapsů, infekčních komplikací a celkovému přežívání po alogenní TKB (práce 2-4)
- sledovat polymorfismus HLA genů při rutinní HLA typizaci hemato-onkologických pacientů a jejich potenciálních dárců se zaměřením na možnou identifikaci nových HLA alel (práce 5-8)

#### 4.1.2. Vyšetřované soubory

Do studií byli zařazeni pacienti po alogenní TKB a jejich příbuzní nebo nepříbuzní dárci kmenových krvevorných buněk. U všech zařazených párů „pacient-dárce“ byly shromážděny vzorky biologického materiálu, klinická / demografická data (viz Tabulka č. 3) a informovaný souhlas s anonymním využitím jejich DNA pro účely těchto studií.

Klinická a demografická charakteristika konkrétních studovaných souborů je součástí jednotlivých předkládaných prací (kapitola 4.2.).

Tabulka č. 3: Přehled shromažďovaných klinických a demografických dat v souboru pacientů po alogenní TKB a jejich dárců kmenových krvetvorných buněk

Identifikace páru	Den ANC > 0,5 x 10 <sup>9</sup> /l
Pohlaví příjemce	Den PLT > 20 x 10 <sup>9</sup> /l
Pohlaví dárce	Kompletní dárcovský chimerismus v den +30
Věk příjemce při TKB	Kompletní dárcovský chimerismus v den +100
Věk dárce při TKB	Kompletní remise choroby (nádoru) po TKB
Základní diagnóza	Relaps základní choroby (nádoru) po TKB
Stav choroby (nádoru) v době TKB	Datum relapsu po TKB
Pokrevní vztah dárce	Relaps na imunosupresivní léčbě/profylaxi
Stupeň HLA shody	Akutní GVHD
Zdroj kmenových buněk	Stupeň akutní GVHD
Krevní skupina příjemce	Chronická GVHD
Krevní skupina dárce	Intenzita chronické GVHD
CMV status příjemce	Léčba GVHD
CMV status dárce	Podání DLI
Přípravný režim	2. TKB
Nemyeloablativní režim (RIC)	Datum 2. TKB
ATG v přípravném režimu	Úmrtí po TKB
Profylaxe GVHD	Příčina úmrtí
CD34+ ve štěpu (x 10 <sup>6</sup> /kg)	Datum poslední kontroly nebo úmrtí
Datum TKB	Poznámky
Rejekce štěpu po TKB	

TKB – transplantace krvetvorných buněk, CMV – cytomegalovirus, ATG – antithymocytární globulin, GVHD – Graft Versus Host Disease (nemoc štěpu proti hostiteli), ANC – absolutní počet neutrofilních granulocytů, PLT – trombocyty, DLI – infúze dárcovských lymfocytů

Soubor zdravé kontrolní populace byl sestaven z náhodně vybraných členů Českého národního registru dárců dřeně, u kterých byla závažnější onemocnění vyloučena zdravotním dotazníkem a pohovorem, a kteří zároveň souhlasili s anonymním využitím DNA pro výzkumné účely.

### 4.1.3. Metodické přístupy

(Princip použitých technik byl stručně popsán v kapitole 3.2.4.1.)

Genomická DNA byla izolována z jaderných buněk periferní žilní krve od všech jedinců zařazených do předkládaných prací (Miller a spol. 1988). K vlastní genotypizaci vyšetřovaných polymorfismů byly použity následující postupy (Technika - Výčet testovaných polymorfismů):

*Polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP)*

Vyšetřované polymorfismy:

*IL6* -174 G/C (rs1800795), *IL6* -597 G/A (rs1800797)

*IL10* -1082 A/G (rs1800896), *IL10* -819 C/T (rs1800871), *IL10* -592 C/A (rs1800872)

*CCL2* -2518 A/G (rs1024611), *CCL2* -2076 A/T (rs1024610)

*MADCAM1* rs758502 C/T, *MADCAM1* rs2302217 A/G, *MADCAM1* rs3745925 G/T

HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1

*PCR with Sequence-Specific Oligonucleotides (PCR-rSSO)*

Vyšetřovaný polymorfismus: HLA-B

*Sequencing-based typing (SBT)*

Vyšetřované polymorfismy: HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1

Podrobnější popis metodik užitých ke genotypizaci včetně sekvencí primerů je uveden v metodických částech předkládaných prací. Validace genotypizace byla prováděna pomocí vzorků ověřených nezávisle jinou technikou, pomocí doplňkového („antisense“) PCR-SSP protokolu nebo pomocí re-sekvenace. Interpretace asociačních studií byla provedena v souladu s pravidly provádění genetických studií (Chanock a spol. 2009, Little a spol. 2009).

### 4.1.4. Statistické vyhodnocení výsledků

V jednotlivých vyšetřovaných souborech byly ze získaných genotypizačních dat vypočítány alelické, genotypové a fenotypové frekvence. Soulad distribuce jednotlivých genotypů s Hardy-Weinbergovým zákonem byl testován pomocí  $\chi^2$  testu. Pro testování vazebné nerovnováhy a analýzu haplotypů byl použit program Arlequin 3.0 (Excoffier a spol. 2005). Analýza asociace jednotlivých genotypů / fenotypů s komplikacemi po TKB byla provedena pomocí softwaru SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Pro univariační analýzu byl použit Pearsonův  $\chi^2$  test, multivariační analýza použila model logistické regrese. Celkové přežívání a úmrtnost spojená s transplantací (TRM) byly vyhodnoceny pomocí Kaplan-Meierových křivek a Coxovou regresí. Při současném

porovnání většího počtu alel byly hodnoty  $p$  korigovány podle Bonferroniho. Za signifikantní byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ . Konkrétní použité statistické postupy jsou popsány v jednotlivých předkládaných pracích.

## **4.2. VÝSLEDKY A DISKUZE**

*(formou rozboru původních prací – součástí dizertace)*

### **4.2.1. POLYMORFISMUS VYBRANÝCH NON-HLA GENŮ A JEJICH VÝZNAM PRO ROZVOJ KOMPLIKACÍ PO TRANSPLANTACI KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK**

#### **4.2.1.1. Rozbor práce č. 1**

Název práce:

**Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population**

Cíle práce:

- 1) Vyšetřit 22 vybraných jednonukleotidových polymorfismů lokalizovaných na 13 genech pro cytokiny a jejich receptory (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R, IL-1RA, IL-4R $\alpha$ , IL-12,  $\gamma$ -IFN, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 a IL-10).
- 2) Stanovit genotypové, alelické a fenotypové frekvence jednotlivých vyšetřených polymorfismů ve zdravé české populaci.
- 3) Porovnat alelické frekvence polymorfismů cytokinových genů a jejich receptorů mezi českou populací a dalšími evropskými populacemi.

Vybrané jednonukleotidové polymorfismy byly vyšetřeny metodou polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) v souboru 120 zdravých nepříbuzných jedinců české „kavkazské“ populace žijících na území Moravy. Zastoupení mužského a ženského pohlaví ve studovaném souboru bylo v poměru 1:1, medián věku byl 28,5 roku (rozmezí 18-66 let). Pro genotypizaci byl použit Cytokine Typing Tray kit, navržený pracovníky z Univerzity v Heidelbergu (Německo). Soulad distribuce stanovených genotypových frekvencí s Hardy-Weinbergovou rovnováhou byl ověřován pomocí  $\chi^2$  testu. Pro porovnání alelických frekvencí mezi populacemi byl použit 2 x 2  $\chi^2$  test s Woolf-Haldanovou korekcí. Za signifikantní byly považovány hodnoty  $p < 0,01$ .



Analyzované polymorfismy byly nejprve porovnány s daty získanými z jiné české (Cinek a spol., 2004) a německé populace (Louie a spol., 2005) vyšetřeny stejnou genotypizační technikou („Heidelberg kit“). Alelické frekvence všech srovnávaných SNP se v naší vyšetřené populaci významně nelišily od frekvencí z obou ostatních souborů (Praha, Heidelberg). Následně byla data olomouckého souboru porovnána s daty dalších slovanských populací (Poláci, Bulhaři, Rusi) a populací jihovýchodní Evropy (makedonští Slované, Řeci, kyperští Řeci). Nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi alelickými frekvencemi porovnávaných polymorfismů mezi českou a polskou populací. Naopak, u některých cytokinových polymorfismů byly pozorovány rozdíly v alelických frekvencích mezi populacemi střední a jihovýchodní Evropy; konkrétně SNP *TNFA* -308 (frekvence alely A 21% u Čechů *versus* 7% u Řeků, resp. 4% u kyperských Řeků), *IL2* +166 (frekvence alely T 35% u Čechů *versus* 22% u makedonských Slovanů, resp. 19% u kyperských Řeků a *IL6* -174 (frekvence alely C 39% u Čechů *versus* 24% u Řeků, resp. 18% u kyperských Řeků. Tato skutečnost s největší pravděpodobností odpovídá teorii rozdílného genetického pozadí evropských etnik s přihlédnutím ke geografické vzdálenosti jednotlivých populací.

#### 4.2.1.2. Rozbor práce č. 2

Název práce:

**Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients**

Cíle práce:

- 1) Vyšetřit jednonukleotidový polymorfismus *IL6* -174 (G/C) v souboru pacientů po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk a jejich příbuzných dárců.
- 2) Zjistit, zda uvedený polymorfismus u pacienta nebo jeho dárce může souviset s rizikem rozvoje akutní reakce štěpu proti hostiteli a zda ovlivňuje celkové přežívání po alogenní TKB.

Záměrem pilotní studie 56 hemato-onkologických pacientů indikovaných k alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk a jejich HLA-identických příbuzných dárců bylo replikovat data dosud publikovaných prací o významu polymorfismu *IL6* -174 a zjistit, zda i v české populaci tento SNP ovlivňuje výskyt akutní nebo chronické GVHD a mortalitu po alogenní TKB. Při srovnání frekvencí *IL6* -174 alel a genotypů skupin pacientů a dárců s alelickými a genotypovými frekvencemi zdravé české

populace (viz práce č. 1) nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. Pro zjištění asociace mezi jednotlivými variantami *IL6* -174 a rozvojem akutní GVHD jsme porovnali alelické a genotypové frekvence pacientů bez akutní GVHD a s manifestní akutní GVHD (stupně II-IV). Pozorovali jsme, že frekvence alely *IL6* -174\*G byla signifikantně vyšší ve skupině pacientů s klinicky rozvinutou akutní GVHD (66,7%) ve srovnání se skupinou příjemců bez klinických známek akutní GVHD (40,9%;  $p=0,01$ ;  $OR=2,8$ ). U *IL6* -174 GG homozygotních pacientů se rozvíjela akutní GVHD častěji (58,8%) než u pacientů s ostatními *IL6* -174 genotypy (29,7%;  $p=0,04$ ;  $OR=3,2$ ). Nebyla zjištěna žádná asociace mezi *IL6* -174 variantami dárce a rozvojem akutní nebo chronické GVHD. Analýza přežívání po alogenní TKB odhalila signifikantní pokles v celkovém přežívání (log-rank test,  $p=0,01$ ) a trend ke kratšímu přežívání bez nemoci ( $p=0,07$ ) u příjemců s *IL6* -174 GG genotypem.

