

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Klára Horáčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sledování hladiny buněčného chimerismu
u pacientů po alogenní transplantaci
hematopoetických kmenových buněk**

Bakalářská práce

Klára Horáčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Jana Navrátilová

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci s názvem „*Sledování hladiny buněčného chimerismu u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk*“ zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Navrátilové na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc za použití citované literatury uvedené v závěru této práce.

V Olomouci dne

.....

Klára Horáčková

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Janě Navrátilové, za odbornou pomoc a trpělivost při zpracování této práce. Stejně tak všem zaměstnancům Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN Olomouc za vstřícnost během vypracovávání experimentální části a v neposlední řadě vedoucí laboratoře RNDr. Martině Divoké, Ph.D. za možnost bakalářskou práci zde provádět.

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou alogenních transplantací hematopoetických kmenových buněk (HSC) u pacientů s hematologickými onemocněními a možnostmi sledování hladiny buněčného chimerismu metodami molekulárně biologickými aj. u pacientů, kteří alogenní transplantaci HSC podstoupili.

Teoretická část shrnuje základní fakta o kmenových buňkách s důrazem na HSC a krevetvorbu. Také se věnuje problematice transplantací HSC a laboratorním metodám využívaným při sledování hladiny dárcovského chimerismu po alogenních transplantacích HSC.

Experimentální část zahrnuje vyšetření předtransplantačních a následně i potransplantačních vzorků u vybraných pacientů pomocí STR-PCR a fragmentační analýzy. Pomocí této metody byla provedena genotypizace 4 pacientů a jejich dárců a analyzováno 19 potransplantačních vzorků, u nichž bylo sledováno postupné přihojování štěpu, remise a u 2 pacientů i relaps onemocnění.

SUMMARY

This bachelor thesis is focused on allogeneic transplantations of hematopoietic stem cells (HSCT) in patients suffering from hematologic malignancies. It describes available methods for chimerism monitoring by molecular methods in case of patients, who has undergone the HSC transplantation.

The theoretical part summarizes the information about stem cells - hematopoietic stem cells in particular, and hematopoiesis. Furthermore, it deals with the topic of HSC transplantations and the methods used for monitoring of donor chimerism levels after the allogeneic HSCTs.

The experimental part presents pre-transplant and post-transplant analyses of samples from 4 chosen patients. Analyses consist of genotypizations of the patients and their donors and post-transplant evaluation of 19 samples. The method used in this case is STR-PCR followed by fragment analysis performed on genetic analyser ABI 3100. The engraftment, as well as remission and relaps have been detected.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1. Kmenové buňky	10
3.2. Hematopoetické kmenové buňky	11
3.3. Transplantace kostní dřeně	12
3.4. Potransplantační jevy	15
3.5. Buněčný chimerismus	17
3.6. Metody stanovení buněčného chimerismu	18
3.6.1. Stanovení na základě buněčných determinant	18
3.6.2. Klasické cytogenetické metody	20
3.6.3. RFLP	20
3.6.5. STR-PCR	22
3.6.6. qPCR	27
3.6.7. ddPCR	32
4. MATERIÁL A METODIKA	34
4.1. Přístroje	34
4.2. Pomůcky	34
4.3. Reagencie	34
4.4. Biologický materiál	36
4.5. Pracovní postup	36
4.5.1. Genotypizace – předtransplantační vyšetření	36
4.5.1.1. Simplex fluorescenční PCR amplifikace 16 STR lokusů u pacienta a jeho dárce	36
4.5.1.2. Fragmentační analýza PCR produktů	38

4.5.2. Stanovení hladiny potransplantačního chimerismu	39
5. VÝSLEDKY	41
5.1. Monitorování pacienta č. 1.....	41
5.2. Monitorování pacienta č. 2.....	43
5.3. Monitorování pacienta č. 3.....	45
5.4. Monitorování pacienta č. 4.....	47
6. DISKUZE.....	50
7. ZÁVĚR	52
8. LITERATURA.....	53
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	60
9.1. Pojmy	60
9.2. Reagencie	61

1. ÚVOD

Incidence nádorových onemocnění je v České republice velmi vysoká. Nezanedbatelnou skupinu nádorových onemocnění tvoří i hematologické malignity. Uvádí se, že zastupují 4 % všech diagnostikovaných onkologických onemocnění. Postižena je hlavně kostní dřeň, případně další orgány, především lymfatické uzliny. Patologická krvetvorba vzniká jako následek maligní transformace hematopoetické kmenové buňky (HSC, z angl. *Hematopoietic Stem Cell*) nebo z ní odvozených progenitorů. Takto pozměněné HSC ani progenitory nejsou schopné diferencovat do své terminální podoby a nekontrolovatelně se v kostní dřeni množí a utlačují fyziologickou krvetvorbu. Časem dochází k postupnému vyčerpání *poolu* fyziologických buněk, ale nové se v postižené dřeni netvoří. Nedostatek krevních elementů je provázen různými příznaky v závislosti na typu onemocnění. Např. pro leukémie je charakteristická anémie spojená s dušností a únavou, náchylnost k infekcím a velmi často patologie krevního srážení. Některé jiné hematologické malignity mají vliv i na další orgány spojené s krvetvorbou - často lze u pacientů s polycythemia vera či dalšími maligními onemocněními pozorovat zvětšení sleziny nebo jater způsobené odstraňováním nadbytečných buněk. Všechna tato onemocnění ovlivňují závažně mnoha způsoby celý organismus. Proto je důležité je včas zachytit, rychle a správně diagnostikovat a následně zvolit vhodný léčebný postup.

Jako jedna z možností léčby hematologických malignit se v moderní medicíně využívá chemoterapie a transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT z angl. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*). Cílem této léčby je nahradit patologickou krvetvorbu zdravou funkční kostní dřeni dárce a také maximálně využít potenciálu štěpu proti reziduálním nádorovým buňkám pacienta. Kontrola úspěšnosti transplantace HSC se v laboratorní praxi provádí sledováním hladiny buněčného chimerismu. Ta je dána procentuálním zastoupením dárcovských buněk (leukocytů) v analyzovaném vzorku periferní krve či kostní dřeni a sleduje se pomocí různých molekulárně biologických metod. V praxi jich existuje několik. Běžně používaná je STR-PCR, i když citlivější metodou je qPCR. Analýza buněčného chimerismu slouží jako kontrolní mechanismus při sledování pacientů po alogenní HSCT a k časnému odhalení případného relapsu onemocnění nebo odhojení štěpu.

2. CÍL PRÁCE

Bakalářská práce na téma *Sledování hladiny buněčného chimerismu u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk* se skládá z teoretické a experimentální části.

Cílem teoretické části (viz kapitola 3. *Současný stav řešené problematiky*) bylo vypracování literární rešerše založené na informacích z aktuálně dostupné vědecké literatury zabývající se problematikou spojenou s tématem práce. Tato část zahrnuje následující témata:

- Kmenové buňky se zaměřením na HSC
- Transplantace HSC
- Buněčný chimerismus
- Metody stanovení buněčného chimerismu užívané v laboratorní praxi

Cílem experimentální části (viz kapitoly 4. *Materiál a metodika*, 5. *Výsledky* a 6. *Diskuze*) bylo zvládnutí metodiky a praktické provedení vyšetření hladiny buněčného chimerismu na vybraném souboru pacientů po alogenní HSCT. Analýza a vyhodnocení výsledků se skládaly z následujících částí:

- Genotypizace vybraných STR lokusů u příjemce a jeho dárce pomocí simplex fluorescenční PCR s následnou fragmentační analýzou PCR produktu
- Určení informativity jednotlivých STR lokusů pro dvojici příjemce - dárce
- Potrasplantační vyšetření vzorků vybraných pacientů se stanovením procentuálního zastoupení hladiny dárcovského chimerismu u příjemce

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Kmenové buňky

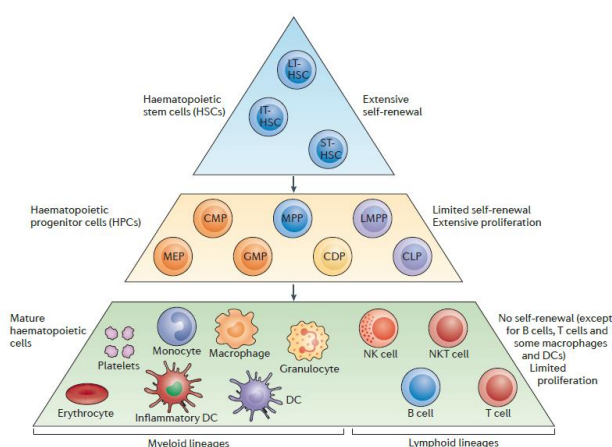
Transplantace v hematologii znamená převod kmenových buněk dárce do systému pacienta. Většina buněk lidského těla má omezený počet buněčných dělení a nachází se v terminálním diferencovaném stavu. Tento stav odpovídá funkci buňky v dané tkáni těla. Výjimkou jsou tzv. kmenové buňky (SC, z angl. *Stem Cells*), které jsou nediferencované a mají neomezenou schopnost proliferace. Stojí na počátku rozdílných buněčných linií, a pokud je potřeba, opakovaně se dělí. Aby buněčným dělením a následnou diferenciací nedocházelo ke snižování jejich počtu, je další důležitou vlastností SC jejich sebeobnova zajištěná asymetrickým buněčným dělením. Při dělení kmenových buněk nedochází ke vzniku dvou buněk identických, naopak se jedna nově vznikající buňka funkčně specializuje a druhá zůstává ve stejném nediferencovaném stavu, v jakém byla buňka mateřská (Klabusay *et al.*, 2005).

Podle plasticity neboli schopnosti diferenciaci do ontogeneticky rozdílných linií lze SC rozdělit do čtyř kategorií:

- **Totipotentní** kmenové buňky jsou schopné vytvořit jakékoliv buňky v těle. Jediným známým příkladem kmenové buňky se schopností totipotence je zygota.
- **Pluripotentní** kmenové buňky stojí na počátku buněčné linie diferencující do jakékoliv buňky těla s výjimkou trofoblastu. Pluripotentními SC jsou např. buňky embryonální.
- **Multipotentní** kmenové buňky jsou specializované pouze pro tvorbu buněk konkrétní tkáně. Mezi multipotentní buňky patří kmenové buňky mezenchymové, nervové nebo hematopoetické.
- **Oligopotentní** kmenové buňky dávají vzniknout pouze specifickým liniím buněk. Jako kmenové buňky se schopností oligopotence označujeme např. progenitorové buňky lymfoidní nebo myeloidní řady krevních elementů (Bindu & Srilatha, 2011).

3.2. Hematopoetické kmenové buňky

Konkrétním příkladem buněčné linie, ve které postupnou diferenciací vznikají vysoce specializované buňky, je řada odvozená od hematopoetické kmenové buňky. Diferenciace multipotentní HSC je indukována růstovými faktory charakteristickými pro každé stádium vývoje krevních elementů. V jejím průběhu vznikají z HSC buňky zaměřené na tvorbu jednotlivých řad krevních elementů (viz Obr. 1). Podle toho, jak dlouho je kmenová buňka schopna diferencovat do všech typů krevních elementů, je dělíme na LT-HSC (z angl. *Long Term*), IT-HSC (z angl. *Intermediate Term*) a ST-HSC (z angl. *Short Term*). HSC prolifereje a asymetrickým dělením z ní vznikají oligopotentní buňky označované jako progenitory. Při diferenciaci krevních elementů rozlišujeme 2 základní progenitory, CMP (z angl. *Common Myeloid Progenitor*) a CLP (z angl. *Common Lymphoid Progenitor*). Dále z nich vznikají MEP (z angl. *Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor*), GMP (z angl. *Granulocyte-Macrophage Progenitor*), CDP (z angl. *Common Dendritic Progenitor*) a LMPP (z angl. *Lymphoid-primed Multipotent Progenitor*). Tyto buňky další diferenciací vytváří prekurzory konkrétních krevních elementů. Z nich postupně vznikají terminálně diferencované krevní elementy. V myeloidní linii jsou to erythrocyty, trombocyty, monocyty, makrofágy, zánětlivé dendritické buňky, dendritické buňky a granulocyty. V případě lymfoidní linie jsou terminálně diferencovanými elementy NK (z angl. *Natural Killers*) buňky, NK T-lymfocyty, T-lymfocyty a B-lymfocyty (Manz & Boettcher, 2014; Orkin & Zon, 2008).



Obr. 1: Schéma diferenciaci jednotlivých krevních elementů

(Převzato z: Manz & Boettcher, 2014)

Hematopoéza je komplexní proces, během něhož může dojít k transformaci HSC a vzniku maligního onemocnění. Hematologické malignity jsou způsobeny nádorovou transformací buď přímo HSC nebo některých progenitorů či prekursorů (Bernt & Armstrong, 2009). Onemocnění se projevují různými způsoby. Příznaky jsou způsobeny nedostatkem fyziologických buněk, jejichž počty se vyčerpají a následně dochází k produkci pouze patologických klonů. To má dopad na fungování celého organismu a je důležité onemocnění včas diagnostikovat a léčit.

3.3. Transplantace kostní dřeně

Existuje několik možných přístupů k léčbě maligního onemocnění hematologického charakteru. V klinické praxi se dnes nejčastěji využívá chemoterapie, radioterapie či transplantace HSC (HSCT z angl. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*). Tyto terapie se pro dosažení co nejpříznivějších výsledků léčby často kombinují (Hatzimichael & Tuthill, 2010). Při zvažování HSCT se zohledňuje mnoho faktorů - diagnóza, věk a zdravotní stav pacienta, ale i možnost léčby jinou jednodušší metodou. Např. u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií existuje možnost využití cílených inhibitorů kináz. Tato léčebná strategie je méně riziková než samotná transplantace a zároveň mají pacienti velmi dobrou odpověď na léčbu (Gratwohl, 2002).

Po dohodě odborníků transplantačního programu o provedení HSCT a následném souhlasu pacienta s léčebným postupem nastává hledání vhodného dárce v rodině (Logue & Savani, 2013). V případě, že není v rodině nalezen vhodný dárce s odpovídající shodou v HLA (z angl. *Human Leukocyte Antigen*) systému, je možné zahájit *search* v registru, tj. databázi dárců kostní dřeně (Slováček *et al.*, 2005). V ČR existuje pro tyto účely databáze pod názvem Český národní registr dárců kostní dřeně, který spolupracuje i s registry v zahraničí (Jindra, 2014).

Po nalezení vhodného dárce začíná přípravný režim pacienta. Skládá se z chemoterapie. Chemoterapeutika mají za úkol eliminaci HSC příjemce a uvolnění místa ve dřeni pro transplantované buňky štěpu. Také dochází k vyřazení imunitního systému a pacient je v tomto období velmi náchylný k infekcím (Gyurkocza & Sandmaier, 2014). Proto celý proces probíhá ve speciálním režimu na transplantační

jednotce, kde je velmi přísný hygienický režim a pokoje mají speciální HEPA filtraci vzduchu (Cetlová, 2013).

