

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Kateřina Skýpalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Zajištění tkáňové shody u transplantace
krvetočných kmenových buněk pomocí
molekulárně-genetických metod**

Bakalářská práce

Kateřina Skýpalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. MUDr. Františka Mrázka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Souhrn

Bakalářská práce se věnuje problematice tkáňové shody u transplantace krvetvorných kmenových buněk. Transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT z angl. Haematopoietic Stem Cell Transplantation) je velmi důležitá při léčbě řady hematologických onemocnění nebo imunodeficitních stavů. Základním předpokladem pro provedení úspěšné transplantace je nalezení vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk, který má s pacientem maximální shodu v HLA (z angl. Human Leukocyte Antigens) znacích. K tomuto účelu se nejdříve vyšetřují rodinní příslušníci pacienta, v případě neúspěchu se pokračuje v hledání vhodného dárce v registru dobrovolných dárců kostní dřeně. Jednou z hlavních komplikací HSCT je stále reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, z angl. Graft versus Host Disease), která vzniká jako aloimunitní reakce T lymfocytů dárce na pacientovy antigeny.

V praktické části byl sestaven a vyhodnocen soubor 109 pacientů, kteří byli indikováni k vyhledávání vhodného dárce pro HSCT. U těchto pacientů, jejich příbuzných a event. nepříbuzenských dárců, byly pomocí sérologických a molekulárně-genetických metod určeny HLA znaky. Soubor pacientů byl zpracován i z hlediska demografických a klinických parametrů; hodnocen byl například průměrný věk vyšetřovaných pacientů, zastoupení mužů a žen, podíl pacientů, kteří byli skutečně transplantováni, nebo průměrná doba od prvního vyšetření po provedení HSCT. Při hodnocení zastoupení jednotlivých HLA alel byl v souboru pacientů nejvariabilnější lokus HLA-B, následován lokusy HLA-DRB1, HLA-C, HLA-A a HLA-DQB1. Z celkového počtu 109 pacientů podstoupilo HSCT ve sledovaném období 36 z nich, ve většině případů se jednalo o transplantace od nepříbuzenského dárce. Průměrná doba od prvního vyšetření po HSCT byla u příbuzenských i nepříbuzenských transplantací téměř shodná, a to přibližně 150 dní.

Summary

This bachelor thesis aims to the area of histocompatibility in haematopoietic stem cells transplantation (HSCT). HSCT is considered being very important treatment approach in many hemato-oncological diseases or severe immunodeficiencies. Essential prerequisite for successful transplantation is identification of suitable donor of haematopoietic stem cells matched optimally with the patients in HLA (human leukocytes antigens). For this purpose members of patient's core family are initially investigated, then the search for suitable donor may continue among voluntary members of bone marrow registries. As one of the most severe complications after HSCT graft versus host disease (GVHD) is considered which arises as an alloimmune reaction of donor's T lymphocytes against patient's antigens.

In the practical part of this thesis the group of 109 patients that were indicated for the search of suitable haematopoietic stem cell donor was assembled and analysed. In these patients, HLA variants were determined using serological and molecular-genetic methods. The group of patients was analysed based on demographic and clinical parameters; e.g. age, gender, proportion of patients really transplanted, average time from the first HLA typing until HSCT. Evaluating frequencies of HLA alleles at particular loci, the highest variability was associated with HLA-B locus, followed by the HLA-DRB1, HLA-C, HLA-A and HLA-DQB1 loci. From the total number of 109 patients who underwent HSCT just 36 patients were finally transplanted in the monitored period, and in majority of cases unrelated donor from registries was used for these patients. The average time from the first HLA typing to HSCT was almost the same (150 days) in transplantations both from family and unrelated donor.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. MUDr. Františku Mrázkovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracovávání této práce. Děkuji také pracovníkům Ústavu imunologie LF UP a FN.

Obsah

1. Cíle práce	7
2. Úvod.....	8
3. Literární přehled.....	9
3.1 Transplantace krvetvorných kmenových buněk.....	9
3.1.1 Historie.....	9
3.1.2 Typy HSCT a jejich indikace	10
3.1.3 Hematopoéza a nemoci způsobené poruchou krvetvorby	12
3.1.4 Komplikace	15
3.2 Kmenové buňky	17
3.2.1 Definice a typy kmenových buněk.....	17
3.2.2 Krvetvorné kmenové buňky a jejich zdroje	20
3.3 HLA systém	22
3.3.1 MHC glykoproteiny	22
3.3.2 Definice a význam HLA systému	24
3.3.3 Funkce, polymorfismus a rozdělení HLA molekul	25
3.4 Metody používané k vyšetření HLA systému	27
4. Materiál a metody.....	29
4.1 Studování jedinci a materiál.....	29
4.2 Metody	29
4.2.1 Strategie HLA vyšetření pro vyhledání dárce krvetvorných kmenových buněk..	29
4.2.2 Izolace DNA na poloautomatickém izolátoru Nordiag Arrow.....	31
4.2.3 PCR-SSP	31
4.2.4 Elektroforéza na agarózovém gelu	32
4.2.5 Vyhodnocení gelu po elektroforéze	32
5. Použité chemikálie a přístroje	33
5.1 Použité chemikálie	33
5.2 Použité přístroje.....	34
6. Výsledky	35
7. Diskuze.....	43
8. Závěr	45
9. Seznam použitých zkratk.....	46
10. Použité zdroje.....	47

1. Cíle práce

V teoretické části zpracovat přehled o transplantaci krvevorných buněk se zaměřením na:

- 1) Indikace (poruchy krvetvorby, nádorová onemocnění krvetvorby, primární imunodeficiency)
- 2) Typy (autologní, alogenní)
- 3) Kmenové buňky obecně a zdroje krvevorných kmenových buněk pro transplantaci
- 4) Komplikace (nemoc štěpu proti hostiteli)
- 5) Hlavní imunogenetické faktory podstatné pro úspěšnost transplantace (HLA systém)

V praktické části:

- 1) Popsat strategii zajištění histokompatibility u transplantace krvevorných kmenových buněk na základě praxe HLA laboratoře ve FN Olomouc (se zaměřením na molekulárně genetické metody).
- 2) Sestavit soubor pacientů indikovaných k vyšetření HLA systému pro účely vyhledávání dárce k transplantaci.
- 3) Statisticky zpracovat sestavený soubor z hlediska jeho demografických, klinických a imunogenetických parametrů.

2. Úvod

Transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT z angl. Haematopoietic Stem Cell Transplantation) se v současnosti využívá k léčbě vybraných maligních i nemaligních onemocnění krvetvorby a závažných imunodeficitů. Zásadním předpokladem pro úspěšné provedení HSCT je nalezení vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk na základě shody v histokompatibilních antigenech (HLA). Nejdříve se u pacienta provede tzv. HLA typizace, kdy se určí, jaké konkrétní HLA znaky nese. Poté se hledá vhodný dárce v rodině, především se vyšetřují sourozenci, u kterých je pravděpodobnost shody v HLA znacích s pacientem přibližně 25% (pro každého ze sourozenců). V případě, že pacient nemá vhodného dárce v rodině, přistupuje se k hledání dárce v registru dobrovolných dárců. Ke dni 31. 1. 2016 je počet dárců v Českém národním registru dárců dřeně 63 656 a v celosvětové databázi všech registrů 28 108 541 dárců. Ve srovnání s čísly z minulých let se jejich počet neustále rychle zvyšuje. Po HSCT mohou bohužel u pacientů propuknout komplikace, např. v podobě akutní nebo chronické GVHD nebo infekce, které v některých případech mohou vést až úmrtí pacienta.

K vyšetření pacientů i jejich potenciálních dárců pro HSCT jsou v současné době nepostradatelné molekulárně-genetické metody. Genotypizací se u pacientů a dárců určí HLA alely na konkrétních HLA genech. Vzhledem k vysoké variabilitě HLA systému člověka jsou v současnosti stále objevovány nové HLA alely. Je prokázáno, že některé HLA alely se v populaci vyskytují častěji než jiné. S tím souvisí i fakt, že pro část pacientů se vzácnějšími kombinacemi HLA alel se stále nemusí podařit najít optimálního dárce.

3. Literární přehled

3.1 Transplantace krvetvorných kmenových buněk

3.1.1 Historie

Jedna z prvních zmínek o léčbě krvetvornými kmenovými buňkami se vztahuje k roku 1891, kdy lékař Brown-Séquard léčil pacienty s poruchami krvetvorby tím, že jim perorálně podával kostní dřev (KD) (Vaňásek *et al.*, 1996). Později, v roce 1939, byla pacientovi s aplastickou anémií podána první transfúze KD (Osgood *et al.*, 1939). Tento pacient denně dostával ke zvýšení počtu krevních destiček a leukocytů krevní transfúze.

Po druhé světové válce, kdy byly použity atomové bomby, se vědci snažili najít způsob, jak obnovit funkci KD u aplazií způsobených ozářeními (Rekers *et al.*, 1950). Zahájení používání transplantace kostní dřevě (TKD) je založeno na výsledcích výzkumu probíhajícího v 50. letech. Tento výzkum vedli vědci Jacobson a Lorenzo, kteří prokázali, že lze chránit supraletálně ozářená zvířata před ireverzibilní aplazií KD podáním buněk KD po ozáření nebo zastíněním sleziny při ozáření (Vaňásek *et al.*, 1996).

První alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT, z angl. Haematopoietic Stem Cell Transplantation) byla provedena E. Donnalem Thomasem a jeho kolegy v roce 1957 (Thomas *et al.*, 1957). Do této studie bylo zahrnuto šest pacientů, u kterých byla provedena chemoterapie a ozařování, a poté dostali intravenózní infúzi kostní dřevě od zdravého dárce. Do 100 dní po transplantaci však nakonec všichni zemřeli. Dosud chyběly zásadní vědomosti o histokompatibilních antigenech, proto nemohli být vyhledáni dárce, kteří by odpovídali příjemci (Van Rood, 1968). Zlom nastal v 60. letech minulého století, kdy byl objeven HLA (Human Leukocyte Antigens) systém. Díky tomuto objevu došlo k rozvoji alogenní TKD na základě přenosu KD mezi HLA-identickými sourozenci. E. Donnall Thomas obdržel za svou práci v roce 1990 Nobelovu cenu. Se svým týmem položili základy pro TKD a prokázali že:

- buňky lidské KD mohou být bezpečně transfundovány i ve větších množstvích
- lidskou kostní dřev lze dlouho konzervovat
- imunosupresivní léčba methotrexátem může u příjemců KD tlumit reakci štetu proti hostiteli
- TKD může mít léčebný účinek i v pokročilejších stádiích leukemických onemocnění

- léčba působením TKD je účinnější v raných stádiích onemocnění (Vaňásek *et al.*, 1996).

První úspěšná TKD byla provedena v roce 1968, tedy krátce po objevení HLA systému, a to u 2 dětí s onemocněním primární imunodeficiencí (Amos *et Bach*, 1968). Od té doby se začal význam TKD při léčbě různých hemato-onkologických a dalších onemocnění rychle rozvíjet. Na území bývalého Československa byla první TKD na základě HLA-kompatibility provedena v roce 1976 v Hradci Králové (Vaňásek *et al.*, 1996).

3.1.2 Typy HSCT a jejich indikace

Krvetvorné kmenové buňky jsou zodpovědné za správnou funkci krvetvorby, která však může být následkem různých nemocí poškozená nebo nefunkční. Například u aplastických anémií kmenové buňky neprodukují krvinky, naopak u leukémií dochází k produkci abnormálních či nefunkčních buněk, což může vést až poškození tkání nebo orgánů (Kavan *et al.*, 1998). Podle vztahu mezi dárce a příjemcem krvetvorných buněk rozdělujeme transplantaci na autologní a alogenní.

Autologní transplantace

Autologní transplantace neboli autotransplantace krvetvorných kmenových buněk se využívá jako podpurná léčba pacientů s hemato-onkologickými onemocněními, dříve také i u některých solidních nádorů. Podmínkou ovšem je, že KD nemocného není poškozena (Ostró *et al.*, 2008). Autologní HSCT představuje v dnešní Evropě 58 % provedených transplantací. Ve 47 % případů byla provedena u pacientů s mnohočetným myelomem, u 30 % pro non-Hodgkinův lymfom, v dalších 11 % případů šlo o Hodgkinův lymfom a ve 3 % o leukémie. V ostatních případech, kdy se prováděla autologní HSCT, se jednalo o méně časté indikace, které zahrnovaly autoimunitní onemocnění (například roztroušenou sklerózu, systémovou sklerózu nebo Crohnovu nemoc) a solidní nádory (sarkom, germinální nádory a neuroblastom) (Pasquini *et Wang*, 2013).

U autotransplantace se pacientovi transplantují jeho vlastní krvetvorné kmenové buňky, které byly odebrány před zahájením léčby. Pacient musí být před transplantací v dobrém stavu, nicméně je třeba vzít v potaz jeho věk a hlavně typ onemocnění. Proto se pacient před samotnou transplantací podrobí řadě vyšetření, která zhodnotí funkci jeho základních životních orgánů, popřípadě zjistí přítomnost mikrobiální infekce (Kavan *et al.*, 1998).

V první fázi tzv. mobilizace jsou pacientovi podány cytotoxické látky s následnou aplikací krvetvorných růstových faktorů. Ve druhé fázi dochází ke zvýšení množství leukocytů

a z KD se do krevního řečiště vyplavuje větší množství krvetvorných buněk. V této fázi se ze žilní krve odebírají pomocí krvinkového separátoru kmenové buňky. Obvykle proběhnou celkem 2 - 3 odběry. Takto získané kmenové buňky se zmrazí tekutým dusíkem při teplotě nižší než -80 °C. Poté může pacient podstoupit vysoce dávkovanou chemoterapii (Ostró *et al.*, 2008). Po ukončení léčby se pacientovi vrátí jeho kmenové buňky k obnovení krvetvorby, která byla předchozí chemoterapií poškozena. Následné hojení vlastními krvetvornými buňkami probíhá u nemocného zpravidla bez problémů. Ovšem v případě, že předchozí terapie zcela nezničila původní chorobu, sama autologní transplantace vrácení choroby nezabrání (Švojgrová *et al.*, 2011). Výhodou autologní HSCT je relativní dostupnost transplantovaných buněk, přičemž nedochází k reakci štěpu proti hostiteli. Pro autologní HSCT není potřeba použití imunosupresivních léků, což také snižuje riziko vzniku pozdějších infekcí (Kavan *et al.*, 1998).