Výsledky této pilotní studie jsou, i přes malou velikost testovaného souboru, v souladu s výsledky několika dříve publikovaných studií (Cavet a spol. 2001, Socié a spol. 2001, Karabon a spol. 2005), které popsaly přítomnost alely *IL6* -174\*G u pacientů jako rizikový faktor pro rozvoj akutní GVHD. Naopak, význam *IL6* -174\*G alely dárce pro rozvoj akutní GVHD popsany ve studii Mullighana a spol. (2004) nebyl v naší práci prokázán.

#### **4.2.1.3. Rozbor práce č. 3**

Název práce:

**Association of IL-6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.**

Cíle práce:

- 1) Vyšetřit jednonukleotidové polymorfismy genů *IL6* (-174 G/C a -597 G/A) a *CCL2* (-2518 A/G a -2076 A/T) v rozšířeném souboru 166 HLA identických párů dárce-příjemce.
- 2) Zjistit, zda uvedené polymorfismy pacienta nebo jeho příbuzného / nepříbuzného dárce kmenových krvetvorných buněk jsou rizikovým faktorem pro alogenní TKB.

Na základě výsledků získaných v úvodní studii (viz práce č. 2) byla analýza vlivu polymorfismů genu *IL6* (-174 a -597) na rozvoj komplikací a přežívání po transplantaci provedena v rozšířeném souboru 166 HLA identických párů, který zahrnoval také pacienty jiných transplantačních center (Plzeň, Ljubljana). Vzhledem k tomu, že v tomto souboru

byly zahrnuty jak transplantace od příbuzných (n=121), tak i nepříbuzných (n=45) dárců krevetvorných buněk, bylo možno provést i subanalýzy podle typu dárce. Asociace *IL6* -174 GG genotypu příjemce se zvýšeným rizikem rozvoje akutní GVHD byla nalezena jak v celém studovaném souboru, tak i v podskupině transplantací od příbuzného dárce. V celém souboru byla akutní GVHD přítomna u 22 ze 42 pacientů (52,4%) s GG genotypem ve srovnání s 39 ze 116 pacientů (33,6%) s ostatními *IL6* -174 genotypy (p=0,03; OR 2,2). V podskupině TKB od příbuzného dárce byla akutní GVHD přítomna u 17 z 30 *IL6* -174 GG homozygotních pacientů (56,7%) ve srovnání s 27 z 86 pacientů (31,4%) s ostatními *IL6* -174 genotypy (p=0,01; OR 2,9). Naopak u pacientů transplantovaných od nepříbuzného dárce nebyl vliv jednotlivých *IL6* -174 genotypů na rozvoj akutní GVHD pozorován. U druhého vyšetřovaného jednonukleotidového polymorfismu genu *IL6* byl genotyp příjemce *IL6* -597 GG asociován s častějším výskytem akutní GVHD pouze ve skupině příbuzenských TKB (p=0,02).

V rozšířeném souboru jsme dále analyzovali vliv polymorfismu *IL6* genu na parametry přežívání po transplantaci krevetvorných buněk. Při hodnocení všech 166 párů jsme zjistili hraniční hodnotu signifikance (p=0,05) pro zkrácení celkového přežívání u pacientů-nosičů *IL6* -174\*G alely (genotypy GG a GC; medián přežívání 14,6 měsíců) ve srovnání s *IL6* -174 CC homozygotními příjemci (medián přežívání 36,5 měsíců). Pozorovali jsme také signifikantní vzestup úmrtnosti spojené s transplantací (TRM, z angl. „transplant-related mortality“) u *IL6* -597 GG homozygotních pacientů (průměrná doba přežívání 37,2 měsíců) ve srovnání s příjemci s ostatními *IL6* -597 genotypy (GA nebo AA; průměrná doba přežívání 71,8 měsíců, p=0,04). Efekt polymorfismu *IL6* genu byl výraznější ve skupině příbuzenských TKB. Celkové přežívání po alogenní TKB zde bylo signifikantně kratší u pacientů nesoucích minimálně jednu *IL6* -174\*G alelu (medián přežívání 14,5 měsíců) ve srovnání s *IL6* -174 CC homozygoty (medián přežívání 36,5 měsíců, p=0,04). Přítomnost *IL6* -174 GG a také *IL6* -597 GG genotypu u příjemce ve srovnání s pacienty s ostatními *IL6* -174 a *IL6* -597 genotypy signifikantně zvyšovala TRM (p=0,02 a p=0,01). Ve skupině nepříbuzenských TKB nebyl vliv polymorfismů *IL6* genu na přežívání po alogenní TKB pozorován.

Uvedené asociace variant *IL6* genu získané v univariační analýze nedosáhly hladiny signifikance v multivariační analýze, která zahrnovala i další biologické a klinické faktory ovlivňující výsledek alogenní TKB.

Tyto výsledky, v kontextu předchozích nálezů, podporují fakt, že polymorfismy genu *IL6* mohou ovlivňovat výsledek alogenních TKB, a to především u pacientů transplantovaných příbuzným dárce.

Při analýze *CCL2* jsme ve studovaném souboru nenalezli žádnou asociaci mezi jednonukleotidovými polymorfismy -2518 a -2076 a rozvojem akutní nebo chronické GVHD; jednotlivé varianty *CCL2* genu neovlivňovaly ani celkové přežívání po alogenní TKB. Analýza úmrtnosti spojené s transplantací (TRM) však odhalila její signifikantní zvýšení u příjemců - *CCL2* -2076 TT homozygotů (průměrná doba přežívání 16,7 měsíců) ve srovnání s nosiči *CCL2* -2076\*A alely (průměrná doba přežívání 67,2 měsíců;  $p=0,04$ ) nebo pacienty s *CCL2* -2076 AA genotypem (průměrná doba přežívání 70,2 měsíců;  $p=0,02$ ). Efekt polymorfismu *CCL2* -2076 na TRM byl pozorován i v kontextu příbuzenských TKB. Navíc, v této skupině bylo zjištěno, že genotyp *CCL2* -2076 TT je asociován také s horším celkovým přežíváním po alogenní TKB (medián přežívání 2,3 měsíce), a to jak ve srovnání s jedinci - nosiči *CCL2* -2076\*A alely (medián přežívání 21 měsíců;  $p=0,04$ ), tak ve srovnání s pacienty *CCL2* -2076 AA homozygoty (medián přežívání 19,2 měsíců;  $p=0,03$ ). Zjištěné asociace nebyly potvrzeny ve skupině TKB od nepřibuzného dárce ani v rámci multivariační analýzy všech skupin (celý soubor, příbuzenské a nepřibuzenské transplantace).

#### 4.2.1.4. Rozbor práce č. 4

Název práce:

**Possible impact of *MADCAM1* gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation**

Cíle práce:

- 1) Vyšetřit jednonukleotidové polymorfismy genu *MADCAM1* (rs758502 C/T, rs2302217 A/G a rs3745925 G/T) v souboru 87 příjemců kmenových krvetvorných buněk a jejich HLA identických dárce.
- 2) Zjistit, zda uvedené polymorfismy pacienta nebo jeho příbuzného / nepřibuzného dárce kmenových krvetvorných buněk jsou rizikovým faktorem pro alogenní TKB.

V této studii 87 pacientů, kteří podstoupili alogenní TKB od HLA-identického příbuzného (n=70) nebo nepřibuzného (n=17) dárce, jsme našli asociaci jednonukleotidového polymorfismu *MADCAM1* genu rs2302217 s rozvojem chronické

GVHD: u *MADCAMI* rs2302217 AA homozygotních příjemců docházelo častěji k rozvoji chronické GVHD než u pacientů s ostatními *MADCAMI* rs2302217 genotypy. Chronická GVHD byla přítomna u 11 ze 17 pacientů s rs2302217AA genotypem (64,7%) ve srovnání s 18 z 53 pacientů s ostatními rs2302217 genotypy (34,0 %;  $p=0,025$ ). Při použití Bonferroniho korekce pro mnohočetné porovnání však tato asociace pozbyla signifikance ( $p_{corr} > 0,05$ ). U ostatních vyšetřovaných polymorfismů *MADCAMI* genu nebyla nalezena žádná souvislost mezi jednotlivými variantami nebo jejich haplotypy u příjemce / dárce a rozvojem GVHD.

Multivariační analýza celkového přežívání po alogenní TKB, která hodnotila všechny dostupné klinické a biologické faktory (diagnóza, typ dárce, kombinace pohlaví v TKB páru, přípravný režim, zdroj krvetvorných buněk, profylaxe GVHD a polymorfismy *MADCAMI* genu) identifikovala přítomnost akutní GVHD ( $p= 1 \times 10^{-5}$ , HR= 4,35), chronické GVHD ( $p < 5 \times 10^{-5}$ , HR= 5,70) a *MADCAMI* rs2302217 AA genotyp ( $p=0,001$ , HR= 2,99) jako nezávislé faktory asociované se zkrácením celkového přežívání po alogenní TKB.

Výsledky úvodní studie potvrzují, že *MADCAMI* rs2302217 AA genotyp příjemce může být asociován s rizikem GVHD a zkracovat přežívání po alogenní TKB. Současně je však nezbytné ověřit získaná data nezávislou studií, která by komplexně zhodnotila efekt i dalších klinických a genetických faktorů.

## **4.2.2. POLYMORFISMUS HLA GENŮ A JEJICH VÝZNAM PRO TRANSPLANTACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK**

### **4.2.2.1. Rozbor práce č. 5**

Název práce:

**A novel HLA-B\*420502 allele identified by PCR-SSO/SSP routine typing and confirmed by Sequencing-based typing**

Cíle práce:

- 1) Určit přesnou nukleotidovou sekvenci nové alely HLA systému (lokusu HLA-B) identifikované původně dvěma nezávislými technikami používanými k detekci polymorfismu HLA systému (PCR-SSP, PCR-SSO).
- 2) Ověřit, zda reaktivita nové alely v technikách PCR-SSP/SSO odpovídá její nukleotidové sekvenci zjištěné pomocí sekvenování (SBT z angl. "Sequencing based typing").

V průběhu HLA typizace prováděné v rámci rodinné studie vedené pro vyhledávání vhodného dárce pro transplantaci kmenových krvetvorných buněk byla identifikována u pacienta a jeho matky nová alela HLA I. třídy – HLA-B\*420502. Při sérologické typizaci HLA antigenů I. třídy byl u obou jedinců zjištěn pouze 1 HLA antigen; výsledek sérologické typizace indikoval přítomnost tzv. „blank“ alely. Na přítomnost nové alely primárně poukázaly výsledky genotypizace HLA-B lokusu dvěma nezávislými technikami – PCR-SSP a PCR-SSO. Výsledky z těchto technik byly unikátní – neodpovídaly žádnému známému genotypu. Přesná sekvence nové alely byla stanovena pomocí typizace založené na sekvenování (SBT z angl. "Sequencing-Based Typing"). Obě alely na lokusu HLA-B byly pro sekvenční analýzu odděleny novou technikou „extrakce specifických haplotypů“. Při zpětném hodnocení bylo zjištěno, že reaktivita nové alely v technikách PCR-SSP/SSO zcela odpovídá její nukleotidové sekvenci zjištěné pomocí SBT. Sekvence nové alely je identická se sekvencí alely B\*420501 s výjimkou záměny T→G v pozici 618 (synonymní mutace). Název HLA-B\*420502 byl nové alele oficiálně přiřazen Nomenklaturním výborem WHO v červnu 2004. Alela je rovněž součástí reportu nomenklatury HLA systému od roku 2004 (Marsh a spol. 2005).