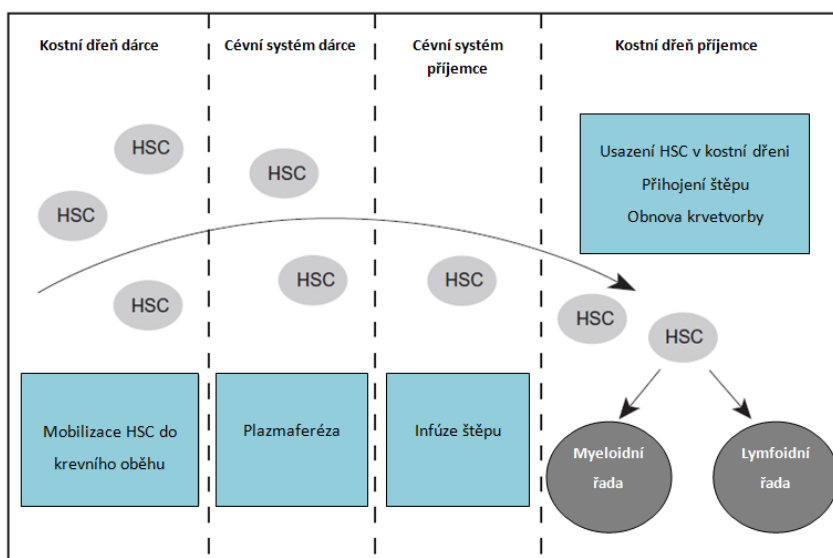
Odběr dárcových HSC může být prováděn několika způsoby. Nejpoužívanějším zdrojem CD34+ kmenových buněk jsou periferní kmenové buňky (PBSC, z angl. *Peripheral Blood Stem Cells*). PBSC se v krevním oběhu nachází fyziologicky, ale jejich množství není dostatečné pro transplantaci. Proto je před odběrem nutné PBSC mobilizovat. Jako mobilizace se označuje stimulace kostní dřeně s následným vyplavením většího množství PBSC do krevního oběhu dárce. K tomu se využívají růstové faktory bílých krvinek G-CSF (z angl. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), které se dárci aplikují před sběrem. Vyplavení PBSC z kostní dřeně trvá několik dní a dosažení dostatečné koncentrace CD34+ buněk v periferní krvi se monitoruje pomocí průtokové cytometrie. V případě, že je množství PBSC v krvi optimální, je provedena separace CD34+ buněk pomocí speciálního přístroje, tzv. separátoru (Jansen *et al.*, 2002). PBSC se v dnešní době využívají jako zdroj HSC ve většině případů - až v 80 %. Existují však i další zdroje HSC, ke kterým se přistupuje v případě, že z nějakého důvodu není možné PBSC mobilizovat (Czerw *et al.*, 2016).

Druhou možností získání HSC je trepanobiopický odběr dřeňové krve. Jako místo odběru se nejčastěji používá lopata kyčelní kosti. Trepanobiopsie má v porovnání s odběrem PBSC několik nevýhod. Samotný odběr dřeňové krve je invazivnější a rizikovější pro dárce a to především kvůli tomu, že se tato metoda provádí v celkové anestézii (Alwasaidi & Bredeson, 2014). Navíc jsou HSC získané trepanobiopickým odběrem náročnější na zpracování. Biologický materiál pocházející z trepanobiopsie často obsahuje nejen CD34+ HSC, ale i mnohé balastní částice - např. kousky kostí, tukové částice nebo krevní sraženiny. Balastní složky je nutné ze štěpu před transplantací odstranit (Ramakrishnan *et al.*, 2013).

Dalším možným zdrojem pro vytvoření štěpu jsou kmenové buňky, které byly uchovány po porodu z pupečnickové krve. Problémem je ale nedostatečný počet buněk obsažených v pupečnickové krvi a její odebrané množství od jednoho dárce. Tento způsob se dnes využívá minoritně (Broxmeyer, 2010).

Po odběru HSC následuje úprava buněk do podoby štěpu. Vytvořeným transplantátem je suspenze CD34+ HSC. Podané množství CD34+ buněk se stanovuje individuálně pro každého pacienta zvlášť podle jeho tělesné váhy (Czerw *et al.*, 2016).

Samotná transplantace hematopoetických kmenových buněk (viz Obr. 2) je proces, během kterého je příjemci podán štěp ve formě infúze. Dárcovské HSC krevním řečištěm putují do kostní dřeně, kde nachází své mikroprostředí označované jako *niche* a usazují se zde. Toto mikroprostředí je nezbytnou podmínkou přihojení štěpu a regenerace hematopoézy. Přihojení štěpu a obnova krvetvorby po transplantaci PBSC trvá asi 2 týdny (Hatzimichael & Tuthill, 2010).



Obr. 2: Schéma alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk
(Upraveno podle: Hatzimichael & Tuthill, 2010).

Podle původu hematopoetických kmenových buněk ve štěpu dělíme transplantace na dva typy - autologní a alogenní. Autologní transplantace je podání štěpu, který pochází z HSC buněk pacienta, jež mu byly odebrány v období remise onemocnění. Autologní transplantace se využívá, je-li nutné nasadit maximální dávky chemoterapie (např. u lymfomů či mnohočetného myelomu). Zajišťuje obnovu krvetvorby po jejím podání. Má své využití i u pacientů, kteří byli indikováni k alogenní HSCT, ale nebyl pro ně v registru či rodině nalezen vhodný dárce (Ali *et al.*, 2015). Hlavní výhodou je to, že se jedná o buňky tělu vlastní se shodnými leukocytárními antigeny (HLA). Nevýhodou autologního transplantátu je častější výskyt relapsu onemocnění díky možné kontaminaci transplantátu původními nádorovými buňkami (Slováček *et al.*, 2005).

Při alogenní transplantaci jsou HSC buňky štěpu získány od dárce, ať již HLA kompatibilního příbuzného či nepříbuzného člověka (Slováček *et al.*, 2005). V tomto případě je zásadní zvolit vhodného dárce, aby se předešlo možným potransplantačním komplikacím. Při jeho výběru se zohledňuje věk a zdravotní stav. Velmi důležitým faktorem je také co nejvyšší imunologická shoda v HLA systému (Rafeah & Fadilah, 2009). Jelikož je HLA identita jedince dědičná, vhodnými dárči často bývají příbuzní, nejčastěji sourozenci. Specifickým typem alogenní transplantace mezi sourozenci je transplantace syngenní, kdy je dárce jednovaječné dvojče. Jednovaječná dvojčata si jsou navzájem ideálními dárči, protože jejich genetická informace je identická. Odpadají komplikace imunitního původu. Ovšem vzhledem k incidenci hematologických onemocnění u jednovaječných dvojčat se vyskytují tyto transplantace raritně (Gratwohl, 2002).

Jelikož jsou transplantované HSC v případě alogenní HSCT tělu příjemce cizorodé, setkání dárcovských leukocytů s tkáněmi příjemce by mohlo vyvolat imunitní odpověď. Je tedy nutné transplantaci doplnit o imunosupresivní léčbu. Ta má za úkol regulovat imunitní reakci štěpu do té míry, aby se předešlo vzniku tzv. nemoci štěpu proti hostiteli (GvHD, z angl. *Graft versus Host Disease*). Zároveň má zpomalený rozvoj imunity i svá negativa. Imunosupresiva prodlužují dobu, po kterou má pacient sníženou obranyschopnost a je tedy velmi náchylný ke všem infekcím. Navíc snížený počet leukocytů má za následek i omezení tzv. efektu štěpu proti nádoru (GvT, z angl. *Graft versus Tumor Effect*). Při výběru konkrétního imunosupresivního režimu je tedy nutné určit dávkování tak, aby se zamezilo vzniku GvHD a zároveň nebyl příliš narušen léčebný mechanismus GvT (Bouchlaka *et al.*, 2010).

3.4. Potransplantační jevy

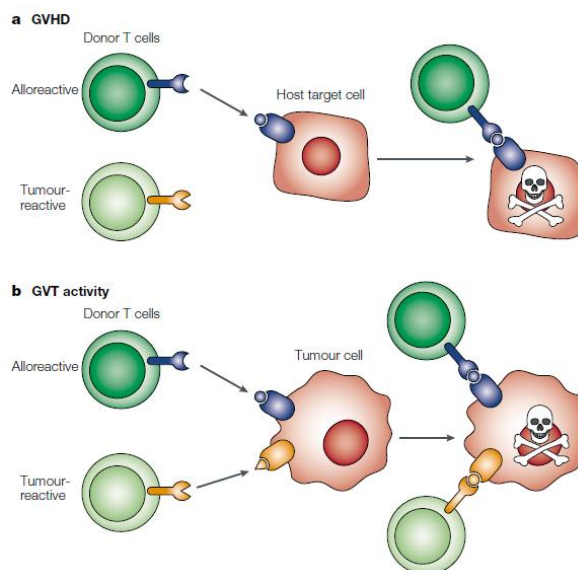
Pokud byla transplantace provedena úspěšně a maligní onemocnění vyléčeno, nastává období remise. Ta může být dočasná a je důležité pravidelně pacienty monitorovat (Khan *et al.*, 2004).

Jednou z možných potransplantačních komplikací je rejekce neboli odmítnutí štěpu. To ale není u transplantací HSC, na rozdíl od transplantací pevných orgánů, příliš běžným jevem (Jaing, 2011).

Naopak známou komplikací je tzv. nemoc štěpu proti hostiteli (viz Obr. 3a). GvHD je zánětlivý proces, kdy buňky alogenního štěpu reagují na buňky příjemce. Ty jsou považovány za cizorodé a transplantované imunocyty se je snaží eliminovat. Imunitní reakce se nejčastěji projevuje kožní vyrážkou, průjmem a nevolností, ale i závažnými poruchami jater, gastrointestinálního traktu nebo žláz s vnitřní sekrecí. Podle doby od transplantace do projevení příznaků rozlišuje formu akutní (do 100 dní po HSCT) a chronickou (100 a více dní po HSCT). Pokud dojde k rozvinutí GvHD, léčba probíhá pomocí kortikosteroidů (Bouchlaka *et al.*, 2010).

Dalším potransplantačním jevem je tzv. reakce štěpu proti nádoru (GvT) (viz Obr. 3b). Na rozdíl od GvHD není GvT potransplantační komplikací, ale léčebným mechanismem. V případě GvT buňky štěpu reagují proti reziduálním buňkám nádoru, které nebyly dříve eliminovány chemoterapií, a ničí je. Objev tohoto efektu dovolil snížit hladinu chemoterapeutik v přípravném režimu na méně toxickou dávku a výrazně zvýšil šance na přežití i úspěšné vyléčení pacientů (Gyurkocza & Sandmaier, 2014).

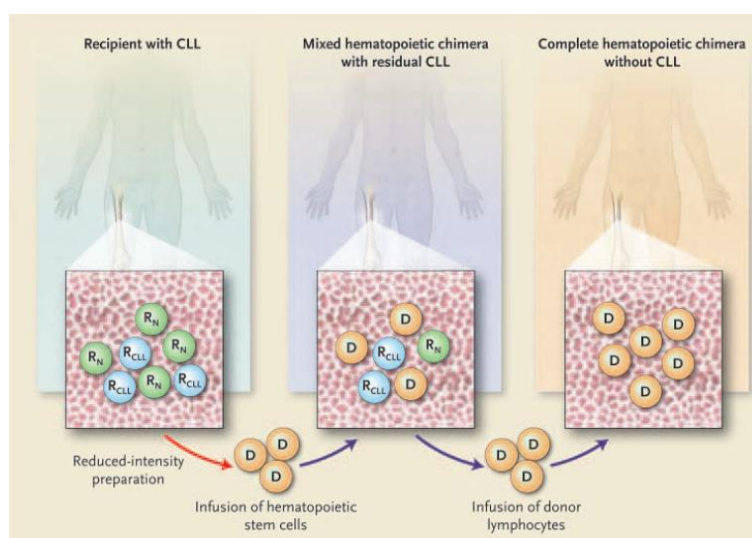
I přes eliminaci buněk nádoru pomocí efektu GvT často v těle malé procento maligně transformovaných buněk zůstává. Takovýto stav se nazývá minimální zbytková choroba (MRD, z angl. *Minimal Residual Disease*). MRD se neprojevuje žádnými klinickými příznaky. Navíc množství buněk je často pod detekovatelnou hranicí metod užívaných pro její stanovení (Khan *et al.*, 2004).



Obr. 3: Schématické zobrazení potransplantačních jevů - reakce štěpu proti hostiteli (a), efekt štěpu proti nádoru (b) (Upraveno podle: van den Brink & Burakoff, 2002)

3.5. Buněčný chimerismus

Po provedení transplantace je nutné pacienta nadále sledovat. Jako sledovací nástroj se využívá tzv. buněčný chimerismus. Tento termín označuje stav, kdy se v těle jednoho jedince nachází buňky pocházející ze dvou nebo více zygotických linií. U pacientů po HSCT tímto termínem označujeme přítomnost krevních elementů nesoucích genetickou identitu dárce. Podle poměru zastoupené DNA v krevních buňkách rozlišujeme několik hladin chimerismu. Pokud analyzované leukocyty pochází od dárce v méně než 99 %, označujeme tento stav jako smíšený chimerismus (viz Obr. 4). V případě, že jsou krevní elementy ve vzorku odvozené z dárcovské linie zastoupeny v rozsahu 99,0 - 99,9 %, jedná se o tzv. mikrochimerismus. Pokud jsou ve vzorku leukocyty nesoucí pouze genetickou informaci dárce, je tento výsledek označován jako kompletní dárcovský chimerismus.



Obr. 4: Schématické zobrazení smíšeného chimerismu na příkladu pacienta s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) (Převzato z: Copelan, 2006)

Velkou vypovídající hodnotu o stavu pacienta po alogenních HSCT má nejen aktuální stav hladiny buněčného chimerismu, ale i jeho vývoj v čase po transplantaci. Jsou známy případy, kdy u pacientů v dlouhodobé remisi došlo k poklesu hladiny dárcovského chimerismu (Liesveld & Rothberg, 2008). Takový vývoj může naznačovat relaps, který musí být potvrzen i pomocí jiných metod, především imunofenotypizačně

(Al-Mawali *et al.*, 2008). Existují ale i případy, kdy je u jedince detekována opakovaně stabilní hladina smíšeného chimerismu. To nemusí znamenat výskyt relapsu, ale pouze přítomnost minoritního podílu původní příjemcovy krvetvorby (Liesveld & Rothberg, 2008).

V některých případech se hodnota chimerismu může lišit i mezi jednotlivými typy leukocytů. Stanovení chimerismu tedy nemusí probíhat jen celkově ze všech leukocytů analyzovaného vzorku, ale lze vyhodnocovat původ konkrétní buněčné linie. Provést stanovení na separovaných buněčných populacích je vhodné právě při stabilním výskytu smíšeného chimerismu. Specifické linie leukocytů se izolují separací na základě CD znaků (z angl. *Cluster of Differentiation*). Např. lze odlišit CD3+ T lymfocyty od CD15+ neutrofilů, eozinofilů a mononukleárních buněk. A díky této možnosti lze přesně zjistit, ve které buněčné linii pacient odhojil či nese smíšený chimerismus (Horký *et al.*, 2009).

3.6. Metody stanovení buněčného chimerismu

3.6.1. Stanovení na základě buněčných determinant

V klinické praxi se buněčný chimerismus používá jako testovací nástroj od druhé poloviny 20. století. V době, kdy ještě nebyly známé a hojně využívané molekulárně-biologické metody, se chimerismus stanovoval pomocí různých buněčných determinant. Využívala se typizace pomocí erytrocytárních antigenů v případě, že dárce a příjemce měli rozdílné krevní skupiny a Rh faktor (Liesveld & Rothberg, 2008). Rozlišení na základě antigenů na membráně červených krvinek probíhalo na principu shlukování, tzv. aglutinaci (Roy *et al.*, 1990). Tato metoda měla ovšem jednu velkou nevýhodu. Pacientům po transplantaci musela být často podávána transfúze erymasy. Vzhledem k životnosti erytrocytů zůstávají tyto buňky v krevním oběhu po dobu zhruba 120 dnů. Během tohoto období nebylo možné chimerismus touto metodou stanovovat, jelikož erytrocyty pocházející z transfúzí zkreslovaly výsledky analýzy (Blume *et al.*, 1980).

V případě determinant vázaných na leukocytární membránu bylo možné analýzu provádět ihned po ustálení nové krevetvorby. Tento posun v rychlosti stanovení chimerismu výrazně zlepšil možnost predikce relapsu nemoci a zvýšil úspěšnost HSCT. Další možnou alternativou této metody bylo využití determinant v podobě leukocytárních isoenzymů. Jako příklad lze uvést fosfoglukomutázu obsaženou v lymfocytech. Mononukleární buňky byly nejprve odděleny pomocí centrifugace v hustotním gradientu. Tato frakce se skládala převážně z lymfocytů. Následně byly buňky lyzovány a enzymatická část byla z lyzátu oddělena pomocí centrifugace. Enzymy byly dále separovány pomocí elektroforézy v 10% škrobovém gelu, během níž se dělily podle své velikosti. Délka proteinu je variabilní a proto bylo možné podle umístění bandů rozlišit isoformy tohoto enzymu příslušící buď dárce, anebo příjemci. (Schmidt *et al.*, 1979).