Alogenní transplantace

Dalším typem HSCT je alogenní transplantace, která bývá provedena tehdy, jsou-li kmenové buňky pacienta kriticky poškozeny a je třeba je nahradit krvetvornými buňkami jiného zdravého jedince (Švojgrová *et al.*, 2011). V případě alogenních HSCT šlo v posledních letech v evropských statistikách v 50 % případů o pacienty s akutní myeloidní leukémií nebo s akutní lymfoblastickou leukémií, v 15 % o pacienty s myelodysplastickým syndromem nebo jinými myeloproliferativními chorobami a v 6 % se jednalo o pacienty se syndromem selhání KD. Další méně časté indikace alogenní HSCT zahrnují lymfomy, myelomy a hematologické poruchy, jako je aplastická anémie nebo thalasémie (Pasquini *et Wang*, 2013). Aby u pacienta došlo ke zničení nádorových buněk, musí podstoupit chemoterapii nebo celotělovou či lokální radioterapii. Několik dní před transplantací tedy probíhá tzv. conditioning, kdy jsou pacientovi podávány vysoké dávky cytostatik. Cílem je zničit nádorové buňky, potlačit funkci imunitního systému a vytvořit vhodné podmínky pro přihojení transplantovaných krvetvorných buněk a zahájení krvetvorby z dárcovských buněk. Samotná transplantace pak probíhá podobně jako transfúze krve, kdy se pacientovi krvetvorné buňky zavádějí přímo do žilního systému. V KD se po předchozí terapii vytvoří v místě poškození buněk prostory, ve kterých se usadí transplantované krvetvorné buňky. Po transplantaci nastává období tzv. přihojování transplantovaných krvetvorných buněk, které trvá přibližně 2 - 4 týdny. Než se ovšem začnou tvořit krvinky, je pacient odkázán na podpůrnou léčbu, která omezuje riziko vzniku infekcí. „Nejjednodušším“ typem HSCT je syngenní transplantace, kdy dochází k výměně buněk mezi jednovaječnými dvojčaty,

u kterých je úplná shoda ve všech znacích HLA systému (Kavan *et al.*, 1998). U alogenní transplantace je třeba zajistit buď úplnou, nebo velmi blízkou tkáňovou shodu (Švojgrová *et al.*, 2011). Proto bývá zpravidla nejvhodnějším dárcem HLA identický sourozenec, mnohem méně často potom jiný příbuzný. Pokud se nenajde vhodný příbuzný, začne se hledat dárci v registru dobrovolných dárců kostní dřeně (Kavan *et al.*, 1998).

V některých případech může u HSCT transplantovaná tkáň navodit přímý protinádorový účinek, kdy dochází k reakci leukocytů dárce proti původní nemoci. Jedná se o tzv. reakci štěpu proti nádoru neboli imunoterapeutický efekt transplantace (Švojgrová *et al.*, 2011). Zajímavostí je, že v případě, kdy je krevní skupina dárce a příjemce rozdílná, dochází po transplantaci k tvorbě červených krvinek, které mají krevní skupinu dárce a pacient, kterému byla kostní dřeň transplantovaná, tak získá krevní skupinu dárce (Kavan *et al.*, 1998).

3.1.3 Hematopoéza a nemoci způsobené poruchou krve tvorby

Tato kapitola se zaměřuje na nejvýznamnější choroby, které postihují krev tvorbu a u kterých se často k léčbě využívá právě HSCT. Hematopoéza, neboli krev tvorba, je regulovaný proces, při kterém dochází k nepřetržité produkci zralých krevních buněk podle potřeby organismu. Základním principem je proliferace a diferenciaci hematopoetických kmenových buněk na buňky progenitorové a prekurzorové, ze kterých se dále vyvíjejí zralé krevní buňky (Pospíšilová *et al.*, c2013). Vzhledem k tomu, že zralé krevní buňky mají převážně krátkou životnost, musí neustále kmenové buňky v průběhu života tyto zralé krevní elementy doplňovat (Orkin, 2000).

Základní onemocnění způsobené poruchou krev tvorby

Chronická myeloidní leukemie (CML) patří mezi nádorová onemocnění s pozvolnějším několikaletým průběhem. Až po přechodu do fáze akcelerace nebo blastického zvratu se jedná o prudké onemocnění s charakterem akutní leukemie (Vokurka, 2008). Jedná se o nádorové myeloproliferativní onemocnění, pro které je typickým znakem přítomnost tzv. Philadelphského chromozomu (Nowell *et Hungerford*, 1960, Pospíšilová *et al.*, c2013), který je produktem reciproční translokace chromozomů 9 a 22 a je charakteristickým znakem CML (Rowley, 1973). Philadelphský chromozom vzniká recipročnou translokací mezi dlouhým raménkem (q34) chromozomu 9 a dlouhým raménkem (q11) chromozomu 22. Dochází k fúzi genů *C-ABL* (chromozom 9) a *BCR* (chromozom 22) a vzniká onkogenní gen *BCR-ABL* (Pospíšilová *et al.*, c2013).

K potvrzení diagnózy se provádí tzv. karyotypizace metafázních chromozomů, pomocí které se Philadelphský chromozom detekuje. Nicméně přibližně v 5 % případů Philadelphský chromozom není detekován. V těchto případech se k detekci genu *BCR-ABL* provádí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a reverzní-transkripce polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) (Chase *et al.*, 2001). CML může postihnout všechny věkové skupiny, ačkoliv nejčastěji je diagnostikována u dospělých průměrně ve věku 64 let. *BCR-ABL* gen kóduje hlavní aktivní tyrosinovou kinasu (TK), která způsobí zvýšení proliferace, aktivuje transkripční faktory a brání buněčné apoptóze. Tyto procesy nakonec vedou k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a diferenciaci (Tefferi, Thiele *et Vardiman*, 2009). Chybná aktivace TK může být způsobena translokací (u CML) nebo bodovou mutací. Ačkoliv se jednotlivé mechanismy chybné aktivace u různých myeloproliferativních onemocnění liší, dopady na organismus jsou velmi podobné (Pospíšilová *et al.*, 2013). CML byla v minulosti jednou z hlavních indikací alogenní HSCT, nověji se vzhledem k objevu nových efektivních léků (inhibitorů tyrosinových kinas) indikuje k HSCT výrazně méně často.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění vzniklé poškozením krvetvorných kmenových buněk a většinou je pozorováno u starších pacientů. MDS narušuje správnou funkci hematopoézy, což má za následek cytopenii a zvyšuje se i riziko přechodu v akutní myeloidní leukemie (Tefferi *et Vardiman.*, 2009).

Předpokládá se, že primární poškození hematopoetické kmenové buňky může být způsobeno spontánními mutacemi nebo účinkem toxické látky. Každopádně poté dochází k reakci imunitního systému, který aktivuje cytotoxické T lymfocyty, a k proliferaci dřeňových makrofágů, které zvyšují sekreci určitých cytokinů. Tyto cytokiny stimulují proliferaci hematopoetických progenitorových buněk a u zralejších buněk vyvolávají apoptózu (Pospíšilová *et al.*, 2013). Průběh onemocnění se u jednotlivých pacientů výrazně liší. Pacienti s pokročilejším stádiem se dožívají zpravidla několika měsíců, oproti tomu pacienti s minimálně rozvinutým MDS se mohou dožít až 10 nebo i více let (Sekeres, 2011). MDS patří mezi choroby nejčastěji indikované k HSCT.

Akutní myeloidní leukemie (AML) je soubor onemocnění, pro které je charakteristická proliferace a akumulace nezralých hematopoetických buněk v KD, které se následně vyplaví do periferní krve. Předpokládá se, že AML je způsobena maligní transformací hematopoetických kmenových buněk, které ztrácejí schopnost diferenciaci (Pospíšilová *et al.*, 2013). Cytogenetické a molekulárně genetické aberace spojené s AML se vyskytují

v leukemických buňkách a zde ovlivňují expresi určitých genů kódujících proteiny, které se poté zapojují do buněčných procesů podporujících leukemogenezi (Kohlmann, Haschke-Becher *et al.*, 2008, Kohlmann, Kipps *et al.*, 2008). Pro AML je typický její rychlý a agresivní vývoj, který trvá obvykle několik dnů, maximálně týdnů (Pospíšilová *et al.*, c2013). Vyskytuje se nejčastěji u pacientů starších 60 let (Vokurka, 2008). Výskyt AML souvisí v menší části případů s genetickou predispozicí, v ostatních případech se může jednat o kumulaci onkogenních mutací, která může být urychlena vystavením účinku kancerogenů. AML je v současné době vůbec nejčastější indikací k alogenní HSCT. Prekurzorové B-buněčné a T-buněčné neoplazie jsou skupinou nádorových onemocnění, mezi které řadíme neoplazie lymfocytárních prekurzorů, které u nemocných vyvolávají akutní lymfoblastickou leukémii (ALL) a lymfoblastický lymfom (LL). Pro neoplazie prekurzorů B-lymfocytů většinou platí, že jsou to leukemie vyskytující se ve dření. Naopak neoplazie prekurzorů T lymfocytů obvykle tvoří mimodřeňové malignity diagnostikované jako lymfomy (Pospíšilová *et al.*, c2013). ALL se vyskytuje u dětí i u dospělých, ale často je diagnostikovaná zejména u dětí ve věku 2 - 5 let (viz dále) (Inaba *et al.*, 2013). Ke stanovení diagnózy ALL se využívá mikroskopie, imunofenotypového vyšetření, průtokové cytometrie a nověji také molekulárně-genetických vyšetření (Pui *et al.*, 2008). Léčba poté obvykle trvá 2 - 2,5 roku a zahrnuje 3 fáze: indukční, konsolidační a fázi udržovací (Pui *et al.*, 2008). Nejznámější neoplazií lymfocytárních prekurzorů je ALL dětského věku, která zahrnuje přibližně třetinu výskytu nádorů u dětí do 18 let (Pospíšilová *et al.*, c2013). LL představuje přibližně třetinu dětských nehodgkinských lymfomů (Sandlund *et al.*, 1996, Cairo *et al.*, 2005).

Neoplazie zralých B-buněk jsou onemocnění vznikající transformací zralých B-lymfocytů na různých úrovních jejich diferenciaci v imunokompetentní buňky, přičemž tyto transformované B-lymfocyty projevují klonální aktivitu.

Neoplazie ze zralých T-buněk a NK-buněk jsou poměrně vzácná onemocnění, která tvoří méně než 10 % nehodgkinských lymfomů (Pospíšilová *et al.*, c2013).

Hodgkinův lymfom (HL) je způsobený maligními neoplazií lymfocytárních buněk a je charakterizovaný přítomností velkých mononukleárních Hodgkinových a velkých multinukleárních Reed-Sternbergových buněk (Weiss, 2000). V rozvojových zemích jsou často postiženi mladí lidé ještě před obdobím dospívání. Naopak v průmyslových zemích bývají zasaženi lidé mezi 20-30 roky nebo potom lidé starší 50 let (Grufferman *et Delzell*, 1984). HL je unikátní v tom, že jeho maligní buňky tvoří méně než 1 %

z celkové buněčné nádorové populace (Kuppers *et al.*, 1994). K léčbě se užívá chemoterapie, která v současné době umožňuje vyléčení více než 80 % pacientů (Hasenclever *et Diehl*, 1998). Úspěšnost alogenní HSCT u HL není příliš vysoká, proto se pacienti s HL indikují k této léčbě zřídka.

Mastocytóza je velmi vzácné heterogenní onemocnění hematopoézy, které se vyskytuje převážně u žen (Pospíšilová *et al.*, c2013). Jedná se o onemocnění poruchy proliferace žírných buněk, které má kožní i systémové projevy. Mezi příznaky mastocytózy patří návaly horka, svědění, bolesti břicha, průjem, hypotenze, synkopa a bolesti svalů a kostí. Tyto příznaky jsou způsobeny uvolněním žírných buněk a jejich infiltrací do kůže, gastrointestinálního traktu, jater, sleziny, lymfatických uzlin a KD (Carter *et al.*, 2014). Ve většině případů je mastocytóza rozpoznána na základě vzniklých charakteristických kožních lézí (Valent *et al.*, 2007).

Mezi další vážné geneticky podmíněné onemocnění krvevorných buněk patří také autoimunitní lymfoproliferativní syndrom a hemofagocytární lymfohistióza (Pospíšilová *et al.*, c2013).

3.1.4 Komplikace

Mezi komplikace, které se u pacientů po HSCT mohou vyskytnout, patří infekce, rejekce/selhání štěpu (odvržení transplantované tkáně), relaps (návrat základního onemocnění), toxické poškození chemoterapií a v neposlední řadě reakce štěpu proti hostiteli, která je níže podrobně rozebrána, protože bezprostředně souvisí s úrovní tkáňové (HLA) shody mezi dárce a příjemcem. V řadě případů se po transplantaci u pacientů objeví „vítaná“ reakce štěpu proti leukémii (GVL, z angl. Graft versus Leukaemia), která je pro pacienta prospěšná, protože darované buňky mohou likvidovat zbytky nádorových buněk u příjemce (Švojgrová *et al.*, 2011).

Teprve před 50 lety byly formulovány podmínky pro rozvoj reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, z angl. Graft versus Host Disease): štěp musí obsahovat imunologicky kompetentní buňky, příjemce musí mít odlišné tkáňové antigeny než dárce a příjemce nemůže zahájit účinnou imunitní odpověď k odstranění transplantovaných buněk (Billingham, 1966-1967). V současnosti neustále roste počet provedených alogenních HSCT, který na celém světě dosahuje ročně přinejmenším desítek tisíc transplantací (Appelbaum, 2001). S rostoucím počtem HSCT také roste počet případů, kdy se u pacientů rozvine také GVHD (Ferrara *et al.*, 2009), která se tradičně dělí podle doby nástupu symptomů na akutní a chronickou formu (Carpenter *et al.*, 2010).

