

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**SOUVISLOST IMUNOGENETICKÝCH FAKTORŮ S
ALOIMUNIZACÍ PROTI ANTIGENŮM ČERVENÝCH
KRVINEK**

Dizertační práce

Mgr. Alena Malušková

Školitel: prof. MUDr. František Mrázek, Ph.D.

Olomouc 2021

Obsah

1	PODĚKOVÁNÍ	4
2	ÚVOD	5
3	OBEČNÁ ČÁST	6
3.1	Úvod do problematiky.....	6
3.2	Aloimunizace a krevní transfuze.....	6
3.3	Imunogenicita, respondeři a nonrespondeři	7
3.4	Vliv transfuzní terapie na stupeň aloimunizace	8
3.5	Úloha HLA molekul v imunitní odpovědi	9
3.6	Asociace HLA s tvorbou protilátek proti antigenům trombocytů (HPA).....	13
3.7	HLA asociace s tvorbou protilátek proti antigenům červených krvinek.....	14
3.7.1	Rh systém.....	15
3.7.2	Kell (K) systém.....	17
3.7.3	Kidd (Jk) systém	18
3.7.4	Duffy (Fy) systém.....	18
3.7.5	MNS systém.....	19
3.8	Multirespondeři	21
3.9	Non HLA faktory a aloimunizace	21
3.10	Vliv deleukotizace a délky skladování erytrocytových TP na aloimunizaci	25
3.11	HLA a nemoci	27
4	SPECIÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Cíle dizertační práce.....	28
4.2	Pacienti a metodické přístupy	28
4.2.1	Skupina responderů	28
4.2.2	Skupina nonresponderů	31
4.2.3	Kontrolní soubor	32
4.3	Izolace DNA.....	32
4.4	Genotypizace <i>HLA-DRB1</i> a <i>DQA1/DQB1</i>	33
4.5	Vyšetření RH genotypu u skupiny nonresponderů	36
4.6	Imunohematologická vyšetření	36
4.6.1	Identifikace erytrocytových protilátek.....	37
4.6.2	Screening erytrocytových protilátek	37
4.6.3	Vyšetření krevní skupiny AB0 a antigenu RhD	37

4.7	Statistická analýza	37
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Monorespondeři a kontrolní soubor	39
5.2	Multirespondeři a kontrolní soubor	47
5.3	RhD negativní a RhD pozitivní multirespondeři	51
5.4	Nonrespondeři a kontrolní soubor	55
5.5	Nonrespondeři a multirespondeři	56
5.6	RhD negativní a RhD pozitivní nonrespondeři	57
6	DISKUZE A ZÁVĚR	58
7	SOUHRN	64
8	SUMMARY	66
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68
10	PŘEHLED LITERATURY	71
11	SEZNAM PUBLIKACÍ A ABSTRAKT	80
11.1	Práce související s dizertační prací (Přílohy dizertační práce).....	80
11.2	Publikovaná abstrakta	80
12	PŘÍLOHY - PUBLIKACE V SOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ (SEPARÁTNÍ VÝTISKY)	82

1 PODĚKOVÁNÍ

Poděkování věnuji v první řadě mému školiteli, **prof. MUDr. Františku Mrázkovi, Ph.D.**, za velkou pomoc, profesionalitu, lidský přístup a podporu, kterou mi poskytoval v celém průběhu studia.

Práce vznikla na oddělení Krevního centra Fakultní nemocnice Ostrava, v HLA/DNA laboratoři. Ráda bych poděkovala všem svým kolegyním z HLA/DNA laboratoře za veškerou pomoc a podporu a zejména **Mgr. Petře Kovářové** za pomoc při vymezení tématu mé práce. Dále děkuji primárce **doc. MUDr. Zuzaně Čermákové, Ph.D., MHA** za vstřícnost a loajálnost během mého studia. Rovněž děkuji kolegovi **MUDr. Martinu Kořístkovi** za pomoc při výběru pacientů do studie a odborné imunohematologické konzultace.

Děkuji **prof. MUDr. Evženu Weiglovi, CSc.**, předsedovi oborové rady doktorského studijního programu Lékařská imunologie na LF UP v Olomouci, za profesionální a lidský přístup při dohledu nad mým studiem, včetně oborové a státní zkoušky.

Děkuji Ing. Helze Hromádkové a celému týmu pracovníků Děkanátu LF UP v Olomouci za vstřícný přístup a formální zajištění doktorského studia.

Závěrem si dovoluji poděkovat také své rodině za všestrannou podporu a pochopení.

2 ÚVOD

Jako studentka kombinované formy DSP v oboru Lékařká imunologie jsem výzkumnou část práce prováděla na svém domovském pracovišti v Ostravě. Pracuji jako vedoucí HLA/DNA laboratoře Krevního centra FN Ostrava, kde se mimo jiné zabýváme vyšetřováním HLA systému. Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na hledání vztahu mezi variantami HLA-II. třídy a aloimunizací proti antigenům červených krvinek. Při své práci jsem měla možnost opřít se o zkušenosti kolegů a kolegyně z úseku Imunohematologie Krevního centra, a především díky jejich podpoře se podařilo nashromáždit potřebný soubor pacientů do studie.

V obecné části DP shrnuji dosavadní poznatky o příčinách aloimunizace proti non-AB0 erytrocytovým antigenům a prokázaných asociacích mezi HLA antigeny II. třídy a tvorbou erytrocytových protilátek. Podstatná část textu obecné části DP byla vydána jako přehledový článek v r. 2016 v časopise *Transfuze a Hematologie dnes*. Speciální část obsahuje údaje o zastoupení studovaných HLA znaků u pacientů rozdělených podle přítomnosti erytrocytových protilátek na monorespondery, multirespondery a nonrespondery. Stěžejní část výsledků byla publikována v mezinárodním časopise s IF, *Vox Sanguinis* (2017) [58]. HLA varianty jsme navíc porovnali u podskupiny multiresponderů dle Rh statusu s cílem určit vztah mezi HLA, Rh fenotypem a tvorbou erytrocytových protilátek. Tyto výsledky byly publikovány rovněž v časopise s IF, *Bratislava Medical Journal* (2021) [105]. Všechny tři zmíněné články jsou součástí DP jako Přílohy. Publikace uvedená jako Příloha 2 [58] byla již opakovaně citována a byla jí udělena Cena děkana Lékařské fakulty UP v Olomouci za nejlepší studentskou vědeckou práci v doktorském studijním programu za rok 2017.

Práce byla podpořena grantem v rámci Institucionální podpory MZ ČR - RVO-FNOs/2014 a částečně Interními granty LF UPOI: IGA_LF_2016_011 a IGA_LF_2020_016.

3 OBECNÁ ČÁST

3.1 Úvod do problematiky

Výskyt aloimunních protilátek proti povrchovým antigenům červených krvinek je důsledkem transfuze plně nekompatibilních transfuzních přípravků. Podobně příčinou výskytu aloprotilátek u gravidních žen je inkompatibilita mezi erytrocytovými antigeny plodu a matky. Výskyt aloprotilátek může mít klinické důsledky v podobě potransfuzní reakce či hemolytického onemocnění novorozence a plodu. V transfuzním lékařství představují aloprotilátky komplikaci při zajišťování odpovídajících TP pro pacienty chronicky transfundované. Ve své práci se zaměřuji především na příjemce transfuzních přípravků, které lze z hlediska tvorby aloprotilátek rozdělit na respondery a nonrespondery. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o aloimunizaci z hlediska odpovědi na aloantigeny, zaměřit se na rizikové faktory aloimunizace, a především na vztah mezi výskytem protilátek a přítomností určitých HLA molekul II. třídy.

3.2 Aloimunizace a krevní transfuze

Aloimunizace je imunitní proces, při kterém dochází k tvorbě protilátek namířených proti antigenům jiného jedince téhož druhu, které u imunizovaného chybí nebo jsou odlišné. Aloimunizace vykazuje určité podobnosti s imunizací proti infekčním agens, je také ovlivněna imunogenicitou antigenu a zánětlivým prostředím, vyskytuje se však v daleko nižší míře než heterologní imunizace [1]. Existují tři základní příčiny imunizace spojené s tvorbou aloprotilátek: aplikace TP, těhotenství a transplantace. Přehled hlavních cílových antigenů a stupeň aloimunizace je uveden v tabulce 1.

Tab. 1 Hlavní cílové aloantigeny, příčiny a stupeň aloimunizace [1, upraveno]

Aloimunizace	Hlavní aloantigeny	Stupeň imunizace
Erytrocytové TP	RBC Ag (RhD, K)	Střední
	ostaní RBC Ag	Nízký
	HLA I. třída*	Střední
Trombocytové TP	HPA-1a, HPA-5b	Nízký
	HLA I. třída**	Střední
Gravidita	RBC Ag (RhD, K)	Střední
	HLA I. třída	Střední
	HPA-1a, HPA-5b	Nízký
Transplantace orgánů	HLA I./II. třída	Vysoký

* zbytkové WBC a PLT především u nedeleukotizovaných TP

** PLT a zbytkové WBC především u nedeleukotizovaných TP

Léčba pomocí transfuzních přípravků se začala masově používat až v první polovině 20. století, kdy byl plně pochopen z hlediska transfuzního lékařství nejdůležitější **krevní skupinový systém AB0**, který je charakterizován jednak přítomností antigenů na červených krvinkách, tak současně existencí „přirozených“ protilátek v plazmě. Antigen erytrocytů lze z hlediska aloimunizace charakterizovat jako strukturu povrchové membrány rozpoznávanou lidskou aloprotilátkou. V současné době je známo více než 350 antigenů řazených do čtyř kategorií: systémů krevních skupin, kolekcí a sérií antigenů s nízkou nebo vysokou frekvencí výskytu. Nyní je registrováno 41 krevních skupinových systémů, které jsou kódovány 45 geny. Aktuální přehledy všech krevních skupinových systémů, kolekcí a sérií antigenů je k dispozici na webových stránkách ISBT (International Society of Blood Transfusion) [2].