#### **4.2.2.2. Rozbor práce č. 6**

Název práce:

**A single amino acid exchange shifts the serological reactivity of the novel HLA-B\*4442 allele product from HLA-B44 to HLA-B21**

Cíle práce:

- 1) Určit přesnou nukleotidovou sekvenci nové alely HLA systému (lokusu HLA-B) identifikované původně nezávislými typizačními technikami (sérologická typizace, PCR-SSP, PCR-SSO).
- 2) Ověřit, zda reaktivita nové alely sledovaná při PCR-SSP/PCR-SSO genotypizaci odpovídá její nukleotidové sekvenci zjištěné pomocí sekvenování (SBT).

Nově identifikovaná alela HLA-B\*4442 se sérologickou reaktivitou HLA-B21 byla odhalena opět při vyšetření pacienta a jeho matky v rámci rodinné studie při hledání příbuzného dárce pro potřeby transplantace kmenových krvetvorných buněk. HLA antigeny I. třídy byly u všech přímých příbuzných primárně typizovány sérologickou technikou (mikrolymfocytotoxický test). Reaktivita typizačních sér poukázala u pacienta

i jeho matky na přítomnost antigenu HLA-B21, přičemž nebylo možno určit, zda se jedná o split B49 nebo B50, a to i při použití nezávislého konfirmačního panelu typizačních sér. Výsledek genotypizace B-lokusu metodou PCR-SSP zařadil alelu do skupiny B\*44, výsledek reaktivity DNA sond u doplňkové typizace pomocí PCR-SSO neumožnil přiřadit alelu k žádnému známému HLA-B genotypu. Konečná sekvence nové alely byla stanovena typizací založenou na sekvenování (SBT). Sekvence nové alely je identická se sekvencí alely B\*4405 s výjimkou záměny C→G v pozici 572, která způsobuje záměnu aminokyseliny serin za tryptofan v pozici 167 exprimovaného HLA-B proteinu ( $\alpha 2$  doména). Naše výsledky přinášejí další potvrzení zjištění, že serin v pozici 167 molekuly HLA-B je hlavním determinantem sérologického epitopu HLA-B12 (Kosman a spol. 2000).

#### 4.2.2.3. Rozbor práce č. 7

Název práce:

**A novel HLA-DRB1 allele, HLA-DRB1\*13:116, identified by sequencing-based typing in a member of the Czech national marrow donor registry**

Cíle práce:

- 1) Určit přesnou nukleotidovou sekvenci nové alely HLA systému (lokusu HLA-DRB1) identifikované v rámci primární genotypizace HLA-DRB1 lokusu metodou PCR-SSP.
- 2) Ověřit, zda reaktivita nové alely sledovaná při PCR-SSP genotypizaci odpovídá její nukleotidové sekvenci zjištěné pomocí sekvenování (SBT).

Další nová alela, tentokrát zjištěná na lokusu HLA-DRB1, byla identifikována v rámci primární PCR-SSP genotypizace nepřibuzného dárce vstupujícího do Českého národního registru dárců dřeně. Při interpretaci PCR-SSP typizace na úrovni „nízkého rozlišení“ (určení alelických skupin) použitý interpretační software SCORE (Helmberg a spol. 1998) ihned vyhodnotil přítomnost vzácné alely HLA-DRB1\*13:17. Výsledek úvodní typizace jsme ověřovali pomocí PCR-SSP typizace na úrovni „vysokého rozlišení“ (určení jednotlivých alel). Použitý typizační kit pro určování alel skupiny DRB1\*13 překvapivě vykazoval atypickou sestavu reaktivity jednotlivých primerů, z níž nebylo možné identifikovat žádný ze známých genotypů. Následná SBT typizace s použitím dvou nezávislých sekvenačních kitů odhalila a potvrdila variantu alely HLA-DRB1\*13:17, která se liší v pozici 227 (záměna T→A) a způsobuje substituci aminokyseliny fenylalanin za

tyrozin v pozici 47 řetězce DR beta 1. Tato záměna modifikuje strukturu distální domény DR beta 1 řetězce, která formuje vazebné místo HLA molekuly a může tak přímo ovlivňovat repertoár antigenních peptidů prezentovaný prostřednictvím HLA-DR molekuly a imunitní odpověď na aloantigeny u transplantací. Název HLA-DRB1\*13:116 byl nové alele oficiálně přiřazen Nomenklaturním výborem WHO v únoru 2010. Alela je rovněž součástí reportu nomenklatury HLA systému od roku 2010 (Marsh a spol. 2005).

#### **4.2.2.4. Rozbor práce č. 8**

Název práce:

**Somatic mutation in acute myelogenous leukemia cells imitated novel germline HLA-A allele: a case report**

Cíle práce:

- 1) Pomocí sekvenování (SBT) určit přesnou sekvenci HLA-A\*02:01 alely u pacientky s akutní myeloidní leukémií (AML).
- 2) Odhalit příčinu inkompatibility HLA-A\*02:01 mezi pacientkou a jejími 9/10 HLA shodnými sourozenci (lokusy HLA-A (druhá alela), -B, -C, -DRB1, -DQB1).

Účelem této práce bylo popsat nález somatické mutace v exonu 4 HLA-A genu v maligních buňkách pacientky s AML, která byla identifikována v rámci základní HLA typizace pro potřeby alogenní TKB. V rámci rodinné studie byly u pacientky a jejích 4 bratrů standardně vyšetřeny HLA antigeny I. třídy (lokusy HLA-A, -B a -Cw) pomocí sérologické techniky (mikrolymfocytotoxický test) a alely II. třídy (lokusy HLA-DRB1 a -DQB1) metodou PCR-SSP na úrovni „nízkého rozlišení“. Na základě tohoto vstupního vyšetření bylo zjištěno, že pacientka má 2 HLA fenotypově identické bratry. Jejich vzájemná HLA identita měla být následně potvrzena HLA genotypizací všech výše uvedených lokusů na úrovni „vysokého rozlišení“ pomocí sekvenování. U pacientky však byla nalezena sekvence shodná s alelou A\*02:01:01G, avšak se záměnou nukleotidu G→A v pozici 781, která způsobuje substituci aminokyseliny glycinu za arginin v alfa řetězci HLA-A molekuly v pozici 237. Tato záměna modifikuje primární strukturu alfa 3 domény HLA-A molekuly, která však neovlivňuje strukturu vazebného místa pro peptid a je považována za méně významnou pro imunní aloreaktivitu (Xiao a spol. 2009), s výjimkou polymorfismů, které mění expresi HLA molekuly (nulová nebo nízká exprese). U obou HLA „shodných“ zdravých bratrů popsaná záměna G781A nebyla zjištěna. Na základě



analýzy jinak vzájemně shodných HLA typů sourozenců bylo zřejmé, že přítomnost nové zárodečné HLA alely u jejich nemocné sestry by mohla být způsobena rekombinací, *de novo* zárodečnou mutací nebo non-paternitou. Dalším vysvětlením našeho nálezu však mohla být i možnost výskytu somatické mutace v nádorových buňkách. Vzhledem k tomu, že iniciální HLA typizace pacientky byla provedena v době vysoké leukocytózy ( $42 \times 10^9$  /l) s výrazným podílem blastů a nezralých buněk v periféri krvi, pro ověření naší hypotézy jsme provedli typizaci z nového krevního vzorku odebraného v době remise (počet leukocytů  $3,5 \times 10^9$  /l, nepřítomnost blastů v diferenciálním rozpočtu buněk periferní krve). Výsledek HLA-SBT typizace vzorku v remisi potvrdil přítomnost běžné alely A\*02:01 s nepřítomností varianty 781A v exonu 4 HLA-A genu. Na základě HLA typizace vzorku v době remise i výsledku typizace verifikačního vzorku bylo potvrzeno, že pacientka je se svými bratry HLA fenotypově identická. Tato kasuistika připomíná, že v případě neodpovídající dědičnosti HLA znaků v rámci rodiny je vždy nezbytné u hematologických pacientů myslet i na možnost somatické mutace v nádorových buňkách. Tento přístup může zabránit chybné HLA typizaci pacienta a nesprávnému výběru jeho dárce kmenových krvetvorných buněk.

## 5. ZÁVĚR

Výsledky studií uvedených v této dizertační práci podporují hypotézu o významu variant non-HLA genů pro úspěšnost alogenní TKB. Jejich potenciální využití v konkrétních klinických situacích je však podmíněno návazným výzkumem (replikace výsledků, metaanalýzy, funkční studie). Stejně tak další práce zde uvedené poukázaly na šíři polymorfismu HLA systému, která může ovlivnit úspěšnost nalezení vhodného dárce kmenových krvetvorných buněk pro pacienty, u nichž byla zjištěna přítomnost vzácné HLA alely. Neméně důležitá je také znalost, v jaké konkrétní fázi hemato-onkologického onemocnění je HLA typizace prováděna; nezbytné je brát v úvahu možnou přítomnost somatické mutace v nádorově pozměněných buňkách, které mohou zapříčinit chybný výsledek HLA typizace a v jeho důsledku pak výběr HLA-inkompatibilního dárce kmenových krvetvorných buněk se všemi jeho negativními konsekvencemi.

Léčba komplikací alogenní TKB (akutní GVHD II. - IV. stupně nebo chronická extenzivní GVHD), zejména v důsledku častých a závažných infekčních komplikací, snižuje kvalitu života transplantovaného jedince a zvyšuje také finanční náklady transplantační léčby, které mohou dosáhnout až několika milionů Kč. Jakákoliv účinná predikce a prevence GVHD proto může, kromě zlepšení samotných léčebných výsledků alogenní TKB, významně snížit finanční náklady na veškerou léčbu spojenou s touto procedurou.

Vyšetření relevantních non-HLA polymorfismů se v budoucnosti může stát podkladem pro stanovení „indexu genetického rizika“ komplikace (např. GVHD) pro konkrétní dvojici dárce a příjemce transplantátu. Tento index by mohl být využíván v klinické praxi spolu s dalšími „negenetickými“ prediktivními markery k nastavení optimální profylaxe a léčby po transplantaci (individualizace dle míry rizika, resp. profylaxe „šitá na míru“). Takový přístup může být prospěšný pro pacienty podstupující alogenní TKB tím, že omezí paušální profylaxi a její nežádoucí účinky v případě nízkého rizika komplikace, vysoké riziko naopak povede k nastavení radikální profylaxe a léčby (Dickinson a spol. 2001). Individualizace léčby pacientů po alogenní TKB na podkladě znalosti genetického rizika může ve svém důsledku nejen zvýšit úspěšnost transplantace, ale především omezit výskyt potransplantačních komplikací a odrazit se i ve snížení nákladů na jejich léčbu.