Akutní GVHD

Akutní GVHD je častou komplikací po provedení alogenní transplantace, kdy se její výskyt u pacientů pohybuje v rozmezí přibližně od 20 do 60 % (Ballen *et al.*, 2012). Akutní GVHD se začíná projevovat 6 a více dní po transplantaci (Dwyre *et al.*, 2008). Příznaky jsou horečka, zarudnutí kůže, těžké průjmy a svědivá bolestivá vyrážka, která postupně postihuje celý povrch těla (Glucksberg *et al.*, 1974). Mezi hlavní biologické rizikové faktory akutní GVHD patří rozdíly v HLA znacích mezi příjemcem a dárcem a celotělové ozařování (Flowers *et al.*, 2011). I nadále zůstává akutní GVHD jednou z hlavních příčin morbidity a mortality po alogenní HSCT (Carpenter *et al.*, 2010). Může postihnout kůži, játra i gastrointestinální trakt a její další členění je založeno na rozsahu poškození cílového orgánu (Przepiora *et al.*, 1995). Pro potvrzení, že se jedná o akutní GVHD, se pacientovi provádí biopsie postiženého orgánu (Carpenter *et al.*, 2010). Nicméně z důvodu nižší citlivosti biopsie, která je pouze 60 %, je konečná diagnóza stanovena i na základě dalších dostupných klinických informací (Weisdorf *et al.*, 2003).

Patofyziologie akutní GVHD je komplexní a probíhá ve třech po sobě jdoucích fázích. V první fázi dochází k poškození hostitelské tkáně a k uvolnění prozánětlivých cytokinů, což má za následek dozrávání antigen-prezentujících buněk (APC) hostitele. Ve druhé fázi poté tyto APC buňky aktivují zralé T lymfocyty dárce, které se následně množí a produkují další cytokiny (Ferrara *et al.*, 2009, Shlomchik, 2007). Důležitým cytokinem akutní GVHD je interleukin-2 (IL-2), produkovaný T lymfocyty dárce. Během léčby GVHD jsou proto pacientovi podávány imunosupresivní látky, jako je např. cyclosporin, tacrolimus nebo monoklonální protilátky, které jsou namířené proti IL-2 nebo jeho receptoru (Ratanatharathorn *et al.*, 1998). Ve třetí fázi vzniká zánětlivá reakce na základě buněčných mediátorů, cytotoxických T lymfocytů a NK buněk, a rozpustných zánětlivých mediátorů, jako jsou faktor nádorové nekrózy α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) a interleukin-1 (IL-1) (Welniak *et al.*, 2007, Ferrara *et al.*, 1991). Tyto rozpustné a buněčné mediátory podporují zánět a tím dochází k poškození cílové tkáně (Hill *et al.*, 2000).

Prevence vzniku GVHD je téměř výhradně zaměřena na snížení rizika vzniku akutní GVHD, která je také nejdůležitějším rizikovým faktorem pro vznik chronické GVHD (Lee *et al.*, 2003). Zlatým standardem pro léčbu akutní GVHD je podávání steroidů, které mají silnou anti-lymfocytární a protizánětlivou aktivitu (MacMillan *et al.*, 2002), používá se však také řada dalších látek s imunosupresivními účinky. Od roku 1980 se začala užívat nová imunosupresiva, cyclosporin a tacrolimus, která brání aktivaci T-buněk tím,

že inhibují calcineurin a výrazně prodlužují přežití transplantátu (Storb *et al.*, 1986). Ačkoliv se cyclosporin a tacrolimus strukturálně liší, jejich mechanismy účinku jsou podobné (Liu *et al.*, 1991). Nověji se užívá terapie založená na methotrexátu v kombinaci s calcineurinovým inhibitorem (Ruutu *et al.*, 2013). Methotrexát je cytotoxické léčivo, které má při nízkých dávkách protizánětlivý účinek a tlumí aktivaci T-buněk (Przepiorka *et al.*, 1996).

Chronická GVHD

Chronická GVHD je multisystémové onemocnění, jehož typickými příznaky jsou zánět a fibróza. Může postihnout široké spektrum tkání a orgánů, včetně očí, ústní sliznice, kůže, pojivové tkáně, plic, jater, gastrointestinálního ústrojí, kloubů, slinných žláz a urogenitálního traktu (Shulman *et al.*, 2006).

Chronická GVHD může vzniknout několika způsoby:

- postupným přechodem akutní GVHD do chronické GVHD,
- samovolně po vyléčení akutní GVHD,
- nebo *de novo* bez předchozí akutní GVHD (Carlens *et al.*, 1998).

Pro léčbu chronické GVHD se často užívá kortikosteroidů (event. v kombinaci s calcineurinovým inhibitorem) (Koc *et al.*, 2002). Dlouhodobé používání imunosupresivních látek včetně steroidů však může způsobit závažné komplikace vzhledem ke své toxicitě. Byly provedeny studie mnoha terapií, ale bohužel žádná nedosáhla takových výsledků, aby byla plošně přijata jako standard.

Významnou roli v imunitních reakcích, které vedou ke GVHD, mohou sehrávat také mikrobiální faktory (mikrobiom). Místa, kde se projevuje akutní GVHD, jako je kůže nebo gastrointestinální trakt, jsou také místem působení rozmanité mikrobiální flóry. Proto působení antimikrobiálních látek, které se podávají v souvislosti s HSCT, pravděpodobně způsobuje hluboké a dlouhotrvající poškození této přirozené mikroflóry. Roli v rozvoji tolerance versus aloimunity může hrát také nepřímá interakce mezi mikrobiomem dárce („mikrobiologická zkušenost“) a mikrobiomem pacienta (Rezvani *et al.*, 2012).

2.2 Kmenové buňky

3.2.1 Definice a typy kmenových buněk

Nejdůležitější částí KD jsou tzv. krvetvorné kmenové buňky (Švojgrová *et al.*, 2011). V současné době se výzkum kmenových buněk obecně rychle rozvíjí a to hlavně z důvodu

široké škály jejich potenciálních aplikací. Jejich schopnost diferencovat se do různých buněčných typů by mohla být využita v regenerativní medicíně - k léčbě poškozených nebo nemocných tkání (Butler *et al.*, 2014). Lidské kmenové buňky jsou stále předmětem výzkumu pro jejich možné využití:

- při obnově poškozené či odumřelé tkáně buňkami vzniklými z kmenových buněk
- při regeneraci poškozené tkáně vlivem zranění nebo nemoci slouží kmenové buňky jako stimulatory růstu ostatních buněk
- při odstranění zbytků nemocných buněk tkáně pomocí implantace zdravých kmenových buněk (Bárta *et al.*, 2010).

Kmenové buňky jsou jedním z mnoha typů buněk lidského organismu. Mají velmi specifickou funkci, a to produkci nových buněk konkrétní tkáně. Dospělý člověk má pro jednotlivé tkáně různé typy kmenových buněk, které se v případě potřeby diferencují na konkrétní typ zralých buněk dané tkáně. Všechny tkáňové kmenové buňky pocházejí z embryonálních kmenových buněk. Protože se z embryonálních kmenových buněk vyvíjejí všechny buněčné typy organismu, označujeme je jako pluripotentní (Koledová *et al.*, 2011). Během posledních let byl zaznamenán velký pokrok a zásadní objevy v oblasti pluripotentních kmenových buněk. Pluripotentní kmenové buňky jsou definovány na základě dvou nezbytných vlastností, kterými jsou sebeobnova a potence. Sebeobnova je schopnost kmenových buněk se po dlouhou dobu dělit, produkovat stále stejné dceřiné buňky a zachovávat při tom stejné vlastnosti, jako měla buňka mateřská. Za konkrétních podmínek je kmenová buňka schopna zapojit se do programu vedoucímu k diferenciaci do specializovaných buněčných typů (Wobus *et Boheler*, 2005).

Typy kmenových buněk:

Kmenové buňky embryonálního původu se získávají 5. - 8. den po oplození přímo z embryoblastu blastocytu, ovšem jejich získání je spojeno se zničením raných embryí (Doležal *et al.*, 2013). Lidské embryonální kmenové buňky mají velký diferenciační potenciál, mohou tvořit buňky všech zárodečných vrstev (Reubinoff *et al.*, 2000). Embryonální a epiblastové kmenové buňky se vyznačují pluripotentností, což znamená, že se mohou diferenciovat do všech buněčných typů dospělého organismu. Naopak trofoblastové kmenové buňky jsou multipotentní a diferencují se jen do určitých buněčných typů placenty (Koledová *et al.*, 2011). První lidské embryonální kmenové buňky byly v roce 1998 získány z blastocysty vzniklé *in vitro* fertilizací (Thomson, 1998).

Tkáňové kmenové buňky mají svůj původ v embryonálních kmenových buňkách. Pro danou tkáň jsou specifické a mohou tvořit buňky pouze té tkáně, ze které pocházejí. Jedná se například o kmenové buňky nervové, hematopoetické, mezenchymové, epidermální apod. (Koledová *et al.*, 2011). Nacházejí se v již diferenciovaných tkáních. Přírozenou funkcí těchto buněk je udržovat a obnovovat starou nebo poškozenou tkáň (Pessina *et Gribaldo*, 2006). I po transplantaci do jiného organismu jsou schopny znovu vytvořit stejnou tkáň, ze které byly odebrány (Koledová *et al.*, 2011).

Nádorové kmenové buňky vznikají buď z tkáňových kmenových buněk patologickou změnou genetické informace, nebo z nádorových buněk, které mají vlastnosti kmenových buněk. Vyznačují se často vysokou odolností vůči chemoterapii i radioterapii. Pokud by po léčení zůstala v organismu i jen jedna nádorová kmenová buňka, může dojít k opětovnému nádorovému bujení (Koledová *et al.*, 2011).

Uměle vytvořené kmenové buňky vznikají přeměnou diferenciovaných buněk na kmenové buňky lidským zásahem (Koledová *et al.*, 2011). Do této skupiny patří tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky, které mají podobné vlastnosti jako embryonální kmenové buňky. Vznikají ze somatických buněk, které se vlivem transkripčních faktorů reprogramují zpět do pluripotentního stavu (Pospíšilová *et al.*, c2013). Bylo prokázáno, že řízenou expresí charakteristických transkripčních faktorů (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) lze přeprogramovat lidské somatické buňky na indukované pluripotentní kmenové buňky (Takahashi *et al.*, 2006). Jejich produkci nepronásledují takové etické problémy, jako u embryonálních kmenových buněk (Koledová *et al.*, 2011).

Mezi základní vlastnosti kmenových buněk patří již zmíněná pluripotence nebo multipotence, čili schopnost kmenové buňky se irreverzibilně diferenciovat na určitý buněčný typ. Při dělení kmenových buněk zajišťuje zachování původních vlastností v dceřiných kmenových buňkách tzv. sebeobnova (Koledová *et al.*, 2011).

Další velice důležitou vlastností kmenových buněk je jejich klonální charakter (Pospíšilová *et al.*, c2013). Protože kmenové buňky neobsahují enzym telomerázu, nedochází u nich ke zkracování chromozomů a buňky se mohou dělit teoreticky až do nekonečna (Koledová *et al.*, 2011).

Dále se mohou kmenové buňky dělit podle jejich původu a diferenciaci na kmenové buňky:

- Totipotentní, které se vyskytují pouze ve stádiu zygoty a ze kterých následně vznikají všechny buňky organismu.

- Pluripotentní, které dávají vznik buňkám odvozených ze všech tří zárodečných vrstev.
- Multipotentní, které jsou schopné tvořit buněčné typy tkání, ze kterých pocházejí.
- Unipotentní, které dávají vzniknout pouze jednomu typu buněk (Doležal *et al.*, 2013).

Vzhledem ke specifickým vlastnostem existují u kmenových buněk i specifické regulace buněčných procesů. U embryonálních kmenových buněk se aktivují speciální proteiny Oct4, Nanog, Sox2 a Klf4, které vazbou na DNA specificky řídí expresi genetické informace, čímž dochází k nastolení pluripotence. Další charakteristikou embryonálních kmenových buněk je jejich specifický chromatin. Pomocí regulačních mechanismů jsou geny označovány speciálními značkami (např. methylací histonů), které značí, jestli se má daný gen přepisovat či nikoliv. Důležitá je regulace buněčného cyklu, který se od klasických somatických buněk liší délkou, především délkou G1 fáze. Embryonální kmenové buňky jsou schopny se rychle dělit, protože jejich buněčný cyklus je velmi krátký. Pro jejich vstup do buněčného cyklu není potřeba růstových faktorů. Naopak je pro ně typická vysoká aktivita cyklin-dependentní kinázy 2 (Cdk2), která urychluje průchod kmenové buňky G1 fází. Nízká aktivita či inhibice Cdk2 má za následek prodloužení G1 fáze a následnou diferenciaci embryonálních kmenových buněk. V případě, že u embryonálních kmenových buněk dojde k poškození DNA v G1 fázi, nezastavují buněčný cyklus, ale dochází u nich k apoptóze. Tím předejdou riziku vzniku mutací při případné opravě DNA, což by mělo fatální následky pro celý organismus (Koledová *et al.*, 2011).

V současnosti se výzkum prováděný na embryonálních kmenových buňkách potýká se silnou kritikou. Vystává zde otázka, zda je embryo lidská bytost, na kterou se vztahují přirozená lidská práva či nikoliv. Odpůrci těchto výzkumů argumentují tím, že lidský život vzniká v okamžiku, kdy dojde k oplození vajíčka spermií. Tím pádem je embryo subjektem přirozených práv a jeho vědomé zničení je srovnatelné s vraždou. Naopak zastánci poukazují na to, že rané embryo nemá rozvinuté své lidské vlastnosti a nelze jej považovat za příslušníka lidské populace (Doležal *et al.*, 2013).

3.2.2 Krvetvorné kmenové buňky a jejich zdroje

Hematopoetické kmenové buňky jsou tkáňové kmenové buňky schopné vytvořit všechny typy krevních buněk a mohou být získány nejen z KD, ale také z periferní nebo pupečnickové krve (Padmanabhan *et al.*, 2009).

KD poskytuje soustavu mikroenvironmentálních domén, neboli tzv. nik, které podporují funkci imunitních a hematopoetických buněk. Buněčné niky jsou funkční prostory uvnitř tkáně, které řídí a kontrolují množství buněk tím, že regulují signály řídící buněčnou sebeobnovu, diferenciaci a klidovou fázi buněčného cyklu (Scadden, 2006). Tyto signály mohou být přenášeny přímým kontaktem buněk, růstových faktorů a cytokinů nebo složkami extracelulární matrix (Schofield, 1978). Hematopoetické kmenové buňky vznikají postupně během embryonálního vývoje. Nejdříve se nacházejí v extraembryonálních tkáních, následně jsou přítomné v „aorta-gonády-mezonefrální“ oblasti, poté v játrech a slezině plodu a nakonec v KD, která je hlavním hematopoetickým orgánem dospělých jedinců (Dzierzak *et* Speck, 2008). Je důležité poznamenat, že ačkoliv většina hematopoetických kmenových buněk je u dospělých přítomna v KD, tak hematopoéza může probíhat také v extramedulárních místech (například ve slezině, játrech a plicích) (O'Malley, 2007). KD také disponuje strukturálními a funkčními vlastnostmi podobnými sekundárním lymfoidním orgánům a obsahuje folikulární struktury podobné lymfatickým uzlinám nebo slezině, ačkoliv postrádá organizované T- a B-buňky. V nepřítomnosti brzlíku poskytuje mikroprostředí KD také vhodné podmínky pro vývoj T-buněk (Dejbakhsh-Jones *et al.*, 1995).