Vedle AB0 systému jsou u dárců plné krve v ČR vyšetřovány většinou standardně i další systémy, především Rh systém (C/c, D, E/e) a Kell. Ostatní systémy se zpravidla určují až v případě potřeby, tj. při výběru přípravků pro pacienty s identifikovanými protilátkami proti červeným krvinkám. Pacientovi se specifickou protilátkou je třeba zajistit transfuzní přípravek obsahující erytrocyty bez této antigenní specifity. Příčinou aloimunizace proti antigenům erytrocytů jsou tedy krevní transfuze erytrocytů kompatibilní většinou pouze v AB0 systému, u dívek a žen ve fertilním věku se doporučuje kompatibilita i v RhD a K antigenech kvůli jejich vysoké imunogenicitě.

3.3 Imunogenicitá, responderi a nonresponderi

Krevní transfuze lze považovat za nejrozšířenější typ transplantace. Ročně je podáno více než 100 milionů transfuzí na celém světě. Proč u některých jedinců k aloimunizaci dochází, zatímco u jiných jsou cizorodé antigeny i po opakovaných transfuzních epizodách tolerovány (tzv. nonresponderi), je stále předmětem intenzivního výzkumu. V této souvislosti se mluví o tzv. imunogenicitě červených krvinek, jež představuje schopnost antigenu stimulovat imunitní odpověď charakterizovanou tvorbou aloimunních protilátek. Jednotlivé skupinové systémy erytrocytů vykazují různou imunogenicitu, u RhD aloimunizace se uvádí u hospitalizovaných pacientů RhD negativních 20-30 % výskyt tvorby anti-D protilátek po expozici RhD pozitivními erytrocyty [3, 4]. Stupeň imunizace u zdravých RhD negativních dobrovolníků je daleko vyšší než u pacientů, po druhé expozici RhD pozitivními erytrocyty dosahuje až 93% [5].

U ostatních protilátek (non-AB0, non-RhD) činí stupeň aloimunizace pacientů 8-10 % při zachování AB0 a RhD kompatibility TP [6-8]. Pokud rozdělíme příjemce transfuzí na podskupinu pacientů bez chronického onemocnění („obecně hospitalizovaní pacienti“) nevyžadující opakované aplikace erytrocytových TP, a podskupinu chronicky transfundovaných pacientů, pak u první podskupiny je daleko nižší míra aloimunizace 1 - 3 % [9,10], než u druhé podskupiny pacientů, u nichž výskyt aloprotilátek dosahuje 18,6 % [11]. U pacientů s hemoglobinopatiemi (se srpkovitou anémií či thalasémií) činí podíl aloimunizovaných pacientů (responderů) dokonce 18 – 65 % [12-17]. Skupinu responderů lze dále diferencovat na monorespondery tvořící i po opakované expozici TP protilátku jediné specifické (proti jednomu antigenu) a multirespondery, u nichž jsou detekovány aloprotilátky s více než jednou specifícou (proti několika antigenům). Z publikovaných prací vyplývá, že 22-30 % aloimunizovaných pacientů patří do skupiny multiresponderů [18, 19].

3.4 Vliv transfuzní terapie na stupeň aloimunizace

Zdá se, že počet transfuzí u pacienta má na aloimunizaci největší vliv. Zalpuri s kolektivem na souboru 3002 nealoimunizovaných pacientů zjistil, že riziko tvorby aloprotilátek se zvyšuje s počtem aplikovaných TU a proti 1 % při aplikaci 5 TU dosahuje 6,5 % při 40 podaných TU [20]. Boatenga a jeho tým zjistili, že stupeň aloimunizace pacientů afrického etnika při AB0, RhD kompatibilitě byl 9,4 % a že míra aloimunizace byla signifikantně asociována se zvýšeným počtem transfuzních epizod [21]. Podobné závěry lze nalézt rovněž ve starších pracích zabývajících se aloimunizací pacientů se SA, které reportovaly míru aloimunizace 11,5 % [22] a 10 % [23]. K poněkud odlišným nálezům dospěla nedávno prováděná studie u pacientů trpících rovněž SA, která ukázala, že ojedinělá transfuzní léčba je ve srovnání s chronickou asociována se zvýšeným rizikem aloimunizace a že většina (prvotních) protilátek byla vytvořena po aplikaci méně než 8 TU a po minimálním počtu transfuzních epizod [24]. U jiných chronicky transfundovaných pacientů se protilátky objevily v průměru po 4,2 transfuzních epizodách [25]. Přesto u chronicky transfundovaných pacientů je pozorováno daleko vyšší procento aloimunizace než u populace „obecně hospitalizovaných pacientů“. Příčinou těchto rozporuplných nálezů je pravděpodobně nedostatečná kontrola tvorby aloprotilátek po transfuzi a s tím související vymizení protilátek z cirkulace [26]. Screening aloimunních erytrocytových protilátek se provádí před aplikací TP, tedy u chronických pacientů je vyšší pravděpodobnost detekovat nově vytvořené protilátky než u jednorázově transfundovaných pacientů. Dokonce i v případech, že byl screening protilátek po

aplikaci TP proveden, nemusí být protilátky zachyceny, protože z hlediska aloimunizace nebylo testování vhodně načasováno (příliš brzy nebo naopak příliš pozdě). Pokud dojde k další transfuzní epizodě v delším časovém odstupu od předchozí, prvotně vytvořené protilátky nemusí být detekovány. V tomto případě může u pacienta, navzdory negativnímu výsledku předtransfuzního vyšetření, dojít k pozdní hemolytické potransfuzní reakci (DHTR) v důsledku sekundární imunitní odpovědi [27]. Typickým příkladem protilátek vyvolávajících DHTR jsou anti-Jk protilátky [28]. Tuto myšlenku podporuje několik prací uvádějících, že až 70 % aloprotilátek vymizí z oběhu nebo je pod hranicí detekce po několika měsících až letech od jejich průkazu [29-31]. Další příčinou podhodnocení míry aloimunizace především u „obecně hospitalizovaných pacientů“ je fragmentace transfuzních záznamů. Bylo demonstrováno, že až u jedné čtvrtiny pacientů byla transfuze podána v jiném zařízení, než ve kterém bylo provedeno testování na přítomnost protilátek [32]. Jinými slovy, rozdílné informační systémy a databáze pacientů neumožňují srovnávat výsledky mezi jednotlivými nemocničními zařízeními a disponovat tak záznamy o celé transfuzní historii pacientů. Na základě těchto skutečností byl v roce 2016 v časopise *Transfusion* publikován návrh zavést screening RBC aloprotilátek v odstupu jednoho až čtyř měsíců po aplikaci erytrocytů jako kontrola možné aloimunizace pacienta [33].

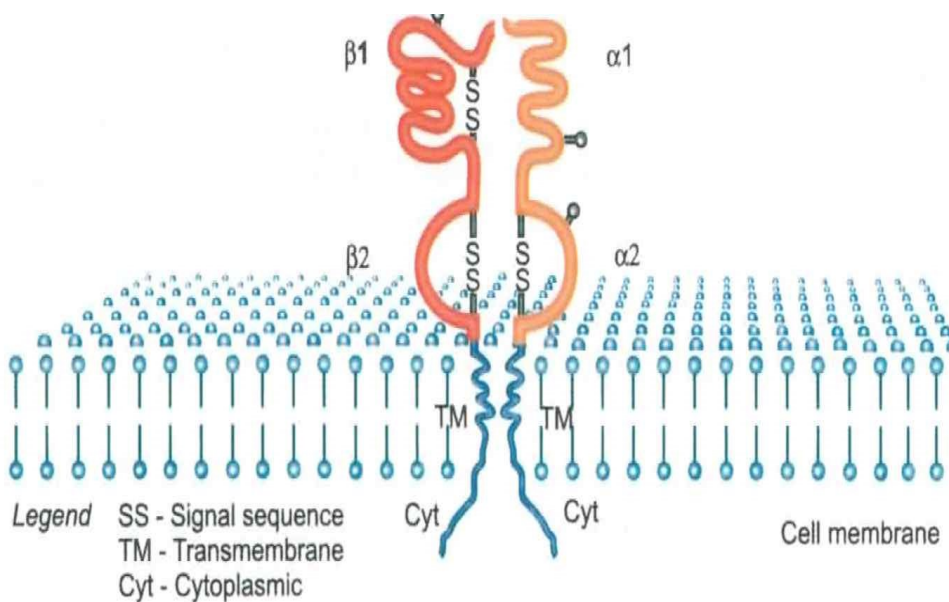
Příčina aloimunizace jen určité části příjemců erytrocytových TP a rozdílná míra a status aloimunizace však zůstává stále neobjasněna. V posledních dekádách se předmětem zájmu stala identifikace genetických faktorů podmiňujících aloimunizaci a vzhledem k dosavadním znalostem o mechanismech tohoto procesu byl jako jeden z nejvhodnějších kandidátů vybrán HLA systém, respektive HLA antigeny II. třídy. Hlavním důvodem je poznatek, že HLA restrikce podstatně ovlivňuje schopnost prezentace peptidů odvozených z alogenních erytrocytových antigenů T_H lymfocytům, což následně může ovlivňovat tvorbu aloprotilátek proti těmto antigenům.