Získané poznatky o uplatnění non-HLA polymorfismů v rozvoji komplikací po alogenní TKB a celkové úspěšnosti transplantační léčby mohou být využity odbornou

komunitou zejména v oblasti aplikovaného translačního výzkumu transplantací krevních kmenových buněk. Mají význam i pro další směřování studia komplexní biologické podstaty interakce mezi transplantátem (krevními buňkami) a organismem pacienta. Nejvýznamnější nálezy této práce (asociace polymorfismu genů *IL6* -174 a *MADCAM1* s rozvojem GVHD) se mohou, v souladu s výše uvedenými doporučeními, stát podkladem pro replikační studie, eventuálně tato data mohou být součástí metaanalýz významu non-HLA polymorfismů pro výsledek alogenní TKB, jak už byla nedávno využita (Chien a spol. 2012).

## 6. SOUHRN DIZERTACE

### Úvod a cíle:

Transplantace kmenových krvetvorných buněk je léčebný postup indikovaný především u závažných hematologických, ale i nehematologických malignit, u těžkých vrozených imunodeficitů nebo dědičných poruch metabolismu. Nejzávažnější imunologickou komplikací, která významným způsobem zvyšuje morbiditu a mortalitu po alogenní TKB, je reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). V její patogenezi se uplatňuje diferenciace aloreaktivních T buněk dárce na efektorové buňky, které vedou k poškození tkání příjemce, zapojení dalších populací zánětlivých buněk a následné dysregulaci cytokinů. K aktivaci alogenních T buněk dárce dochází na základě rozpoznání rozdílů v genetických polymorfismech HLA a non-HLA systémů.

Cílem první části této dizertační práce bylo objasnit souvislost kandidátních genových polymorfismů pro cytokiny, chemokiny a adhezivní molekuly (non-HLA genů) s genetickou predispozicí k rozvoji reakce štěpu proti hostiteli a s ovlivněním přežívání po alogenní TKB. Druhá část dizertační práce se zaměřila na studium variability (polymorfismu) genů hlavního histokompatibilního komplexu (HLA u člověka) a její význam pro TKB.

### Pacienti a metodika:

Do studií byli zařazeni pacienti s hemato-onkologickým onemocněním indikovaní k alogenní TKB, jejich příbuzní nebo nepříbuzní dárci kmenových krvetvorných buněk (n= 56 až 166 dle studie) a kontrolní zdraví jedinci (n=120). V části práce zabývající se genetickou predispozicí non-HLA genů k rozvoji GVHD byly vyšetřovány funkční polymorfismy genů *IL6*, *CCL2* a *MADCAM1*. Byly sledovány rozdíly v distribuci vyšetřovaných polymorfismů mezi pacienty s rozvinutou akutní či chronickou reakcí štěpu proti hostiteli a příjemci bez GVHD a souvislost těchto polymorfismů s klinickou manifestací GVHD a přežíváním po alogenní TKB (OS, TRM). Pro stanovení distribuce genotypů pro vybrané cytokiny a jejich receptory v české populaci bylo testováno celkem 22 polymorfismů lokalizovaných na 13 genech. Ke genotypizaci souboru párů dárce-příjemce v rámci alogenních TKB a souboru zdravých kontrolních jedinců byla použita polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP). V druhé části práce byly pro genotypizaci HLA systému (lokusy HLA-A, -B a -DRB1) použity dvě

modifikace polymerázové řetězové reakce (PCR-SSP/SSO) a typizace založená na sekvenování (SBT).

### Výsledky:

Při analýze vlivu genových polymorfismů na rozvoj reakce štěpu proti hostiteli po alogenní TKB jsme prokázali signifikantně vyšší frekvenci alely *IL6* -174\*G ve skupině pacientů s klinicky rozvinutou akutní GVHD ve srovnání se skupinou příjemců bez klinických známek akutní GVHD. V souladu s tím se u *IL6* -174 GG homozygotních pacientů se rozvíjela akutní GVHD častěji než u pacientů s ostatními *IL6* -174 genotypy. Dále jsme zjistili zkrácení celkového přežívání u pacientů-nosičů *IL6* -174\*G alely ve srovnání s *IL6* -174 CC homozygotními příjemci (s hraniční hodnotou signifikace). Pozorovali jsme také signifikantní vzestup úmrtnosti spojené s transplantací (TRM) u *IL6* -597 GG homozygotních pacientů ve srovnání s příjemci s ostatními *IL6* -597 genotypy. Efekt polymorfismu *IL6* genu byl výraznější ve skupině příbuzenských TKB. Naopak u pacientů transplantovaných od nepříbuzného dárce nebyl vliv jednotlivých *IL6* -174 genotypů na rozvoj akutní GVHD ani na přežívání po alogenní TKB pozorován. Při analýze *CCL2* genu jsme ve studovaném souboru nenalezli žádnou asociaci mezi jednonukleotidovými polymorfismy -2518 a -2076 a rozvojem akutní nebo chronické GVHD; jednotlivé varianty *CCL2* genu neovlivňovaly ani celkové přežívání po alogenní TKB. Analýza úmrtnosti spojené s transplantací (TRM) však odhalila její signifikantní zvýšení u příjemců *CCL2* -2076 TT homozygotů ve srovnání s nosiči *CCL2* -2076\*A alely nebo pacienty s *CCL2* -2076 AA genotypem. Efekt polymorfismu *CCL2* -2076 na TRM byl pozorován i v kontextu příbuzenských TKB. Navíc, v této skupině bylo zjištěno, že genotyp *CCL2* -2076 TT je asociován také s horším celkovým přežíváním po alogenní TKB. Dále jsme našli asociaci jednonukleotidového polymorfismu *MADCAM1* genu rs2302217 s rozvojem chronické GVHD: u *MADCAM1* rs2302217 AA homozygotních příjemců docházelo častěji k rozvoji chronické GVHD než u pacientů s ostatními *MADCAM1* rs2302217 genotypy. Multivariační analýza celkového přežívání po alogenní TKB identifikovala přítomnost akutní nebo chronické GVHD a *MADCAM1* rs2302217 AA genotyp jako nezávislé faktory asociované se zkrácením celkového přežívání.

V druhé části práce jsme v rámci rutinní HLA typizace pro vyhledávání dárce kmenových krvetvorných buněk v rodině identifikovali a popsali tři nové alely HLA systému (HLA-B\*420502, HLA-B\*4442, HLA-DRB1\*13:116) a publikovali neobvyklý

případ výskytu somatické mutace alely HLA-A\*02:01 v nádorových buňkách pacienta s akutní myeloidní leukémií.

Všechny uvedené výsledky byly publikovány v osmi článcích v časopisech s impakt faktorem, které jsou součástí dizertace.

### **Závěr:**

Data získaná v námi provedených genetických studiích podporují hypotézu o významu variant vybraných non-HLA genů pro úspěšnost alogenní TKB. Jejich potenciální využití v konkrétních klinických situacích je však podmíněno návazným výzkumem (replikace výsledků, metaanalýzy, funkční studie). Vyšetření relevantních non-HLA polymorfismů může v budoucnosti přispět ke zpřesnění předpovědi rizika komplikace (např. GVHD) pro konkrétní dvojici dárce a příjemce kmenových krvetvorných buněk. Individualizace léčby pacientů po alogenní TKB na podkladě znalosti genetické predispozice k potransplantačním komplikacím může ve svém důsledku nejen zvýšit úspěšnost transplantace, ale především omezit výskyt těchto komplikací a odrazit se i ve snížení nákladů na jejich léčbu.

Další práce pak potvrdily šíři polymorfismu HLA systému, který může ovlivnit úspěšnost nalezení vhodného dárce kmenových krvetvorných buněk pro pacienty, u nichž byla zjištěna přítomnost vzácné HLA alely.

## 7. SUMMARY OF THE THESIS

### **Introduction and aims:**

Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a therapeutical approach indicated mainly in serious haematological but also non-haematological malignancies, severe congenital immunodeficiencies or hereditary metabolic disorders. Graft-versus-host disease (GVHD) is the most serious immunological complication which significantly increases morbidity and mortality after allogeneic HSCT. Differentiation of alloreactive donor T cells to the effector cells which leads to the recipients' tissues damage and activation of the other inflammatory cells followed by cytokine dysregulation is the crucial mechanism of the GVHD pathogenesis. Donor alloreactive T cells activation is caused by the recognition of differences in HLA and non-HLA genetic polymorphisms.

The aim of the first part of this thesis was to clarify causal link between the genetic polymorphisms of cytokines, chemokines and adhesion molecules (non-HLA genes) and genetic predisposition for development of GVHD and for influence on allogeneic HSCT survival. The second part of this thesis was focused on the study of gene variability (polymorphism) located within the region of Major Histocompatibility Complex (HLA in humans) and its relevance to HSCT.

### **Patients and methods:**

Patients with haematological malignancies indicated for allogeneic HSCT, their related or unrelated haematopoietic stem cells donors (n=56-166 according to the study) and healthy control subjects (n=120) were engaged to our studies. In the part of the thesis relevant to non-HLA genes and predisposition to GVHD development, functional polymorphisms of *IL6*, *CCL2* and *MADCAM1* genes were investigated. Distribution of investigated polymorphisms between the patients with acute or chronic GVHD and recipients without GVHD was compared and an association of these polymorphisms with clinical manifestation of GVHD and survival after allogeneic HSCT (OS, TRM) was analysed. To evaluate genotype distribution of selected cytokine, chemokine and their receptor genes in the Czech population, 22 polymorphisms localized in 13 genes were investigated. Genotyping of the donor-recipient pairs for allogeneic HSCT and healthy control subjects was performed using polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP). In the second part of the thesis two modifications of the polymerase

chain reaction (PCR-SSP/SSO) and sequencing-based typing were used for HLA system genotyping (loci HLA-A, -B and -DRB1).

### Results:

Analysing the impact of genetic polymorphisms for development of GVHD after allogeneic HSCT we have observed significantly higher frequency of the *IL6* -174\*G allele among the recipients with clinically significant acute GVHD (aGVHD) compared to those without aGVHD. Furthermore, *IL6* -174 GG homozygous patients developed aGVHD more frequently than individuals with other *IL6* -174 genotypes. In patients possessing at least one *IL6* -174\*G allele, a borderline significance for decrease in overall survival compared to *IL6* -174 CC homozygous recipients was also found. Furthermore, a significant increase in TRM was observed in *IL6* -597 GG homozygous recipients compared to patients with other *IL6* -597 genotypes. The effect of *IL6* gene polymorphism was stronger in the subgroup of related aHSCT. On the contrary, in patients transplanted by unrelated donor investigated *IL6* -174 genotypes did not significantly affect on occurrence of acute GVHD nor modify survival after aHSCT. Analysing *CCL2* gene variants, in our study group we have not found any association of -2518 and -2076 SNPs with the development of acute or chronic GVHD; particular *CCL2* gene variants did not influence overall survival after aHSCT. Analysis of TRM revealed significant increase of mortality in *CCL2* -2076 TT homozygous patients compared to individuals carrying *CCL2* -2076\*A allele or to those possessing *CCL2* -2076 AA genotype. The effect of *CCL2* -2076 gene polymorphism on TRM was seen also in the context of related HSCT. Furthermore, in this subgroup of related HSCT, *CCL2* -2076 TT genotype in recipients appeared to associate with worse overall survival after aHSCT. We have found also the association between the *MADCAMI* gene SNP rs2302217 and development of chronic GVHD: *MADCAMI* rs2302217 AA homozygous recipients developed chronic GVHD more frequently than patients with other *MADCAMI* rs2302217 genotypes. Multivariate analysis of overall survival after aHSCT identified the presence of acute and chronic GVHD and the *MADCAMI* rs2302217 AA genotype as independent risk factors associated with decrease of overall survival.