Krvetvorné kmenové buňky lze pro účely transplantace v současné době získat v zásadě ze tří různých zdrojů – 1) klasickým odběrem kostní dřeně, 2) odběrem krvetvorných buněk z periferní krve po stimulaci růstovými faktory a 3) z pupečnickové krve.

Ad 1) Klasický odběr KD je nejstarším způsobem získání krvetvorných kmenových buněk a provádí se ve sterilním prostředí při celkové anestezii. Pacientu ležícímu na břicho je punkční jehlou opakovaně nasávána KD z dřeňové dutiny kyčelní kosti. Množství odebrané KD závisí na hmotnosti pacienta, přičemž se obvykle odebírá 10 ml na 1 kg váhy. (Kavan *et al.*, 1998).

Ad 2) Mezi novější metody odběru krvetvorných kmenových buněk patří odběr z krve, kdy jsou kmenové buňky procesem mobilizace vyplaveny z kostí do krevního oběhu. U dárců se k mobilizaci používá aplikace růstových faktorů, tělu vlastních molekul, které regulují růst a množení krvetvorných buněk. Často se používá tzv. růstový faktor pro granulocyty (G-CSF). Po několika dnech podávání růstového faktoru, kdy dochází k masivnímu uvolňování krvetvorných buněk z kostní dřeně do krve, je dárce napojen na separátor, který je schopen oddělit jednotlivé typy krvinek podle jejich fyzikálních vlastností. Způsob odběru kmenových buněk pomocí separátoru trvá několik hodin, ale pro dárce je bezpečný.

Ad 3) Pupečnicková krev je vhodným zdrojem krvetvorných kmenových buněk, protože před narozením obsahuje krev plodu volně plovoucí kmenové buňky ve velkém množství. Po porodu část kmenových buněk dítěte zůstává v pupeční šňůře (Švojgrová *et al.*, 2011). Pupečnicková krev se používá jako zdroj krvetvorných buněk vzhledem k její dostupnosti a jednoduchosti pořízení (Kurtzberg, 2009). V současnosti existuje ve světě řada bank uchovávajících pupečnickovou krev (Švojgrová *et al.*, 2011). Limitujícím faktorem je množství krvetvorných kmenových buněk v pupečnickové krvi (Chinen *et Buckley*, 2010). Proto se používají pro dospělé pacienty krvetvorné kmenové buňky získané od více než jednoho dárce nebo se pupečnicková krev užívá k léčení dětských pacientů (Švojgrová *et al.*, 2011).

Registry dobrovolných dárců KD existují ve všech vyspělých zemích světa a usnadňují pacientům včas najít mezi dobrovolníky jedince se stejným tkáňovým (HLA) typem. Dobrovolníci v registru jsou zdraví lidé, kteří jsou ochotni v případě potřeby poskytnout nemocnému svoje krvetvorné buňky. Dárcovství se považuje za nejvyšší dar člověku v nouzi, proto je všude ve světě zcela bezplatné. Dobrovolník při vstupu do registru projde informačním pohovorem, kdy získá informace o celém procesu darování a případném odběru krvetvorných buněk. Z krve se určí nejen tkáňový typ dárce, ale před vlastním darováním se provedou také testy na přítomnost infekčních nemocí (Švojgrová *et al.*, 2011), například na přítomnost viru HIV-1, HIV-2, hepatitidy B, hepatitidy C a syfilis (Ostró *et al.*, 2008). Speciální počítačové programy porovnávají tkáňový typ pacienta, který aktuálně potřebuje transplantaci, s typy všech dostupných dárců. V případě nalezení vhodného dárce se pro potvrzení provedou další krevní testy. Během hledání vhodného dárce v registru či v průběhu transplantace platí jak pro dárce, tak pro pacienta přísná pravidla anonymity (Švojgrová *et al.*, 2011).

3.3 HLA systém

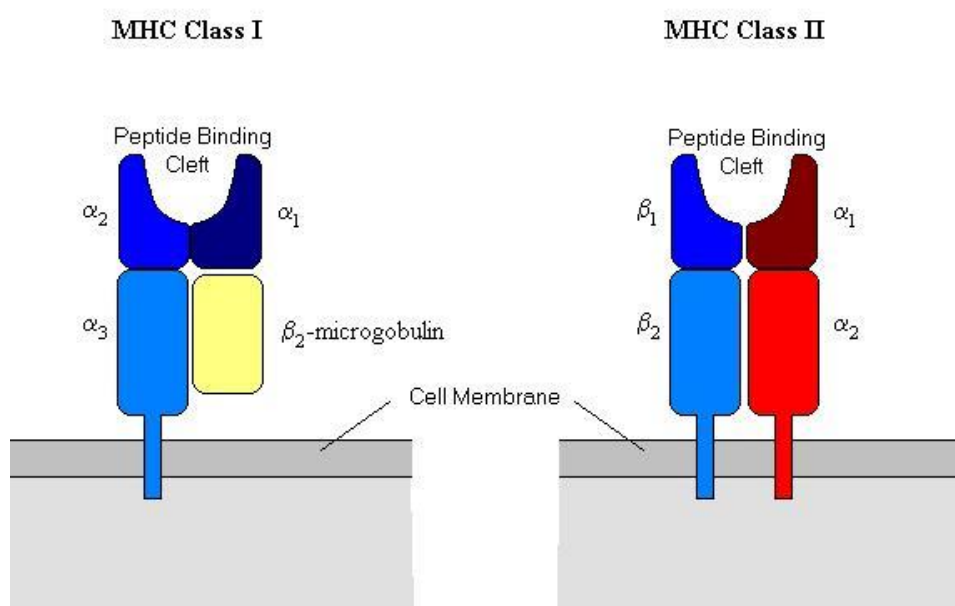
3.3.1 MHC glykoproteiny

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) je rozsáhlý genový komplex, který hraje klíčovou roli v imunitním systému. Molekuly kódované *MHC* geny I. a II. třídy jsou vysoce polymorfní glykoproteiny vyskytující se na povrchu buněk, kde vážou a imunokompetentním buňkám prezentují intracelulární a extracelulární peptidy (Klein, 1986).

MHC glykoproteiny se dělí do dvou tříd. MHC I. třídy se vyskytují na membránách všech jaderných buněk, zatímco MHC glykoproteiny II. třídy se objevují pouze na specializovaných buňkách prezentujících antigen (Hořejší *et al.*, 2013). U různých druhů obratlovců se specifické označení pro MHC komplex liší. U lidí se MHC glykoproteiny označují jako HLA molekuly (Pospíšilová *et al.*, 2013).

Vazebná místa pro peptidy jsou si u obou tříd MHC molekul strukturně velice podobná, ačkoliv se MHC I. a II. třídy liší složením svých podjednotek (Obrázek 1).

Obrázek 1 - Struktura MHC glykoproteinů I. a II. třídy. Molekula MHC I. třídy (vlevo) je tvořena těžkým řetězcem alfa a nekovalentně vázaným beta-2 mikroglobulinem. Molekulu MHC II. třídy (vpravo) tvoří heterodimer dvou symetrických řetězců alfa a beta.



(<http://doctor-jones.co.uk/Immunology/Tutorial/The%20Major%20Histocompatibility%20Complex.htm> navštívené 19. 1. 2016)

MHC molekuly I. třídy jsou tvořeny transmembránovým řetězcem α , který se skládá ze tří domén - α_1 , α_2 , α_3 , a se kterým nekovalentně interaguje řetězec tvořený β_2 -mikroglobulinem. Oproti tomu MHC molekuly II. třídy se skládají z α a β podjednotek, které vytváří vazebné místo pro peptidy, stejně jako domény α_1 a α_2 u MHC glykoproteinů I. třídy. Hlavní funkcí MHC glykoproteinů je tedy vázat peptidy z proteinů produkovaných buňkou nebo pocházejících z vnějšího prostředí buňky a vystavit je na svém buněčném povrchu tak, aby byly rozeznatelné pro T lymfocyty (Hořejší *et al.*, 2013).

3.3.2 Definice a význam HLA systému

Objev HLA systému těsně souvisí s historií transplantací tkání a orgánů. Zjistilo se, že právě neshoda v HLA molekulách mezi příjemcem a dárcem způsobuje u příjemce odvržení tkáně (Pospíšilová *et al.*, c2013). Primární funkcí HLA znaků je umožnit rozpoznávání tělu nevlastních antigenů a tím odhalovat infikované, poškozené nebo cizorodé buňky. Za rozpoznání HLA molekul s navázanými antigenními peptidy zodpovídají T lymfocyty se svými receptory pro antigen (TCR) (Švojgrová *et al.*, 2011).

Nejdůležitější funkcí HLA molekul je indukovat a regulovat imunitní odpověď. T-buňky rozpoznají cizí antigen v kombinaci s HLA molekulami. V imunitní odpovědi je cizí antigen zpracován a vystaven ve formě antigenních peptidů na povrchu buňky. Pro tento účel mají HLA molekuly místo označované jako „antigen-vážíci“, do kterého se antigenní peptidy vkládají. T-buňky interagují s komplexem HLA/peptid a tím jsou aktivovány. Po aktivaci se T-buňky množí a mohou ničit buňky prezentující daný antigen anebo uvolňují cytokiny, které stimulují a regulují imunitní odpověď (Bose *et al.*, 2013).

V případě převodu orgánu nebo tkáně z jednoho jedince na druhého je proto velmi důležité, aby příjemce i dárcem měli co nejpodobnější HLA typ, jinak rozdíl podněcuje imunitní systém k obranným reakcím (Švojgrová *et al.*, 2011). Nicméně i přes úplnou shodu v HLA znacích mohou po transplantaci u příjemce nastat komplikace, na jejichž vzniku se podílejí genetické faktory, tzv. nonHLA polymorfismy (Pospíšilová *et al.*, c2013).

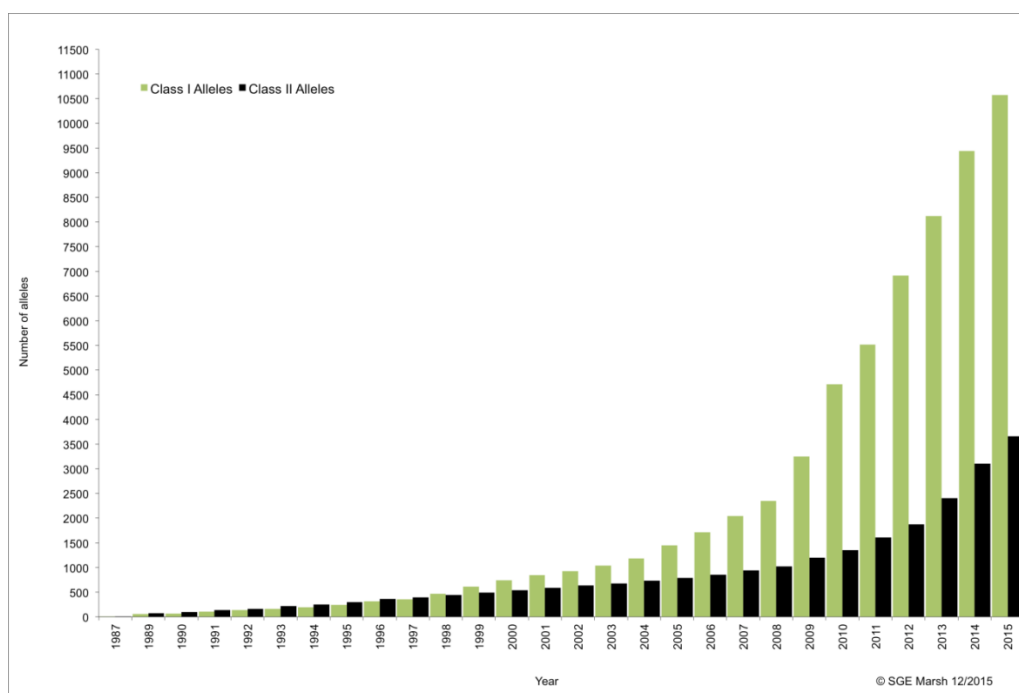
Polymorfismus HLA systému je v lidské populaci tak velký, že počet možných kombinací HLA znaků („HLA výbav“) řádově převyšuje počet lidí na planetě. Některé kombinace HLA znaků se však vyskytují mnohem častěji než jiné a jejich zastoupení se také liší mezi etniky (Švojgrová *et al.*, 2011). Geny kódující HLA molekuly jsou kodominantní a řídí se pravidly Mendelovské dědičnosti. Všechny geny HLA systému se dědí jako celek, tzv. haplotyp. HLA genotyp jedince se skládá ze dvou haplotypů, z nichž jeden pochází od otce a druhý od matky. Podle Mendelovských zákonů dědičnosti je u sourozenců 25% pravděpodobnost, že budou identičtí, 50% pravděpodobnost, že budou mít shodný 1 haplotyp a 25% pravděpodobnost, že budou zcela neshodní. Populačně-genetické studie prokázaly, že vazebná nerovnováha je typickým rysem HLA systému, mezi jejíž příčiny patří redukovaná frekvence rekombinací, selekční tlak nebo tzv. zakladatelský efekt. V transplantační hematologii je vazebná nerovnováha HLA systému výhodná např.

při hledání HLA shodného nepříbuzného dárce (snižuje celkovou haplotypovou variabilitu) (Pospíšilová *et al.*, c2013).

3.3.3 Funkce, polymorfismus a rozdělení HLA molekul

HLA systém lze definovat jako vysoce polygenní a polymorfní (viz Obrázek 2). Polymorfismus *HLA* genů se vyvinul postupnou akumulací bodových mutací, genovou konverzí a rekombinací. Jednotlivé HLA molekuly se od sebe navzájem liší také ve své aminokyselinové sekvenci (vytvářejí různé HLA antigeny), což způsobuje také odlišnosti ve struktuře peptid-vázacího místa a tím i ve spektru antigenních peptidů, které tyto molekuly mohou vázat.