Další variantou bylo stanovení chimerismu s využitím HLA antigenů. V této metodě se HLA identita dárce a příjemce určovala pomocí monoklonálních protilátek. Nejprve byly připraveny různé typy protilátek, které charakteristicky reagovaly s povrchovými antigeny B a T lymfocytů dárce a příjemce. Typizace lymfocytů probíhala pomocí průtokové cytometrie. Buňky byly selektovány na základě různých kritérií, např. pomocí monoklonálních protilátek a nepřímé imunofluorescence. Chimerismus byl následně vypočten z poměru buněk s HLA identitou dárce a příjemce. Jak se posléze zjistilo, ani HLA jako markery ale nebyly vhodným řešením. U transplantací HSC je totiž vyžadována co nejvyšší shoda v těchto znacích, aby se předešlo vzniku GvHD (Reinherz *et al.*, 1982).

U pacientů se shodnými HLA bylo možné stanovovat chimerismu sledováním i jiných determinant - např. pomocí rozdílů v imunoglobulinech, tzv. alotypech. Alotypy jsou produkty různých alel téhož genu kódujícího určitý typ řetězce imunoglobulinů. Výsledkem exprese rozdílných alel jsou unikátní epitopy, které se dají odlišit sérologickým vyšetřením (Jefferis & Lefranc, 2009). Při analýze chimerismu pomocí těchto determinant se používaly pro odlišení dárcovských a patientských imunoglobulinů polymorfismy v těžkých řetězcích gama a lehkém řetězci kappa. Detekce konkrétního typu imunoglobulinů probíhala pomocí aglutinačního inhibičního testu (Sparkes *et al.*, 1979; Witherspoon *et al.*, 1978).

3.6.2. Klasické cytogenetické metody

Později se pro stanovení buněčného chimerismu začalo využívat i klasických cytogenetických metod. Konkrétně se cytogenetika uplatňovala v případě *sex-mismatched* transplantací, kdy se jako markery používaly pohlavní chromozomy X a Y. (Ginsburg *et al.*, 1985). Detekce gonozómů v metafázi sloužila k určení počtů buněk dárce a příjemce, z nichž byl poté vypočítán procentuální poměr (Blume *et al.*, 1980). U transplantací, kdy byl dárce i příjemce stejného pohlaví, bylo možné původ buněk rozlišit na základě rozdílů v morfologii chromozomů. Jednou z možností bylo analyzovat odlišnosti mezi skupinami D a G obecně. Také bylo možné odlišit jedince na základě polymorfismu chromozomů 1, 9 a 16 (Roy *et al.*, 1990). U těchto chromozomů jsou totiž známé mnohé variability v konstitutivním heterochromatinu, které mohou sloužit jako markery (Hsu *et al.*, 1987). Další možností bylo sledování přítomnosti specifických chromozomových aberací typických pro dané onemocnění (Blume *et al.*, 1980). Stanovení chimerismu na základě analýzy chromozomů pomocí klasické cytogenetiky bylo ale velmi časově náročné a nebylo ani dostatečně citlivé a přesné, proto se od něj brzy upustilo (Baron & Sandmaier, 2006).

3.6.3. RFLP

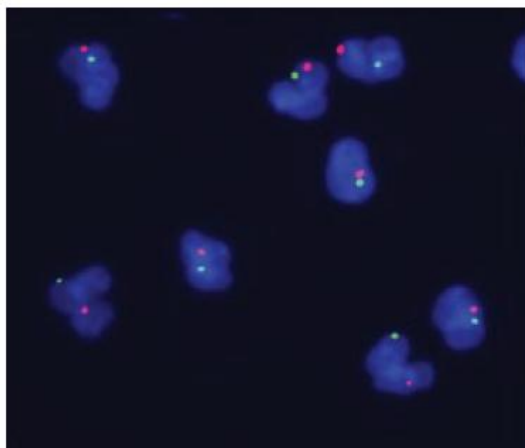
Technologicky pokročilejším přístupem k analýze buněčného chimerismu bylo vzorky analyzovat pomocí metod molekulární biologie. Využívalo se metody stanovení délkového polymorfismu restričních fragmentů (RFLP, z angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). V tomto případě se nejprve z buněk vyizolovala DNA, která byla posléze naštěpena restričními endonukleázami. Fragменты DNA získané pomocí RFLP byly poté rozděleny pomocí gelové elektroforézy, z gelu byly přeneseny na membránu a vizualizovány audioradiografií na základě značení radioaktivním fosforem ³³P nebo pomocí Southern blottingu (Liesveld & Rothberg, 2008). Výsledné kvantitativní stanovení chimerismu vycházelo z porovnání délkového polymorfismu vzorků s předem získanými vzorky pacienta a dárce (Roy *et al.*, 1990). Štěpením vzniklé fragmenty se lišily svou délkou, která byla specifická pro příjemce i dárce.

Rozdíly v délkách fragmentů byly způsobeny bodovými mutacemi v restričních místech (Knowlton *et al.*, 1986). Ačkoliv bylo využití RFLP pro stanovení chimerismu krokem k přesnější analýze, citlivost metody se stále pohybovala nad hranicí detekce mikrochimerismu (Bader *et al.*, 2005). Další nevýhodou byl čas potřebný k provedení metody, která trvala někdy i několik dní a vyžadovala velké množství laboratorních úkonů. Navíc bylo pro RFLP nutné dodat velké množství kvalitní vstupní DNA, kterou bylo u leukopenických pacientů po transplantaci obtížné získat (Liesveld & Rothberg, 2008).

3.6.4. XY-FISH

Běžně užívanou metodou, která byla výrazně rychlejší, byla fluorescenční *in situ* hybridizace na pohlavních chromozomech (XY-FISH) (Baron & Sandmaier, 2006). Výhodou XY-FISH bylo také to, že na rozdíl od klasických cytogenetických metod nebyly k jejímu provedení potřeba mitotické buňky. Princip XY-FISH spočíval v hybridizaci sond značených různě barevnými fluorochromy na pohlavní chromozomy X a Y. Např. bylo možné detekci provést pomocí značení chromozomu Y komplementární sondou s navázaným biotinem, který hybridizoval s avidinem konjugovaným s Texaskou červení. U Y chromozomu bylo možné mikroskopicky detekovat červené fluorescenční záření. Chromozom X byl značen sondou s navázaným digoxigeninem a v reakční směsi se nacházely protilátky proti digoxigeninu značené fluoresceinem. Pokud došlo k navázání protilátek na digoxigenin, bylo možné detekovat zelené záření (viz. Obr. 5). V buňkách muže byly nalezeny červeně i zeleně značené chromozomy, zatímco v buňkách ženy byly oba pohlavní chromozomy značeny zeleně (Martin, 2016). Následně bylo možné kvantitativně stanovit hladinu buněčného chimerismu jako poměr buněk nesoucích kombinací XX a XY (Najfeld *et al.*, 1997).

Vzhledem k využití pohlavních chromozomů jako determinačních znaků bylo možné tuto metodu využívat pouze při *sex-mismatched* transplantacích. Další limitací byla i občasná ztráta chromozomu Y. Ta může být způsobena např. aberantním procesem dělení, kdy ke ztrátě Y chromozomu dochází u nádorových buněk (Martin, 2016).



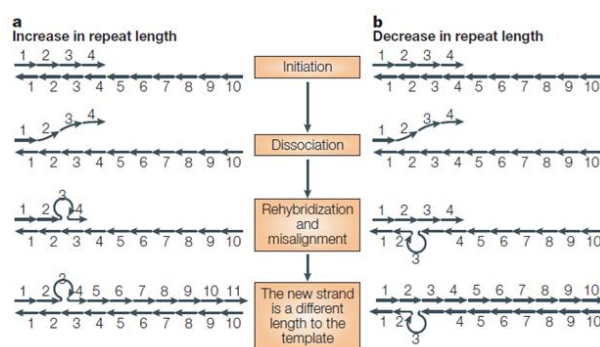
Obr. 5: Stanovení chimerismu pomocí FISH v separovaných granulocytech - červený signál nesou chromozomy X a zelený chromozomy Y. Ve vzorku se nachází pouze buňky s kombinací XY, což odpovídá 100% dárcovskému chimerismu.
(Upraveno podle: Martin, 2016)

3.6.5. STR-PCR

Nejběžněji užívanou metodou pro analýzu hladiny buněčného chimerismu je STR-PCR (z angl. *Short Tandem Repetitions - Polymerase Chain Reaction*). STR (z angl. *Short Tandem Repetitions*) jsou tandemové repetice nacházející se v genomu prokaryot i eukaryot. Tyto sekvence se vyznačují typickou strukturou tvořenou opakujícími se motivy, které jsou umístěny za sebou. Repetitivní motiv má délku 2-10 párů bází. Rozložení mikrosatelitů v genomu není náhodné. Nachází se především v nekódujících oblastech DNA, jako jsou teloméry či centromerické oblasti, ale velmi ojediněle i v kódujících oblastech (Vieira *et al.*, 2016). Jejich množství v genomu je druhově specifické. Uvádí se, že mikrosatelity u člověka zastupují okolo 3 % genomu (Tiercy, 2011).

Mikrosatelitní alely vykazují vysoký polymorfismus. V jednom STR lokusu existuje v populaci mnoho variant alel a jednotlivé alely se od sebe vzájemně liší počtem repetic (Hashiyada, 2011). Takový polymorfismus se nazývá délkový. Existence velkého počtu alel je způsobena vyšší mutagenezí, řádově desetkrát častější než v ostatních částech genomu (Vieira *et al.*, 2016). Jejich častý vznik je spojen s opakující se strukturou repetic. Jedním z mechanismů vzniku mutace může být

sklouznutí polymerázy, tzv. DNA *slippage*. Podle vlákna, na kterém je replikace dočasně narušena, se liší výsledná mutace. V případě sklouznutí polymerázy na nově vznikajícím vlákně dochází k adici a počet repetit se zvýší (viz Obr. 6a). Pokud naopak dojde k disociaci polymerázy z vlákna templátového, je nově syntetizované vlákno o daný počet repetit kratší (viz Obr. 6b). Další možnou příčinou vzniku mutací v STR může být chybná rekombinace. Důsledkem je nerovnoměrný *crossing-over* a změna počtu repetit - jeden z chromozomů v procesu získá repetici navíc a jeho rekombinantní partner naopak stejný počet repetit ztratí (Oliveira *et al.*, 2006).



Obr. 6: Mechanismus vzniku nových STR alel pomocí DNA *slippage*

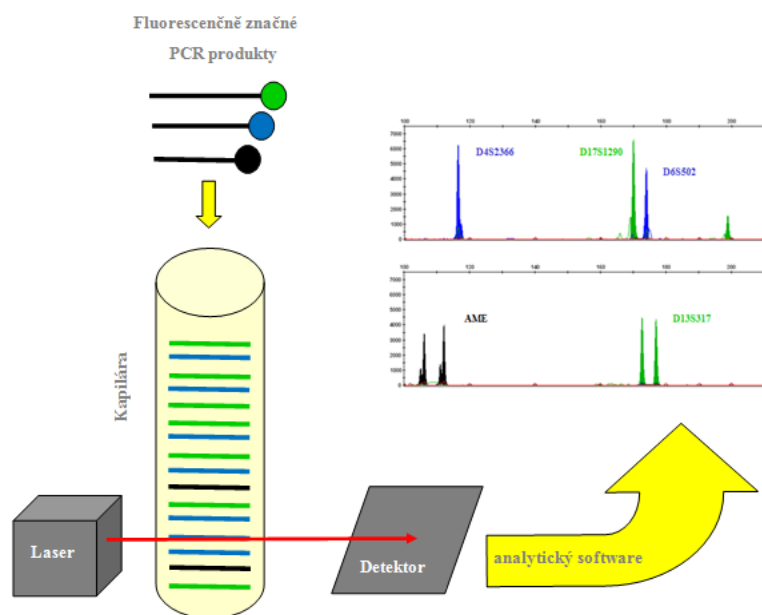
(Převzato z: Ellegren, 2004)

Využití mikrosatelitů jako genetických markerů je široké. Vychází především z toho, že STR jsou vysoce variabilní v rámci populace, a lze díky nim od sebe odlišit jedince. Používají se pro identifikaci původu vzorků v klinické i forenzní medicíně. Dále se mikrosatelitní markery uplatňují i při fylogenetických analýzách či určování paternity. V těchto případech se využívá faktu, že se alely STR lokusů dědí podle pravidel Mendelovské dědičnosti a mají mezi sebou kodominantní vztah (Oliveira *et al.*, 2006).

Metoda STR-PCR je založena na specifické amplifikaci vybraných mikrosatelitních alel. Skládá se ze dvou částí - PCR amplifikace STR lokusů pomocí fluorescenčně značených primerů a následné fragmentační analýzy provedené pomocí kapilární elektroforézy. Nejprve se amplifikují STR lokusy pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. *Polymerase Chain Reaction*). Primery v reakci jsou fluorescenčně značeny na 5' konci pomocí fluorochromu jako je např. 6-

FAM (modrá), HEX (zelená) nebo TAMRA (černá) (Hancock *et al.*, 2003). V reakci se specificky vážou na tzv. *flanking region*, oblast obklopující STR lokus. Takto ohraničené sekvence tandemových repetit jsou amplifikovány *in vitro* v termocycleru. Po skončení PCR získáváme velké množství kopií cílových STR sekvencí značených fluorochromem (Khan *et al.*, 2004).

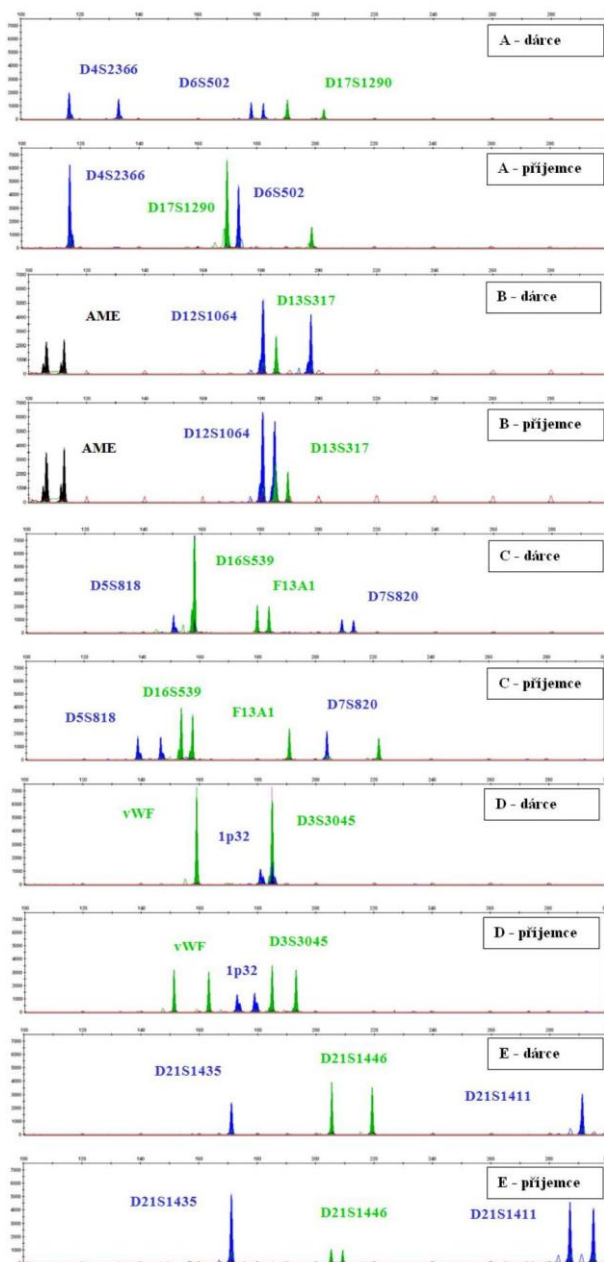
Následuje fragmentační analýza, jejíž princip je založen na klasické elektroforetické separaci PCR produktů, které se dělí podle své velikosti v tenké kapiláře obsahující speciální polymer. Při průchodu přes detektor jsou PCR produkty ozářeny laserem. Dochází k excitaci fluorochromu, ten následně emituje fluorescenční záření, jež je zachyceno pomocí CCD kamery a převedeno na signál. Vyhodnocení poté probíhá ve specifickém programu (GeneMapper®, GeneMarker® aj.), kde jsou data z kapilární elektroforézy převedeny na konkrétní elektroforetogramy obsahující píky specifické pro jednotlivé lokusy (viz Obr. 7) (Hashiyada, 2011).