3.5 Úloha HLA molekul v imunitní odpovědi

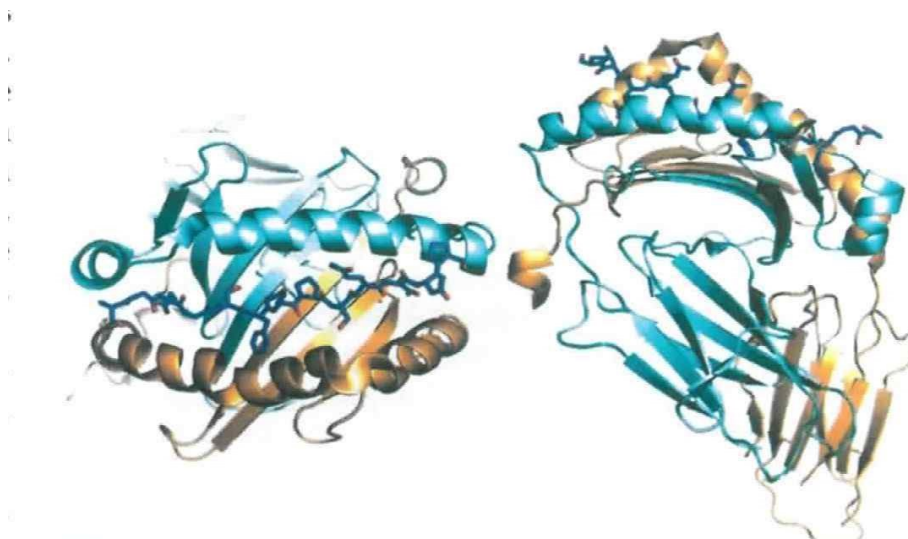
Skutečnost, že tvorba aloimunních protilátek je podmíněna prezentací antigenních peptidů skupinových systémů krevních buněk prostřednictvím HLA molekul II. třídy, vedla k otázce, zda má polymorfismus MHC molekul, a tedy různá schopnost vazby zpracovaných peptidů, spojitost s výskytem určité specificity protilátky (podrobně bude popsáno dále). MHC systém se stal jednou z nejjintenzivněji studovaných oblastí lidského genomu, protože v této oblasti leží geny kódující HLA antigeny, jež mají klíčovou úlohu při navození i regulaci

imunitní odpovědi. HLA antigeny II. třídy jsou heterodimery skládající se z řetězců α a β kódovaných geny A, resp. B lokusů DR, DQ a DP. Vazebný žlábek HLA antigenů druhé třídy tvoří $\alpha 1$ a $\beta 1$ domény obou řetězců (viz Obr. 1 a Obr. 2). Geny HLA II. třídy jsou vysoce polymorfní. Polymorfismus je omezen především na vazebný žlábek těchto molekul, přičemž u HLA-DR je polymorfní pouze β řetězec kódovaný geny *HLA-DRB1*, 3, 4 a 5. HLA-DQ a DP lokusy obsahují polymorfismy v α i β řetězcích kódovaných geny *DQA1*, *DQB1*, *DPA1*, *DPB1* [34, kapitola 4].

Obr. 1 Schematické zobrazení HLA-molekuly II. třídy [34, kapitola 4].



Obr. 2 Molekula HLA-DQ8 prezentující ve vazebném místě peptid odvozený z glutenu. Vlevo pohled shora na vazebný žlábek, vpravo pohled ze strany [34, kapitola 6].



Exogenní antigeny jsou pohlceny APC buňkami a štěpeny v lysozomech či jiných organelách obsahujících proteolytické enzymy. Odtud jsou dopravovány endozómy do specializovaných endozomálních váčků označovaných jako MCII, kam jsou dopravovány rovněž nově sestavené molekuly MHC molekuly II. třídy. Zde dochází několikastupňovým procesem k vazbě zpracovaného peptidu na vazebný žlábek HLA molekuly. Peptidy prezentované molekulami HLA II. třídy obsahují minimálně 13 aminokyselin, ale mohou dosahovat délky 30 reziduí i více [35,36]. Komplex MHC II s peptidem je rozeznáván antigenně specifickým TCR receptorem T lymfocytů, který je strukturně podobný imunoglobulinům. TCR se skládá ze dvou řetězců (u člověka nejčastěji α a β), jejichž variabilita je důsledkem náhodných genových přestaveb (podobně jako u imunoglobulinů) během vývoje T lymfocytů v thymu. Velikost potenciálního repertoáru TCR je odhadována na 10^{15} , což je více než aktuální počet T buněk v lidském organismu. T lymfocyty pomocí svého TCR zkoumají konformační změny na komplexech „vlastních“ HLA molekul, které jsou způsobeny vazbou (cizího) antigenního peptidu na vazebný žlábek MHC. Pokud T lymfocyt svým TCR tento komplex

rozezná, může být za účasti adhezivních molekul, kostimulačních receptorů a jejich ligandů (tzv. imunologická synapse) zahájena proliferace a diferenciací T lymfocytu. T buňky jsou schopny rozpoznat ovšem i cizí (alogenní) HLA molekuly, a to buď přímo (v komplexu MHC – peptid) nebo nepřímo, tj. po jejich zpracování autologními APC buňkami a následné prezentaci v podobě peptidů na vlastních MHC molekulách II. třídy.

HLA molekuly tedy regulují imunitní odpověď tím, že jsou schopny vázat antigenní peptidy ve svém žlábků a prezentovat je T lymfocytům (tzv. HLA restrikce), současně však určují či vymezují T buňky, které jsou schopné se na komplex HLA-peptid vázat svým TCR a konečně vymezují B lymfocyty, jež mohou na svém BCR receptoru (= membránový IgM nebo IgD) vázat stejný typ antigenu [34 kap.6].

Aloimunní protilátky jsou indukovány T-dependními antigeny, to znamená, že k aktivaci příslušných B lymfocytů je zapotřebí spolupráce s T lymfocyty CD4+, především Tfh. Při tomto ději je důležité, aby B buňka, která rozpoznala antigen svým BCR, tento antigen pohltila, rozštěpila na peptidové fragmenty a v komplexu MHC II je prezentovala na svém povrchu T lymfocytům, které svým TCR tento peptidový fragment rozeznají. Stejné komplexy MHC II s peptidovým fragmentem se objevují i na APC buňce (dendritické), která pohltila stejný antigen jako B lymfocyt. Nejprve tedy musí APC buňka iniciovat vznik klonu Th buněk schopných svým TCR vázat příslušný peptid v komplexu s MHC II a až takto aktivovaný T lymfocyt může poskytnout B lymfocytu pomoc a stimulovat jej k proliferaci a diferenciaci v plazmatické buňky produkující specifické protilátky [36].

HLA systém člověka charakterizuje vysoký počet genů (více než 200) a současně vysoký počet alel, tj. variant jednotlivých genů. HLA systém je tedy vysoce polymorfní, což znamená, že téměř každý jedinec, s výjimkou monozygotních dvojčat a HLA identických sourozenců, nese unikátní sestavu molekul HLA I. a II. třídy, což spolupodmiňuje jeho individuální imunologickou reaktivitu [36]. Aktuální počet HLA alel k říjnu 2020 je uveden v tabulkách 2-4 [37].

Tab. 2. Celkový počet známých variant (alel) HLA genů [37]

Počet HLA alel	
HLA I. třída	20 459
HLA II. třída	7 652
Celkem HLA alel	28 111

Tab. 3. Počet variant (alel) HLA genů I. třídy a odvozených proteinů [37]

HLA I. Třída						
Geny	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>
Alely	6291	7562	6223	256	45	82
Proteiny	3896	4803	6618	110	6	22

Tab. 4. Počet variant (alel) HLA genů II. třídy a odvozených proteinů [37]

HLA II. třída								
Geny	<i>DRA</i>	<i>DRB1</i>	<i>DQA1</i>	<i>DQB1</i>	<i>DPA1</i>	<i>DPA2</i>	<i>DPB1</i>	<i>DPB2</i>
Alely	29	3536	264	1930	216	5	1654	6
Proteiny	2	2476	114	1273	80	0	1064	0

3.6 Asociace HLA s tvorbou protilátek proti antigenům trombocytů (HPA)

Na fenomén HLA restrikce v souvislosti s indukcí tvorby aloprotilátek bylo poprvé poukázáno u destičkového antigenu HPA-1a. Během těhotenství tvoří 7-10 % HPA-1a negativních žen anti-HPA-1a protilátku namířenou proti HPA-1a antigenu na destičkách plodu. Tato protilátka je nejčastější příčinou FMAITP. Většina HPA-1b homozygotních matek však zůstává bez imunní odezvy (produkce protilátek) na HPA-1a antigen přítomný na destičkách plodu, označujeme je jako „nonresponderky“. Několik sérologických studií demonstrovalo asociaci tvorby anti-HPA-1a protilátky u responderů s přítomností HLA-DRw52a [38, 39] se závěrem, že varianta HLA-DRw52 je nezbytná pro imunitní odpověď, avšak sama o sobě nedostatečná, jelikož se tato molekula nacházela i u nonrespondek. Pozdější genotypizace HLA II. třídy pomocí PCR-SSO a konfirmování výsledků pomocí sekvenování *DRB3* a *DQB1* genů určilo přítomnost alely *HLA-DRB3*01:01* u 91 % respondek ($p_c < 0,001$; OR = 27,9) a alelu *HLA-DQB1*02:01* dokonce u 94 % respondek ($p_c < 0,001$, OR = 25,4), přičemž alespoň jedna z určených alel byla pozitivní u 100 % aloimunizovaných žen [40]. V případě HPA-1b homozygotní matky pozitivní na alespoň jednu z asociovaných HLA alel existuje relativně vysoké riziko aloimunizace, a naopak je vysoce nepravděpodobné, aby HPA-1b homozygotní žena bez přítomnosti alespoň jedné ze dvou asociovaných alel tvořila anti-HPA-1a protilátku během těhotenství. Existenci přirozeně zpracovaných peptidů z HPA-1a antigenu (obsahující

Leu³³ polymorfismus) vystavených prostřednictvím produktu alely *HLA-DRB3*01:01* na povrchu APC buněk byla dokázána identifikací 4 peptidů o délce do 17 aminokyselin obsahujících centrální epitop Trp²⁵ – Leu³³ [41]. Vznik souboru různě dlouhých, překrývajících se peptidů se shodnou centrální částí, je typickým znakem pro přirozeně zpracovávané peptidy [42, 43]. K tomuto jevu dochází tak, že molekula HLA II. třídy váže a chrání hlavní epitop extracelulárního antigenu před proteolytickým štěpením již v časně fázi jeho zpracování. Následné štěpení peptidových fragmentů je náhodné a zcela variabilní, čímž vzniká délkový polymorfismus fragmentů obsahujících shodný hlavní epitop [44, 45]. Druhou nejčastější aloprotilátkou vedoucí k rozvoji FMAITP je anti-HPA-5b. Vazba HLA-DR6 antigenu s imunizací proti HPA-5b referovaná v prvotní práci [46], nebyla potvrzena v pozdější studii [47], z níž vyplynula pouze statisticky významná negativní asociace u alely *HLA-DRB1*03:01* ($p_c < 0,008$; OR = 0,08), tj. s protektivním efektem vůči aloimunizaci. V souvislosti se vzácnější anti-HPA-6b protilátkou byl nalezen haplotyp *HLA-DRB1*15:01, DQA1*01:02, DQB1*06:02* (100 % vs. 27 % u kontrol). Vzhledem k malé velikosti souboru (pouze 5 gravidních žen), nebyla však po korekci tato asociace signifikantní [48].