Obrázek 2 – Růst počtu známých HLA alel ve světové populaci od roku 1987 do konce prosince 2015. Zeleně jsou znázorněny počty alel HLA I. třídy, černě alely HLA II. třídy.



(Zdroj: <http://www.hla.alleles.org/> Navštívené: 7. 3. 2016)

Oblast na 6. chromozomu kódující HLA proteiny se rozděluje do 3 základních regionů (Pospíšilová *et al.*, c2013), tvoří zhruba 1 promile z celého lidského genomu a obsahuje více než 200 genů a pseudogenů (Rohoň *et al.*, 2009). Blíže centromere se vyskytuje region II. třídy kódující geny pro α a β řetězec HLA molekul II. třídy. Více telomericky se nachází region I. třídy obsahující geny pro těžké α řetězce HLA molekul I. třídy. Mezi těmito regiony se nachází oblast III. třídy nesoucí geny pro komplement, některé cytokiny a proteiny tepelného šoku. Region I. obsahuje asi 20 genů. Nejdůležitější jsou geny HLA-

A, HLA-B a HLA-C, také často označovány jako klasické *MHC* geny (Pospíšilová *et al.*, c2013). Za zmínku také stojí izotypy HLA-E, HLA-F a HLA-G, které se vyskytují jen na určitých buňkách, mají nižší polymorfismus a specifické funkce (Hořejší *et al.*, 2013) a geny MICA a MICB. Tato oblast obsahuje také pseudogeny HLA-H, HLA-J, HLA-K a MICC. Region II. obsahuje složitý komplex párů genů kódujících dimér HLA molekul II. třídy označovaných jako HLA-DR, HLA-DP a HLA-DQ, a také další geny proglykoproteiny, které mají funkci ve zpracování a prezentaci antigenů (Pospíšilová *et al.*, c2013). V rámci tříd se jednotlivé izotypy HLA antigenů označují jako HLA lokusy (Rohoň *et al.*, 2009).

Z funkčního hlediska se obě třídy HLA molekul liší ve zpracování a prezentaci antigenu. Pro CD4⁺ T lymfocyty je nutné vystavení antigenních peptidů prostřednictvím HLA-II. třídy, naopak pro CD8⁺ T lymfocyty je nezbytná prezentace antigenů HLA molekulami I. třídy. HLA molekuly I. třídy jsou zpracovány v endoplazmatickém retikulu spolu s peptidy získanými degradací cytosolických proteinů v proteazomu. HLA I. třídy tedy prezentují peptidy z intracelulárně syntetizovaných antigenů, např. buňce vlastních nebo virových proteinů. Tento peptidový komplex HLA molekuly I. třídy a antigenního peptidu je poté exprimován na povrchu buňky a prezentován CD8⁺ T-buňkám, viz Obrázek 3. Aktivované CD8⁺ T-buňky pak svými cytotoxickými efektorovými mechanismy zabíjejí virem infikované buňky (Wagner *et al.*, 2012, Bose *et al.*, 2013).

Naproti tomu HLA molekuly II. třídy prezentují peptidy, které byly získány proteolytickým štěpením proteinových antigenů, které se do buňky dostaly endocytózou z vnějšího prostředí. HLA molekuly II. třídy prezentují tyto exogenní peptidy CD4⁺ T-buňkám, které pak napomáhají k rozvoji specifické imunitní odpovědi pro exogenní antigen, viz Obrázek 3 (Bose *et al.*, 2013). Jak již bylo uvedeno, další rozdíl se týká exprese, kdy molekuly HLA-I. třídy jsou přítomny (s různou denzitou) na všech jaderných buňkách. Exprese HLA molekul II. třídy se omezuje na antigen-prezentující buňky (APC, např. dendritické buňky, monocyty, makrofágy, B-lymfocyty, Langerhansovy buňky) (Pospíšilová *et al.*, c2013, Cresswell, 1994).

Obrázek 3 - Způsob zpracování a prezentace antigenního peptidu HLA molekulami I. a II. třídy, podrobnosti jsou uvedeny v textu.

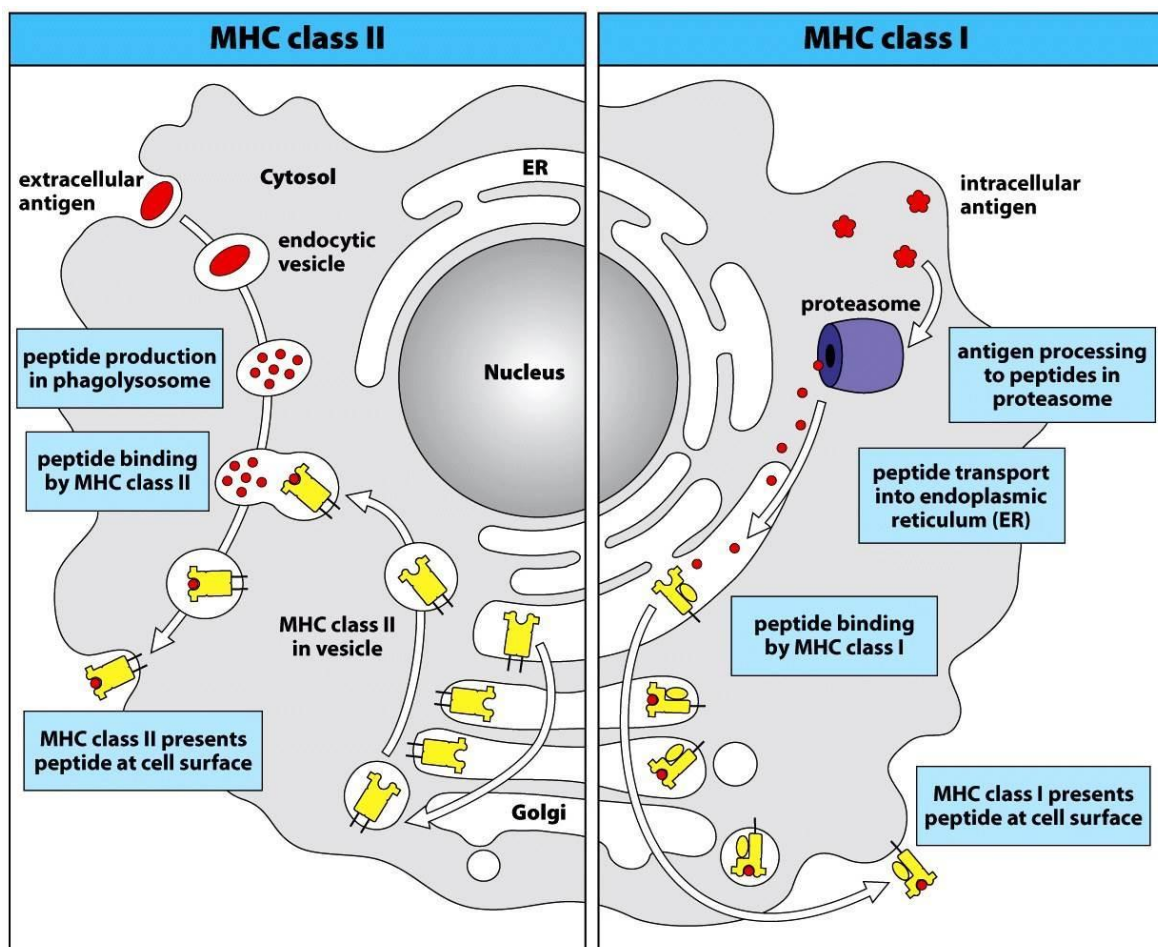


Figure 5.20 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

(Zdroj: <https://www.studyblue.com/notes/n/bio-3500-study-guide-2013-14-schwartz/deck/9568555>. Navštívené 3. 4. 2016)

3.4 Metody používané k vyšetření HLA systému

Pojmem HLA typizace označujeme určení konkrétních HLA znaků, které jsou přítomny u vyšetřovaného jedince. Pro HLA typizaci existují dva základní metodické přístupy, sérologické metody, které k HLA typizaci využívají specifické protilátky a molekulárně-genetické (DNA) metody, které cílí na úroveň HLA genů.

Sérologická typizace je historicky starší a určuje HLA antigeny exprimované na povrchu buněk. K základnímu vyšetření HLA znaků se využívá tzv. lymfocytotoxický test, založený na reakcích HLA antigenů na lymfocytech pacienta se sadou diagnostických protilátek, které s konkrétními antigeny specificky reagují. Tyto anti-HLA protilátky se s lymfocyty smíchají na tzv. Terasakiho plotničkách. V případě, že se anti-HLA protilátka naváže na příslušný antigen na povrchu lymfocytů, dojde mezi nimi k vazbě.

Tato vazba je poté zviditelněna přidáním komplementu, který usmrtí buňky s navázanými anti-HLA protilátkami a reakce je pozitivní. V opačném případě, kdy se HLA antigen, proti kterému je specifická protilátka namířena, na buňkách nenachází, nedojde k usmrcení buněk a reakce je negativní.

K HLA typizaci pomocí molekulárně genetických metod se jako výchozí materiál využívá genomická DNA získaná nejčastěji z krevních leukocytů vyšetřovaného jedince. V oblasti HLA typizace pomocí molekulárně-genetických metod se využívají zejména techniky založené polymerázové řetězové reakci (PCR), konkrétně modifikace PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP). Nejpřesnější výsledky HLA typizace poskytuje v současné době sekvenování HLA genů. Při molekulárně genetické typizaci HLA znaků rozlišujeme dvě základní úrovně rozlišení.

Typizace na úrovni nízkého rozlišení (příklad zápisu HLA-A*02, *03) odpovídá zhruba rozlišení základních HLA znaků sérologickými metodami a považuje se za dostatečnou úroveň typizace například pro transplantace ledvin. Typizace na úrovni vysokého rozlišení určuje jednotlivé HLA alely (příklad zápisu HLA-A*02:06, *03:01) a je nezbytná pro zajištění HSCT (Pospíšilová *et al.*, c2013).

Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) je metoda, která rozlišuje HLA varianty již na úrovni PCR. Pro daný lokus je typizační soustava tvořena jednotlivými primerovými páry komplementárními k určitým alelám. Pokud je vyšetřovaný jedinec nositelem dané alely, primery se naváží na její sekvenci a dojde k amplifikaci fragmentu DNA. Produkty PCR-SSP se poté detekují pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a následně jsou zviditelněny ultrafialovým zářením.

U polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP) nejdříve dochází k amplifikaci dané části *HLA* genu pomocí značených PCR primerů. Tyto naamplifikované fragmenty *HLA* genu jsou podrobeny hybridizaci s množstvím oligonukleotidových sond specifických pro dané alely. Po opakovaném promytí zůstanou na DNA sondách navázány pouze zcela komplementární značené DNA úseky, které se následně zviditelní, např. fluorescenčním signálem.

Typizace založená na sekvenování (SBT z angl. Sequencing-Based Typing) je nejpřesnější metoda HLA typizace, která slouží k určení přesného pořadí nukleotidů vybraných úseků (zejména exonů) *HLA* genů. Využívá se zejména pro HLA typizaci na úrovni vysokého rozlišení. Daná oblast *HLA* genu se naamplifikuje, výsledný produkt se přečistí a podrobí

sekvenační reakci s fluorescenčně značenými terminátory (ddNTPs). Vzniklé sekvenační fragmenty se dále analyzují při sekvenační elektroforéze. Získané sekvence se následně srovnávají s knihovnou *HLA* alel (Rohoň *et al.*, 2009). Kromě výše popsaného konvenčního způsobu sekvenování (modifikovaná metoda sekvenování dle Sangera) se v současné době do oblasti *HLA* typizace stále více prosazují metody tzv. sekvenování další generace (NGS, z angl. next-generation sequencing).

4. Materiál a metody

4.1 Studování jedinci a materiál

Pro experimentální část byly v anonymní formě použity výsledky vyšetření pacientů z Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL), jejich rodinných příslušníků a event. nepříbuzenských dárců. 109 hodnocených pacientů bylo indikováno v roce 2014 a 2015 k vyšetření *HLA* systému pro účely vyhledání vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk k transplantaci pro různá hemato-onkologická onemocnění nebo choroby spojené s poruchou krvetvorby.

Veškerá zde uváděná vyšetření byla provedena pracovníky *HLA* laboratoře Ústavu imunologie FNOL za použití standardních operačních postupů. Pro statistickou část (charakteristika studovaného souboru) byly použity výsledky molekulárně-genetické typizace lokusů *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* a klinické údaje 109 pacientů. Všichni jedinci zařazení do hodnoceného souboru nebo jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas k molekulárně-genetickému vyšetření *HLA* znaků.

V průběhu přípravy této bakalářské práce jsem se podrobně prakticky seznámila s molekulárně-genetickou typizací *HLA* znaků pomocí metody PCR-SSP (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery). Tato metoda byla použita k *HLA* typizaci všech hodnocených jedinců (u většiny pacientů v kombinaci s typizací založenou na sekvenování). Pracovní postup metody PCR-SSP je proto v experimentální části podrobně popsán.