Obr. 7: Schéma fragmentační analýzy (Autor: Klára Horáčková)

Před samotnou transplantací jsou analyzovány genotypy příjemce i dárce (viz Obr. 8). Ze získaných genotypů jsou vybrány informativní lokusy, které se dále budou využívat jako markery pro potransplantační vyšetření. Volba konkrétních lokusů závisí na jejich informativitě a je vždy specifická pro každou transplantaci

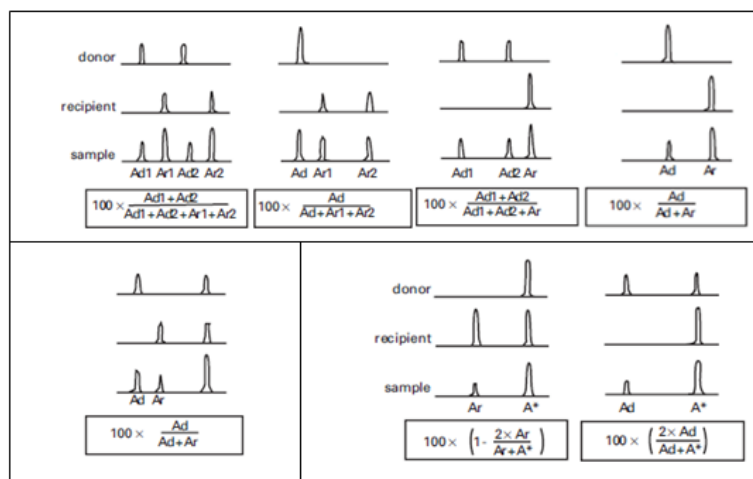
(Odriozola *et al.*, 2012). Při výběru informativních STR je nutné vzít v úvahu několik faktorů. Na rozdíl od dříve užívaných metod jako byla např. XY-FISH, nehraje u STR-PCR roli pohlaví. Nutné je ale zohlednit kombinaci alel pacienta a dárce v daném lokusu a rozdíl v délce jejich alel (Nollet *et al.*, 2001).



Obr. 8: Genotypizace dárce a příjemce před transplantací (Autor: Klára Horáčková)

Potransplantační vyšetření se skládá stejně jako genotypizace z PCR amplifikace a fragmentační analýzy. Z dat získaných z elektroforetogramů se stanovují hladiny

buněčného chimerismu. Pro vyhodnocení je důležitá výška i plocha píku, který označuje danou alelu. Pro výpočet procentuálního zastoupení dárcovské krvetvorby se využívá hodnot plochy píků (Hancock *et al.*, 2003). Při výběru co nejpřesnějšího způsobu výpočtu hraje roli konkrétní kombinace alel (viz Obr. 9). Výsledkem stanovení hladiny chimerismu je procentuální podíl dárcovských buněk v analyzovaném vzorku (Nollet *et al.*, 2001).



Obr. 9: Schéma možných kombinací alel při výběru informativního lokusu pro analýzu buněčného chimerismu (Upraveno podle: Nollet *et al.*, 2001)

I když je STR-PCR přesná a reprodukovatelná metoda, jsou známy určité artefakty objevující se běžně v elektroforetogramech. Často se nachází falešně pozitivní vrcholy, tzv. *stutter peaks*. Ty jsou způsobeny sklouznutím polymerázy během samotné PCR amplifikace. Tyto vrcholy neodpovídají reálným délkám alel a jsou pouze o repetici kratší. Proto je vhodné nevolit jako analyzovaný lokus takový, jehož alely se liší jen o jednu repetici. *Stutter peak* od dárcovské alely ležící v pozici, kde se nachází patientská alela, by totiž mohl zkreslit výsledky hladiny chimerismu (Hancock *et al.*, 2003).

Citlivost STR-PCR je 1 % genotypu příjemce. Přesná hodnota citlivosti závisí na několika faktorech. Důležitý je rozdíl délek alel mezi dárcem a příjemcem. Roli hraje také to, zda je kratší alela dárcovská nebo patientská, a to z důvodu lepší amplifikace kratších sekvencí. Nejlepší je tedy zvolit takový lokus, v němž je alela příjemce co nejkratší. V neposlední řadě záleží i na počtu amplifikovaných alel. Roli hraje

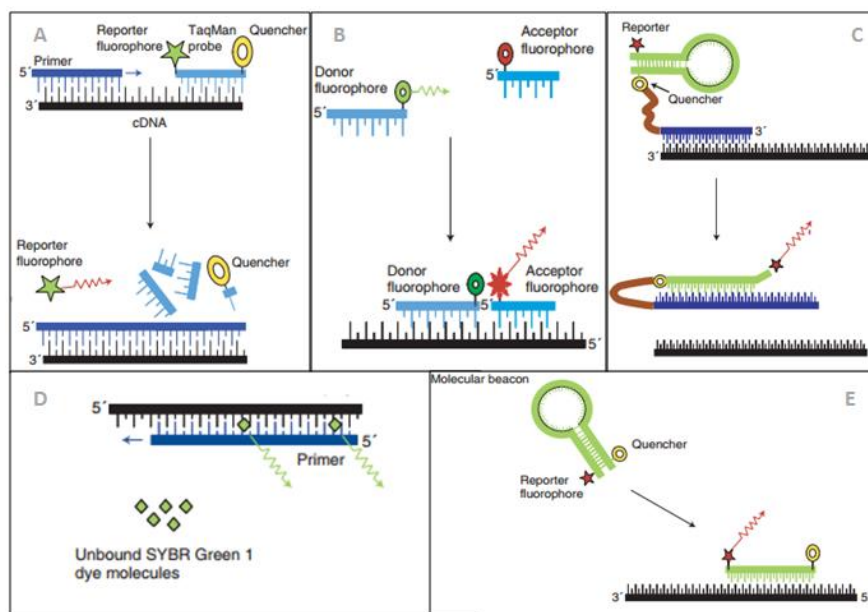
i dodržení správného laboratorního postupu. Přítomnost heteroduplexů totiž může citlivost také snižovat. Tomu se předchází denaturací PCR produktů před jejich elektroforetickou separací. Při optimalizaci výběru alel, např. zvolením kratších alel u příjemce, je možné dosáhnout citlivosti až 0,8 % (Hancock *et al.*, 2003; Watzinger *et al.*, 2006). Průměrně se však citlivost STR-PCR pohybuje v rozmezí 1-5 % (Bader *et al.*, 2005).

3.6.6. qPCR

Citlivost předešlých metod využívaných pro stanovování chimerismu, jako jsou např. XY-FISH nebo STR-PCR, se pohybuje kolem 1 %. Tento detekční limit je zároveň hranicí pro detekci mikrochimerismu. S rozvojem nových laboratorních metod se stále hledala nová citlivější metoda, která by jej dokázala detekovat. Předpokládalo se, že přesnější stanovení mikrochimerismu by mohlo přispět k dřívější detekci případného relapsu. Metodou splňující požadavky citlivosti byla kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR, z angl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) (Horký *et al.*, 2007).

Kvantitativní PCR v reálném čase je založena na amplifikaci cílové sekvence, kdy při každém cyklu PCR dochází k vyhodnocení množství kopií PCR produktu pomocí intenzity fluorescence. Celá analýza probíhá ve speciálním termocykleru, který je kromě změny teploty schopen měřit emitované fluorescenční záření. Značení PCR produktů může být prováděno různými mechanismy. Jedna možnost je kvantifikovat vznikající produkty pomocí záření vycházejícího z interkalačního barviva jako je např. SYBR® Green (viz Obr. 10D). Dále lze využít fluorescenčně značených sond, které se vážou na vnitřní část amplifikované sekvence. Existuje několik principů, na nichž funguje fluorescence sond. U tzv. FRET sond (z angl. *Flourescence Resonance Energy Transfer*) lze indukovat fluorescenci duální hybridizací dvou částí sondy na blízké oblasti sekvence (viz Obr. 10B). Případně je možné využít mechanismu tzv. molekulárních majáků, kdy zhášeče (angl. *Quencher*) záření fluorochromu v dvouvláknové konformaci sondy absorbují. Při rozvolnění vlásenkové struktury během hybridizace sondy s vláknem nukleové kyseliny se od sebe fluorochrom a zhášeč

oddálí natolik, že je možné fluorescenci detekovat. Na tomto principu fungují např. *molecular beacons* (viz Obr. 10E). Sondy obsahující flouorchrom a zhášec mohou také emitovat fluorescenci při své hydrolýze jako je tomu u TaqMan® sond (viz Obr. 10A). V neposlední řadě je možné využít nejen fluorescenčně značených sond, ale i primerů. Konkrétním příkladem mohou být *scorpion* primery (viz Obr. 10C), jejichž emise fluorescence probíhá na stejném principu jako je tomu u *molecular beacons* (Arya *et al.*, 2005).



Obr. 10: Princip chemismu qPCR - TaqMan® sonda (A), FRET sondy (B), *scorpion* primer (C), SYBR® Green (D), *molecular beacon* (E)

(Upraveno podle: Arya *et al.*, 2005)

Po umístění mikrozkušavek s reakční směsí do termocycleru trvá zhruba 20 cyklů, než dojde k první měřitelné detekci emitované fluorescence. Počet cyklů před dosažením detekčního limitu se nazývá hodnota Ct (z angl. *Threshold Cycle*). Ct je závislá na několika faktorech - např. na míře exprese konkrétního genu i na množství počátečního templátu. V tomto případě platí, že čím více templátu se použije, tím nižší je detekční limit. Emitovaná fluorescence je měřena v reálném čase během procesu amplifikace. Po dokončení PCR je z počtu reakčních cyklů vytvořena amplifikační křivka. Je to sinusoida zobrazující logaritmus síly detekovaného fluorescenčního signálu na počtu proběhnutých cyklů PCR.

Z amplifikační křivky můžeme zjistit množství templátu odečtením koncentrace na základě porovnání Ct hodnot se standardní křivkou. Koncentrace cílového genu se pak normalizuje podle hodnoty tzv. *housekeeping* genu. Pro absolutní kvantifikaci počtu kopií je nutné využít kalibrační křivku tvořenou Ct hodnotami o známém počtu kopií. Jako standard se používá např. plazmid o dané koncentraci. Porovnáním hodnot fluorescence analyzované sekvence s hodnotami referenčního genu je pak možné vypočítat množství vzniklého PCR produktu.

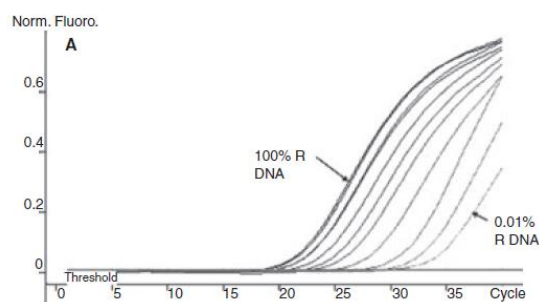
Jako genetické markery pro qPCR lze zvolit několik druhů sekvencí. Jednou z možností je u *sex-mismatch* transplantací využít specifické sekvence na chromozomu Y jako je např. gen *USP9Y* (z angl. *Ubiquitin-Specific Protease 9 gene on the Y*) (Fehse *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2003). V případě dvojic dárce - příjemce se stejným pohlavím lze jedince odlišovat na základě jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. *Single Nucleotide Polymorphism*) (Bai *et al.*, 2006) či krátkých Indel sekvencí založených na inzercích a delecích krátkých úseků v DNA (Alizadeh *et al.*, 2002). Ve specifických případech, kdy je např. u jednoho z dvojice přítomná nulová alela (tj. alela, jejíž expresí nevzniká žádný produkt), lze provést stanovení chimerismu i pomocí ní (Jiménez-Velasco *et al.*, 2005). Nulovou alelou může mít např. gen *RhD*, který kóduje antigen D Rh faktoru (Flegel, 2007). U *HLA-mismatch* transplantací je také možné využít této odlišnosti mezi pacientem a dárce jako markeru pro stanovení chimerismu (Lucas *et al.*, 2005). Při použití různých markerů se citlivost qPCR liší (viz Tab. 1). Často se ale různé typy markerů při stanovení chimerismu kombinují, např. lze využívat sekvence Indel spolu s těmi, které jsou lokalizované na Y chromozomu, a dosáhnout tak co nejpřesnějším výsledků (Horký *et al.*, 2007).

Typ sekvence použité jako marker	Detekční limit chimerismu	Publikace
sekvence chromozomu Y (<i>USP9Y</i> gen)	0,001%	Fehse <i>et al.</i> , 2001
nulová alela	0,01%	Jiménez-Velasco <i>et al.</i> , 2005
SNP	0,1%	Bai <i>et al.</i> , 2006
Indel	0,1%	Alizadeh <i>et al.</i> , 2002

Tab. 1: Citlivost qPCR v závislosti na výběru markeru

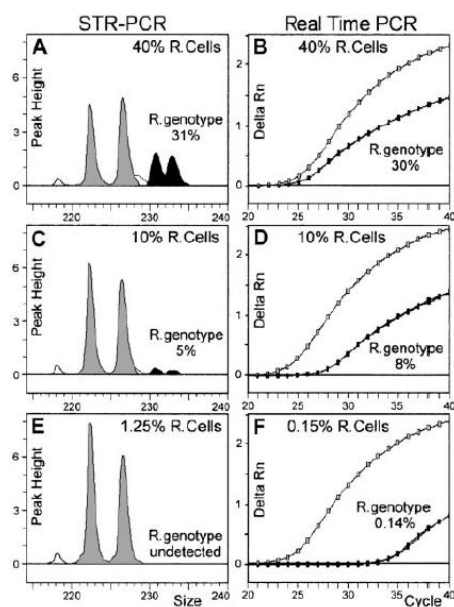
Nejběžněji se jako markery při qPCR používají SNP a Indel sekvence. Pro oba typy sekvencí je typický tzv. bialelický polymorfismus (BP, z angl. *Biallelic Polymorphism*). Testované alely existují pouze ve dvou variantách a liší se od sebe buď záměnou báze v jednom nukleotidu jako je tomu u SNP anebo krátkým insertovaným či deletovaným úsekem v případě Indel (Chen *et al.*, 2011). SNP jsou považovány za nejběžnější variabilní oblasti genomu - dva jedinci se mezi sebou liší více než milionem jednonukleotidových substitucí (Gineikiene *et al.*, 2009). Stejně tak Indel sekvence jsou v genomu poměrně časté - zastupují kolem 16 % genetické informace jedinců. Na rozdíl od jednonukleotidových polymorfismů mohou být Indel dlouhé až 10 000 bp (Santurtún *et al.*, 2014). BP sekvence vykazují menší míru mutageneze než např. mikrosatelity, ale její četnost je stále dostatečně velká pro odlišení dvou jedinců (Santurtún *et al.*, 2017). Např. substituce nukleotidu vedoucí ke vzniku SNP probíhá s incidencí asi $5 \cdot 10^{-4}$ (Horký *et al.*, 2007). I přes zvýšenou mutagenezi mají BP sekvence dostatečně stabilní primární strukturu a je možné je využít při analýzách chimerismu, ale např. i paternity (Santurtún *et al.*, 2017).

Při stanovení hladiny buněčného chimerismu pomocí qPCR je nutné nejprve genotypizovat dárce a příjemce. To se provádí identifikací pozitivních a negativních alel pomocí qPCR. Pozitivní alela je taková, jejíž Ct hodnota je v rozmezí 20 až 23 cyklů. Negativní alela má naopak hodnotu Ct vyšší než 36 cyklů. Alely amplifikující se mezi 23 a 36 cykly nejsou pro odlišení pacienta a dárce vhodné a nepoužívají se jako markery. Ke vzorku DNA dárce i příjemce jsou přidány primery a sondy specifické pro vybraný počet lokusů ve stejném množství, se kterým bude později prováděno stanovení potransplantačního chimerismu. Podle výsledků shody pozitivních a negativních markerů dárce a příjemce jsou zvoleny informativní lokusy. Za informativní lokus je považován ten, v němž má dárce i příjemce odlišné alely. Amplifikační křivka konkrétní alely daného lokusu má typický průběh, a je možné podle jejího tvaru odlišit dárce a příjemce (Alizadeh *et al.*, 2002). U zvoleného informativního lokusu je následně vytvořena ředící řada DNA dárce ředěných v DNA příjemce. Výsledkem této ředící řady je série amplifikačních křivek, kdy každá z nich odpovídá různé koncentraci dárcovské DNA v příjemcově (viz Obr. 11). Tato ředící řada je poté při potransplantačním vyšetření použita jako referenční standard pro kvantifikaci dárcovského chimerismu (Bai *et al.*, 2006).