Jako další potencionální genetický rizikový faktor HPA-1a aloimunizace u inkompatibilních těhotenství byly studovány *KIR* a *HLA-C* geny. Ze studie zahrnující 75 aloimunizovaných matek – responderek a 55 matek – nonresponderek nevzešla žádná kombinace mateřských *KIR*/fetálních *HLA-C* genů, jež by v rámci indukce fetomaternální tolerance mohla ovlivnit HPA-1a aloimunizaci [49].

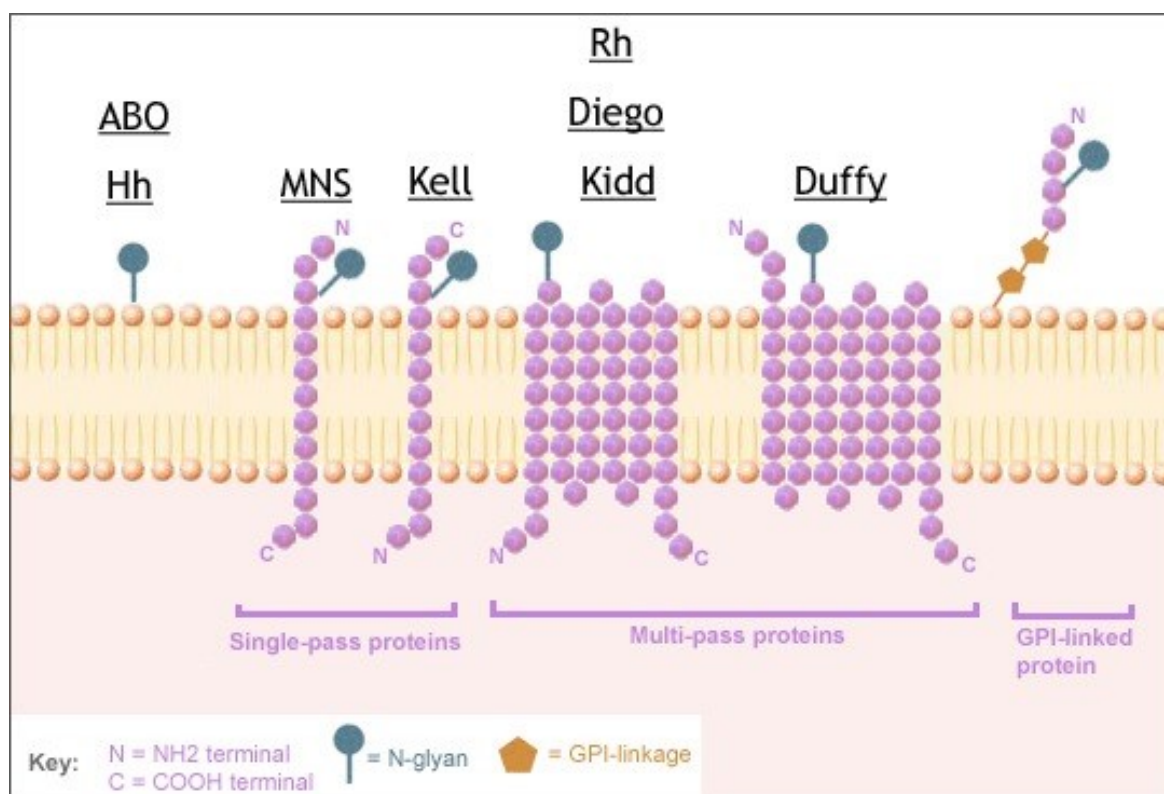
3.7 HLA asociace s tvorbou protilátek proti antigenům červených krvinek

Transfuze erytrocytových TP a u žen navíc i gravidita jsou hlavními příčinami aloimunizace proti RBC antigenům. Pouze menšina, v průměru méně než 10 % příjemců (inkompatibilní) transfuze, však produkuje aloprotilátky. V r. 1988 byla publikována práce, ve které autoři tvrdí, že imunitní odpověď na RBC aloantigeny je nezávislá na HLA typu [50]. Později však byly nalezeny asociace mezi přítomností monospecifických protilátek a *HLA-DRB1* variantami v několika publikacích [51-56]. Navíc v případě detekce polyspecifických protilátek u multiresponderů byla nalezena asociace s *DRB1*15* variantami, a to i v práci naší skupiny [57-59]. Byl také referován protektivní efekt *HLA-DQB1*02* alel na aloimunizaci [56, 60]. Jednotlivé asociace budou probrány podrobněji v dalších kapitolách. Nutno však zmínit, že zjištěné frekvence *HLA-DRB1* alel u pacientů s klinicky významnými aloprotilátkami proti

antigenním systémům erytrocytů nedosáhla v dosud publikovaných studiích u žádného ze systémů tak vysokou hodnotu OR jako v případě HPA-1a aloimunizace.

Na membráně erytrocytů lze rozlišit 3 typy proteinů, které nesou antigeny krevních skupinových systémů: proteiny I. typu, které procházejí membránou jednou (single-pass proteins), proteiny II. typu protínající membránu několikrát (multi-pass proteins) a proteiny odvozené od glykosylfosfatidylinositolu (GPI-linked proteins). Rozdělení vybraných klinicky významných krevních skupinových systémů do jednoho ze tří typů erytrocytových membránových proteinů je uvedeno v Obr. 3 [61].

Obr. 3 Schématické znázornění vybraných krevních skupinových systémů erytrocytů na povrchu erytrocytové membrány [61]



3.7.1 Rh systém

Rh systém je nejpolymorfnějším z antigenních systémů erytrocytů a pomocí polyklonálních sér lze rozlišit 53 antigenů (dle ISBT nomenklatury označovány RH1 až RH59) a je vedle ABO klinicky nejvýznamnějším systémem v transfuzním lékařství. Základními antigeny jsou D, C, c, E, e a Cw. Imunitní odpověď na antigeny proteinového typu, což je případ Rh systému, je typickým příkladem protilátkové odpovědi závislé na T lymfocytech, vyžadující kooperaci mezi B buňkami a pomocnými T lymfocyty. Z protilátek jsou klinicky

nejvýznamnější anti-D a anti-c způsobující těžké HON [62, 63] a mírné až těžké DHTR [64]. Proteiny RhD a RhCcEe (a jejich varianty) jsou kódovány dvěma geny lokalizovanými na chromozomu 1, *RHD* a *RHCcEe*. Zatímco RhD pozitivní jedinci mají alespoň jednu kopii *RHD* genu, negativní jedinci (z kavkazoidní populace) mají obě kopie *RHD* genu deletované. Téměř 70 % RhD negativní černošské populace nese kompletní, ale neaktivní *RHD* pseudogen (*RHD Ψ*) [65]. RhD protein je považován za antigen s nejvyšším stupněm imunogenicity (po AB0), což je způsobeno tím, že rozdíl mezi RhD a RhCcEe antigenem u RhD negativních jedinců činí asi 35 aminokyselin, takže pravděpodobnost tvorby imunogenních epitopů prezentovaných v kontextu s MHC II specifickým receptorům T lymfocytů je mnohem větší než v případě rozdílu v jedné aminokyselině u polymorfismu E/e, nebo polymorfismu C/c určeného substitucí 4 aa, z nichž extramembranózní je pouze Ser(C)103Pro(c) [66].

V prvotní práci byla studována role HLA antigenů v aloimunizaci na souboru 76 anti-D pozitivních matek a 54 anti-D negativních, tj. neimunizovaných matek [51]. Sérologickým vyšetřením lokusů HLA-A, B, C, DR a DQ bylo zjištěno zvýšené riziko imunizace (OR > 2) u HLA-A3, B17, Cw2 a DR4 antigenů. Tento náález ovšem nebyl potvrzen novějšími studiemi, ve kterých u 171 pacientů s monospecifickou anti-D protilátkou byla nalezena statisticky signifikantní asociace pouze s *HLA-DRB1**01 skupinou alel (OR = 1,8) a současně s kombinovanou přítomností alelických skupin *HLA-DRB1**01, *03, *11 (OR = 2,1) [57]. Výsledně nízké OR svědčí o malém podílu HLA restrikce v prezentaci z RhD antigenu odvozených peptidů a je i možným vysvětlením vysokého stupně imunogenicity RhD antigenu obecně. Tento předpoklad byl potvrzen také ve studii, jejímž cílem bylo pomocí synteticky připravených 68 překrývajících se peptidů o délce 15 aminokyselin, jež představují kompletní sekvenci RhD proteinu, identifikovat dominantní epitopy vyvolávající T lymfocytární odpověď. Autoři zjistili, že k signifikantní proliferaci mononukleárních izolovaných od aloimunizovaných dárců vedly všechny synteticky připravené peptidy a ve většině případů bylo stimulačních několik peptidů současně. Detekce těchto epitopů by mohla být východiskem pro vývoj peptidové imunoterapie jako prevence HON a rovněž navržení syntetického imunogenu by mohlo nahradit imunizaci dobrovolníků pomocí RhD pozitivních krvinek při přípravě humánního anti-D séra [67].

Druhou nejčastěji detekovanou aloprotilátkou v systému Rh je anti-E. Schonewille se svým týmem našel ve skupině 136 pacientů s touto protilátkou signifikantně zvýšenou frekvenci *HLA-DRB1**09 (8,8 % vs. 2,5 %; OR = 3,7) a v případě přítomnosti kombinace protilátek signifikantně zvýšené frekvence alelických skupin *DRB1**07 a *09 (36 % vs. 22 %; OR = 2,2). V případě anti-C/c protilátek, jejichž výskyt je v kavkazoidní populaci vzácnější,

nebyly zvýšené frekvence *HLA-DRB1** variant statisticky významné. Příčinou mohl být i malý soubor pacientů tvořený 11 pacienty s anti-C a 30 s anti-c protilátkou [57].