In the second part of the thesis we have identified during the routine HLA typing for search of haematopoietic stem cells donor within the family three new HLA alleles (HLA-B\*420502, HLA-B\*4442, HLA-DRB1\*13:116) and described a case of somatic



mutation of the HLA-A\*02:01 allele in tumour cells of patient with acute myelogenous leukemia.

All mentioned results were published in eight articles in journals with impact factor which are the supplements of this thesis.

### **Conclusion:**

The data acquired in our genetic studies support the hypothesis about the relevance of selected non-HLA gene variants to the outcome of allogeneic HSCT. Nevertheless, their potential application in particular clinical conditions have to be based on further consecutive research (replication of the results, metanalysis and functional studies). Investigation of relevant non-HLA polymorphisms in the future may permit genetic risk assessment of aHSCT complications (e.g. GVHD) for particular donor-recipient pair. Individualized therapy of aHSCT patients based on the genetic risk prediction may result not only in increase of aHSCT success rate but most importantly may reduce occurrence of post-transplantation complications and reduce also the cost of their treatment.

Further studies of this thesis confirmed the importance of wide polymorphism of the HLA system which can influence the success of suitable haematopoietic stem cells donor search for patient with described uncommon HLA alleles.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANC	Absolute neutrophil count
APC	Antigen presenting cell
AML	Acute myelogenous leukemia
ATG	Antithymocyte globulin
CARD	Caspase recruitment domain-containing protein
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CNV	Copy number variation
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA	Cytotoxic T lymphocyte associated protein
CXCL	CXC-chemokine ligand
dbSNP	Single nucleotide polymorphism database
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate
DLI	Donor lymphocyte infusion
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr virus
FasL	Fas ligand
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathione S-transferase
GVHD	Graft-versus-host disease
GVL	Graft-versus leukemia effect
HHV	Human herpes virus
HLA	Human leukocyte antigens
HSCT	Haematopoietic stem cell transplantation
HSV	Herpes simplex virus
IFN	Interferon

IL	Interleukin
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
MAdCAM	Mucosal addressin cell adhesion molecule
MBL	Mannose-binding lectin
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MHC	Major histocompatibility complex
miHA	Minor histocompatibility antigen
MIP	Macrophage inhibitory protein
MTHFR	Methylene tetrahydrofolate reductase
NGS	Next generation sequencing
NK	Natural killer
NMDP	National Marrow Donor Program
NO	Nitric oxide
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain containing protein
OR	Odds ratio
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PLT	Platelet count
RIC	Reduced-intensity conditioning
RNA	Ribonucleic acid
rs	Reference SNP ID number
rSSO	Reverse sequence-specific oligonucleotides
SBT	Sequencing-based typing
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSO	Sequence-specific oligonucleotides
SSP	Sequence-specific primers
STR	Short tandem repeats
TCR	T cell receptor
TGF	Transforming growth factor
Th	T-helper

TKB	Transplantace kmenových krvetvorných buněk
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumour necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
Treg	T regulator cell
TRM	Transplant-related mortality
VNTR	Variable number of tandem repeats
VZV	Varicella-zoster virus
WHO	World Health Organization

## 9. PŘEHLED LITERATURY

1. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JLM. Interleukin 1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1993;56:518-23.
2. Ager A. Lymphocyte recirculation and homing: Roles of adhesion molecules and chemoattractants. *Trends Cell Biol* 1994;4:326-32.
3. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005;105:2227-34.
4. Angelini G, de Preval C, Gorski J, Mach B. High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:4489-93.
5. Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998;101:1835-42.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
7. Barbaux S, Tregouet DA, Nicaud V, Poirier O, Perret C, Godefroy T, Francomme C, Combadiere C, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Evans AE, Kee F, Morrison C, Tiret L, Brand-Herrmann SM, Cambien F. Polymorphisms in 33 inflammatory genes and risk of myocardial infarction – a system genetics approach. *J Mol Med (Berl)* 2007;85:1271-80.
8. Barton BE. IL-6: Insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:16-20.
9. Bensinger WI, Storb R. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5:67-86.
10. Berro M, Mayor NP, Maldonado-Torres H, Cooke L, Kusminsky G, Marsh SG, Madrigal JA, Shaw BE. Association of functional polymorphisms of the transforming growth factor B1 gene with survival and graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010;95:276-83.
11. Bertinetto FE, Dall'Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L, Magistroni P, Caropreso P, Falda M, Locatelli F, Busca A, Amoroso A. Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2006;33:375-84.

12. Bettens F, Passweg J, Gratwohl A, Chalandon Y, Helg C, Chapuis B, Schanz U, Libura J, Roosnek E, Tiercy JM. Association of TNF $\alpha$  and IL-10 polymorphisms with mortality in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2006;81:1261-7.
13. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966;62:21-78.
14. Bogunia-Kubik K, Polak M, Lange A. TNF polymorphisms are associated with toxic but not with aGVHD complications in the recipients of allogeneic sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:617-22.
15. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Lange A. Recipient interferon-gamma 3/3 genotype contributes to the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005;90:425-6.
16. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Jaskula E, Lange A. The presence of IFNG 3/3 genotype in the recipient associates with increased risk for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;132:326-32.
17. Bowlus CL, Karlsen TH, Broorné U, Thorsby E, Vatn M, Schrumpf E, Lie BA, Boberg KM. Analysis of MAdCAM-1 and ICAM-1 polymorphisms in 365 Scandinavian patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2006;45:704-10.
18. Buc M, Ferenčík M. *Imunogenetika*. Bratislava, Alfa plus 1994.
19. Cardoso SM, DeFor TE, Tilley LA, Bidwell JL, Weisdorf DJ, MacMillan ML. Patient interleukin-18 GCG haplotype associates with improved survival and decreased transplant-related mortality after unrelated-donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2004;126:704-10.
20. Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 1999;94:3941-6.
21. Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98:1594-1600.
22. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-43.
23. Cinek O, Vavrincova P, Striz I, Drevinek P, Sedlakova P, Vavrinec J, Slavcev A. Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in Czech population. *J Rheumatol* 2004;31:1206-10.

24. Cook K, Hill G, Crawford J, Bungard D, Brinson Y, Delmonte J Jr, Ferrara J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft versus host disease. *J Clin Invest* 1998;102:1882-91.
25. Copelan EA. Hematopoietic Stem-cell Transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813-26.
26. Correia C, Coutinho AM, Almeida J, Lontro R, Lobo C, Miguel TS, Martins M, Gallagher L, Conroy J, Gill M, Oliveira G, Vicente AM. Association of the alpha4 integrin subunit gene (ITGA4) with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 150B:1147-51.
27. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117:6267-76.
28. Cullup H, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Cavet J, Middleton PG. Donor interleukin 1 receptor antagonist genotype associated with acute graft-versus-host disease in human leucocyte antigen-matched sibling allogeneic transplants. *Br J Haematol* 2001;113:807-13.
29. Cullup H, Dickinson AM, Cavet J, Jackson GH, Middleton PG. Polymorphisms of interleukin-1  $\alpha$  constitute independent risk factors for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2003;122:778-87.
30. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127-59.
31. Dausett J. Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954;4:190-8.
32. Dickinson AM, Sviland L, Dunn J, Carey P, Proctor SJ. Demonstration of direct involvement of cytokines in graft-versus-host reactions using an in vitro human skin explant model. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:209-16.
33. Dickinson AM, Cavet J, Cullup H, Wang XN, Sviland L, Middleton PG. GvHD risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: role of cytokine gene polymorphisms and an in vitro human skin explant model. *Hum Immunol* 2001; 62:1266-76.
34. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E on behalf of Eurobank members. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004;127:479-490.
35. Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2005;17:1-9.

36. Dickinson AM, Harrold JL, Cullup H. haematopoietic stem cell transplantation: can our genes predict clinical outcome? *Expert Rev Mol Med* 2007; 9:1-19.
37. Dickinson AM, Pearce KF, Norden J, O'Brien SG, Holler E, Bickeböllner H, Balavarca Y, Rocha V, Kolb HJ, Hromadnikova I, Sedlacek P, Niederwieser D, Brand R, Ruutu T, Apperley J, Szydlo R, Goulmy E, Siegert W, de Witte T, Gratwohl A. Impact of genomic risk factors on outcome after hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;95:922-27.
38. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, Ferrara JL, Teshima T. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 2004;172:7393-8.
39. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberger J, Scaradavu A, Loberiza FR, Champlin RE, Klein JP, Horowitz MM, Wagner JE. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369:1947-54.
40. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-50.
41. Eksteen B, Miles AE, Grant AJ, Adams DH. Lymphocyte homing in the pathogenesis of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Clin Med* 2004; 4:173-80.
42. Elangbarn CS, Qualls CW, Jr., Dahlgren RR. Cell adhesion molecules – update. *Vet Pathol* 1997;34:61-73.
43. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1:47-50.
44. Ferrara JL. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol* 1993;5:794-9.
45. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 2003;78:181-7.
46. Filep JG, Baron C, Lachance S, Perreault C, Chan JS. Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells. *Blood* 1996;87:5136-43.
47. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V., Yudkin J.S., Humphries S., Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-76.



48. Flex A, Giovannini S, Biscetti F, Liperoti R, Spalletta G, Landi F, Angelini F, Caltagirone C, Ghirlanda G, Bernabei R. Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2013 Sep 6 [Epub ahead of print].
49. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104:1923-30.
50. Girnita DM, Brooks MM, Webber SA, Burckart GJ, Ferrell R, Zdanowicz G, DeCroo S, Smith L, Chinnock R, Canter C, Addonizio L, Bernstein D, Kirklin JK, Ranganathan S, Naftel D, Girnita AL, Zeevi A. Genetic polymorphisms impact the risk of acute rejection in pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Transplantation* 2008; 85:1632-39.
51. Goyal RK, Lin Y, Schultz KR, Ferrell RE, Kim Y, Fairfull L, Livote E, Yanik G, Atlas M. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms are associated with severity of acute graft-versus-host disease following matched unrelated donor bone marrow transplantation in children: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:927-936.
52. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, Einsele H, Cordonnier C; Acute and Chronic Leukemia Working Parties; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:757-69.
53. Gratwohl A, Stern M, Brand R, Apperley J, Baldomero H, de Witte T, Dini G, Rocha V, Passweg J, Sureda A, Tichelli A, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Leukemia Net. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* 2009;115:4715-26.
54. Hafler DA, De Jager PL. Applying a new generation of genetic maps to understand human inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2005;5:83-91.
55. Hansen JA, Petersdorf EW, Lin MT, Wang S, Chien JW, Storer B, Martin PJ. Genetics of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Role of HLA matching, functional variation in immune response genes. *Immunol Res* 2008;41:56-78.
56. Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Kashiwase K, Yabe T, nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. *Blood* 2012;119:6365-72.

57. Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:229-36.
58. Hattori K, Hirano T, Miyajima H, Yamakawa N, Tateno M, Oshimi K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 1998;91:4051-5.
59. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nagatoshi Y, Sakata N, Kawa K, Okamura J, Hara T. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:665-71.
60. Helmberg W, Lanzer G, Zahn R, Weinmayr B, Wagner T, Albert E. Virtual DNA analysis – a new tool for combination and standardised evaluation of SSO, SSP and sequencing-based typing results. *Tissue Antigens* 1998;51:587-92.
61. Hiemenez JW. Management of infections complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol* 2009;46:289-312.
62. Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002;2:560-7.
63. Hu JJ, Wang, ZT, Zhong J. Lack of association between the interleukin 6 gene -174G>C polymorphism and colorectal cancer; evidence from a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2013; 12:2205-14.
64. Chang RJ, Lee SH. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol* 1986;137:2853-6.
65. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE, Brooks LD, Cardon LR, Daly M, Donnelly P, Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE Statement. *Hum Genet* 2009;125:131-51.
66. Chien JW, Zhao LP, Storer B, Martin PJ, Boeckh M, Warren EH, Hansen JA. Improving hematopoietic cell transplant outcomes in a new era of genomic research. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:42-5.
67. Chien JW, Zhang XC, Fan W, Wang H, Zhao LP, Martin PJ, Storer BE, Boeckh M, Warren EH, Hansen JA. Evaluation of published single nucleotide polymorphisms associated with acute GVHD. *Blood* 2012;119:5311-19.

68. Ikegawa S. A short history of the genome-wide association study: where we were and where we are going. *Genomics Inform* 2012;10:220-25.
69. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:569-75.
70. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
71. Junghanass C, Marr KA. Infectious risks and outcomes after stem cell transplantation: are myeloablative transplants changing the picture? *Current Opin Infect Dis* 2002;15:347-53.
72. Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol* 2005; 66:700-710.
73. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* 2007;110:2235-41.
74. Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB, Shin IH. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 2005;79:1615-22.
75. Kosman C, Steiner N, Pulyaeva H, Mitton W, Slack R, Hartzman RJ, Ng J, Hurley CK. The relationship between HLA-B45 and B\*5002 in the five major U.S. population groups. *Tissue Antigens* 2000;55:437-42.
76. Krejčí M, Mayer J, Adam Z, Vrolíček J. Transplantace krvetvorných buněk. *Vnitř Lék* 2009;55:738-45.
77. Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1997;4:553-8.
78. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 2003;5:43-60.
79. Lacha J, Hribova J, Kotsch K, Brabcova I, Bartosova K, Volk HD et al. Effect of cytokines and chemokines (TGF-beta, TNF-alpha, IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES) gene polymorphisms in kidney recipients on posttransplantation outcome: influence of donor-recipient match. *Transplant Proc* 2005;37:764-6.
80. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M,

- Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110: 4576-83.
81. Lekakis L, de Padua Silva L, de Lima M. Novel preparative regimens in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des* 2008;14:1923-35.
  82. Levine JE, Uberti JP, Ayasah L, Reynolds C, Ferrara JL, Silver SM, Braun T, Yanik G, Hutchinson R, Ratanatharathorn V. Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:189-97.
  83. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Eng J Med* 2003;349:2201-10.
  84. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Genet Epidemiol.* 2009;33:581-98.
  85. Lombardi L, Poretti G, Mattioli M, Fabris S, Agnelli L, Bicciato S, Kwee I, Rinaldi A, Ronchetti D, Verdelli D, Lambertenghi-Delilieri G, Bertoni F, Neri A. Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes chromosomes Cancer* 2007;46:226-38.
  86. Louie LG, Silver EW, Direskeneli GS, Kearney FC, Spiroski MZ, Peste-Tsilimidou C et al. Worldwide variation in cytokine genes. 2005 In: *HLA 2002 – Immunobiology of the Human MHC*, IHWG Press, Seattle.
  87. MacMillan ML, Radloff GA, DeFor TE, Weisdorf DJ, Davies SM. Interleukin-1 genotype and outcome of unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2003;121:597-604.
  88. MacMillan ML, Radloff GA, Kiffmeyer WR, DeFor TE, Weisdorf DJ, Davies SM. High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 2003;76:1758-62.
  89. Mapara MY, Leng C, Kim YM, Bronson R, Lokshin A, Luster A et al. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:623-34.
  90. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Hurley CK, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Trowsdale J.

- Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*. 2005;65:301-69.
91. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75:291-455.
  92. Marshall SE, Welsh KI. The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes Immun* 2001;2:297-303.
  93. Martin PJ. Biology of chronic graft-versus-host disease: Implications for future therapeutic approach. *Keio J Med* 2008;57:177-83.
  94. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
  95. McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chilewski SD, Antin JH, Lee SJ, Ruutu T, Storer B, Warren EH, Zhang B, Zhao LP, Ginsburg D, Soiffer RJ, Partanen J, Hansen JA, Ritz J, Palotie A, Altshuler D. Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet* 2009;41:1341-4.
  96. Mehra MR, Uber PA, Benitez RM. Gene-based bio-signature patterns and cardiac allograft rejection. *Heart Fail Clin* 2010;6:87-92.
  97. Mehta PA, Eapen M, Klein JP, Gandham S, Elliott J, Zamzow T, Combs M, Aplenc R, MacMillan ML, Weisdorf DJ, Petersdorf E, Davies SM. Interleukin-1 alpha genotype and outcome of unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2007;137:152-7.
  98. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998;92:3943-8.
  99. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, Ho V, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 2005;105:2973-8.
  100. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
  101. Mullally A, Ritz J. Beyond HLA: significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2007;109:1355-62.
  102. Mullighan C, Heatley S, Doherty K, et al. Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004;77:587-96.

103. Mullighan CG, Bardy PG. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:127-44.
104. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suernatsu M, Terashima Y, Harada A, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003;4:154-60.
105. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.
106. Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006;150:191-204.
107. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-7.
108. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1992;175:405-13.
109. Nestel FP, Greene RN, Kichian K, Ponka P, Lapp WS. Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis. *Blood* 2000;96:1836-43.
110. New JY, Li B, Koh WP et al. T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:979-86.
111. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17:2503-16.
112. Nordlander A, Uzunel M, Mattsson J, Remberger M. The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2002;119:1133-6.
113. O'Doherty C, Roos IM, Antiguada A, Aransay AM, Hillert J, Vandebroek K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007;189:151-7.
114. Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Koderu Y, Takehiko S on behalf of the Japan Marrow Donation program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:39-41.
115. Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, Iwaki K, Ishihara T, Akamatsu S, Ikegami H, Kurimoto M. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2000;164:6067-74.

116. Oros KK, Arcand SL, Bayani J, Squire JA, Mes-Masson AM, Tonin PN, Greenwood CM. Analysis of genomic abnormalities in tumors: a review of available methods for Illumina two-color SNP genotyping and evaluation of performance. *Cancer Genet* 2013;206:103-15.
117. Ottinger HD, Ferencik S, Beelen DW et al. Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors and HLA-matched unrelated donors. *Blood* 2003; 102:1131-37.
118. Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004;104: 2976-80.
119. Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:155-170.
120. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:588-93.
121. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-28.
122. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, Leitman SF, Anderlini P, Klein JP, Horowitz MM, Miller JP, King RJ, Confer DL. Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher CD34+ cell dose. *Blood* 2009;114:2606-16.
123. Rafeah NT, Fadilah SA. The A-B-C of haematopoietic stem cell transplantation. *Med J Malaysia* 2009;64:94-100.
124. Rashidi-Nezhad A, Azimi C, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Hossein-Nezhad A, Izadi P, Sobhani M, Noori-Dalooi AR, Noori-Dalooi MR. TGF-Beta codon 25 polymorphism and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2010;9:1-6.
125. Relichová J. Genetika populací. Nakladatelství Masarykovy univerzity. Brno 1997.
126. Resende RG, Correia-Silva Jde F, Araújo TC, Silva TA, Abreu MH, Bittencourt H, Gomez RS. Investigation of functional IL-10 gene polymorphism and IL-10 levels in acute graft-versus-host disease. *J Clin Immunol* 2010;30:465-73.
127. Rocha V, Franco RF, Porcher R, Bittencourt H, Silva WA Jr, Latouche A, Devergie A, Esperou H, Ribaud P, Socie G, Zago MA, Gluckman E. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 3908-18.

128. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344-8.
129. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
130. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
131. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, Teshima T. Donor-derived thymic-dependent t cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;109:1756-64.
132. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
133. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clinical Cancer Research* 2007;13:6107-14.
134. Shamim Z, Ryder LP, Heilmann C, madsen H, Lauersen H, Andersen PK, Svejgaard A, Jacobsen N, Müller K. Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukin-7 receptor-alpha: prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:485-91.
135. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-26.
136. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, Madrigal JA, Begovich AB, Horowitz MM, Gratwohl A, Ringdén O, Marsh SGE, Petersdorf EW. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2007;110:4560-66.
137. Shaw BE, Fleischhauer K, Zino E, Malkki M, Speelman S, Morishima Y, Gooley T, Petersdorf E. Significant differences in outcome following unrelated donor HCT can be better predicted using an algorithm incorporating both allele and epitope level matching for HLA-DPB1 (abstract). *Bone Marrow Transplant* 2009;43:S78.
138. Shaw BE, Arguello R, Garcia-Sepulveda CA, Madrigal JA. The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2010;150:251-58.
139. Shlomchik WD. Antigen presentation in graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2003;31:1187-97.



140. Schmaltz C, Alpdogan O, Horndasch KJ, Muriglan SJ, Kappel BJ, Teshima T, Ferrara JL, Burakoff SJ, van den Brink MR. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2001;97:2886-95.
141. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglan SJ, Rotolo JA, Ongchin J, Willis LM, Greenberg AS, Eng JM, Crawford JM, Murphy GF, Yagita H, Walczak H, Peschon JJ, van den Brink MR. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 2002;8:1433-7.
142. Schröppel B, Fischereeder M, Lin M, Marder B, Schiano T, Kramer BK, Murphy B. Analysis of gene polymorphisms in the regulatory region of MCP-1, RANTES and CCR5 in liver transplant recipients. *J Clin Immunol* 2002; 22:381-85.
143. Silverman EK, Palmer LJ. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:645-8.
144. Sivula J, Turpeinen H, Volin L, Partanen J. Association of IL-10 and IL-10Rbeta gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. *BMC Immunol* 2009;10:24.
145. Smith AJP, Humhries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009; 20:43-59.
146. Socié G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E, Charron D. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001;72:699-706.
147. Socié G, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood* 2009;114:4327-36.
148. Sorrow ML, Storer B, Storb RF. Validation of the hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index (HCT-CI) in single and multiple institutions: limitations and inferences. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:757-8.
149. Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Proctor SJ, Middleton PG. Tumour necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2003;76:1742-9.
150. Sullivan KM. Graft versus host disease. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, et al (eds). *Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford: Blackwell Science 1999:515-36.
151. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007;150:197-214.
152. Sundquist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27:2737-46.