Obr. 11: Amplifikační křivka ředící řady pro kvantitativní stanovení dárcovského chimerismu (R, z angl. *Recipient*) (Upraveno podle: Bai *et al.*, 2006)

V porovnání s STR-PCR má qPCR mnohé výhody. Nejdůležitější je citlivost metody, hlavně při stanovování mikrochimerismu. Alizadeh *et al.* (2002) provedli komparativní analýzu těchto dvou metod se zaměřením na srovnání citlivosti a přesnosti detekce chimerismu na souboru pacientů po alogenní HSCT. Při analýze těchto vzorků pomocí obou metod zjistili, že mez detekce u STR-PCR byla v jejich případě 1,25 % patientské krevtvorby, zatímco limit qPCR byl 0,15 % (viz Obr. 12). Pomocí qPCR bylo možné detekovat mikrochimerismus, který by v případě použití STR-PCR nebyl zachycen.



Obr. 12: Srovnání stanovení chimerismu pomocí metody STR-PCR a qPCR (Převzato z: Alizadeh *et al.*, 2002)

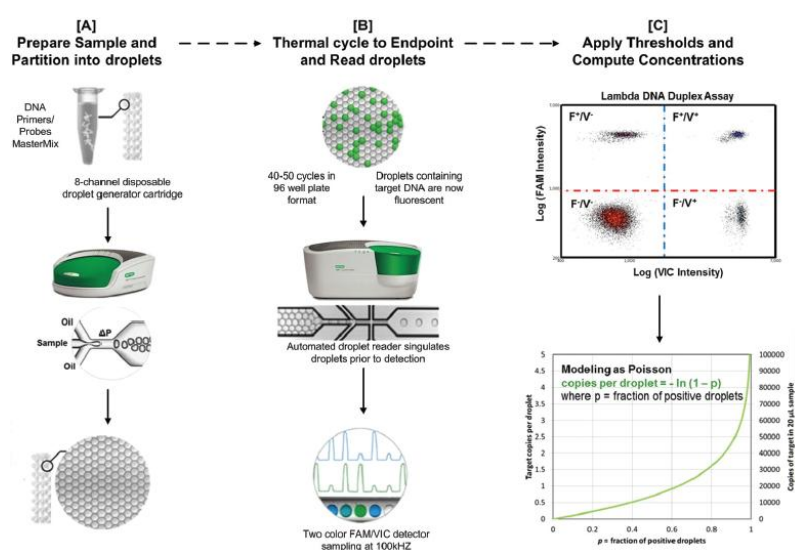
Kromě vyšší citlivosti je qPCR také rychlejší a navíc nevyžaduje dvoukrokovou analýzu zahrnující oddělenou amplifikaci a fragmentační analýzu amplifikovaných PCR produktů jako STR-PCR. Další výhodou je univerzálnost metody. Vyhodnocení všech polymorfismů probíhá najednou v jednom grafu, ne odděleně v dílčích elektroforetogramech jako u STR-PCR. Existují i nevýhody. Cena qPCR je vyšší než je tomu u STR-PCR. Navíc nelze tuto metodu aplikovat na všechny dvojice dárců-příjemce. U qPCR asi v 10 % případů nebylo možné nalézt vhodný znak, který by byl použitelný jako odlišující marker (Horký *et al.*, 2007).

Dalším problémem qPCR je přesnost. Vzhledem ke způsobu kvantifikace, spočívajícím v počtu cyklů, existují v případě qPCR velké rozdíly mezi naměřenými hodnotami fluorescence, a tím i v přepočteném počtu amplikonů (absolutní kvantifikace) nebo míře exprese (relativní kvantifikace). Během každého cyklu se teoreticky počet kopií produktu zdvojnásobí. Prakticky se však účinnost reakce může lišit v závislosti na *anealingu* primerů, složení reakční směsi, přítomnosti inhibitorů či enhancerů reakce. Bylo zjištěno, že qPCR je při stanovení dárcovského chimerismu přesná jen u vzorků, které obsahují do 5 % buněk pacienta. Proto není vhodné stanovovat chimerismus pomocí qPCR ihned, od okamžiku podání štěpu, kdy je dárcovská i patientská krvetvorba zastoupena někdy i v řádech desítek procent. Při stanovování chimerismu je tedy výhodné qPCR kombinovat s STR-PCR a maximálně tak využít výhody obou metod - přesnost STR-PCR při smíšeném chimerismu a citlivost qPCR při detekci mikrochimerismu. Při propojení obou technologií byla prokázána zvýšená míra odhalení zbytkové reziduální choroby a dřívější zachycení relapsu (Horký *et al.*, 2007; Horký *et al.*, 2009).

3.6.7. ddPCR

Se zavedením qPCR do klinické praxe se výrazně zvýšila schopnost detekce mikrochimerismu. V posledních pár letech se začalo uvažovat o využití metody přesnější, která by byla zároveň dostatečně citlivá pro stanovení nízkých hladin buněčného chimerismu. V tomto směru v sobě nese velký potenciál metoda tzv. *droplet*

digital PCR (ddPCR). Uvádí se, že je schopná analyzovat DNA s citlivostí kolem 0,01% (George *et al.*, 2013). Pro označení cílových sekvencí DNA se využívá fluorescenčně značených primerů obdobně jako u STR-PCR. Unikátnost této metody spočívá v disperzi molekul DNA do vodních kapének v olejovém prostředí. Teoreticky by se v každé kapce měla nacházet jedna molekula DNA. Po disperzi templátové DNA do kapek jsou amplifikovány a po dokončení PCR se kvantitativně vyhodnocuje jejich přítomnost v jednotlivých kapkách. Na základě detekce fluorescence emitované TaqMan® sondami je možné od sebe odlišit dva vzorky a určit jejich relativní množství ve směsi (viz Obr. 13) (Santurtún *et al.*, 2017).



Obr. 13: Schéma provedení ddPCR (Převazato od: Pinhero *et al.*, 2012)

Největší výhodou ddPCR spočívá v možnosti analyzovat heterogenní vzorky obsahující DNA od více jedinců. Toho by se dalo využít hlavně ve forenzních analýzách, kdy vzorky z místa činu obsahují velké množství genetické informace. Vysoká citlivost ddPCR je ale také vhodná pro použití metody u vzorků, kdy je v nich jeden druh DNA zastoupen minoritně. Proto by byla ddPCR vhodnou metodou i pro stanovení mikrochimerismu u pacientů po alogenních HSCT (Santurtún *et al.*, 2017).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Přístroje

zařízení na výrobu ledu
zařízení na úpravu vody Direct-Q 3UV (Milipore)
centrifuga Z 323 K (Hermle)
stolní minicentrifuga C 1301 (Labnet)
automatické pipety (Pipetoman®, Gilson)
mrazicí boxy (-80 °C, -20 °C)
ledničky (4 °C)
termocycler PTC-200 (MJ Research)
spektrofotometr NanoDrop BD-1000 (NanoDrop Technologies)
genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)

4.2. Pomůcky

špičky s filtrem
mikrozkumavky 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml
PCR mikrozkumavky 0,2 ml
ochranné rukavice
96 jamková PCR destička + gumové septum
materiál potřebný pro provoz genetického analyzátoru ABI PRISM 3100
materiál potřebný pro provedení fragmentační analýzy

4.3. Reagencie

reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Milipore)
10 mM Tris (pH 7,5)
10 x PCR Buffer II (-MgCl₂) (Applied Biosystems, Life technologies)
25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Life technologies)
10 mM zásobní směs dNTPs (Promega)

komerční kit Gentra® Quigen® Blood Kit

lokusově specifické primery *forward* (F) + *reverse* (R) (viz Tab. 2)

5U/μl Ampli Taq Gold® Taq DNA polymeráza (Applied Biosystems)

HiDi deionizovaný formamid (Applied Biosystems, Life technologies)

DNA velikostní standard GeneTrace 500 ROX (Genomac)

3100 POP-4™ (Performance Optimized Polymer) (Applied Biosystems, Life technologies)

elektroforetický pufr 10 x Buffer with EDTA (Applied Biosystems, Life technologies)

STR lokus	Typ primeru	Nukleotidová sekvence (5'→3')	Fluorescenční značení na 5' konci
D21S1411	<i>forward</i>	atgatgaatgcatagatggatg	6-FAM
	<i>reverse</i>	aatgtgtgtccttcaggc	žádné
D21S1446	<i>forward</i>	atgtacgatacgaataacttgacaa	HEX
	<i>reverse</i>	gtcccaaaggacctgctc	žádné
D21S1435	<i>forward</i>	ccctctcaattgttctatc	6-FAM
	<i>reverse</i>	gcaagagatttcagtgtccat	žádné
1p32	<i>forward</i>	tggcgagactccatcaaag	6-FAM
	<i>reverse</i>	ccttttaagctgcaacaatttc	žádné
D3S3045	<i>forward</i>	accaaagagacagtggcat	HEX
	<i>reverse</i>	atgaggacgggtgacatctg	žádné
D4S2366	<i>forward</i>	tcctgacattcctagggtga	6-FAM
	<i>reverse</i>	aaaacaaatatggetctatctatcg	žádné
D12S1064	<i>forward</i>	actactccaaggttcagcc	6-FAM
	<i>reverse</i>	aatattgactttctcttctacc	žádné
D13S317	<i>forward</i>	acagaagtctgggatgtgga	HEX
	<i>reverse</i>	gccccaaaagacagacagaa	žádné
D5S818	<i>forward</i>	gggtgatttctcttttgg	6-FAM
	<i>reverse</i>	tgattccaatcatagccaca	žádné
D16S539	<i>forward</i>	gatccaagcttctctctt	HEX
	<i>reverse</i>	acgtttgtgtgcatctgt	žádné
D6S502	<i>forward</i>	ttttgtatttcattgtacattcg	6-FAM
	<i>reverse</i>	cgtagctataaattgtcattttc	žádné
D17S1290	<i>forward</i>	gccaacagagcaagactgtc	HEX
	<i>reverse</i>	ggaaacagttaaatggccaa	žádné

Tab. 2: Přehled fluorescenčně značených primerů vybraných STR lokusů využívaných při stanovení chimerismu

STR lokus	Typ primeru	Nukleotidová sekvence (5'→3')	Fluorescenční značení na 5' konci
D7D820	<i>forward</i>	tgtcatagtttagaacgaactaacg	6-FAM
	<i>reverse</i>	ctgaggtatcaaaaactcagagg	žádné
F13A1	<i>forward</i>	gaggttgcactccagcctt	HEX
	<i>reverse</i>	atgcatgcagattagaaa	žádné
vWF	<i>forward</i>	tgtacctagttatctatcctg	HEX
	<i>reverse</i>	gtgatgatgatggagaca	žádné
AME	X	ccctgggctctgtaaagaatagtg	TAMRA
	Y	atcagagcttaaactgggaagctg	žádné

Tab. 2 (pokračování): Přehled fluorescenčně značených primerů vybraných STR lokusů využívaných při stanovení chimerismu

4.4. Biologický materiál

- aspirát kostní dřeně nebo vzorek periferní krve odebraný do zkumavky s K₃EDTA dárce před alogenní HSCT
- aspirát kostní dřeně nebo vzorek periferní krve odebraný do zkumavky s K₃EDTA pacienta před alogenní HSCT
- aspirát kostní dřeně nebo vzorek periferní krve odebraný do zkumavky s K₃EDTA pacienta po alogenní HSCT

4.5. Pracovní postup

4.5.1. Genotypizace – předtransplantační vyšetření

4.5.1.1. Simplex fluorescenční PCR amplifikace 16 STR lokusů u pacienta a jeho dárce

- izolace genomické DNA ze vzorku kostní dřeně nebo periferní krve pacienta a dárce pomocí komerčního kitu Gentra® Quigen® Blood Kit
- stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA pomocí NanoDropu ND-1000
- ředění DNA na koncentraci 30 ng/μl v 10 mM Tris o pH 7,5

d) příprava Master Mixu pro PCR amplifikaci viz Tab. 3 a Tab. 4

Reagencie	Výchozí koncentrace	Výsledná koncentrace	1x [μl]
reverzně osmotická a ultračistá voda	-	-	18,2
10x PCR Buffer II (-MgCl ₂)	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
primer mix F+R	10 pmol/μl	3 pmol	0,3
Ampli Taq Gold® <i>Taq</i> DNA polymeráza	5 U/μl	0,5 U/μl	-

Tab. 3: Složení Master Mixu pro PCR amplifikaci STR lokusů D12S1064, D13S317, D5S818, D16S539, D3S3045, D21S1411

Reagencie	Výchozí koncentrace	Výsledná koncentrace	1x [μl]
reverzně osmotická a ultračistá voda	-	-	18
10x PCR Buffer II (-MgCl ₂)	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
mix primerů F+R	10 pmol/μl	5 pmol	0,5
Ampli Taq Gold® <i>Taq</i> DNA polymeráza	5 U/μl	0,5 U/μl	-

Tab. 4: Složení Master Mixu pro PCR amplifikaci STR lokusů D4S2366, D17S1290, D6S502, D7S820, F13A1, 1p32, VWF, D21S1435, D21S1446

e) napipetování reakční směsi viz Tab. 5 do 0,2 ml PCR zkumavek

Složka reakční směsi	Objem složek [μl]
Master Mix	23
0,5 U/μl Ampli Taq Gold® <i>Taq</i> DNA polymeráza	1
30 ng/μl DNA	1

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci STR lokusů

f) amplifikace všech 16 STR lokusů pacienta i dárce souběžně v termocycleru PTC-200 viz Tab. 6

Teplota	95 °C	94 °C	56 °C	72 °C	60 °C	4 °C
Doba	10 min	30 s	30 s	45 s	45 min	∞
Počet cyklů	-		35x		-	-

Tab. 6: Časový a teplotní profil PCR amplifikace STR lokusů

4.5.1.2. Fragmentační analýza PCR produktů

- g) příprava HiDi formamidu spolu s velikostním standardem Gene Trace Rox 500 v podobě Master mixu viz Tab. 7

Skupina lokusů	Původ DNA	Objem PCR produktu [μl]	Objem formamidu [μl]	Objem GeneTrace 500 ROX DNA [μl]
A	příjemce	5	15	0,375
	dárce	5	15	0,375
B	příjemce	3	10	0,25
	dárce	3	10	0,25
C	příjemce	6	15	0,375
	dárce	6	15	0,375
D	příjemce	5	15	0,375
	dárce	5	15	0,375
E	příjemce	5	15	0,375
	dárce	5	15	0,375

Tab. 7: Složení denaturační směsi pro provedení fragmentační analýzy PCR produktů při genotypizaci příjemce a dárce

- h) rozpipetování do 96 jamkové destičky
i) napipetování STR lokusů pacienta a dárce viz Tab. 8

Skupina lokusů	Objem PCR produktu [μl]	STR lokus	Délkový rozsah [bp]	Fluorescenční značení primerů na 5' konci
A	2	D4S2366	120 - 144	6-FAM
	1	D17S1290	170 - 210	HEX
	2	D6S502	168 - 224	6-FAM
B	1	D12S1064	173 - 201	6-FAM
	1	D13S317	157 - 201	HEX
	1	AME	X = 106 Y = 112	TAMRA
C	1	D5S818	141 - 171	6-FAM
	1	D16S539	148 - 172	HEX
	2	D7D820	194 - 234	6-FAM
	2	F13A1	182 - 230	HEX

Tab. 8: Složení skupin STR lokusů pro provedení fragmentační analýzy PCR produktů

Skupina lokusů	Objem PCR produktu [μ l]	STR lokus	Délkový rozsah [bp]	Fluorescenční značení primerů na 5' konci
D	2	1p32	140 - 208	6-FAM
	1	D3S3045	176 - 208	HEX
	2	vWF	139 - 167	HEX
E	2	D21S1411	240 - 300	6-FAM
	2	D21S1435	+ - 170	6-FAM
	2	D21S1446	+ - 220	HEX

Tab. 8 (pokračování): Složení skupin STR lokusů pro provedení fragmentační analýzy PCR produktů