3.7.2 *Kell (K) systém*

Kell systém je charakterizovaný základním antigenním /alelickým párem: antigenem K (Kell, *KEL1*) a k (Cellano, *KEL2*) a dalšími páry, např. Kp^a (Penny, *KEL3*) a Kp^b (Rautenberg, *KEL4*). Celkem bylo dosud identifikováno 33 antigenů. Antigen K je třetím nejimunogennějším antigenem erytrocytů (po AB0 a RhD). K/k polymorfismus je dán jednonukleotidovou substitucí c. 698 C > T vedoucí k záměně methioninu za threonin na 33. pozici peptidového řetězce. Tato mutace vede k narušení N glykosylačního místa K antigenu, a tím k chybění glykosylace, což vysvětluje jeho vysokou antigenicitu. Antigen K je méně frekventní než k, anti-K protilátka může způsobit těžké HON s útlumem erytropoézy plodu a těžší formy HTR [64, 65].

Chiaroni se spolupracovníky našli zvýšenou frekvenci *HLA-DRB1**11 v souboru 54 pacientů (57 %) oproti kontrolní skupině (27 %), OR = 3,5. Kombinovaná frekvence skupin alel *HLA-DRB1**11 a *DRB1**13 byla signifikantně vyšší u pacientů s anti-K protilátkou (83 %), než u kontrolní skupiny (52 %), OR = 4,5. Autoři podrobně analyzovali *HLA-DRB1**11 a *13 alely, jež sdílejí společnou sekvenci v *HLA-DRB1* genu, kódující P4 kapsu vazebného žlábků a obsahující 3 specifické aminokyselinové zbytky v pozicích 13, 70 a 74. Tato sekvence aminokyselin byla častější u imunizovaných pacientů než v kontrolní skupině. Toto zjištění vedlo autory k závěru, že zmíněná sekvence S13D70A74 je odpovědná za prezentaci peptidu odvozeného z K antigenu T lymfocytům. Praktické využití svého nálezu vidí autoři především u gravidních žen antigen K negativních, *HLA-DRB1**11 a/nebo *HLA-DRB1**13 pozitivních, u kterých by se prováděl častější odběr vzorků z důvodu vyššího rizika K imunizace [52].

Noizat-Pirene se svým týmem našli signifikantní asociaci mezi anti-K aloimunizací a variantami *HLA-DRB1* genu jen v případě alelické skupiny *DRB1**13 (28,33 % vs. 13,54 %, OR = 2,5) [53]. Důvodem mohl být početně menší soubor 30 aloimunizovaných pacientů zařazených do analýzy oproti 54 pacientům s anti-K protilátkou ve studii od Chiaroniho et al. [52]. Skutečnost, že ve skupině pacientů s anti-K protilátkou byla evidována značná různorodost HLA molekul a distribuce získaných fenotypů korespondovala s distribucí fenotypů v kontrolní skupině, vedla autory k závěru, že vazba, respektive prezentace peptidů odvozených z K antigenu není omezena specifickou HLA-DR molekulou [53]. Tento poznatek koreluje i se zjištěním Schonewilla a kol., který v souboru 156 anti-K pacientů nenalezl

signifikantní asociaci s žádnou *HLA-DRB1* alelou a potvrdil tak předpoklad, že peptidové fragmenty zpracované z K antigenu mohou v podstatě prezentovat všechny HLA-DR varianty vyskytující se v kavkazoidní populaci. Schonewille s kol. v souvislosti s anti-K imunizací prokázal pouze signifikantně vyšší kombinovanou frekvenci alel *DRB1**01, *11, *13 nebo *15 u pacientů (80,1 %) než u kontrol (58,3 %), OR = 2,9 [57].

3.7.3 Kidd (*Jk*) systém

Kidd systém tvoří alelický pár *JK**01 (dříve *JK**A) a *JK**02 (dříve *JK**B) lišící se substitucí c. 838G> A, která vede k záměně Asp280Asn ve čtvrté extracelulární doméně Jk antigenu. Obě alely se dědí kodominantně. Genotypové frekvence v kavkazoidní populaci tvoří zhruba čtvrtina homozygotů $Jk^a Jk^a$, druhá čtvrtina $Jk^b Jk^b$ a asi polovina heterozygotů ($Jk^a Jk^b$). Kidd glykoprotein je přenašečem močoviny [64]. Anti-Jk protilátky mohou být velmi nebezpečné, jelikož jsou obtížně detekovatelné, mají tendenci rychle mizet z plazmy a mohou způsobit těžké HTR, především DHTR [65]. Reviron a kol. v analyzovaném souboru 20 pacientů a gravidních žen s anti- Jk^a protilátkou našel statisticky významně vyšší frekvenci alelické skupiny *HLA-DRB1**01 než v kontrolní skupině (55 % vs. 17 %, OR 5,9). *HLA-DRB1**10 byla také více zastoupena u pacientů než u kontrol (10 % vs. 3 %, OR 4,3), rozdíl však nebyl statisticky významný [54]. Silná asociace *HLA-DRB1**01 s anti- Jk^a imunizací byla potvrzena i na větším souboru 68 pacientů Schonewilla a kol., s OR = 3,1 [57]. Méně častá anti- Jk^b protilátka byla studována na souboru pouze 11 pacientů, kdy byla zaznamenána zvýšená frekvence *HLA-DRB1**11 (OR = 2,8), která však nebyla statisticky významná [57].

3.7.4 Duffy (*Fy*) systém

Duffy systém je tvořen dvěma hlavními variantami *FY**01 nebo *FY**A a *FY**02 nebo *FY**B lišícími se substitucí c. 125A> G v exonu 2 *FY* genu, která vede k záměně Asp42Gly v peptidovém řetězci glykoproteinu Fy^a a Fy^b . Další alely *FY*:01W a *FY*:02W kódují slabé varianty $Fy(a+^w)$ a $Fy(b+^w)$ antigenu. Extracelulární část antigenu obsahuje tři místa N-glykosylace. *Fy* glykoprotein je receptorem pro prozánětlivé chemokiny, ale usnadňuje také invazi některých druhů Plasmodií [64]. Téměř 70% černošské populace má fenotyp $Fy(a-b-)$ způsobený mutací v promotorové oblasti *FY* genu erytroidních buněk zamezující vazbě transkripčního faktoru GATA-1 a následné expresi proteinu. Fenotyp $Fy(a-b-)$ rozšířený zejména v malarických oblastech zajišťuje rezistenci erytrocytů k malarické infekci a slouží tak jako přirozený obranný mechanismus. Aloprotilátky mohou způsobit jak HTR, tak HON [65]. Výskyt anti- Fy^a protilátky je 20 x častější než anti- Fy^b . Anti- Fy^a je pravděpodobně i jednou

z protilátek, které se mohou podílet na rejekci renálního štěpu [68]. Podání anti-RhD (IgG) imunoglobulinu překvapivě suprimuje tvorbu anti-Fy^a protilátky a je prevencí HON [69]. Noizat-Pirenne se svým týmem analyzovala soubor 29 jedinců s anti-Fy^a protilátkou a zjistila, že 100 % jedinců s anti-Fy^a jsou nositelé *HLA-DRB1*04* fenotypu, zatímco v kontrolní skupině byla tato varianta zastoupena v 19 %. Alelická frekvence *DRB1*04* (56,6 %) byla statisticky významně vyšší v anti-Fy^a pozitivní skupině ve srovnání s kontrolní skupinou (9,9 %), OR = 12,9 [53]. Asociaci *HLA-DRB1* s anti-Fy^a aloimunizací se u jihoevropské populace zabývala rovněž Picard se spolupracovníky. Na skupině 67 pacientů potvrdili asociaci s *DRB1*04* a našli signifikantní asociaci i s *DRB1*15*. Jak *DRB1*04*, tak *DRB1*15* byly signifikantně častěji přítomny u pacientů (35 %, resp. 30 %) než u kontrol (12 %, resp. 9 %), OR = 4,2 resp. 4,3. Dokonce 96 % pacientů s anti-Fy^a protilátkou neslo nejméně jednu *DRB1*04* nebo *DRB1*15* alelu ve srovnání s 34 % v kontrolní skupině (OR = 41,4). Varianty *HLA-DRB1*03* a **07* byly přítomny pouze u 10 % pacientů s anti-Fy^a ve srovnání s 51 % v kontrolní skupině ($p_c < 0,001$), což svědčí o možném protektivním účinku těchto alel z důvodu jejich neschopnosti prezentovat peptidy odvozené z Duffy antigenu T_H lymfocytům [55]. Tato zjištění byla potvrzena i ve studii Schonewilla a kol., jenž pro skupinu 52 pacientů s anti-Fy^a protilátkou uvádí asociaci s *HLA-DRB1*04* (OR = 7,9) a s *DRB1*15* (OR = 3,2), při současné přítomnosti obou alel pak OR = 16 [57]. Ke stejnému závěru dospěla i Raos se svým týmem, která na souboru 70 aloimunizovaných pacientů našla signifikantní rozdíly ve fenotypových frekvencích *HLA-DRB1*04* a *DRB1*15* ve srovnání se zdravými kontrolami (OR = 10,5, resp. OR = 8,0) [56].