153. Sykes M, Romick ML, Hoyles KA, Sachs DH. In vivo administration of interleukin 2 plus T cell-depleted syngenic marrow prevents graft-versus-host disease mortality and permits alloengraftment. *J Exp Med* 1990;171:645-58.
154. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F, Inano K, Takahashi M, Aizawa Y, Koike T. Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1317-23.
155. Tambur AR, Yaniv I, Stein J, Lapidot M, Shabtai E, Kfir B, Klein T. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2001;33:502-3.
156. Thakkinstian A, Dimitrenko S, Gerbase-Delima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM, McEvoy M, Ingsathit A, Trevillian P, Barber WH, Attia J. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1688-92.
157. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-16.
158. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, Goodell BW, Hickman RO, Lerner KG, Neiman PE, Sale GE, Sanders JE, Singer J, Stevens M, Storb R, Weiden PL. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511-33.
159. Ting C, Alterovitz G, Merlob A, Abdi R. Genomic studies of GVHD – lessons thus far. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:4-9.
160. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Hematol* 2008;21:101-17.
161. Tseng SY, Dustin ML. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:575-80.
162. Tseng LH, Storer B, Petersdorf E, Lin MT, Chien JW, Grogan BM, Malkki M, Chen PJ, Zhao LP, Martin PJ, Hansen JA. IL10 and IL10 receptor gene variation and outcomes after unrelated and related hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2009;87:704-10.
163. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24:1-8.
164. Ueha S, Murai M, Yoneyama H, Kitebatake M, Irnai T, Shimaoka T, Yonehara S, Ishikawa S, Matsushima K. Intervention of MAdCAM-1 or fractalkine alleviates graft-versus-host reaction associated intestinal injury while preserving graft-versus-tumor effects. *J Leukoc Biol* 2007;81:176-85.

165. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:273-81.
166. Vaňásek J, Starý J, Kavan P, Vaňásek jr. J. *Transplantace kostní dřeně*, Galén 1996.
167. Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC, Aranha FJ, de Brito Eid KA, Oliveira GB, Miranda EC, de Souza CA, Visentainer JE. IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 2007;66:703-10.
168. Vollmert C, Illig T, Altmüller J, Klugbauer S, Loesgen S, Dumitrescu L, Wjst M. Single nucleotide polymorphism screening and association analysis – exclusion of integrin beta 7 and vitamin D receptor (chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1841-50.
169. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:940-52.
170. Waldman E, Lu SX, Hubbard VM, Kochman AA, Eng JM, Terwey TH, Muriglan SJ, Kim TD, Heller G, Murphy GF, Liu C, Alpdogan O, van den Brink MR. Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 2006;107:1703-11.
171. Wall DA Sheehan KC. The role of tumor necrosis factor and interferon gamma in graft-versus-host disease and related immunodeficiency. *Transplantation* 1994;57:273-9.
172. Welniak LA, Blazer BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2006;25:139-70.
173. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:170-3.
174. Wu CJ, Ritz J. Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Adv Immunol* 2006;90:133-73.
175. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4191-9.
176. Xiao Y, Lazaro AM, Masaberg C, Haagenson M, Vierra-Green C, Spellman S, Dakshanamurthy S, Ng J, Hurley CK. Evaluating the potential impact of mismatches outside the antigen recognition site in unrelated hematopoietic stem cell transplantation: HLA-DRB1\*1454 and DRB1\*140101. *Tissue Antigens* 2009;73:595-8.
177. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on

inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994;83:2360-7.

178. Yu XZ, Martin PJ, Anasetti C. Role of CD28 in acute graft-versus-host disease. *Blood* 1998;92:2963-70.
179. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, Liu Y, Kandeel F, Forman S, Strober S, Zeng D. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* 2006;107:2993-3001.
180. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evaluation. *Genome Biol* 2006;7:243.
181. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-11.

## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK

### 10.1. Práce související s dizertační prací

#### 10.1.1. Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s impakt faktorem a předkládané v dizertační práci (separátní výtisky *in extenso*)

##### Práce č. 1

Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, **Ambruzova Z**, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. *Int J Immunogenet* 2006;33(4):261-7. (IF 2006: 1,333, počet citací dle SCI: 18).

##### Práce č. 2:

**Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M. Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. *Int J Immunogenet* 2008;35(4-5):401-3. (IF 2008: 1,160, počet citací dle SCI: 4).

##### Práce č. 3:

**Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of IL-6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;44(4):227-35. (IF 2009: 2,998, počet citací dle SCI: 17).

##### Práce č. 4:

**Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Stahelova A, Faber E, Indrak K, Petrek M. Possible impact of MADCAM1 gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2009;70(6):457-60. (IF 2009: 2,550, počet citací dle SCI: 5).

*Za soubor prací č. 3 a č. 4 byla udělena Cena děkana Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za nejlepší studentskou vědeckou práci v doktorském studijním programu v roce 2009.*

##### Práce č. 5:

Mrazek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Raida L, Indrak K, Petrek M, Fischer GF. A novel HLA-B\*420502 allele identified by PCR-SSO/SSP routine typing and confirmed by Sequencing-based typing. *Tissue Antigens* 2005;65(3):275-7. (IF 2005: 2,747, počet citací dle SCI: 3).

##### Práce č. 6:

Mrazek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Raida L, Kriegova E, Indrak K, Fischer GF, Petrek M. A single amino acid exchange shifts the serological reactivity of the novel HLA-B\*4442 allele product from HLA-B44 to HLA-B21. *Int J Immunogenet* 2006;33(3):197-200. (IF 2006: 1,333, počet citací dle SCI: 0).

##### Práce č. 7:

Mrazek F, Onderkova J, **Ambruzova Z**, Zachova S, Petrek M. A novel HLA-DRB1 allele, HLA-DRB1\*13:116, identified by sequencing-based typing in a member of the Czech national marrow donor registry. *Int J Immunogenet* 2013;41(2):149-50 (IF 2012: 1,355, počet citací dle SCI: 0).

### Práce č. 8:

Mrazek F, Onderkova J, Szotkowski T, Konigova N, **Ambruzova Z**, Raida L. Somatic mutation in acute myelogenous leukemia cells imitated novel germline HLA-A allele: a case report. *Tissue Antigens* 2014 Apr 23. doi: 10.1111/tan.12362. [Epub ahead of print] (IF 2012: 2,753, počet citací dle SCI: 0).

### 10.1.2. Publikovaná abstrakta

#### Abstrakta v časopisech s impakt faktorem:

1. Mrazek F, Kriegova E, **Ambruzova Z**, Staffova K, Stahelova A, Raida L, Indrak K, Petrek M. Selected non-MHC variants and acute graft versus host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2013;81:317-318.
2. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Stahelova A, Indrak K, Petrek M. ITGB7 gene polymorphism and chronic graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2010;75:558.
3. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Stahelova A, Indrak K, Petrek M. MAdCAM1 and ITGA4 gene polymorphisms and their possible effect on the allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome. *Tissue Antigens* 2009;73:442.
4. **Ambruzova Z**, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Mrazek F, Faber E, Onderkova J, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Interleukin-6 gene polymorphisms and survival after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2008;71:327,P-110.
5. **Ambruzova Z**, Vidan-Jeras B, Raida L, Mrazek F, Jeras M, Faber E, Stahelova A, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of MCP-1/CCL2 gene polymorphism with the acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2008;71: 323, P-099.
6. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M. NOD2/CARD15 gene variants and GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: pilot study. *Tissue Antigens* 2007;69,5(Suppl.):515, P-294.
7. Raida L, Faber E, Indrak K, Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Petřek M, Koza V, Langová K. An influence of cytokine polymorphism on the outcome of allografted patients. *Blood Rev* 2007; 21,1(Suppl.): S93.
8. Mrazek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Faber E, Indrak K, Fischer GF, Petrek M. A novel HLA-B\*44 allele identified in the Czech Family and confirmed by Sequencing-based Typing. *Genes and Immunity* 2005;6(Suppl.1):S14-2.

#### Abstrakta v ostatních časopisech:

1. Mrázek F, Onderková J, Zachová S, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Identifikace nové HLA alely DRB1\*13:116 při vstupním vyšetření členky Registru dárců krvetvorných kmenových buněk. *Transfúze a Hematologie dnes* 2011;17:81. (Abstrakta XXV.

Olomouckých hematologických dnů s mezinárodní účastí).

2. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M. Polymorfismus genu *ITGB7* a chronická reakce štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. *Alergie* 2010;12,1(Suppl.):76.
3. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M. Jednonukleotidové polymorfismy genu MAdCAM-1 a jejich význam pro předpověď komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. *Alergie* 2008;10, 2(Suppl.):138.
4. Petřek M, Mrázek F, Petřková J, **Ambrůzová Z**, Gallo J. Úloha HLA a non-HLA genů v imunopatologii zánětlivých nemocí a komplikací transplantační léčby. *Alergie* 2008;10,2 (Suppl.):72-73.
5. **Ambrůzová Z**, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M, Raida L, Faber E, Mrázek F. Souvislost polymorfismů genu MAdCAM-1 se vznikem komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. *Vnitřní lékařství* 2008;54(5, Příloha): P85 – Sborník abstrakt.

#### **Abstrakta ve sbornících z konferencí:**

1. Mrázek F, Onderkova J, Königova N, **Ambruzova Z**, Szotkowski T, Raida L, Petrek M. Novel HLA-A allele or somatic mutation in acute myeloid leukemia blasts? A case report. Programme Book of Abstracts, page 26. 7th East-West Immunogenetics Conference, March 6-8, 2013, Praha.
2. Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Imunogenetika alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk – současné přístupy a perspektivy. Sborník abstrakt, str. 39. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 24.-26. června 2012, Olomouc.
3. Mrázek F, Onderková J, Zachová S, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Novel HLA-DRB1\*13:116 allele identified by sequencing based typing in member of the bone marrow donor registry. Sborník abstrakt, str. 22. 6th East-West Immunogenetics Conference, 1.-2. března 2012, Olomouc.
4. **Ambruzova Z**, Mrázek F, Petrek M. Non-HLA gene polymorphism – mere ISI impact or real impact in allogeneic HSCT? Sborník abstrakt, str. 10. 5th East-West Immunogenetics Conference, 4.-5. března 2010, Plzeň.
5. **Ambruzova Z**, Mrázek F, Raida L, Stahelova A, Faber E, Indrak K, Petrek M. MAdCAM1 gene polymorphisms and the outcome of the allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Sborník abstrakt str. 37. Abstracts for the Conference Donor Recipient Matching and Cellular Therapy in Transplantation: Technological and Clinical Aspects, April 23-24, 2009, Wroclaw, Poland.
6. **Ambruzova Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K,

- Petrek M. Association of nonMHC polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Book of Abstracts page 33, East-West Immunogenetics Conference, Congress Centre IKEM, March 1 – 3, 2007, Prague, Czech Republic.
7. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Indrák K, Petřek M. Polymorfismus nonHLA genů jako potenciální faktor pro předpověď komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. Sborník abstrakt - str. 13-969. XXI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 16.-19.6.2007.
  8. Zachová S, Mrázek F, Lukešová M, Onderková J, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Genotypizace vybraných polymorfismů imunitních genů pomocí PCR-SSP s využitím univerzálního protokolu. Sborník V. dvoudenní konference Imunologických laborantů, Brno, 1.-2.6.2007.
  9. **Ambrůzová Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Ondrák K, Petřek M. Polymorfismus genů pro IL-6 a IL-10: význam pro alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk. Konference vědeckých prací studentů DSP, 11.-12.10.2006, Olomouc. Sborník abstrakt, str. 9, Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, Ediční řada-Sborníky.
  10. Mrázek F, Fae I, **Ambruzova Z**, Raida L, Indrak K, Fischer GF, Petrek M.: Novel HLA-B alleles identified in the Czech families during the search for haematopoietic stem cell donor. Sborník „East-West Immunogenetics Conference“, str. 20, 22.-24.2.2006, Praha, Česká republika.
  11. **Ambruzova Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M.: IL-6 and IL-10 gene polymorphisms and the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Sborník „East-West Immunogenetics Conference“, str. 29, 22.-24.2.2006, Praha, Česká republika.
  12. **Ambrůzová Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Indrák K, Petrek M. Polymorfismus genů pro IL-6 a IL-10: význam pro alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk. Sborník abstrakt XX. Olomouckých hematologických dnů 2006, 90:605.
  13. Raida L, Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Indrák K, Petřek M. Ovlivňuje polymorfismus genu pro interleukin-6 (IL-6) výsledky alogenních transplantací kmenových buněk? Sborník XIV. Slovensko-českého hematologického a transfuziologického zjazdu (strana 7), 29.9.-2.10.2005, Štrbské pleso, Slovensko.
  14. Mrázek F, Fae I, **Ambrůzová Z**, Raida L, Faber E, Onderková J, Indrák K, Fischer GF, Petřek M: Nové alely HLA systému identifikované v rámci imunogenetického vyšetření pro účely transplantace kmenových buněk krvetvorby. Sborník XIX. Olomouckých hematologických dnů (strana 21), 15.-18.6.2005, Olomouc.