- j) centrifugace destičky při 2000 rpm po dobu 2 min
- k) denaturace za vysoké teploty ve vyhřátém termocykleru PTC 200 po dobu 5 minut při teplotě 95 °C
- l) chlazení destičky na ledu minimálně 5 min
- m) spuštění fragmentační analýzy v genetickém analyzátoru ABI PRISM 3100
- n) analýza dat pomocí softwaru GeneMapper® - určení informativních lokusů vhodných pro analýzu chimerismu
- o) výběr 1 informativního lokusu pro potransplantační vyšetření chimerismu

4.5.2. Stanovení hladiny potransplantačního chimerismu

- a) izolace DNA z potransplantačního odběru kostní dřeně nebo periferní krve pacienta pomocí komerčního kitu Gentra® Quigen® Blood Kit
- b) stanovení koncentrace a čistoty DNA pomocí přístroje NanoDrop ND-1000
- c) naředění DNA na koncentraci 30 ng/ μ l v 10 mM Tris o pH 7,5
- d) příprava Master Mixu pro PCR amplifikaci zvolených informativních STR lokusů viz Tab. 3 a Tab. 4
- e) příprava reakční směsi viz Tab. 5 pro PCR amplifikaci zvolených informativních STR lokusů

f) amplifikace zvolených informativních STR lokusů v termocycleru PTC-200 viz Tab. 6

g) napipetování denaturační směsi viz Tab. 9

STR lokus	Objem PCR produktu[μ l]	Objem formamidu [μ l]	Objem GeneTrace 500 ROX DNA [μ l]
D4S2366	2	10	0,25
D17S1290	1	10	0,25
D6S502	2	10	0,25
D12S1064	1	10	0,25
D13S317	1	10	0,25
AME	1	10	0,25
D5S818	1	10	0,25
D16S539	1	10	0,25
D7D820	2	10	0,25
F13A1	2	10	0,25
1p32	2	10	0,25
D3S3045	1	10	0,25
vWF	2	10	0,25
D21S1411	2	10	0,25
D21S1435	2	10	0,25
D21S1446	2	10	0,25

Tab. 9: Složení denaturační směsi pro provedení fragmentační analýzy PCR produktů při potransplantačním stanovení chimerismu

h) spuštění fragmentační analýzy v genetickém analyzátoru ABI PRISM 3100

i) analýza dat pomocí softwaru GeneMapper® - výpočet hladiny chimerismu z ploch píků daného lokusu

5. VÝSLEDKY

Sledování buněčného chimerismu po alogenní transplantaci HSC bylo provedeno u 4 vybraných pacientů (Pacient č. 1 - 4). Hladina chimerismu byla monitorována v různých stádiích potransplantační péče. Pacient č. 1 podstoupil transplantaci 12. 1. 2017, a proto bylo jeho vyšetření provedeno pouze z prvních čtyř potransplantačních odběrů. Pacient č. 2 byl transplantován v roce 2016. V případě pacientů č. 3 a 4. proběhla transplantace v roce 2015. Pacient č. 3 podstoupil druhou transplantaci od stejného dárce v roce 2016 z důvodu relapsu onemocnění.

5.1. Monitorování pacienta č. 1

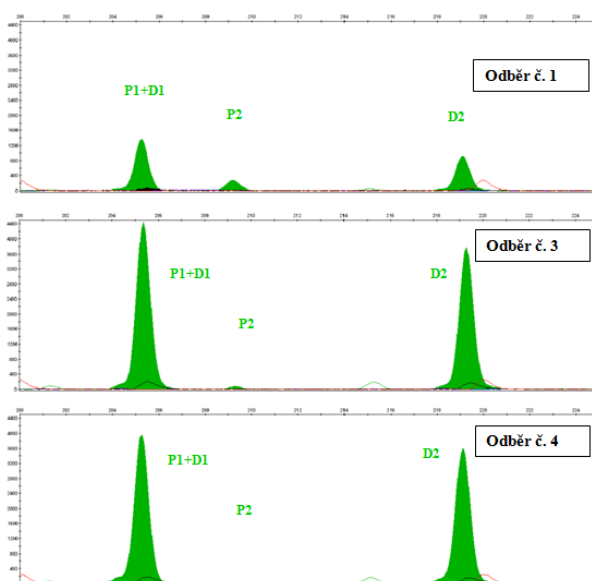
Pacient č. 1 podstoupil transplantaci HSC kvůli diagnostikované akutní myeloidní leukémii (AML) nesoucí inverzi chromozomu 16 ústící ve fúzní gen *CBFβ/MYH11*. Pacient byl léčen od roku 2015 klasickou chemoterapií, ale z důvodu časného relapsu onemocnění a nepříznivé prognózy byl indikován k HSCT. K transplantaci došlo 12. 1. 2017 a štěp pocházel od HLA kompatibilního nepříbuzného dárce z Německa. Genotypizací dárce (D) a příjemce (P) byl jako informativní lokus zvolen D21S1446. Jak dárce, tak i příjemce jsou v tomto lokusu heterozygoti a sdílejí jednu alelu (viz Tab. 10).

	Délka alely
Dárce	205/219
Příjemce	205/209

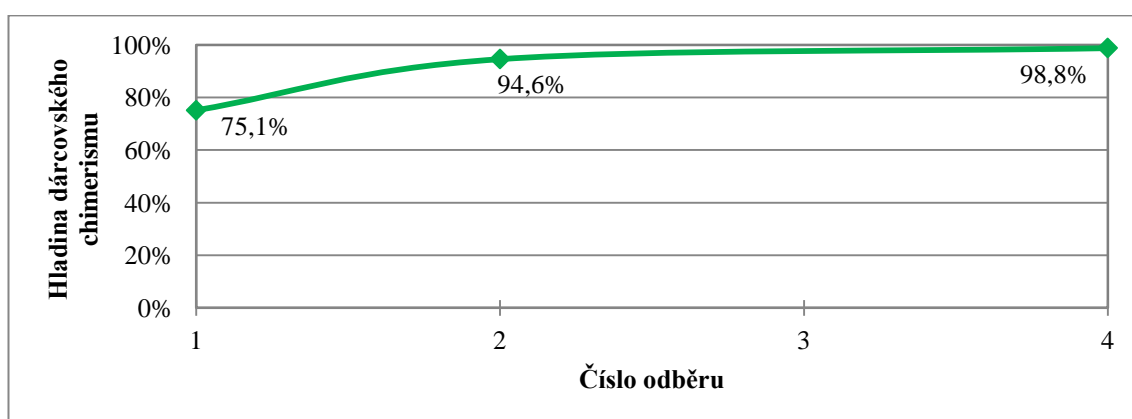
Tab. 10: Délka alel lokusu D21S1446 pacienta č. 1 a jeho dárce

První potransplantační vyšetření proběhlo 14 dní po transplantaci (26. 1. 2017) a byl v něm analyzován vzorek periferní krve (PK). Na základě výsledků vyšetření bylo potvrzeno, že přihojení štěpu po transplantaci proběhlo u pacienta úspěšně. V elektroforetogramu byly nalezeny alely příslušící dárce, ale i příjemci. Výpočtem bylo zjištěno, že hladina dárcovského chimerismu u pacienta v tomto lokusu byla 75,1 %. Také byl detekován podíl krvetvorby příjemce (24,9 %). V následujícím odběru PK ze dne 2. 2. 2017 byla stejně jako při předchozím vyšetření detekována zbytková

pacientská krvetvorba, avšak hladina dárcovského chimerismu výrazně vzrostla. Při tomto vyšetření byl podíl dárcovské krvetvorby 94,6 %. Ani ve čtvrtém potransplantačním vyšetření (1. 3. 2017) nebyla hladina chimerismu 100%. Avšak došlo k poklesu podílu pacientské krvetvorby a hladina dárcovského chimerismu byla stanovena 98,8 %. Pacient a jeho hladina chimerismu je pravidelně monitorována, aby se zamezilo rozvinutí případného relapsu. Výsledky dosavadních stanovení hladiny buněčného chimerismu u pacienta č. 1 se nachází na Obr. 14 a v Grafu 1.



Obr. 14: Elektroforetogram lokusu D21S1446 z potransplantačních odběrů pacienta č. 1



Graf 1: Vývoj hladiny dárcovského chimerismu během potransplantačního sledování pacienta č. 1

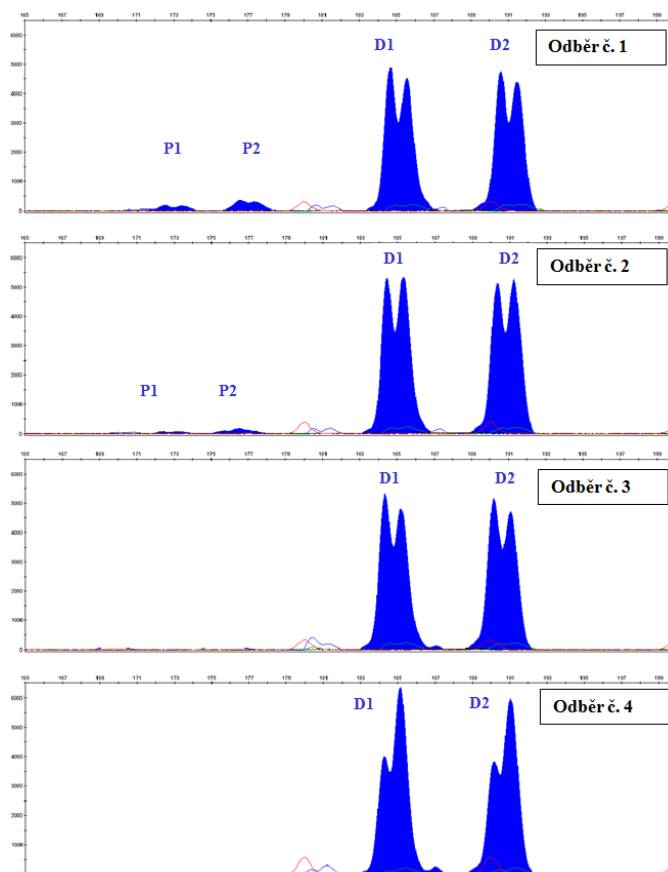
5.2. Monitorování pacienta č. 2

Pacientovi č. 2 byla v prosinci roku 2015 diagnostikovaná akutní myeloidní leukémie nesoucí translokaci t(8;21), která ústí ve specifický fúzní gen *AML1/ETO*. Po ukončení základní léčby byl pacient indikován k alogenní transplantaci. Transplantován byl 10. 3. 2016 štěpem od nepříbuzného dárce z Německa. Z výsledků genotypizace pacienta a dárce byl jako informativní zvolen lokus 1p32. Příjemce i dárce jsou v tomto lokusu heterozygoti a nemají žádnou alelu společnou (viz Tab. 11).

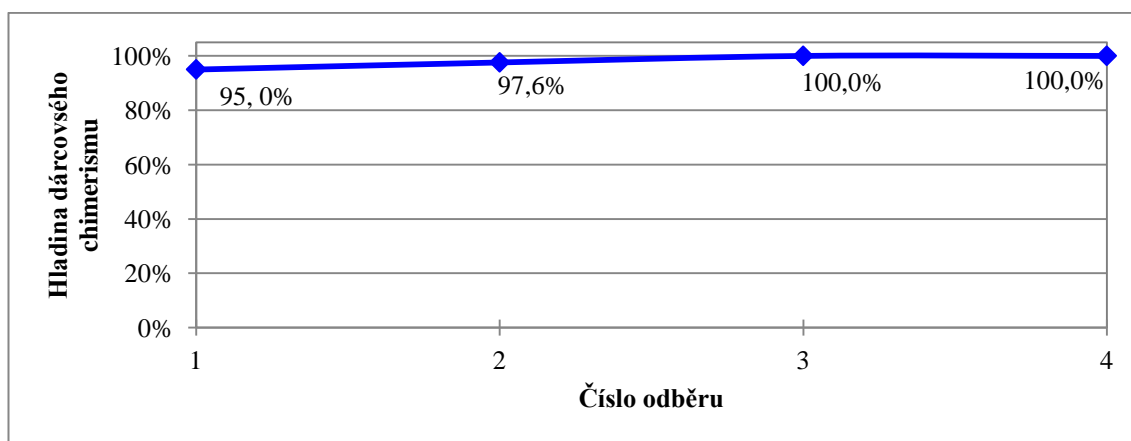
	Délka alely
Dárce	185/191
Příjemce	172/176

Tab. 11: Délka alel lokusu 1p32 pacienta č. 2 a jeho dárce

Po transplantaci došlo postupně k úspěšnému přihojení štěpu. V prvním potransplantačním odběru periferní krve provedeném 14 dní po HSCT (24. 3. 2016) byl zjištěn 95% dárcovský chimerismus. Současně byl detekován minoritní podíl původní pacientovy krvetvorby v 5 %. V následujícím odběru kostní dřeně (KD) provedeném 8. 4. 2016 byla detekována přetrvávající minoritní patientská krvetvorba. Hladina dárcovského chimerismu byla spočítána na 97,6 %. Současně byl pacient č. 2 testován na přítomnost specifického fúzního genu *AML1/ETO*. Ve vzorku KD byla detekována exprese tohoto genu pomocí qRT-PCR (z angl. *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) v množství 0,32 %, což svědčí o přítomnosti původní patologické krvetvorby. V odběru č. 3 (26. 4. 2016) byla již hladina dárcovského chimerismu 100%. Navíc přítomnost fúzního genu *AML1/ETO* nebyla detekována. Tento trend pokračoval i v následujících odběrech. V odběru č. 4 provedeném 3 měsíce po HSCT (6. 6. 2016) byl pacient negativní na přítomnost fúzního genu a hladina dárcovského chimerismu byla 100 %. Pacient č. 2 je od 26. 4. 2016 v hematologické i molekulární remisi původního onemocnění a v ambulantní péči lékařů. Výsledky jednotlivých stanovení hladiny buněčného chimerismu u pacienta č. 2 jsou zaznamenány na Obr. 15 a v Grafu 2.



Obr. 15: Elektroforetogram lokusu 1p32 z potransplantačních odběrů pacienta č. 2



Graf 2: Vývoj hladiny dárcovského chimerismu během potransplantačního sledování pacienta č. 2

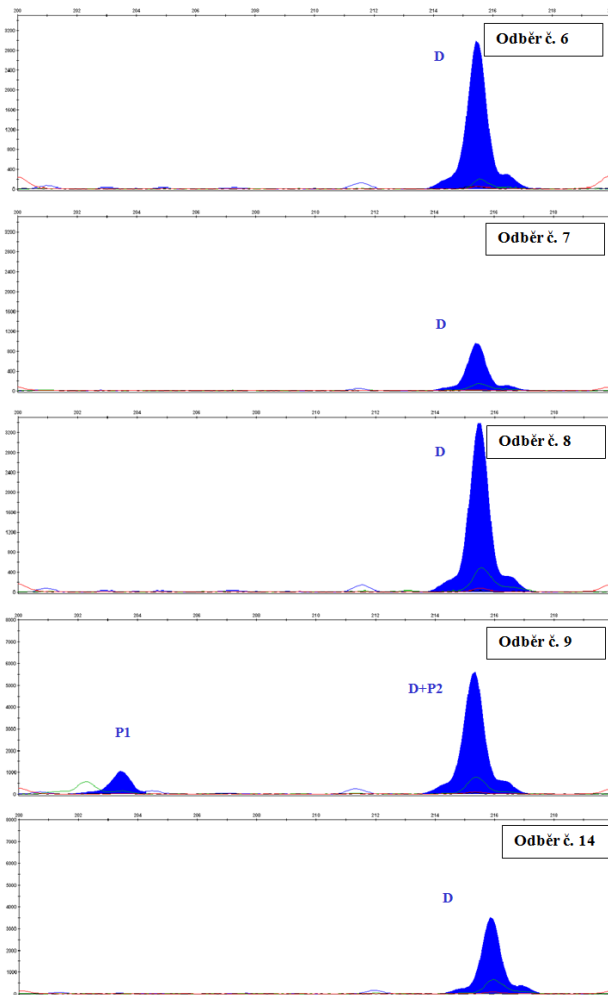
5.3. Monitorování pacienta č. 3

Pacient č. 3 byl v dubnu 2015 diagnostikován s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), která byla charakterizována přítomností fúzního genu *BCR/ABL1* se zlomem v oblasti minor. Pacient byl z důvodu špatné prognózy svého onemocnění 15. 6. 2015 transplantován štěpem od příbuzného dárce. Jako informativní lokus byl zvolen D7S820. Dárce je v tomto lokusu homozygot a tato alela je zároveň společná i pro příjemce (viz Tab. 12).