3.7.5 MNS systém

MNS systém je druhým nejpolymorfnějším antigenním systémem červených krvinek (dosud zdokumentováno 46 antigenů). Největší význam mají antigeny M a N (glykoforiny A, GPA) a antigeny S a s (glykoforiny B, GPB), u černošské populace i antigen U. Glykoforiny jsou sialoglykoproteiny. Antigenní epitopy M a N jsou lokalizovány na N-konci GPA molekul a liší se ve dvou aminokyselinách v pozici 1 (Ser1Leu) a 5 (Gly5Glu). Antigen M je v kavkazoidní populaci přítomen u 78 % jedinců a N u 72% populace. Polymorfismus S/s určuje záměna jediné aminokyseliny v GPB molekule (Met29Thr). Antigen S je v kavkazoidní populaci přítomen u 55 % jedinců a s u 99 %. GPB sdílí s GPA^N (s epitopem N) na N terminálním konci prvních 26 aminokyselin. Geny *GYP A* a *GYP B* jsou vysoce homologní a jsou v těsné vazbě. Zatímco protilátky anti-M (častější, mnohdy spíše poinfekční než aloimunní) a anti-N (vzácnější) reagují za nižších teplot a jsou většinou klinicky nezávažné, tak

anti-S, -s, -U jsou většinou třídy IgG, reagující při 37 °C a mohou způsobit klinicky závažné HTR a HON [64, 65]. Asociace *HLA-DRBI* s anti-S protilátkou byla analyzována Schonewillem et al. v souboru 19 aloimunizovaných pacientů. Bylo zjištěno, že alela *DRBI**07 byla přítomna u 68,4 % pacientů s OR = 8,7 (proti kontrolní skupině), kombinovaná přítomnost *DRBI**07 nebo *08 byla rovněž signifikantně asociována s OR = 8,4. Ovšem zvýšená frekvence výskytu *DRBI**08 (OR = 4,1) nebyla po korekci již statisticky významná [57]. Asociace mezi antigeny HLA II. třídy a výskytem protilátek proti dalším antigenům MNS systému nebyly dosud publikovány. Výsledky všech zmíněných asociací jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tab. 5 Asociace mezi *HLA-DRBI* a výskytem monospecifických aloprotilátek, převzato z obsáhlé práce Schonewilla a kol. (OR₁) [57] a doplněno o údaje ze souvisejících citovaných článků (OR₂)

Specificita protilátky (velikost souboru)	Asociované <i>HLA-DRBI</i> * alely	OR ₁	OR ₂ (citovaný článek uveden v závorce)
anti-D (171)	*01 *01, *03 nebo *11	1,8 2,1	- -
anti-E (136)	*07 *07 nebo *09	3,7 2,2	- -
anti-K (156)	*10, *11, *13 nebo *15 *11 *13	2,9 NS NS	4,5 [52] 3,5 [52] 2,5 [53]
anti-Fy ^a (52)	*04 *15 *04 nebo *15	7,9 3,2 16	12,9 [53]; 4,2[55]; 10,5[56] 4,3 [55]; 8,0 [56] 41,4 [55]
anti-Jk ^a (68)	*01	3,1	5,9 [54]
anti-S (19)	*07 *07 nebo *08	8,7 8,4	- -

NS – statisticky nevýznamný, OR – odds ratio

Je zřejmé, že prezentace výsledků dosažených analýzou souborů s méně než 30 jedinci a omezených úzkým populačním spektrem může zkreslovat výsledná data a je pravděpodobně příčinou rozdílných výsledků OR či nepotvrzení nalezených asociací v pozdějších studiích provedených s odlišnou kohortou pacientů. Výsledky mohly být rovněž ovlivněny specificitou zkoumaných protilátek, nástupem jejich tvorby po imunizačním podnětu, délkou přetrvávání

v oběhu a jejich detekovatelností. Nejvýznamnější asociace byla nalezena mezi alelickou skupinou *HLA-DRB1*04* a anti-Fy^a aloimunizací a *HLA-DRB1*07* s anti-S.

3.8 Multirespondeři

Kohortu 379 pacientů s výskytem dvou a více protilátek (tzv. multirespondeři) analyzoval opět Schonewille et al. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupin, první skupinu tvořilo 275 multiresponderů s vícečetnou specificitou již při prvním vyšetření aloprotilátek, druhá skupina 114 pacientů měla původně detekovanu pouze monospecifickou protilátku, ke které později přibyly další specificity. Po korekci zůstala statisticky významná vazba v případě první skupiny pouze pro *HLA-DRB1*12* (8 % vs. 3,8 %, OR = 2,2) a *DRB1*15* (40 % vs. 25,2 %, OR = 2). Při analýze obou skupin (379 pacientů) byla signifikance zachována pouze pro *HLA-DRB1*15* (OR = 1,8) vůči kontrolnímu souboru. Předpoklad, že se u multiresponderů vyskytuje zvýšená frekvence součtu všech asociovaných *HLA-DRB1* variant ve srovnání s kontrolní populací, byl ověřován analýzou kombinací protilátkových dvojic (např. C+D, D+E, c+E, atd). Z 625 vzniklých kombinací byla pouze u 80 (12,8 %) nalezena suma *DRB1* alel asociovaných s výskytem monospecifické aloprotilátky. Ve skupině 2 a více protilátek byly nalezeny u 5 kombinací protilátek signifikantně asociované *DRB1* alely, ve skupině právě dvou protilátek byla nalezena signifikance pouze pro kombinaci anti-c+E s *DRB1*07* a *DRB1*13* fenotypem [57]. Výsledky u multiresponderů jsou shrnuty v Tabulce 6.

Tab. 6 Statisticky významné asociace mezi *HLA-DRB1* a výskytem vícečetných protilátek proti erytrocytovým antigenům [57].

2 a více protilátek	<i>HLA-DRB1</i>*	OR
C+D	*01, *12	4,6
D+E	*03, *09	11,2
c+E	*07, *13	7,1
K+Fy ^a	*04, *15	7,5
K+S	*07, *10	39,4
2 protilátky	<i>DRB1</i>*	OR
c+E	*07, *13	9,2

3.9 Non HLA faktory a aloimunizace

Vedle vyšetření HLA genů byla u aloimunizovaných pacientů v několika studiích věnována pozornost i jiným genům. Byly to například *TAP-1*, 2 a *HSP70* non-HLA geny ležící v HLA oblasti, které byly vyšetřovány v souvislosti s HPA aloimunizací (zmíněnou dříve).

Signifikantní pozitivní asociace byla prokázána u *TAP2* homozygotní kombinace aminokyselin Ile-Ile v pozici 379 ($p_c < 0,02$, OR = 4,7), tento nálezn však nevedl k žádnému obecnému závěru [49]. Tatari-Calderone a kol. se zabýval pacienty se SA, onemocněním typickým pro populaci afrického původu, pro které jsou opakované transfuze erytrocytovými transfuzními přípravky jedinou možností léčby. Podíl responderů činil 18 až 47 % a byl až čtyřikrát vyšší než stupeň aloimunizace u pacientů bez této dědičné choroby a transfundovaných z jiných příčin. Autoři se zaměřili na geny s imunomodulačními vlastnostmi ležícími v blízkosti genu pro Hb β S. Jedním z vybraných kandidátních genů byl gen Ro52 se SNP polymorfismem rs660, který je asociován s SLE u afroameričanů. Produkt genu, protein Ro52, slouží jako intracelulární receptor pro imunokomplexy. Jeho vazbou se aktivují imunitní procesy v buňce vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů. Současně má stejná molekula i zcela opačnou funkci, jelikož inhibuje produkci interferonů typu I, má i protizánětlivé účinky. Polymorfismus rs660C/T se nachází v oblasti 1. intronu genu a zdá se, že ovlivňuje vazbu transkripčních faktorů na sekvenci obsahující zmíněný SNP. Na skupině 83 pacientů (afroameričanů) homozygotních pro hemoglobin S, transfundovaných nejméně dvěma AB0, RhD kompatibilními deleukotizovanými erytrocytovými TP, však zjistili, že žádný z genotypů polymorfismu rs660 není asociovaný s vyšším stupněm aloimunizace, ani s vážností onemocnění. Podání první transfuze před pátým rokem věku u pacientů s rs660T/T genotypem však vedl k toleranci aloimunizace při následném aloimunizačním podnětu. Po 5. roce věku je schopnost aloimunizace u nositelů C/T nebo T/T genotypů stejná. Zůstává otázkou, je-li příčinou imunotolerance skutečně genotyp T/T nebo obecně stav imunity u novorozenců a malých dětí [70]. Africká populace je v průměru schopna vyvinout silnější zánětlivou a imunitní odpověď než jiní transfundovaní pacienti, což je pravděpodobně příčinou vysokého podílu responderů. U afroameričanů je vyšší výskyt zánětlivých onemocnění (astma, SLE, RA atd.) a vyšší výskyt akutních rejekcí po transplantaci ve srovnání s kavkazoidní populací [71].

Vedle centrální role HLA molekul se při prezentaci peptidů odvozených z aloantigenů uplatňují i další složky buněčné a humorální imunity. Výzkum se v poslední době věnuje studiu polymorfismů v promotorové nebo jiné regulační oblasti genů pro cytokiny nebo kostimulační molekuly, které by mohly způsobit disbalanci v imunitní odpovědi a ovlivnit náchylnost jedince k RBC aloimunizaci. Sippert na souboru 161 pacientů s SA alo i nealoimunizovaných vyšetřovala celkem 7 polymorfismů v cytokinových genech: *IL1B*, *IL4*, *IL10*, *IL17* a *TNFA*. Autorka a její tým našli signifikantní asociaci alely *TNFA*-308A a genotypu *TNFA*-308GA s RBC aloimunizací (OR=3,65) a vyslovili hypotézu, že tento genotyp vede k vyšší produkci

TNF- α , který zvyšuje prozánětlivý status jedince a předurčuje pacienty s SA k vyššímu riziku aloimunizace. I další polymorfismus *IL1B*-511C/T, konkrétně genotypy -511TT a -511CT byly statisticky významně častější u skupiny aloimunizovaných ve srovnání s nealoimunizovanými (OR = 2,6 a OR = 3,6). I v tomto případě vyslovili hypotézu, že asociované genotypy jsou spojeny s dysregulací transkripce genu vedoucí k vyšší produkci prozánětlivého cytokinu IL-1 β . Žádná další signifikantní asociace mezi polymorfismy studovaných cytokinových genů nebyla nalezena. Autoři také zkoumali distribuci *HLA-DRB1*, *DQB1* a *DQA1* variant a našli zvýšenou frekvenci *DRB1**15 alelické skupiny u pacientů s anti-Rh protilátkami (15,6 %) ve srovnání s nealoimunizovanými (8,8 %) i kontrolní skupinou (6,98 %). Rovněž kombinovaný haplotyp *HLA-DRB1**15/ *TNFA*-308G byl častější u pacientů s anti-Rh protilátkami než u pacientů bez protilátek ($p = 0,031$; OR=2,75), ukázalo se však, že *DRB1**15 je nezávislý rizikový faktor a je asociován s vyšší vnímavostí k Rh aloimunizaci než polymorfismus *TNFA*-308G [72].

Příkladem kostimulační molekuly, která byla zkoumána v souvislosti s tvorbou RBC protilátek, je CTLA-4. Jedná se o receptor negativně regulující imunitní reakce, exprimovaný na aktivovaných Th CD4⁺ a Treg. Vazbou na ligandy CD80 a CD86 APC buněk přenáší T buňkám inhibiční signál, je antagonistou stimulačního receptoru CD28. Prvním polymorfismem zkoumaným v souvislosti s výskytem autoimunních chorob byl polymorfismus -318C/T v promotorové oblasti genu *CTLA-4*, kde byla nalezena asociace s autoimunním onemocněním štítné žlázy [73]. Ryder s kolektivem zkoumali vztah mezi autoimunitními onemocněními a aloimunizací proti červeným krvinkám a zjistili, že chronické zánětlivé prostředí je rizikovým faktorem pro tvorbu protilátek [74].