4.2 Metody

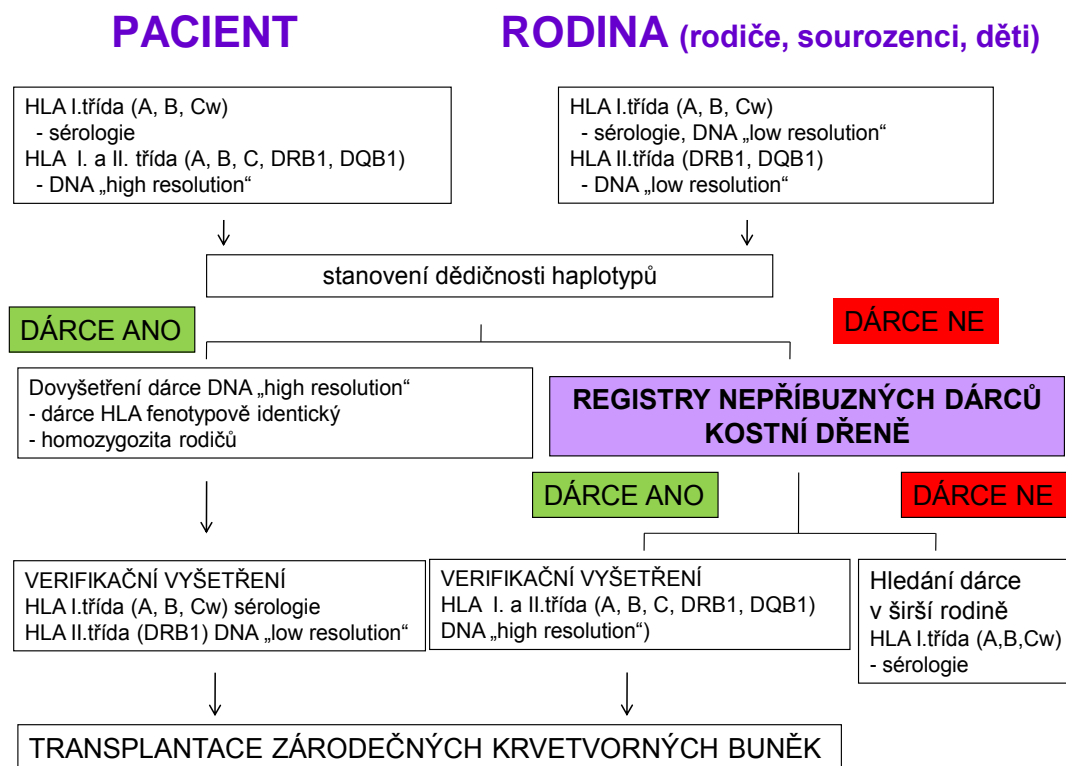
4.2.1 Strategie *HLA* vyšetření pro vyhledání dárce krvetvorných kmenových buněk

Vyšetření pro účely vyhledávání dárce pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk bylo vždy zahájeno na podkladě požadavku ošetřujícího lékaře z Hemato-onkologické

kliniky FNOL. Cílem vyšetření bylo nalezení dárce, který je s pacientem identický v HLA znacích lokusů HLA-A, -B, -C, DRB1 a DQB1 na úrovni vysokého rozlišení. Nejdříve byla u pacienta provedena sérologická typizace HLA-I. třídy a zároveň molekulárně-genetická typizace s vysokým rozlišením („high resolution“). Současně se provádí vyšetření rodinných příslušníků pacienta (rodiče, sourozenci, děti) sérologickou metodou (HLA-I. třídy) a metodou PCR-SSP na úrovni nízkého rozlišení (HLA-II. třídy).

Pokud má pacient v této fázi předběžně shodného dárce (nejčastěji sourozence) v rodině, musí být shoda definitivně potvrzena rodinnou studií (dědičnost haplotypů) nebo dovyšetřením předběžně shodného příbuzného na úrovni vysokého rozlišení. Před vlastní HSCT byla HLA shoda mezi pacientem a jeho shodným příbuzným potvrzena z nových vzorků (verifikační test). V případě, že pacient neměl vhodného dárce mezi rodinnými příslušníky, přistoupilo se k hledání v registru dobrovolných dárců krevetvorných kmenových buněk. Pokud ani zde nebyl nalezen vhodný dárce, vyšetřovala se u některých pacientů také širší rodina. Jestliže byl nalezen vhodný dárce v registru, přistoupilo se před HSCT opět k verifikačnímu vyšetření HLA (viz Obrázek 4).

Obrázek 4 - Schéma procesu hledání dárce pro transplantaci krevetvorných kmenových buněk na základě HLA shody mezi pacientem a dárce. Schéma převzato se svolením pracovníků HLA laboratoře Ústavu imunologie FNOL z dokumentace laboratoře. Podrobně vysvětlení v textu.



4.2.2 Izolace DNA na poloautomatickém izolátoru Nordiag Arrow

Použitá souprava „Arrow Blood DNA 500“ obsahovala jednorázové pumpičky s pipetovacími špičkami a kazety s roztoky k izolaci DNA. Před započítím izolace se do přístroje vkládaly prázdné eluční mikrozkušavky o objemu 1,5 ml pro zachycování DNA a 1,5ml mikrozkušavky se vzorkem krve. Přístroj provedl izolaci DNA v několika po sobě jdoucích krocích. Zprvu došlo k lýzi buněk, jejichž DNA byla následně navázaná na magnetické kuličky. DNA navázaná na magnetické kuličky byla několikrát promyta a mezi jednotlivými promýváními pomocí magnetického pole separována. Tento komplex částic s DNA byl poté resuspendován v elučním pufru a DNA bez magnetických částic separována do elučních mikrozkušavek. Po proběhnutí reakce byl eluát, který obsahoval DNA, ve flow boxu přepipetován do řádně popsanych 1,5ml mikrozkušavek. Následně bylo provedeno měření koncentrace vzorku získané DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

4.2.3 PCR-SSP

K provedení PCR-SSP bylo využito soupravy od firmy Olerup SSP podle návodu výrobce. Součástí soupravy byly pro každý HLA lokus plátky mikrozkušavek, které na dně obsahovaly lyofilizované primerové páry komplementární k určitému HLA alelám. Ve 1,5 ml mikrozkušavce byly smíchány v předepsaných množstvích jednotlivé reagenty: originální „master-mix“ pro PCR, deionizovaná voda, vzorek DNA pacienta a termostabilní „Taq“ DNA polymeráza (TopBio). Směs byla rozpipetována v objemu 10 μ l do mikrozkušavek s primery. Připravené mikrozkušavky s PCR směsí byly vloženy do termocykléru s teplotním profilem:

Začátek:

- 94 °C po dobu 2 minut

Opakující se cykly:

- 10 cyklů se střídáním teplot 94 °C po dobu 10 sekund a 65 °C po dobu 1 minuty
- 20 cyklů se střídáním teplot 94 °C po dobu 10 sekund, 61 °C po dobu 50 sekund a 72 °C po dobu 30 sekund

Závěr:

- 25 °C po dobu 1 minuty

V případě, že vyšetřovaná DNA obsahovala HLA alelu, ke které byly primery v dané zkumavce komplementární, došlo v této zkumavce k navázání primerů na sekvenci alely a amplifikaci daného fragmentu DNA.

4.2.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

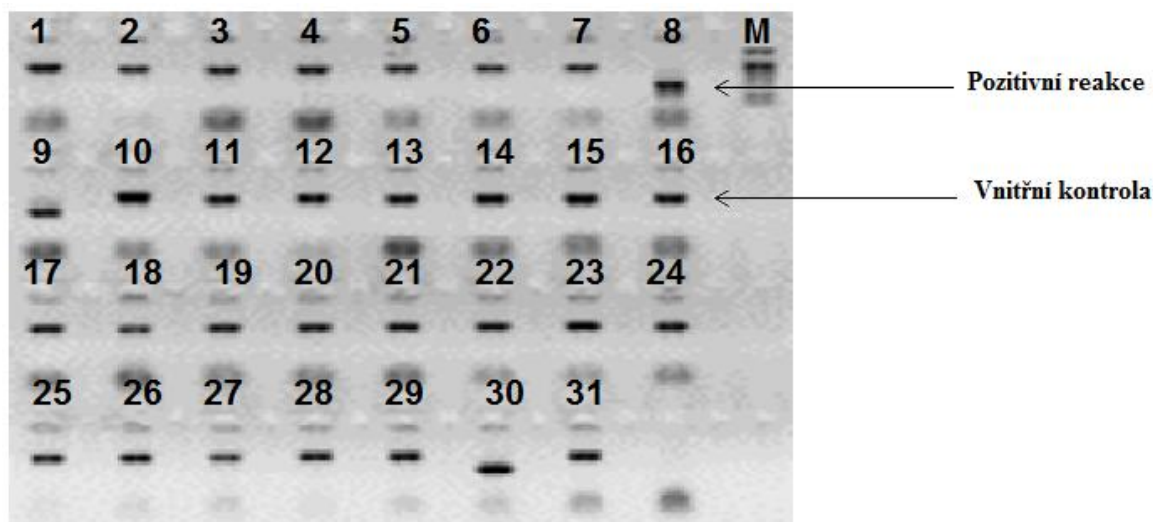
Do erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 2,4 g agarózy, přidáno 120 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru. Tato směs byla zamíchána a vařena v mikrovlnné troubě dokud se agaróza dokonale nerozpustila. Po vychladnutí gelu na přibližně 70 °C byl do něj vmíchán roztok ethidium bromidu (5 µl, 10mg/ml) a gel byl vlit do předem připravené misky s hřebeny, kde se nechal ztuhnout.

Do jednotlivých jamek v gelu bylo napipetováno 10 µl PCR produktu a do jedné jamky 10 µl originálního DNA velikostního markeru Olerup (50base pairs, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 1000bp). Elektroforetická vana se uzavřela víkem a připojila ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastaveného na 130 V po dobu 22 minut. Při elektroforéze došlo k rozdělení DNA fragmentů podle jejich velikosti, rychlost migrace v gelu byla nepřímo úměrná jejich velikosti.

4.2.5 Vyhodnocení gelu po elektroforéze

Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany a přemístěn na UV-transluminátor, kde došlo k vizualizaci DNA fragmentů. Byl vytvořen snímek gelu a uložen do databáze pro další práci s protokoly. Ve všech reakcích byly hodnoceny fragmenty vnitřní kontroly a v případě, že došlo k dokonalému navázání specifických primerů, byly v některých drahách identifikovány také specifické produkty – taková reakce byla hodnocena jako pozitivní (viz Obrázek 5). Samotná interpretace výsledků, zjištění HLA alel pacienta, bylo provedeno pomocí softwaru „SCORE“ a interpretačních tabulek pro jednotlivé typizační soupravy.

Obrázek 5 - Fotografie výsledků agaróзовé elektroforézy po PCR-SSP s vizualizací ampliconů pomocí UV transluminátoru. Jedná se o výsledek vyšetření HLA-DRB1 lokusu na úrovni nízkého rozlišení. Bylo provedeno 31 PCR (jednotlivé dráhy označeny čísly). Ve drahách č. 8, 9 a 30 vidíme specifické PCR produkty, které v gelu migrovaly rychleji (pozitivní reakce). M – velikostní DNA marker. Výsledný HLA typ je v tomto případě HLA-DRB1*04,*07 (podrobněji v textu).



5. Použité chemikálie a přístroje

5.1 Použité chemikálie

Agaróza (Serva)

Deionizovaná voda

Ethidium bromid (TopBio, Praha, originální roztok 10 mg/ml)

Olerup SSP DNA size marker (Stockholm, Švédsko)

Roztok 5x koncentrovaného TBE pufu

- 54 g TrizmaBase (Sigma)
- 40 g H₃BO₃ (Sigma)
- Rozpustit ve 200 ml deionizované vody
- Doplnit deionizovanou vodou na objem 1 l

Souprava Arrow Blood DNA 500 CE/IVD (Výrobce NorDiag, kat.č. 12.17.02)

Soupravy pro PCR-SSP od firmy Olerup SSP (Stockholm, Švédsko)

Termostabilní Taq DNA polymeráza (TopBio Praha)

5.2 Použité přístroje

Poloautomatický izolátor nukleových kyselin NorDiag Arrow

Centrifuga Hettich Universal 16R

Elektroforetická vana (Owl Scientific)

Elektronické váhy AND FA-200 (výrobce AND)

Flow box Skan Basel B48S

Fotoaparát Polaroid

Kodak Gel Logic Imaging Systém

Mikrovlnná trouba Le cygne electronics

Pipety Eppendorf v rozsahu 2 μ l do 1000 μ l

Příruční minicentrifuga Mini Labnet

Spektrofotometr Nanodrop ND-1000

Termocyklér DNA Engine Tetrad 2 (Biorad)

UV-transiluminátor EB20

Vortex VELP Scientific

Zdroj napětí Labnet 300V

6. Výsledky

V praktické části bakalářské práce byl sestaven a statisticky charakterizován soubor 109 pacientů indikovaných v roce 2014 a 2015 k vyšetření HLA znaků pro účely transplantace krvetvorných kmenových buněk v HLA laboratoři Ústavu imunologie FNOL. U všech pacientů byly pro HLA typizaci využity molekulárně-genetické metody, většina z pacientů byla vyšetřena na úrovni vysokého rozlišení HLA typizace. Základní charakteristika souboru pacientů je shrnuta v Tabulce 1. V hodnoceném souboru bylo zastoupeno 67 mužů a 42 žen. Průměrný věk pacientů při jejich prvním vyšetření byl 43,5 let, nejmladšímu pacientovi byly 3 měsíce a nejstaršímu 74 let. U 72 pacientů byli vyšetřeni také rodinní příslušníci, zpravidla rodiče, sourozenci nebo jiní příbuzní. Úplnou shodu v HLA znacích s jedním sourozencem mělo 28 pacientů, dva shodné sourozence měli 2 pacienti a 1 pacient byl shodný dokonce se třemi sourozenci. U 18 pacientů, kteří měli shodného jednoho nebo více sourozenců, byly dále provedeny verifikační testy. Verifikační testy jsou opakovaným vyšetřením pacienta a jeho vybraného potenciálního dárce krvetvorných buněk z nově odebraných vzorků biologického materiálu. Jejich účelem je vyloučit riziko chyby nebo záměny vzorku při úvodní HLA typizaci. U části pacientů, pro které nebyl nalezen v rodině shodný sourozenec, se přistoupilo k hledání vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk v registru dobrovolných dárců. 25 z těchto pacientů dospělo do fáze verifikačního testu s nepříbuzenským dárce. Z celkového počtu 43 verifikovaných pacientů byla u 35 z nich detekovaná úplná HLA shoda s dárce na úrovni vysokého rozlišení v obou znacích na lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1 (tzv. shoda 10/10). U zbylých 8 pacientů byla shoda pouze 9/10, v 6 případech se jednalo o neshodu na lokusu HLA-A, ve dvou případech na lokusu HLA-C. Nicméně i přes neúplnou shodu v HLA znacích proběhla u sedmi z osmi těchto pacientů HSCT. Průměrná doba od prvního vyšetření po provedení HSCT byla u příbuzenské transplantace 149 dní, u nepříbuzenské 150 dní. K transplantaci dospělo ve sledovaném období (přibližně do konce roku 2015) celkem 36 pacientů (ze 109 v souboru), z toho 25 mužů a 11 žen. U 12 pacientů byl dárce sourozenec, 24 pacientů našlo vhodného nepříbuzného dárce v registru. Mezi nejčastější onemocnění, pro která byli pacienti nakonec skutečně transplantováni, patřila akutní myeloblastická leukemie, akutní lymfoblastická leukemie, anémie (většinou aplastické) nebo myelodysplastické syndromy.