### 10.1.3. Seznam přednášek / posterů přednesených na veřejných odborných fórech

1. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Stahelova A, Indrak K, Petrek M. ITGB7 gene polymorphism and chronic graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2010;75:558. (poster)
2. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Stahelova A, Indrak K, Petrek M. MAdCAM1 and ITGA4 gene polymorphisms and their possible effect on the allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome. *Tissue Antigens* 2009;73:442. (poster)
3. **Ambruzova Z**, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Mrazek F, Faber E, Onderkova J, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Interleukin-6 gene polymorphisms and survival after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2008;71:327,P-110. (poster)
4. **Ambruzova Z**, Vidan-Jeras B, Raida L, Mrazek F, Jeras M, Faber E, Stahelova A, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of MCP-1/CCL2 gene polymorphism with the acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2008;71: 323, P-099. (poster)
5. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M. NOD2/CARD15 gene variants and GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: pilot study. *Tissue Antigens* 2007;69,5(Suppl.):515, P-294. (poster)
6. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M. Polymorfismus genu *ITGB7* a chronická reakce štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. *Alergie* 2010;12,1(Suppl.):76. (poster)
7. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M. Jednonukleotidové polymorfismy genu MAdCAM-1 a jejich význam pro předpověď komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. *Alergie* 2008;10, 2(Suppl.):138. (poster)
8. **Ambrůzová Z**, Sťahelová A, Indrák K, Petřek M, Raida L, Faber E, Mrázek F. Souvislost polymorfismů genu MAdCAM-1 se vznikem komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. *Vnitřní lékařství* 2008;54(5, Příloha): P85 – Sborník abstrakt. (poster)
9. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Petrek M. Non-HLA gene polymorphism – mere ISI impact or real impact in allogeneic HSCT? Sborník abstrakt, str. 10. 5th East-West Immunogenetics Conference, 4.-5. března 2010, Plzeň. (přednáška)
10. **Ambruzova Z**, Mrazek F, Raida L, Stahelova A, Faber E, Indrak K, Petrek M. MAdCAM1 gene polymorphisms and the outcome of the allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Sborník abstrakt str. 37. Abstracts for the Conference Donor Recipient Matching and Cellular Therapy in Transplantation: Technological and Clinical Aspects, April 23-24, 2009, Wroclaw, Poland. (přednáška)

11. **Ambruzova Z**, Raida L, Mrazek F, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M. Association of nonMHC polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Book of Abstracts page 33, East-West Immunogenetics Conference, Congress Centre IKEM, March 1 – 3, 2007, Prague, Czech Republic. (přednáška)
12. **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Raida L, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Indrák K, Petřek M. Polymorfismus nonHLA genů jako potenciální faktor pro předpověď komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. Sborník abstrakt - str. 13-969. XXI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 16.-19.6.2007. (přednáška)
13. **Ambrůzová Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Ondrák K, Petřek M. Polymorfismus genů pro IL-6 a IL-10: význam pro alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk. Konference vědeckých prací studentů DSP, 11.-12.10.2006, Olomouc. Sborník abstrakt, str. 9, Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, Ediční řada-Sborníky. (přednáška)
14. **Ambruzova Z**, Raida L, Mrazek F, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, Indrak K, Petrek M.: IL-6 and IL-10 gene polymorphisms and the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Sborník „East-West Immunogenetics Conference“, str. 29, 22.-24.2.2006, Praha, Česká republika. (přednáška)
15. **Ambrůzová Z**, Raida L, Mrázek F, Faber E, Onderková J, Kriegová E, Indrak K, Petrek M. Polymorfismus genů pro IL-6 a IL-10: význam pro alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk. Sborník abstrakt XX. Olomouckých hematologických dnů 2006, 90:605. (poster)

## 10.2. Přehled ostatních publikací

### 10.2.1. Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech

1. Jindra P, **Ambrůzová Z**, Mrázek F, Pittrová H, Navrátilová J, Steinerová K, Koza V. Výsledky konfirmačních HLA typizací dárců jako indikátor kvality HLA typizace dárců Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD). *Transfuzie a hematologie dnes* 2007;3:142-148.

### 10.2.2. Publikovaná abstrakta

#### Abstrakta v časopisech s impakt faktorem:

1. Mrazek F., Staffova K., Marcinkova J., Zurkova M., Kriegova E., **Ambruzova Z.**, Kolek V., Petrek M. ATG16 autophagy related 16-like 1 gene polymorphism and susceptibility to sarcoidosis in Czech patients. *Tissue Antigens* 2012;79:574-575.
2. Stahelova A, Gallo J, Navratilova Z, Smizansky M, **Ambruzova Z**, Mrazek F, Petrek M. Association of interleukin-1 beta gene variant with infection after total joint arthroplasty. *Tissue Antigens* 2011;77:499-500.

3. **Ambruzova Z**, Gallo J, Mrazek F, Kubistova Z, Onderkova J, Petrek M. Association of cytokine gene polymorphisms with the expansive periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Tissue Antigens* 2006;67:6:P-178.

#### **Abstrakta v ostatních časopisech:**

1. Onderková J, Zachová S, Mrázek F, Skotalová M, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Identifikace HLA alely s nízkou expresí A\*25:02:01:02L na základě diskrepance mezi sérologickou a molekulárně-genetickou typizací. *Alergie* 2010;12,1(Suppl.):78-79.
2. Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Nové vydání nomenklatury HLA systému a jeho praktické dopady *Transfúze a Hematologie dnes* 2010;16:21-22. (Abstrakta XXIV. Olomouckých hematologických dnů s mezinárodní účastí, 24.-27.6.2010).
3. Petřek M, Mrázek F, Petřková J, **Ambrůzová Z**, Gallo J. Úloha HLA a non-HLA genů v imunopatologii zánětlivých nemocí a komplikací transplantační léčby. *Alergie* 2008;10,2 (Suppl.):72-73.
4. Mrázek F, Gallo J, **Ambrůzová Z**, Kubištová Z, Onderková J, Kriegová E, Petřek M. Souvislost polymorfismů cytokinových genů s periprotetickou osteolýzou po endoprotéze kyčelního kloubu. *Klinická imunologie a alergologie* 2007;3:40.
5. **Ambrůzová Z**, Gallo J, Mrázek F, Kubištová Z, Onderková J, Kriegová E, Petřek M. Význam polymorfismů cytokinových genů pro predikci závažné osteolýzy po totální endoprotéze kyčle. XXIII. sjezd CSAKI a XI. Kongres českých a slovenských imunologů, 25.-28. října 2006. *Alergie* 2006;8,2(Suppl.):46(P-62).
6. Slavíková E, **Ambrůzová Z**, Skotalová M, Lukešová M, Mrázek F, Petřek M. Systém kontroly kvality v rutinní praxi HLA laboratoře. *Alergie* 2006;8,2(Suppl.), abstrakta.

#### **Abstrakta ve sbornících z konferencí:**

1. Petřek M, **Ambrůzová Z**. Vyšetření HLA protilátek metodou Luminex u pacientů zařazených do programu transplantací ledvin. Sborník abstrakt, FONS 2010, Symposium klinické biochemie, 20.-21. září 2010 – **posteru udělena cena organizátora**.
2. Gallo J, Mrazek F, **Ambruzova Z**, Kubistova Z, Onderkova J, Kriegova E, Petrek M. Single nucleotide polymorphisms in genes for cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6 and TNF $\alpha$  are associated with osteolysis in total hip arthroplasty. Sborník abstrakt, str. 213, P-067. EORS 2008 (European Orthopaedic Research Society – 17th Annual Meeting, April 24 -26, 2008, Madrid, Španělsko).
3. Gallo J, Mrazek F, **Ambruzova Z**, Kubistova Z, Onderkova J, Kriegova E, Petrek M. Single nucleotide polymorphisms in genes for cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6 and TNF $\alpha$  are associated with osteolysis in total hip arthroplasty. Sborník abstrakt (elektronická podoba). EFORT (European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology - 9th EFORT congress, May 29 – June 1, 2008, Nice, Francie) – **posteru udělena cena “Jacques-Duparc award” (nejlepší poster)**.

4. Zachová S, Mrázek F, Lukešová M, Onderková J, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Genotypizace vybraných polymorfismů imunitních genů pomocí PCR-SSP s využitím univerzálního protokolu. Sborník V. dvoudenní konference imunologických laborantů, Brno, 1.-2.6.2007.
5. Gallo J, Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Individuální dispozice k selhání endoprotézy. X. národní kongres ČSOT s mezinárodní účastí, 17.-20.5.2006, Praha. Kniha abstrakt, 2006; 42.

### **10.2.3. Seznam přednášek / posterů přednesených na veřejných odborných fórech**

1. **Ambruzova Z**, Gallo J, Mrázek F, Kubistova Z, Onderkova J, Petrek M. Association of cytokine gene polymorphisms with the expansive periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Tissue Antigens* 2006;67:6:P-178. (poster)
2. Mrázek F, **Ambrůzová Z**, Petřek M. Nové vydání nomenklatury HLA systému a jeho praktické dopady *Transfuze a Hematologie dnes* 2010;16:21-22. (Abstrakta XXIV. Olomouckých hematologických dnů s mezinárodní účastí, 24.-27.6.2010). (přednáška)
3. **Ambrůzová Z**, Gallo J, Mrázek F, Kubištová Z, Onderková J, Kriegová E, Petřek M. Význam polymorfismů cytokinových genů pro predikci závažné osteolýzy po totální endoprotéze kyčle. XXIII. sjezd CSAKI a XI. Kongres českých a slovenských imunologů, 25.-28. října 2006. *Alergie* 2006;8,2(Suppl.):46(P-62). (přednáška i poster)

## **Publikace předkládané v dizertační práci**

*(separátní výtisky in extenso)*