Oliveira spolu s dalšími pracovníky zkoumal u kohorty pacientů s SA kteří jsou predisponováni k tvorbě protilátek, polymorfismy -318C/T a 49A/G v genu pro *CTLA-4* a jejich asociaci s aloimunizací. Ze srovnání genotypových frekvencí obou polymorfismů u pacientů s SA vyšla signifikantně vyšší frekvence genotypu -318CT u aloimunizovaných pacientů (15,5%) ve srovnání s neimunizovanými pacienty (3,2 %; $p=0,016$; OR 5,4) [75].

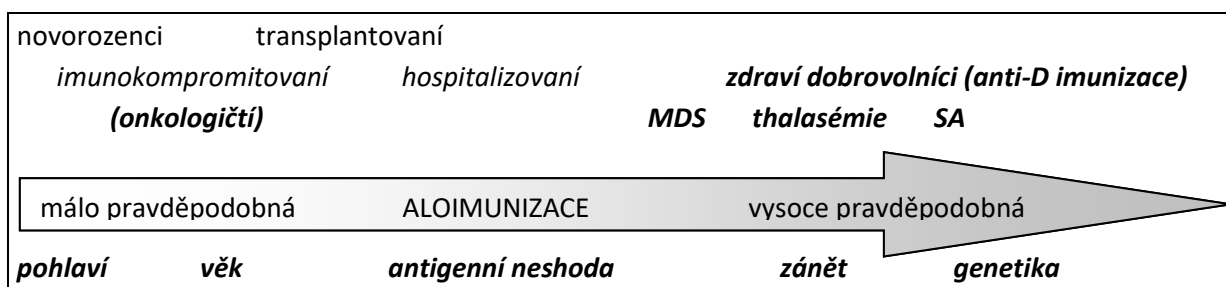
Práce Howea a Stacka se věnuje vlastnostem epitopů antigenů (velikost, prostorové uspořádání, náboj, hustota a glykosylace), které by mohly mít vliv na relativní imunogenicitu krevních skupinových antigenů [76]. Autoři pomocí regresní analýzy zjistili, že s výjimkou systému Kell nemá glykosylace epitopu vliv na imunogenicitu krevních skupinových antigenů. Nalezli pozitivní souvislost mezi imunogenicitou non RhD antigenů a velikostí domén těchto

proteinů. Silná imunogenicita RhD proteinu (700 x vyšší ve srovnání s dalšími RBC antigeny) silně koreluje s počtem rozdílných aa mezi RhCE a RhD proteiny, ale počet odlišných aa nemůže být příčinou rozdílné imunogenicity u non RhD krevních skupinových systémů, protože ostatní RBC antigeny, vyjma antigenu M, se liší od svého protikladu nebo homologního antigenu jen v jedné aa. Naopak autoři nenalezli žádnou spojitost mezi hustotou antigenů a jejich imunogenicitou.

Je známo, že tvorba protilátek u příjemců TP závisí na množství podaných TP a imunogenitě aloantigenů. Svou roli v rozdílné imunogenitě RBC hrají pravděpodobně i další vrozené a získané faktory, např. zvýšené riziko aloimunizace u žen v souvislosti s graviditou, u pacientů s diabetem a solidními nádory, snížené riziko u pacientů s myeloproliferativními chorobami (dysfunkce lymfocytů, imunosuprese). Zalpuri zveřejnil plán kohortové studie, jejímž cílem bude zkoumat možný vztah mezi klinickým stavem, životním prostředím a genetickou charakteristikou příjemců transfuze erytrocytů a rizikem aloimunizace během transfuzní periody. Autoři předpokládají dva výstupy ze studie: 1) identifikace skupiny příjemců transfuze, u nichž bude nutné zajistit co nejshodnější TP a 2) pochopení mechanismů související s tvorbou aloprotilátek. U vybraných pacientů (celkem asi 500 případů) i v kontrolní skupině (celkem 1000 jedinců) budou zmapovány všechny faktory modulující imunitní odpověď – očkovaní, onemocnění v dětském věku, návštěva předškolních zařízení, životní styl (vesnický, městský), sociálně-ekonomický status, chov domácích zvířat. Z genetických markerů budou vyšetřeny HLA geny, z biomarkerů cytokiny a titr protilátek proti antigenům vakcín [77].

Na základě dostupných informací lze schématicky (**Obr. 4**) znázornit faktory ovlivňující pravděpodobnost aloimunizace [78].

Obr. 4. Faktory ovlivňující aloimunizaci, převzato z publikace [78].



3.10 Vliv deleukotizace a délky skladování erytrocytových TP na aloimunizaci

Na myších modelech byl demonstrován efekt zánětlivého prostředí na aloimunizaci ve srovnání s kontrolní skupinou myší [79]. Byl rovněž zjištěn pozitivní vliv délky skladování myších erytrocytových přípravků na robustnější odezvu k aloantigenům ve srovnání s transfuzí čerstvějších přípravků [80] a v práci z roku 2018, rovněž prováděné na myších modelech, bylo dokázáno, že imunní aktivace k jednomu RBC antigenu může přímo zvyšovat protilátkovou odpověď na zcela odlišný RBC aloantigen [81]. Tyto závěry byly impulsem pro další studium aloimunizace u lidí. Zbytkové leukocyty a trombocyty zejména v nedeleukotizovaných TP mohou uvolňovat ze svých granulí během skladování prozánětlivé cytokiny, histaminy a lipidy. Yazer a Schonewille potvrdili, že základní zánětlivé onemocnění může příjemce TP potenciálně předurčit k responderství [82, 83].

Bilgin a kol. v přehledovém článku shrnul výhody plynoucí ze zavedení plošné deleukotizace nejen na aloimunizaci asociovanou s transfuzí, ale i na další klinické jednotky – snížení přenosu CMV infekce, snížení počtu febrilních transfuzních reakcí a TRALI a snížení mortality v kardiochirurgii [84]. Rovněž Desai potvrdil, že aloimunizace je asociována s transfuzí starších erytrocytových TP u pacientů s SCD [85]. Klinický efekt deleukotizace TP je neoddiskutovatelný, přesto v případě aloimunizace existují rozdílné výsledky. Např. Schonewille s kol. nenalezl rozdíl v aloimunizaci po aplikaci deleukotizovaných a nedeleukotizovaných TP [86]. Naopak v práci Seftela byl na retrospektivně analyzovaném souboru 617 pacientů podstupujících chemoterapii pro akutní leukemii nebo transplantaci krvetvorných buněk demonstrován benefit po zavedení plošné deleukotizace erytrocytových a destičkových TP v Kanadě od r. 1999. Transfuze deleukotizovaných TP vedla ke snížení aloimunizace z 19 % na 7 %, $p < 0,01$. Signifikantně byla snížena i refrakternost trombocytů z 14 % na 4 % a potřeba podání HLA shodných trombocytových TP. Autoři definovali tři nezávislé rizikové faktory aloimunní refrakternosti: podání nedeleukotizovaných TP, imunizační podnět v historii (těhotenství, transfuze) a podání 13 a více destičkových TP [87].

Asociací mezi délkou skladování erytrocytových TP a aloimunizací se zabýval tým Yazera. Do studie bylo zahrnuto 29 responderů a 58 nonresponderů RhD negativních, kterým byly podány transfuze erytrocytů různého stáří, z nichž část tvořily RhD pozitivní erytrocytové TP. Nonresponderům bylo aplikováno více TP včetně RhD pozitivních. Nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi aloimunizací a stářím všech podaných TP nebo stářím RhD

pozitivních TP mezi oběma skupinami pacientů [88]. Tým Zalpurioho v bicentrické studii retrospektivně zjišťoval, zda skladování erytrocytů je spojeno s rizikem tvorby antierytrocytových aloprotilátek. Do studie, která je součástí probíhající multicentrické studie R-FACT zmíněné dříve [76], byla vybrána kohorta 144 pacientů s nově vytvořenou protilátkou a 286 pacientů bez protilátky (kontrolní skupina), medián počtu transfundovaných jednotek byl 9, medián stáří TP byl 16 dnů. Ze srovnání skupiny pacientů a kontrol rozdělených do intervalů 1-14 dnů (čerstvé TP), 15 a 24 dnů (střední) a více než 21 dnů (starší) nebyl zjištěn žádný rozdíl. Pouze srovnáním pacientů, kterým byly transfundovány jen čerstvé TP a pacientům, kterým byly aplikovány pouze starší TP byla nalezena nejasná asociace (OR = 0,4) indikující určitý protektivní efekt starších TP. Z důvodu malého počtu příjemců TP s velmi krátkou expirací (do 7 dnů) a s dlouhou expirací (> 28 dnů) byly statisticky zpracovány data pouze příjemců TP stáří 7-28 dnů. Autoři na základě svých výsledků vyslovili hypotézu, která by mohla vysvětlit nepotvrzení očekávané asociace: 1. zvýšená imunogenicita způsobená aktivitou WBC v čerstvých TP se skladováním snižuje, 2. imunogenicita způsobená akumulací cytokinů, lipidů, histaminů a mikrogranulí se skladováním zvyšuje [89]. Protichůdné výsledky nalezené na myších modelech a v humánní medicíně byly pravděpodobně způsobené odlišnými podmínkami studie. Zatímco myši byly imunizovány „univerzálně“ TP o stáří 15 dnů (odpovídají 42 dnům lidských TP), pacienti ve studiích byli „léčeni“ TP různého stáří. Do studie nebyl zahrnut zdravotní stav dárců TP a dále zdravotní faktory pacientů, které mohly mít vliv na přežívání erytrocytů v jejich oběhu.

V souvislosti s vysokou prevalencí aloprotilátek proti antigenům erytrocytů u pacientů s SA bylo pozorováno, že opakované transfuze nejsou jedinou příčinou tvorby protilátek, ale také chronický zánětlivý stav spojený s chorobami a prozánětlivé cytokiny stimulující aktivaci APC buněk [90].