Tabulka 1 - Charakteristika souboru pacientů, jejich dárců a průběh vyšetření až po HSCT

Zastoupení mužů a žen	
Muži	67
Ženy	42
Věk pacienta při prvním vyšetření	
Nejstarší pacient	74 let
Nejmladší pacient	3 měsíce
Průměr	43,5 let
Vyšetření sourozenců (HLA shoda)	
Shoda s 1 sourozencem	28
Shoda se 2 sourozenci	2
Shoda se 3 sourozenci	1
Verifikace HLA vyšetření	
Příbuzenská - se sourozencem	18
Nepříbuzenská	25
Shoda v HLA znacích (u verifikovaných párů)	
Úplná (10/10)	35
Neúplná (9/10)	8
Přehled HLA neshod (u verifikovaných párů)	
Lokus HLA-A	6
Lokus HLA-C	2
Průměrná doba od 1. vyšetření po provedení HSCT	
Příbuzenská transplantace	149 dní
Nepříbuzenská transplantace	150 dní
Transplantace	
Celkem	36
Muži	25
Ženy	11
Dárce příbuzný	12
Dárce nepříbuzný	24
Základní diagnózy u transplantovaných pacientů	
Akutní myeloblastická leukemie	14
Akutní lymfoblastická leukemie	6
Anémie	6
Myelodysplastické syndromy	4
Hodgkinův lymfom	2
Chronická lymfocytická leukemie z B-buněk	1
Chronická myeloidní leukemie, BCR/ABL-pozitivní	1
B-buněčný lymfom z velkých buněk, difuzní	1
Idiopatická trombocytopenická purpura	1

V Tabulce 2 jsou shrnuta jednotlivá základní onemocnění, která se v celém hodnoceném souboru pacientů (N=109) vyskytovala (údaje převzaty ze žádanek na úvodní HLA vyšetření, v některých případech mohlo dojít k upřesnění nebo korekci finální diagnózy). Nejčastějším onemocněním byla akutní myeloblastická leukemie, která postihla 32 pacientů. Mezi další čtenější onemocnění patřila u 12 pacientů akutní lymfoblastická leukemie, u 8 pacientů chronická lymfocytická leukemie z B-buněk a u dalších 8 pacientů chronická myeloidní leukemie. Četnost dalších onemocnění v souboru již nebyla tak vysoká.

Tabulka 2 - Přehled základních diagnóz (při úvodním vyšetření) pacientů indikovaných k HLA typizaci pro účely HSCT (studovaný soubor N=109).

Onemocnění	Kód onemocnění	Výskyt u pacientů
Akutní myeloblastická leukemie	C920	32
Akutní lymfoblastická leukemie	C910	12
Chronická lymfocytická leukemie z B-buněk	C911	8
Chronická myeloidní leukemie, BCR/ABL-pozitivní	C921	8
Jiné myelodysplastické syndromy	D467	5
B-buněčný lymfom z velkých buněk, difuzní	C833	3
Jiné anemie z nedostatku železa, nespec.	D508	3
Aplastická anemie, nespec.	D619	3
Jiné určené poruchy bílých krvinek	D728	3
Klasický Hodgkinův lymfom nodulárně sklerotický	C811	2
Lymfom z plášťové zóny	C831	2
Jiné určené typy non-Hodgkinova lymfomu	C857	2
Myelodysplastický syndrom	D469	2
Esenciální (hemoragická) trombocytémie	D473	2
Anemie z nedostatku železa, nespec.	D509	2
Konstituční aplastická anemie	D610	2
Nemoc krve a krvetvorných orgánů, nespec.	D759	2
Zvětšené mízní uzliny, nespec.	R599	2
Burkittův lymfom	C837	1
T-buněčný lymfom, periferní, jinde neklasifikovaný	C844	1
Jiné lymfomy ze zralých T/NK-buněk	C845	1
Polycythaemia vera	D45	1
Refrakterní anemie bez prstenčitých sideroblastů	D460	1
Novotvary nejistého a neznámého chování z histiocyty a kmenových buněk	D470	1
Získaná hemolytická anemie, nespec.	D595	1
Idiopatická aplastická anemie	D613	1
Jiné určené aplastické anemie	D618	1

Onemocnění	Kód onemocnění	Výskyt u pacientů
Anemie, nespecifikovaná	D649	1
Idiopatická trombocytopenická purpura	D693	1
Sekundární trombocytopenie	D695	1
Trombocytopenie, nespecifikovaná	D696	1
Agranulocytóza	D70	1

U nejčastěji zastoupených onemocnění v hodnoceném souboru bylo v tabulce 3 ještě provedeno srovnání výskytu mezi muži a ženami. Akutní myeloblastické leukemie, chronická lymfocytická leukemie z B-buněk a chronická myeloidní leukemie s pozitivním onkogenem *BCR/ABL* byly mírně častěji zastoupeny u mužů než u žen. Naproti tomu akutní lymfoblastická leukemie se častěji vyskytovala u žen než u mužů.

Tabulka 3 - Zastoupení nejčastějších onemocnění u mužů a žen v hodnoceném souboru. Počty nemocných s danou diagnózou jsou vztaženy na celkový počet mužů a žen (za lomítkem).

Akutní myeloblastická leukemie	
Muži	22/67
Ženy	10/42
Akutní lymfoblastická leukemie	
Muži	3/67
Ženy	9/42
Chronická lymfocytická leukemie z B-buněk	
Muži	6/67
Ženy	2/42
Chronická myeloidní leukemie, BCR/ABL-pozitivní	
Muži	6/67
Ženy	2/42

Jedním z hlavních cílů statistického hodnocení studovaného souboru bylo určení zastoupení jednotlivých HLA alel mezi pacienty. Pro tuto statistiku bylo vybráno pouze 98 pacientů, u kterých byla provedena HLA genotypizace s vysokým rozlišením. V Tabulce 4 je shrnut výskyt jednotlivých HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1 alel v absolutním počtu, podíl na celkovém počtu alel na lokusu (alelická frekvence) a četnost případných homozygotů pro danou alelu. Nejvariabilnějším lokusem, pokud jde o počet pozorovaných alel, byl lokus HLA-B následován lokusy HLA-DRB1, -C, -A a -DQB1. V několika případech měli pacienti pro daný HLA lokus jedinou alelu, tudíž byli pro danou alelu homozygotní. Jednalo se zpravidla o homozygoty pro alely, které se v daném souboru

vyskytovaly nejčastěji. Na lokusu HLA-A jsme identifikovali 13 homozygotních pacientů, na lokusu HLA-C 11 a na lokusu HLA-DRB1 celkem 14 homozygotních pacientů. Podle očekávání byli na nejvariabilnějším lokusu HLA-B zjištěni pouze 4 homozygotní pacienti, oproti tomu nejméně variabilní lokus HLA-DQB1 byl charakterizován 18 homozygoty.

Tabulka 4 – Zastoupení HLA alel na jednotlivých lokusech ve studovaném souboru pacientů (hodnoceno u 98 pacientů s kompletním HLA vyšetřením na úrovni vysokého rozlišení). Uveden je absolutní počet alel, jejich podíl na celkovém počtu alel pro daný lokus (alelická frekvence) a zastoupení všech homozygotů pro jednotlivé alely.

HLA-A alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
02:01	47	24,0	8x
01:01	33	16,8	3x
03:01	26	13,3	1x
24:02	25	12,8	1x
26:01	15	7,7	
25:01	10	5,1	
11:01	7	3,6	
68:01	6	3,1	
23:01	5	2,6	
29:02	4	2,0	
31:01	4	2,0	
32:01	4	2,0	
30:01	2	1,0	
30:02	2	1,0	
33:03	2	1,0	
26:08	1	0,5	
29:01	1	0,5	
34:02	1	0,5	
66:01	1	0,5	
HLA-B alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
07:02	24	12,2	2x
08:01	22	11,2	
51:01	14	7,1	
38:01	11	5,6	1x
15:01	11	5,6	
57:01	10	5,1	
13:02	9	4,6	
44:02	9	4,6	1x
44:03	9	4,6	
39:01	7	3,6	
35:01	7	3,6	
18:01	7	3,6	
40:01	6	3,1	
35:03	6	3,1	

HLA-B alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
40:02	4	2,0	
27:05	4	2,0	
27:02	4	2,0	
52:01	3	1,5	
35:02	3	1,5	
56:01	2	1,0	
50:01	2	1,0	
49:01	2	1,0	
44:05	2	1,0	
37:01	2	1,0	
18:03	2	1,0	
15:17	2	1,0	
58:01	1	0,5	
48:01	1	0,5	
47:01	1	0,5	
44:27	1	0,5	
41:02	1	0,5	
39:06	1	0,5	
15:24	1	0,5	
15:08	1	0,5	
14:02	1	0,5	
14:01	1	0,5	
08:18	1	0,5	
HLA-C alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
07:01	33	16,8	3x
07:02	27	13,8	2x
06:02	23	11,7	
04:01	21	10,7	1x
12:03	18	9,2	1x
02:02	14	7,1	2x
01:02	10	5,1	
05:01	9	4,6	1x
03:04	8	4,1	
03:03	8	4,1	
15:02	4	2,0	
07:04	4	2,0	1x
12:02	3	1,5	
08:02	3	1,5	
16:01	2	1,0	
14:02	2	1,0	
17:03	1	0,5	
16:02	1	0,5	

HLA-C alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
15:05	1	0,5	
15:04	1	0,5	
08:03	1	0,5	
04:09	1	0,5	
03:02	1	0,5	
HLA-DRB1 alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
07:01	31	15,8	2x
15:01	25	12,8	4x
03:01	22	11,2	1x
11:01	21	10,7	3x
13:01	16	8,2	3x
01:01	10	5,1	
04:01	9	4,6	
16:01	8	4,1	
12:01	8	4,1	
11:04	8	4,1	1x
08:01	8	4,1	
13:02	5	2,6	
14:54	4	2,0	
13:03	3	1,5	
04:04	3	1,5	
15:02	2	1,0	
10:01	2	1,0	
04:07	2	1,0	
16:02	1	0,5	
14:04	1	0,5	
13:05	1	0,5	
11:12	1	0,5	
08:03	1	0,5	
08:02	1	0,5	
04:06	1	0,5	
04:03	1	0,5	
01:02	1	0,5	
HLA-DQ1 alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
03:01	50	25,5	8x
06:02	23	11,7	4x
02:01	22	11,2	1x
02:02	19	9,7	2x
06:03	18	9,2	3x
05:01	12	6,1	
03:03	12	6,1	
05:02	9	4,6	
04:02	9	4,6	
03:02	9	4,6	

HLA-DQ1 alely	Výskyt u pacientů	Četnost alely v souboru pacientů [%]	Zastoupení alely v homozygotním stavu
06:04	5	2,6	
05:03	5	2,6	
06:01	2	1,0	
05:04	1	0,5	

7. Diskuze

V praktické části této bakalářské práce byl analyzován soubor 109 pacientů s chorobami (většinou hemato-onkologickými), u kterých lze uvažovat o léčbě pomocí HSCT. Tito pacienti byli indikováni k vyhledávání vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk pro transplantaci a byly proto u nich vyšetřeny HLA znaky. K HLA typizaci byly použity sérologické a molekulárně-genetické metody, z nich konkrétně PCR-SSP a typizace založená na sekvenování. U většiny vyšetřovaných pacientů (N=98) byla provedena typizace na lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1 na úrovni vysokého rozlišení. Ze 109 vyšetřených pacientů byla ve sledovaném období pouze u 36 (přibližně u 1/3 pacientů) provedena HSCT. Příčiny relativně nízkého podílu skutečně transplantovaných pacientů ze všech vyšetřených jsou následující: 1) U některých pacientů mohlo dojít po upřesnění jejich diagnózy ke zvolení jiného typu léčby, 2) U části pacientů nebyla HSCT nutná vzhledem k úspěchu primární léčby (např. u části aplastických anémií), 3) U části pacientů byla HSCT kontraindikována vzhledem k dalším přidruženým chorobám nebo pokročilému věku. 4) V některých případech mohlo dojít rovněž v důsledku rychlého vývoje onemocnění nebo komplikací při chemoterapii k úmrtí pacientů. 5) Je velmi pravděpodobné, že část pacientů, kteří jsou aktuálně v remisi onemocnění a HSCT aktuálně nepotřebují, budou ještě transplantaci potřebovat v budoucnu.

Z hlediska typu dárce byl pro 1/3 transplantovaných pacientů využit jejich sourozenec, zbývajících 2/3 transplantovaných pacientů našlo vhodného nepříbuzného dárce v registru dobrovolných dárců. Tyto údaje jsou v souladu s aktuálními trendy v oblasti alogenních transplantací krvetvorných kmenových buněk, kdy stále více narůstá podíl transplantací od nepříbuzenských dárců. To souvisí také s výrazným zlepšením dostupnosti nepříbuzenských dárců vzhledem k nárůstu jejich počtu a také výraznému pokroku v metodice HLA typizace (zejména aplikaci přesných, molekulárně genetických metod). Z klinického hlediska je ovšem důležité, že je stále zhruba čtvrtina pacientů transplantována od nepříbuzenského dárce bez kompletní shody v HLA znacích, což potvrzují i naše data.

Průměrná doba mezi prvním vyšetřením pacienta a samotnou HSCT byla u příbuzenských i nepříbuzenských dárců podobná a dosahovala přibližně 150 dní. Časový faktor je u HSCT považován za velmi důležitý, zjistilo se totiž, že čím dříve od stanovení diagnózy je HSCT provedena, tím má u řady diagnóz lepší výsledky.

Z hlediska indikací k HSCT byli v našem souboru nejčastěji transplantováni pacienti s AML, ALL, aplastickými anémiemi nebo myelodysplastickými syndromy. Zastoupení diagnóz v našem souboru transplantovaných pacientů je tak velmi podobné s údaji, které uvádějí evropské statistiky.

Zastoupení základních chorob v našem souboru bylo orientačně srovnáno mezi pohlavími s údaji uvedenými ve statistice National Cancer Institute pro dané onemocnění. Pro AML, ALL, CML i chronickou lymfocytární leukemii v jejich statistice prováděné u pacientů v letech 2009 - 2013 platí, že se tato onemocnění vyskytují více u mužů než u žen (<http://seer.cancer.gov/statfacts/>). V souboru pacientů hodnoceném v této bakalářské práci se AML, CML a chronická lymfocytární leukemie objevovaly více u mužů, nicméně ALL se dvakrát více vyskytovala u žen, což však může být zkresleno malým celkovým počtem ALL v našem souboru. Náš soubor také není reprezentativní pro jednotlivé diagnózy, protože byl primárně sestaven pro účely HSCT.