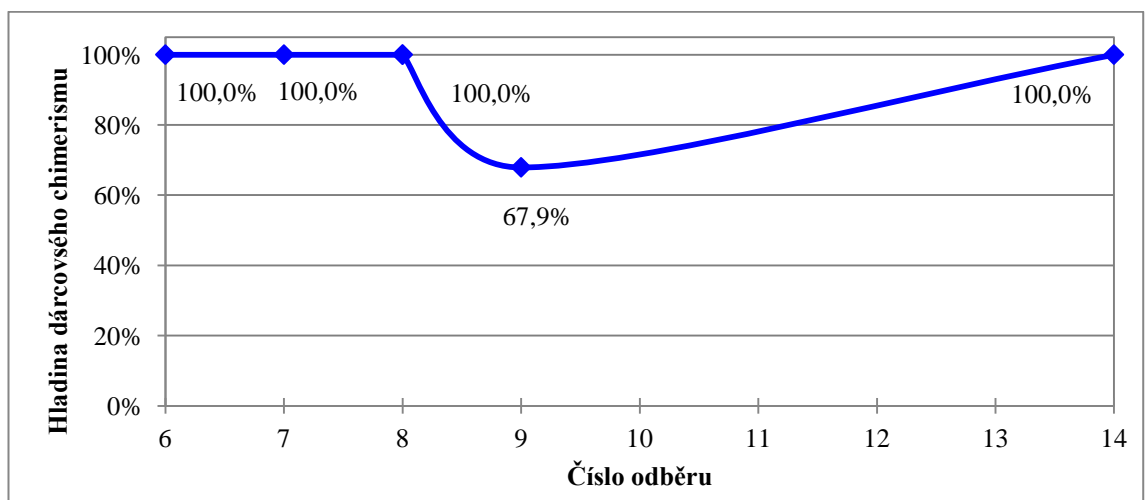
	Délka alely
Dárce	216
Příjemce	204/216

Tab. 12: Délka alel lokusu D7S820 pacienta č. 3 a jeho dárce

Po transplantaci byl štěp přihojen a krvetvorba se obnovila. V šestém potransplantačním odběru periferní krve (28. 1. 2016) byl nalezen 100% dárcovský chimerismus a pacient byl také negativní na přítomnost fúzního genu. Tytéž výsledky byly zjištěny v sedmém vyšetření vzorku kostní dřeně analyzovaném 25. 2. 2016 i v osmém potransplantačním odběru PK tři měsíce poté. Snížení hladiny dárcovského chimerismu bylo zaznamenáno v následujícím vyšetření 15. 9. 2016., kdy ve vzorku periferní krve bylo přítomno pouze 67,9 % buněk dárcovského původu. V tomto odběru byl pacient pozitivní na přítomnost *BCR/ABL1* minor, a to z důvodu relapsu s klonem nesoucím mutaci F359V v kinázové doméně. Relaps onemocnění indikoval pacienta k druhé transplantaci od stejného dárce, která proběhla 30. 9. 2016. Po ní byl štěp úspěšně přihojen a došlo k obnovení krvetvorby. Následné potransplantační odběry (např. 14. odběr periferní krve z 9. 1. 2017) neprokázaly přítomnost fúzního genu *BCR/ABL1* a hladina dárcovského chimerismu je stabilně 100 %. Pacient č. 3 je stále v ambulantní péči lékařů a pravidelně je monitorována jeho hladina dárcovského chimerismu, aby byl odhalen další případný relaps. Sledování hladiny chimerismu pacienta č. 3 po obou transplantacích je shrnuto na Obr. 16 a v Grafu 3.



Obr. 16: Elektroforetogram lokusu D7S820 z potransplantačních odběrů pacienta č. 3



Graf 3: Vývoj hladiny dárcovského chimerismu během potransplantačního sledování pacienta č. 3

5.4. Monitorování pacienta č. 4

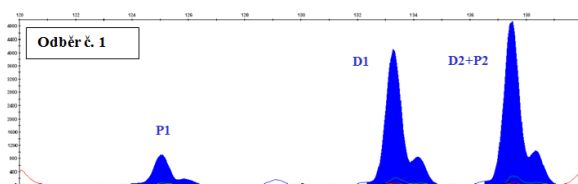
Pacientovi č. 4 byla 31. 12. 2014 diagnostikována akutní myeloidní leukémie s fúzním genem *MLL/AF6*. Z tohoto důvodu byl pacient indikován k alogenní HSCT a 16. 3. 2015 byl transplantován štěpen pocházejícím od příbuzného dárce. Jako informativní lokusy byly zvoleny D4S2366 a D21S1435. V obou těchto lokusech byli pacient i dárce heterozygoti a sdíleli jednu alelu stejné délky (viz Tab. 13).

	Délka alely D4S2366	Délka alely D21S1435
Dárce	133/138	167/171
Příjemce	125/138	167/180

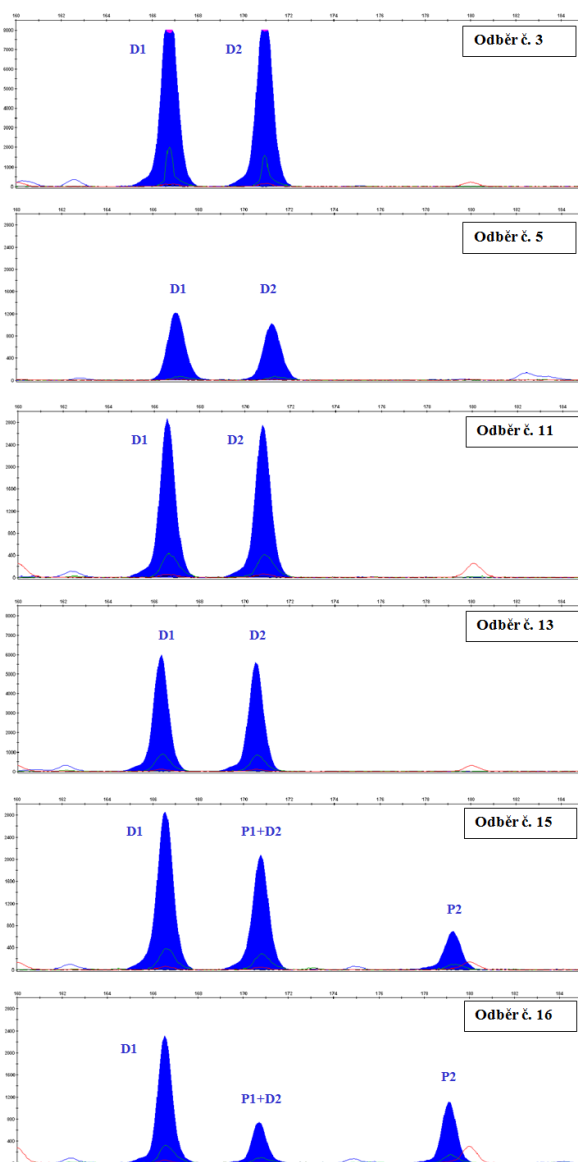
Tab. 13: Délka alel lokusu D4S2366 a D21S1435 pacienta č. 4 a jeho dárce

Po transplantaci došlo k postupnému přihojení štěpu a obnovení krvetvorby. V prvním potransplantačním odběru periferní krve ze dne 3. 6. 2015 byl dárcovský chimerismus 83 % se zbytkovou 17% patientskou krvetvorbou. Chimerismus byl v případě prvního potransplantačního vyšetření stanovován v lokusu D4S2366. Pro další stanovení dárcovského chimerismu byl používán lokus D21S1435. V následujících odběrech došlo ke snížení podílu patientské krvetvorby a při třetím odběru (7. 7. 2015) byl dárcovský chimerismus již 99 %. Poté došlo k mírnému poklesu hladiny dárcovského chimerismu. Ve vzorku PK z pátého odběru (13. 8. 2015) byl dárcovský chimerismus vypočítán na hodnotu 98,2 %. Hladina patientské krvetvorby se nadále snižovala a rok po transplantaci (11. odběr 3. 3. 2016) byl už dárcovský chimerismus 100 %. Tato hladina byla stabilní po 13 měsících, při třináctém odběru PK z 2. 6. 2016 bylo detekováno 100 % dárcovských buněk. 15 měsíců po transplantaci došlo k nárůstu patientské krvetvorby. V patnáctém potransplantačním vyšetření (1. 9. 2016), kdy byl analyzován vzorek kostní dřeně, byl podíl patientské krvetvorby 27 %. V následujícím odběru 21. 9. 2016 hladina dárcovského chimerismu dále klesala - činila v periferní krvi pouze 37,5 %. Mimo chimerismu byla u pacienta během potransplantační péče sledována i přítomnost fúzního genu *MLL/AF6* pomocí qRT-PCR. Pacient byl po celou dobu na přítomnost tohoto fúzního genu pozitivní. Relaps onemocnění byl zachycen včas, nicméně pacient po odmítnutí další léčby 19 měsíců po transplantaci zemřel.

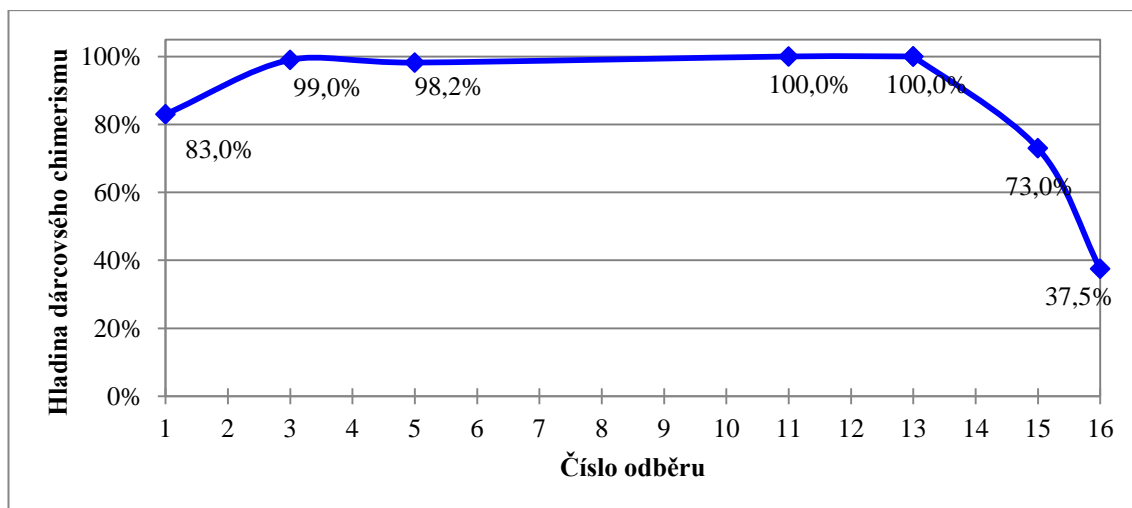
Grafické znázornění vývoje hladiny buněčného chimerismu pacienta č. 4 se nachází na Obr. 17 a Obr. 18 a vývoj hladiny dárcovského chimerismu je shrnut v Grafu 4.



Obr. 17: Elektroforetogram lokusu D4S2366 z potransplantačních odběrů pacienta č. 4



Obr. 18: Elektroforetogram lokusu D21S1435 z potransplantačních odběrů pacienta č. 4



Graf 4: Vývoj hladiny dárcovského chimerismu během potransplantačního sledování pacienta č. 4

6. DISKUZE

Součástí potransplantační péče pacientů po HSCT je sledování hladiny buněčného chimerismu. Ten slouží jako orientační vyšetření po transplantaci a jeho výsledky mají vypovídající hodnotu o míře přihojení štěpu a minimální reziduální chorobě. V dnešní době se v klinické praxi při stanovení hladiny chimerismu využívají STR-PCR nebo qPCR. Existují i další metody, jimiž se dá chimerismus stanovovat, ale ty nespĺňují požadavky na dostatečnou citlivost, jednoduché provedení a v neposlední řadě i cenu a v praxi se nevyužívají.

STR-PCR s následnou fragmentační analýzou má několik zásadních výhod. Fragmentační analýza je automatizovaná pomocí genetického analyzátoru. Navíc má STR-PCR vysokou reprodukovatelnost výsledků. Výsledky hladiny chimerismu je možné pomocí STR-PCR získat velmi rychle - v případě potřeby i do druhého dne. Také cena jejího provedení není vysoká (Bader *et al.*, 2005).

Nevýhodou je ale citlivost. V porovnání s qPCR je STR-PCR méně citlivá. Uvádí se, že její citlivost se pohybuje na hranici stanovení mikrochimerismu, tedy 1 %, zatímco s qPCR je možné stanovit buňky s citlivostí až 0,0001 % (Bader *et al.*, 2005). Detekce mikrochimerismu jako markeru pro sledování přítomnosti původní patientské krvetvorby, jenž je potenciálním zdrojem relapsu onemocnění, je diskutabilní. Některé vědecké týmy jej považují za důležitý a předpokládají, že detekce co nejnižšího podílu patientských buněk by mohla vést k včasnému odhalení vznikajícího relapsu a následné léčebné intervenci v raném stádiu rozvoje onemocnění (Horký *et al.*, 2007). Možnost předpovědi relapsu na základě detekce mikrochimerismu jako jeden z prvních publikoval Alizadeh *et al.* v roce 2002. Horký *et al.* (2011) na něj navázali se studií provedenou na skupině pacientů po alogenní HSCT, jež byla indikovaná kvůli akutní myeloidní leukémii. Z výsledků srovnání STR-PCR s následnou fragmentační analýzou a qPCR analýzy vyšlo najevo, že pomocí qPCR bylo odhaleno 87 % relapsů v porovnání s 39 % odhalenými pomocí STR-PCR. Jiné skupiny vědců jako Choi *et al.* (2000) nebo Schaap *et al.* (2002) nepovažují detekci mikrochimerismu za zásadní pro odhalení relapsu. Tvrdí, že přítomnost zbytkové patientské krvetvorby nemusí být nutně spojena se vznikem relapsu a změna její hladiny není ovlivněna jen zvyšujícím se počtem patologických buněk. Jako možné příčiny detekce rozdílných hladin

mikrochimerismu či smíšeného chimerismu, která nesouvisí s relapsem uvádí např. druh malignity, typ přípravného režimu před transplantací, počet T lymfocytů nebo reakci štěpu proti hostiteli.

Sledování buněčného chimerismu má v klinické praxi spíše informativní charakter. Pokud je detekována zvyšující se hladina patientské krvetvorby naznačující relaps, je toto podezření potvrzeno dalším vyšetřením. Např. se provádí imunofenotypizační vyšetření, které je schopno odhalit přítomnost patologických blastů a potvrdit či vyvrátit jejich výskyt v kostní dřeni (Al-Mawali *et al.*, 2008). Také je STR-PCR často doplněna o sledování MRD pomocí specifického molekulárního markeru. Tím je většinou fúzní gen, který je specificky exprimován blastickými elementy (Khan *et al.*, 2004).

7. ZÁVĚR

S narůstajícím počtem diagnostikovaných nádorových onemocnění je důležité zvolit vhodné analytické metody využívané jako diagnostický nástroj při léčbě malignit. V případě hematologických onemocnění jsou jednou z možností léčby alogenní transplantace HSC. Pro detekci příhojení štěpu, remise onemocnění, ale i relapsu onemocnění nebo odhojení štěpu slouží jako kontrolní mechanismus tzv. buněčný chimerismus. Ten lze sledovat pomocí metody STR-PCR s následnou fragmentační analýzou.

V rámci této bakalářské práce byla pomocí STR-PCR provedena analýza buněčného chimerismu u 4 pacientů, kteří byli léčeni na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc. Zde jim byla indikována alogenní HSCT jako kurativní léčba akutní myeloidní leukémie (Pacient č. 1, č. 2 a č. 4) a akutní lymfoblastické leukémie (Pacient č. 3). Pomocí STR-PCR a fragmentační analýzy byla u všech pacientů provedena genotypizace, určena informativita jednotlivých STR lokusů a následně vyhodnoceno 19 potransplantačních vzorků periferní krve a kostní dřeně. Na základě výsledků analýzy bylo možné u všech pacientů potvrdit příhojování štěpu po transplantaci. U Pacientů č. 3. a č. 4. byla zachycen relaps onemocnění. Sledování buněčného chimerismu je vhodný a užitečný nástroj k monitorování potransplantačního stavu štěpu u pacientů.