V současnosti je známo u HLA-I. třídy nejvíce popsanych alel na lokusu HLA-B, poté HLA-A a nejméně na lokusu HLA-C. U II. třídy HLA glykoproteinů je nejpočetnější lokus HLA-DRB1, méně alel bylo identifikováno na lokusu HLA-DQB1 (<http://www.hla.alleles.org/proteins/class1.html>). V souboru pacientů hodnoceném v této bakalářské práci bylo podle očekávání pozorováno nejvíce alel na lokusu HLA-B, méně na lokusu HLA-C a nejméně HLA-A (pořadí variability lokusů HLA-A a HLA-C zde bylo opačné než v celosvětové databázi). U HLA glykoproteinů II. třídy bylo u našich pacientů pozorováno mnohem více různých alel na lokusu HLA-DRB1 než u lokusu HLA-DQB1, což odpovídá celkovému polymorfismu těchto lokusů. Variabilita jednotlivých HLA genů nesouvisí přímo s jejich pozicí na chromozomu, ale vyskytují se zde regiony se silnou vazebnou nerovnováhou, kde se alela jednoho lokusu (HLA-DRB1*15:01) častěji váže s konkrétní variantou z jiného lokusu (HLA-DQB1*06:02). Celkově bylo zastoupení HLA alel v našem souboru pacientů velmi podobné distribuci v běžné (zdravé) české populaci. To bylo patrné zejména v pořadí nejčetnějších alel na všech lokusech. Přesto se nám v našem souboru podařilo identifikovat několik poměrně vzácných variant (HLA-B*15:08, B*08:18, C*04:09).

8. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala tématu transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT) a zajištění tkáňové shody mezi pacientem a dárce pro tento typ transplantace. V literárním přehledu jsem se zaměřila na různé aspekty HSCT (kmenové buňky a jejich zdroje, hlavní indikace, komplikace) a zahrнула i základní charakteristiku HLA systému a hemato-onkologických onemocnění, pro které je HSCT nejčastěji indikována.

V experimentální části jsem sestavila, analyzovala a statisticky hodnotila soubor 109 pacientů, u kterých byly HLA znaky vyšetřeny pomocí molekulárně - genetických metod a výsledky porovnávala s obecně dostupnými údaji. Nejdůležitějšími hodnocenými údaji byl podíl skutečně transplantovaných pacientů z celkového počtu indikovaných, zastoupení příbuzenských a nepříbuzenských transplantací, průměrná doba od prvního vyšetření pacienta po samotné provedení transplantace a zastoupení jednotlivých HLA alel v souboru. Z celkového počtu 109 pacientů bylo ve sledovaném období transplantováno 36 (1/3 pacientů). Jak se ukázalo, průměrná doba od prvního vyšetření HLA znaků k provedení HSCT, byla velmi podobná u pacientů s příbuzenským i nepříbuzenským dárce. Z 36 transplantovaných pacientů jich 24 našlo vhodného dárce v registru dobrovolných dárce, což ukazuje nepostradatelnou úlohu těchto registrů při transplantacích.

9. Seznam použitých zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
APC	antigen-presenting cells - antigen prezentující buňky
CDK	cyklin dependentní kinasa
CML	chronická myeloidní leukemie
DNA	deoxyribonucleic acid - deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
G-CSF	růstový faktor pro granulocyty
GVHD	graft versus host disease - reakce štěpu proti hostiteli
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	human leukocytes antigens - lidské leukocytární antigeny
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation - transplantace krvetvorných kmenových buněk
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
KD	kostní dřen
LL	lymfoblastický lymfom
MDS	myelodysplastický syndrom
MHC	major histocompatibility complex - hlavní histokompatibilní komplex
NK	natural killers - přirození zabíječi (buňky)
PCR	polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
SSOP	sequence-specific oligonucleotide probe
SSP	sequence-specific primers - sekvenčně specifické primery
TCR	receptor pro antigen
TK	tyrosinová kinasa
TKD	transplantace kostní dřeně
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
UV	ultraviolet - ultrafialové (záření)

10. Použité zdroje

Amos, D. B., Bach, F. H. (1968): Phenotypic expressions of the major histocompatibility locus in man (HL-A): leukocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity. *The Journal of Experimental Medicine* 128, 623-637.

Appelbaum, B. M. (2001): Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411, 385-389.

Ballen, K. K., Koreth, J., Chen, Y. B., et al. (2012): Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant (Review). *Blood* 119, 1972-1980.

Bárta, T. (2010): Od fyziologie k medicíně: aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití. 1st ed., Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.

Billingham, R. E. (1966-1967): The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lectures* 62, 21-78.

Bose, B., Johnson, D. V., Campbell, S. B. (2013): Transplantation antigens and histocompatibility matching. In: *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation* (Rath, T., ed.), InTech, 371-390.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., Robertson, E. (1984): Formation of gem-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.

Butler, M., Fonarow, G. C., Zileetal, M. R. (2014): Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction: current state and future directions. *Journal of the American College of Cardiology* 2 (2), 97-112.

Cairo, M. S., Raetz, E., Lim, M. S., et al. (2005): Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma: New insights in biology and critical challenges for the future. *Pediatr Blood Cancer* 45, 753-769.

Carlens, S., Ringden, O., Remberger, M., Lonnqvist, B., Haglund, H., Klaesson, S., et al. (1998): Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplantation* 22, 755-761.

Carpenter, P. A., Macmillan, M. L. (2010): Management of acute graft-versus-host disease in children. *Pediatr Clinics of North America* 57, 273-295.

Carter, M. C., Metcalfe, D. D., Komarow, H. D. (2014): Mastocytosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 34 (1).

Cresswell, P. (1994): Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annual review of Immunology* 12, 259-293.

- Dejbakhsh-Jones, S., Jerabek, L., Weissman, I. L., Strober, S. (1995): Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells. *Journal of Immunology* 155, 3338-3344.
- Doležal, A., Černý, D., Doležal, T. (2013): Kmenové buňky: etické a právní aspekty výzkumu. Ústav státu a práva AV ČR, Edice Kabinetu zdravotnického práva a bioetiky, Praha.
- Dustin, M. L. (2001): Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *Journal of Clinical Immunology* 21, 258-263.
- Dwyre, D. M., Holland, P. V. (2008): Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Vox Sanguinis* 95, 85-93.
- Dzierzak, E., Speck, N. A. (2008): Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* 9, 129-136.
- Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P., Holler, E. (2009): Graft-versus-Host Disease. *Lancet* 373 (9674), 1550-1561.
- Ferrara, J. L., Deeg, H. J. (1991): Graft-versus-host disease. *The New England Journal of Medicine* 324, 667-674. (Ferrara et Deeg, 1991)
- Flowers, M. E. D., Inamoto, Y., Carpenter, P. A., et al. (2011): Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 117, 3214-3219.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., et al. (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 18, 295-304.
- Grufferman, S., Delzell, E. (1984): Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiologic reviews* 6, 76-106.
- Hasenclever, D., Diehl, V. (1998): A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine* 339 (21), 1506-1514.
- Hill, G. R., Ferrara, J. L. (2000): The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-2759.
- Hořejší, V. (2013): MHC glykoproteiny-prezentace peptidových fragmentů. In: *Základy imunologie*. 5th ed., Triton, Praha, 72-81.
- Chase, A., Huntly, B. J., Cross, N. C. (2001): Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14, 553-571.

- Chinen, J., Buckley, R. H. (2010): Transplantation immunology: Solid Organ and bone marrow. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2), 324-335.
- Inaba, H., Greaves, M., Mullighan, C. G. (2013): Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381, 9881.
- Kantarjian, H. M., Dixon, D., Keating, M. J., et al. (1988): Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 61, 1441-1446.
- Kavan, P., Starý, J., Koutecký, J. (1998): Transplantace kostní dřeně: průvodce pro pacienty i zdravotníky. 1st ed., Makropulos, Praha, 79 stran.
- Klein, J. (1986): Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley, New York.
- Koc, S., Leisenring, W., Flowers, M. E., et al. (2002): Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 100, 48-51.
- Kohlmann, A., Haschke-Becher, E., Wimmer, B., et al. (2008): Intraplatform reproducibility and technical precision of gene expression profiling in 4 laboratories investigating 160 leukemia samples: the DACH study. *Clinical Chemistry* 54, 1705-1715.
- Kohlmann, A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., et al. (2008): An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in Leukemia study prephase. *British Journal of Haematology* 142, 802-807.
- Koledová, Z. (2011): Kmenové buňky: využití ve výzkumu a klinické praxi. Univerzita Palackého, Olomouc, 54 stran.
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. et al. (1994): Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23), 10962-10966.
- Kurtzberg, J. (2009): Update on umbilical cord blood transplantation. *Current Opinion in Pediatrics* 21, 22-29.
- Lee, S. J., Vogelsang, G., Flowers, M. E. (2003): Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9, 215-233.
- Liu, J., et al. (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.

- MacMillan, M. L., Weisdorf, D. J., Wagner, J. E., et al. (2002): Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 8, 387-394.
- Nowell, P. C., Hungerford, D. (1960): A minute chromosome in human granulocytic leukaemia. *Science* 132, 1490-1501.
- O'Malley, D. P. (2007): Benign extramedullary myeloid proliferations. *Modern Pathology* 20, 405-415.
- Orkin, S. H. (2000): Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics* 1, 57-64.
- Osgood, E. E., Riddle, M. C., Mathews, T. J. (1939): Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Annals of Internal Medicine* 13, 357-367.
- Ostró, A., Lešník A., Lešník, F. (2008): *Biologické aspekty regenerační medicíny*. 1st ed., Nakladatelství Olomouc, Olomouc.
- Padmanabhan, A., Reich-Slotky, R., Jhang, J. S., Dael, S., Crowder, T., Colovai, A. I. et al. (2009): Use of the haematopoietic progenitor cell parameter in optimizing timing of peripheral blood stem cell harvest. *Vox Sanguinis* 97, 153-159.
- Pessina, A., Gribaldo, L. (2006): The key role of adult stem cells: Therapeutic perspectives. *Current Medical Research and Opinion* 22, 2287-2300.
- Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J. (c2013): *Molekulární hematologie*. 1st ed., Galén, Praha.
- Przepiorka, D., et al. (1996): Tacrolimus and minidose methotrexate for prevention of acute graft-versus-host disease after matched unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 88, 4383-4389.
- Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H. G., Beatty, P., Hows, J., Thomas, E. D. (1995): 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplantation* 15, 825-828.
- Pui, C. H., Robinson, L. L., Look, A. T. (2008): Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030-1043.
- Ratanatharathorn, V., Nash, R. A., Przepiorka, D., et al. (1998): Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 92, 2303-2314.
- Rekers, P. E., Coulter, M. P., Warren, S. L. (1950): Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. *Archives of Surgery* 60, 635-667.

- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000): Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 18, 399-404.
- Rezvani, A. R., Storb, R. F. (2012): Prevention of graft-vs.-host disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 13 (12), 1737-1750.
- Rohoň, P. (2009): Imunogenetika transplantace krvetvorných kmenových buněk. In: *Molekulární biologie v hematologii - od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. 1st ed., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 81-90.
- Rowley, J. D. (1973): Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.
- Ruutu, T., et al. (2013): Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplantation*.
- Sandlund, J. T., Downing, J. R., Crist, W. M. (1996): NonHodgkin's lymphoma in childhood. *The New England Journal of Medicine* 334, 1238-1248.
- Scadden, D. T. (2006): The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075-1079.
- Sekeres, M. A. (2011): Epidemiology, natural history, and practice patterns of patients with myelodysplastic syndromes in 2010. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 9, 57-63.
- Shlomchik, W. D. (2007): A comprehensive review of the immune response underlying acute GVHD. *Nature Reviews Immunology* 7, 340-352.
- Shulman, H. M., Kleiner, D., Lee, S. J., et al (2006): Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. Pathology Working Group report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12, 31-47.
- Schofield, R. (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Storb, R., et al. (1986): Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *New England Journal of Medicine* 314, 729-735.
- Švojrová, M., Koza, V., Hamplová, A. (2011): *Transplantace kostní dřeně: průvodce Vaší léčbou*. 2nd ed., Apexart, Plzeň, 126 stran.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblast by Defined Factors. *Cell* 131, 861-872.

- Tefferi, A., Thiele, J., Vardiman, J. W. (2009): The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms order out of chaos. *Cancer* 115, 3842-3847.
- Tefferi, A., Vardiman, J. W. (2009): Myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* 361 (19), 1872-1885.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C., Ferrebee, J. W. (1957): Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* 257, 491-496.
- Thomson, J. A. (1998): Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145-1147.
- Valent, P., Akin, C., Escribano, L., et al. (2007): Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *European Journal of Clinical Investigation* 37, 435-453.
- Van Rood, J. J. (1968): The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Seminars in Hematology* 5, 187-214.
- Vaňásek, J. (1996): *Transplantace kostní dřeně*. 1st ed., Galén, Praha, 191 stran.
- Vokurka, S. (2008): *Základní hemato-onkologická onemocnění a jejich charakteristiky*. 1st ed., Galén, Praha.
- Wagner, C. S., Grotzke, J. E. Cresswell, P. (2012): Intracellular events regulating cross-presentation. *Frontiers in Immunology* 3, 138.
- Weisdorf, D. J., Hurd, D., Carter, S., et al. (2003): Prospective grading of graft-versus-host disease after unrelated donor marrow transplantation: a grading algorithm versus blinded expert panel review. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9, 512-518.
- Weiss, L. M. (2000): Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. *Current Oncology Reports* 2 (2), 199-204.
- Welniak, L. A., Blazar, B. R., Murphy, W. J. (2007): Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual Review of Immunology* 25, 139-170.
- Wobus, A. M., Boheler, K. R. (2005): Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews* 85 (2), 635-678.

Internetové zdroje:

Pasquini, M. C., Wang, Z.: Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation 2013 [pptx] [online] [cit. 2016-3-30] Dostupné z: <http://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/Documents/2013%20Summary%20Slides-%20Final%20Web%20Version%20%20V2%204.14.2014.pptx>

National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program [online] [cit. 2016-4-15] Dostupné z: <http://seer.cancer.gov/statfacts/>

HLA Nomenclature [online] [cit. 2016-4-16] Dostupné z: <http://www.hla.alleles.org/proteins/class1.html>