8. LITERATURA

1. Ali, N., Adil, A. N., Shaikh, M. U. (2015): Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation —10 Years of Data From a Developing Country. *Stem Cells Translational Medicine* 4: 873-877.
2. Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., Dauriac, C., Birebent, B., Lapart, C., Lamy, T., Le Prisé, P. Y., Beauplet, A., Bories, D., Semana, G., Quelvennec, E. (2002): Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99 (12): 4618-4625.
3. Al-Mawali, A., Gillis, D., Hissaria, P., Lewis, I. (2008): Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. *The American Journal of Clinical Pathology* 129: 934-945.
4. Alwasaidi, T., Bredeson, C. (2014): Peripheral blood stem cells or bone marrow as the graft source for allogeneic hematopoietic cell transplantation? *Journal of Taibah University Medical Sciences* 9 (2): 91-99.
5. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (2): 209-219.
6. Bader, P., Niethammer, D., Willasch, A., Kreyenberg, H., Klingebiel, T. (2005): How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* 35: 107-119.
7. Bai, L., Deng, Y. M., Dodds, A. J., Milliken, S., Moore, J., Ma, D. D. F. (2006): A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients. *European Journal of Haematology* 77: 425-431.
8. Baron, F., Sandmaier, B. M. (2006): Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 20: 1690-1700.
9. Bernt, K. M., Armstrong, S. A. (2009): Leukemia Stem Cells and Human Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology* 46 (1): 33-38.

10. Bindu, A. H., Srilatha B. (2011): Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 1 (3).
11. Blume, K. G., Beutler, E., Bross, K. J., Schmidt, G. M., Spruce, W. E., Teplitz, R. L. (1980): Genetic Markers in Human Bone Marrow Transplantation. *The American Journal of Human Genetics* 32: 414-419.
12. Bouchlaka, M. N., Redelman, D., Murphy, W. J. (2010): Immunotherapy following hematopoietic stem cell transplantation: potential for synergistic effects. *Immunotherapy* 2 (3): 399-418.
13. Broxmeyer, H. E. (2010): Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community.
14. Cetlová, A. (2013): Reverzní izolace – chrání nebo zatěžuje pacienty po transplantaci kostní dřeně? *Onkologie* 7 (3): 155-158.
15. Copelan, E. A. (2006): Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine* 354: 1813-1826.
16. Czerw, T., Labopin, M., Schmid, C., Cornelissen J. J., Chevallier, P., Blaise, D., Kuball, J., Vigouroux, S., Garban, F., Lioure, B., Fegueux, N., Clement, L., Sandstedt, A., Maertens, J., Guillermin, G., Bordessoule, D., Mohty, M., Nagler, A. (2016): High CD3+ and CD34+ peripheral blood stem cell grafts content is associated with increased risk of graft-versus-host disease without beneficial effect on disease control after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation from matched unrelated donors for acute myeloid leukemia — an analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Oncotarget* 7 (19): 27255-27266.
17. Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
18. Fehse, B., Chukhlovin, A., Kühlcke, K., Marinetz, O., Vorwig, O., Renges, H., Krüger, W., Zabelina, T., Dudina, O., Finckenstein, F. G., Kröger, N., Kabisch, H., Hochhaus, A., Zander, A. R. (2001): Real-Time Quantitative Y Chromosome-Specific PCR (QYCSPCR) for Monitoring Hematopoietic Chimerism after Sex- Mismatched Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 10 (3): 419-425.

19. Flegel, W. A. (2007): The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion* 5: 50-57.
20. George, D., Czech, J., John, B., Yu, M., Jennings, L. J. (2013): Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism* 4 (3): 102-108.
21. Gineikiene, E., Stoskus, M., Griskevicius, L. (2009): Single Nucleotide Polymorphism-Based System Improves the Applicability of Quantitative PCR for Chimerism Monitoring. *Journal of Molecular Diagnostics* 11 (1): 66-74.
22. Ginsburg, D., Antin, J. H., Smith, B. R., Orkin, S. H., Rapoport, J. M. (1985): Origin of Cell Populations After Bone Marrow Transplantation: Analysis Using DNA Sequence Polymorphisms. *The Journal of Clinical Investigation* 75 (2): 595-603.
23. Gratwohl, A. (2002): Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100 (7): 2374-2386.
24. Gyurkocza, B., Sandmaier B. M. (2014): Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood* 124 (3): 344-353.
25. Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., Affara, N. A. (2003): Usp9y (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to Usp9x that is under selective constraint. *Mammalian Genome* 14 (7): 437-447.
26. Hancock, J. P., Goulden, N. J., Oakhill, A., Steward, C. G. (2003): Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 17: 247-251.
27. Hashiyada, M. (2001): DNA biometrics. *Biometrics*.
28. Hatzimichael, E., Tuthill, M. (2010): Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 3: 105-117.
29. Horký, O., Mayer, J., Dvořáková, D. (2007): Stanovení chimérismu pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Přehled a první vlastní zkušenosti. *Transfuze a hematologie dnes* 13 (2): 73-78.

30. Horký, O., Mayer, J., Kablásková, L., Borský, M., Krejčí, M., Dvořáková, D. (2009): Mikrochimérismus – na hraně počínajícího relapsu AML? *Transfúze a hematologie dnes* 15 (2): 97-102.
31. Horký, O., Mayer, L., Kablásková, L., Rázga, F., Krejčí, M., Kisoová, J., Borský, M., Ježíšková, I., Dvořáková, D. (2011): Increasing hematopoietic microchimerism is a reliable indicator of incipient AML relapse. *International Journal of Laboratory Hematology* 33: 57-66.
32. Hsu, L. Y. F., Benn, P. A., Tannenbaum, H. L., Perlis, T. E., Carlson, A. D. (1987): Chromosomal Polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 Major Ethnic Groups: A Large Prenatal Study. *American Journal of Medical Genetics* 26: 95-101.
33. Chen, D. P., Tseng, C. P., Wang, W. T., Wang, M. C., Tsai, S. H., Sun, C. F. (2011): Real-time biallelic polymorphism–polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clinica Chimica Acta* 412: 625-630.
34. Choi, A. J., Lee, K. H., Kim, S., Chung, H. J., Lee, J. S., Kim, S. H., Park, S. H., Chi, H. S., Kim, W. K. (2000): Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplantation* 26: 327-332.
35. Jaing, T. H. (2011): Complications of haematopoietic stem cell transplantation. *ISBT Science Series* 6: 332-336.
36. Jansen, J., Thompson, J. M., Dugan, M. J., Nolan, P., Wiemann, M. C., Birhiray, R., Henslee-Downey, P. J., Akard, L. P. (2002): Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. *Therapeutic Apheresis* 6 (1): 5-14.
37. Jefferis, R., Lefranc, M. P. (2009): Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *mAbs* 1 (4): 332 - 338.
38. Jindra, P. (2014): 50 tisíc dárců českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) a obhájení akreditace WMDA: dobrá zpráva pro program transplantací krevetvorných buněk ČR. *Transfúze a hematologie dnes* 20 (4): 101-102.
39. Jiménez-Velasco, A., Barrios, M., Román-Gómez, J., Navarro, G., Buno, I., Castillejo, J. A., Rodríguez, A. I., García-Gemar, G., Torres, A., Heiniger, A.

- I. (2005): Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 19: 336-343.
40. Khan, F., Agarwal, A., Agarwal, S. (2004): Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation* 34: 1-12.
41. Klabusay, M., Dvořák, P., Mayer, J. (2005): Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. *Vnitřní lékařství* 51 (2): 206-215.
42. Knowlton, R. G., Brown, V. A., Braman, J. C., Barker, D., Schumm, J. W., Murray, C., Takvorian, T., Ritz, J., Donis-Keller, H. (1986): Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 68 (2): 378-385.
43. Liesveld, J. L., Rothberg, P. G. (2008): Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplantation* 42: 297-310.
44. Logue, M., Savani, B. P. (2013): Understanding basic steps to hematopoietic stem cell transplantation evaluation. *American Journal of Blood Research* 3 (2): 102-106.
45. Lucas, K. G., Nelson, J. L., Erickson, T. D., Sun, Q. (2005): Microchimerism detection by human leucocyte antigen-specific quantitative-polymerase chain reaction analysis in recipients of allogeneic Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *British Journal of Haematology* 129: 442-446.
46. Manz, M. G., Boettcher S. (2014): Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews Immunology* 14: 302-314.
47. Martin, P. J. (2016): Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism After Hematopoietic Cell Transplantation. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation Fifth Edition*: 272-282.
48. Najfeld, V., Burnett, W., Vlachos, A., Scigliano, E., Isola, L., Fruchtman, S. (1997): Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplantation* 19 (8): 829-834.
49. Nollet, F., Billiet, J., Sellaslag, D., Criel, A. (2001): Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplantation* 28: 511-518.

50. Odriozola, A., Riancho, J. A., Mijares, V., Nunez-Cespedes, J., Zarrabeita, M. T. (2012): Chimerism detection by short tandem repeat analysis when donor and recipient genotypes are not known. *Clinica Chimica Acta* 413: 548-551.
51. Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29 (2): 294-307.
52. Orkin, S. H., Zon, I. L. (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 131: 631-644.
53. Pinhero, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., Emslie, K. R. (2012): Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytica Chemistry* 84: 1008-1011.
54. Rafeah N. T., Fadilah, S. A. W. (2009): The A-B-C of Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The Medical Journal of Malaysia* 64 (1): 94 - 100.
55. Ramakrishnan, A., Torok-Storb, B., Pillai, M. M. (2013): Primary Marrow-Derived Stromal Cells: Isolation and Manipulation. *Methods in Molecular Biology* 1035: 75-101.
56. Reinherz, E. L., Geha, R., Rapoport, J. M., Wilson, M., Penta, A. C., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Daley J. F., Levine, H., Rosen, F. S., Schlossman, S. F. (1982): Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79: 6047-6051.
57. Roy, D. C., Tantravahi, R., Murray, C., Dear, K., Gorgone, B., Anderson, K. C. (1990): Natural History of Mixed Chimerism After Bone Marrow Transplantation With CD6-Depleted Allogeneic Marrow: A Stable Equilibrium. *Blood* 75 (1): 296-304.
58. Santurtún, A., Riancho, J. A., Arozamena, J., López-Duarte, M., Zarrabeitia, M. T. (2017): Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. *International Journal of Legal Medicine* 131: 67-72.

59. Santurtún, A., Riancho, J. A., Santurtún, M., Zarrabeitia, M. T. (2014): Analysis of post-transplant chimerism by using a single amplification reaction of 38 Indel polymorphic loci. *Bone Marrow Transplantation* 49: 1432-1435.
60. Schaap, N., Schattenberg, A., Mensink, E., Preijers, F., Hilegers, M., Knops, M., Pennings, A., Boezeman, J., Geurts van Kessel, A., de Pauw, B., de Witte, T. (2002): Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 16: 13-21.
61. Schmidt, G. M., Blume, K. G., Bross, K. J., Spruce, W. E., Staats, C. G., Turner, M. A. (1979): The Use of Lymphocyte Phosphoglucomutase as a Genetic Marker in Bone Marrow Transplant Recipients. *Blut* 38: 135-137.
62. Slováček, L., Jebavý, L., Blažek, M., Kmoníček, M., Žák, P. (2005): Transplantace kostní dřeně. Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy* 26 (3-4): 125-134.
63. Sparkes, R. S., Sparkes, M. C., Gale, R. P. (1979): Immunoglobulin synthesis following allogeneic bone marrow transplantation in man. Conversion to donor allotype. *Transplantation* 27 (3): 212-213.
64. Tiercy, J. M. (2011): Immunogenetics of hematopoietic stem cell transplantation: the contribution of microsatellite polymorphism studies. *International Journal of Immunogenetics* 38: 366-372.
65. van den Brink, M. R. M., Burakoff, S. J. (2002): Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature Reviews Immunology* 2: 273-281.
66. Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., de Freitas Munhoz, C. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39 (3): 312-328.
67. Watzinger, F., Lion, T., Steward, C. (2006): The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 20: 1448-1452.
68. Witherspoon, R. P., Schanfield, M. S., Storb, R., Thomas, E. D., Giblett, E. R. (1978): Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation* 26 (6): 407 - 408.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1. Pojmy

6-HEX	6-karboxy -2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein	
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
AML	Akutní myeloidní leukémie	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
BP	Bialelický polymorfismus	<i>Biallelic Polymorphism</i>
bp	Páry bazí	<i>Base Pairs</i>
CCD	Zařízení s vázanými náboji	<i>Charged-Coupled Device</i>
CD	Diferenciační skupina	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD15+	Pozitivní na přítomnost diferenciační skupiny 15	<i>CD 15 positive</i>
CD3+	Pozitivní na přítomnost diferenciační skupiny 3	<i>CD 3 positive</i>
CD34+	Pozitivní na přítomnost diferenciační skupiny 34	<i>CD 34 positive</i>
CDP	Společný progenitor dendritických buněk	<i>Common Dendritic Progenitor</i>
CLL	Chronická lymfatická leukémie	<i>Chronic Lymphoid Leukemia</i>
CLP	Společný lymfoidní progenitor	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	Společný myeloidní progenitor	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
Ct	Prahový cyklus	<i>Threshold Cycle</i>
D	Dárce	
ddPCR	Polymerázová řetězová reakce na principu kapkového digitálního systému	<i>droplet digital PCR</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FAM	5-karboxyfluorescein	
FRET	Přenos energie rezonancí fluorescence	<i>Flourescence Resonance Energy Transfer</i>
G-CSF	Růstový faktor stimulující kolonie granulocytů	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	Progenitor granulocytů a makrofágů	<i>Granulocyte-Macrophage Progenitor</i>
GvHD	Nemoc štěpu proti hostiteli	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvT	Efekt štěpu proti nádoru	<i>Graft versus Tumor Effect</i>
HLA	Lidské leukocytární antigeny	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSC	Hematopoetická kmenová buňka	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
HSCT	Transplantace hematopoetických kmenových buněk	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
IT-HSC	Hematopoetická kmenová buňka dělící se po středně dlouhou dobu	<i>Intermediate Term-Hematopoietic Stem Cell</i>
KD	Kostní dřev	

LMPP	Primární lymfoidní multipotentní progenitor	<i>Lymphoid-primed Multipotent Progenitor</i>
LT-HSC	Hematopoetická kmenová buňka dělicí se po dlouhou dobu	<i>Long Term-Hematopoietic Stem Cell</i>
MEP	Progenitor megakaryocytů a erytrocytů	<i>Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor</i>
MRD	Minimální zbytková choroba	<i>Minimal Residual Disease</i>
P	Příjemce	
PBSC	Kmenové buňky z periferní krve	<i>Peripheral Blood Stem Cells</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PK	Periferní krev	
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce na principu reverzní transkripce	<i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
R	Příjemce	<i>Recipient</i>
RFLP	Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Rh faktor	<i>Rhesus</i> faktor	<i>Rhesus Factor</i>
SC	Kmenová buňka	<i>Stem Cell</i>
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST-HSC	Hematopoetická kmenová buňka dělicí se po krátkou dobu	<i>Short Term-Hematopoietic Stem Cell</i>
STR	Krátké tandemové repetice	<i>Short Tandem Repetitions</i>
STR-PCR	Polymerázová řetězová reakce s využitím krátkých tandemových repetice	<i>Short Tandem Repetitions-Polymerase Chain Reaction</i>
TAMRA	5-karboxytetramethylrhodamin	
USP9Y gen	Gen pro ubikvitin-specifickou proteázu 9 lokalizovaný na chromozomu Y	<i>Ubiquitin-Specific Protease 9 gene on the Y</i>
XY-FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace na chromozomech X a Y	<i>Fluorescent in situ hybridization on chromosomes X and Y</i>

9.2. Reagencie

dNTPs	Deoxynukleotidy	<i>Deoxynucleotides</i>
EDTA	Kyselina etylen-diamin-tetraoctová	
F	<i>Forward</i>	
Hidi	Vysoce deionizovaný	<i>Highly deionized</i>
K₃EDTA	Tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové	
MgCl₂	Chlorid hořečnatý	
R	<i>Reverse</i>	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	