Autoři Hod a Spitalnik se ve svém přehledovém článku zabývají příčinami nežádoucích potransfuzních reakcí po aplikaci déle skladovaných erytrocytových TP. Během skladování erytrocytů dochází k jejich poškození („storage lesion“) a buněčným změnám, což vede k tomu, že až 25 % transfundovaných červených krvinek je z cirkulace eliminováno makrofágy během prvních 24 hodin. Autoři vyslovili hypotézu, že za (alespoň některé) nežádoucí reakce po transfuzi je odpovědná velká dávka železa, jež se uvolní z hemoglobinu těchto fagocytovaných erytrocytů, a která je až 60 x vyšší ve srovnání s eliminací erytrocytů za fyziologických podmínek (z 1 ml fagocytovaných krvinek je za hodinu průměrně uvolněno 1 mg železa). Tento bolus uvolněného železa převyšuje „metabolickou“ kapacitu makrofágů a

vede k uvolnění železa bez vazby na transferin. Na myších modelech bylo dokázáno, že extracelulární železo je mediátorem pro aktivaci nespecifické (vrozené) imunity, zánětu a infekce (volné chelatované železo je využíváno některými bakteriemi pro svůj růst). Studie na zdravých dobrovolnících, kterým byly odebrány dvě jednoty TP a poté transfundovány během prvních sedmi dní skladování a 40. - 42. den expirace, dopadla podobně, ovšem signifikantní byly pouze biochemické markery zvýšeného metabolismu železa svědčící o extravaskulární hemolýze. Byla potvrzena také vyšší proliferace ferrifilních bakterií v séru. Nebyla však detekována žádná přítomnost zánětu po aplikaci čerstvých nebo starších autologních TP [91].

3.11 HLA a nemoci

Hlavním cílem této DP je studium asociace mezi HLA systémem a aloimunizací proti erytrocytovým antigenům. Asociace mezi HLA geny a nemocemi je však známa více než 30 let. Asociované HLA alely představují pro nositele zvýšené riziko vzniku onemocnění. Avšak ne každý nositel asociované HLA alely onemocní, a ne každý pacient s daným onemocněním zdědil asociovanou HLA alelu. U některých onemocnění má ale určení HLA alel nebo kombinace těchto alel vysokou negativní prediktivní hodnotu, tzn., že při nepřítomnosti některé z asociovaných HLA alel je vysoce nepravděpodobné, že pacient trpí touto chorobou. Příkladem takového onemocnění je celiakie (nesnášenlivost lepku), pro kterou jsou charakteristické 3 haplotypové kombinace: 1. *HLA-DQA1*05:01, -DQB1*02:01*; 2. *HLA-DQA1*03:01, -DQB1*03:02* a 3. *HLA-DQA1*05:05, -DQB1*02:02* (v trans pozici), tvořící tzv. DQ2 a DQ8 heterodimery [92]. Ty mají vysokou afinitu k peptidům odvozeným z glutenu a deamidovaného glutenu s následnou T buněčnou imunitní odpovědí. Většina onemocnění asociovaných s HLA je autoimunitních. Příkladem orgánově specifického autoimunitního onemocnění je diabetes I. typu se silnou genetickou vazbou na HLA haplotypy: *DRB1*03, DQA1*05:01, DQB1*02:01* a *DRB1*04, DQA1*03:01, DQB1*03:02* (tytéž jako v případě celiakie), přičemž heterozygoti s oběma haplotypy mají vysoké riziko onemocnění s OR 16,59 [93]. U pacientů s RA se vyskytují signifikantně častěji alely *DRB1*03:01* a *DRB1*01:01* [94], přičemž *DRB1*03:01* je spojena s ancestrálním haplotypem HLA-A1, B8, DR3, který je nejčastěji citovaným haplotypem v souvislosti s autoimunitními chorobami.

4 SPECIÁLNÍ ČÁST

4.1 Cíle dizertační práce

Cílem této dizertační práce bylo:

1) Identifikovat možnou asociaci určitých HLA alel II. třídy s přítomností monospecifických erytrocytových aloprotilátek anti-C, -c, -Cw, -e, -M;

2) Potvrdit asociace HLA II. třídy u multiresponderů a u anti-E monoresponderů, publikované v dřívější studii [57];

3) Zjistit, zda existuje asociace mezi variantami HLA II. třídy a nepřítomností aloimunních protilátek proti antigenům červených krvinek u příjemců transfuze (nonresponderů), tzn. odhalit případný protektivní efekt některých HLA alel;

4) Rozdělit skupinu multiresponderů a nonresponderů dle Rh statusu a porovnat distribuci HLA II. třídy v RhD negativní a RhD pozitivní podskupině pacientů.

Kromě sledování *HLA-DRB1* asociací jsme se doplňkově zaměřili i na *DQB1* a *DQA1* geny.

4.2 Pacienti a metodické přístupy

4.2.1 Skupina responderů

Do studie responderů bylo zařazeno 230 pacientů aloimunizovaných proti antigenům RBC (163 žen a 67 mužů, poměr 2,4) ve věkovém rozmezí 22 – 90 let. U 35 žen (15 %) byly aloprotilátky identifikovány v kontextu s graviditou. Transfuzní terapie byla zajištěna erytrocytovými TP typu EBR nebo ERD, přičemž během studie činil poměr EBR a ERD v průměru 1,8. Erytrocytové TP mají expiraci 42 dnů, pacientům v naší studii byly aplikovány v 50 % případů TP stáří 12 dnů a méně a v 90 % případů byly TP vydány do 25. dne ode dne výroby.

Pacienti byli zařazováni do studie s ohledem na specificitu protilátky a míru aloimunizace (specifikováno v dalším textu). Pro statistické účely byli responderi rozděleni do dvou základních podskupin: podskupina 1 – monorespondeři a podskupina 2 - multirespondeři.

4.2.1.1 Podskupina monoresponseřů

U pacientů podskupiny 1 jsme při výběru preferovali jedince se specifickou protilátkou proti Rh antigenu. Celkem jsme získali 86 vzorků se specifitami anti-C, -Cw, -c, -E a -e. Rozhodli jsme se do studie zahrnout rovněž 20 jedinců s anti-M protilátkou, protože tato specifita nebyla dosud ve vztahu s HLA antigeny studována. Na Rh aloimunizaci jsme se soustředili proto, abychom zjistili roli HLA restrikce v případech, kdy je variabilita genů kódující antigeny určena mnoha SNP polymorfismy, viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Distribuce pacientů v podskupině monoresponseřů podle identifikovaných monospecifických protilátek (Podskupina 1, 106 pacientů)

Identifikované RBC protilátky	Anti-C	Anti-Cw	Anti-c	Anti-E	Anti-e	Anti-M
Počet jedinců	18	15	12	39	2	20

4.2.1.2 Podskupina multiresponseřů

Podskupina 2 byla zastoupena heterogenní kohortou 124 aloimunizovaných pacientů (91 žen a 33 mužů, poměr 2,76) tvořících aloprotilátky minimálně proti dvěma antigenům červených krvinek (multiresponseři). Celkem bylo v této skupině identifikováno 19 specifit aloprotilátek. Z celkového počtu 124 jedinců podstoupilo 72 pacientů (69 %) předtransfuzní vyšetření a transfuzní terapii ve FN Ostrava (poměr žen a mužů 2,4), počet transfundovaných jednotek činil 1 až 48, medián 4 jednotky). Zbylých 31 pacientů (poměr žen a mužů 1,7) nemělo žádný záznam o transfuzní historii v databázi Krevního centra FNO. 20 žen (22 %) mělo protilátky komplikující těhotenství. Průměrný věk mužů byl 66,3 roku (rozmezí 42–92 let), průměrný věk žen s vyloučením gravidních byl 69 let (rozmezí 39–91 let). Skupina 20 těhotných žen měla věkový průměr 31,9 let (rozmezí 22–43 let).

Pro statistické vyhodnocení jsme pacienty v podskupině 2 dále rozdělili podle nejčastějších kombinací protilátek (např.: anti-C+D, anti-E+c atd.). Celkem bylo statisticky zpracováno 112 multiresponseřů s konkrétními kombinacemi protilátek přítomnými u více než jednoho jedince, viz Tabulka 8.

Porovnávali jsme fenotypové frekvence HLA variant II. třídy v podskupinách multiresponseřů RhD pozitivních a RhD negativních (Tabulka 9). Kvůli poměrně vysokému zastoupení pacientů s fenotypem RhDCCee jsme rovněž provedli porovnání distribuce HLA

varint II. třídy mezi dvěma podskupinami RhD pozitivních multiresponderů s fenotypem CCDee a ostatními RhD pozitivními fenotypy (tj. CcDee, CcDEe, ccDEe a ccDEE).

Tabulka 8 Distribuce pacientů v podskupině multiresponderů s identifikovanými vícečetnými protilátkami (Podskupina 2, 124 pacientů) podle nejčastějších kombinací protilátek

Kombinace protilátek	Počet jedinců	RhD pozitivních	RhD negativních	RhCE fenotyp
C+D+další (≥ 2 Abs)	46	0	46	ccee
C+D (=2 Abs)*	33	0	33	
C+G	2	0	2	ccee
E+další (≥ 2 Abs)	61	44	17	CCee, Ccee,ccee
E+c (≥ 2 Abs)	20	20	0	CCee
E+Cw (≥ 2 Abs)	14	12	2	Ccee, CCee
E+D	12	0	12	Ccee, ccee
e+C	8	8	0	ccEE
Ostatní (c+K, Cw+K, Jka+Fya, D+c,...)	9	8	1	----

* Přítomnost anti-C+D protilátek a anti-G protilátek byla testována pouze u gravidních žen; tyto specifity se u transfundovaných pacientů nerozlišují.

Dále jsme porovnali frekvence *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *-DQB1* alelických skupin u 124 multiresponderů s frekvencemi HLA II. třídy kontrolní skupiny zdravých členů ČNRDD a také s frekvencemi HLA II. třídy u nonresponderů. Multirespondery a nonrespondery jsme porovnali i podle přítomnosti RhD antigenu, který je nejimunogennějším non-AB0 antigenem a podle Rh statusu. Pomocí rozdělení pacientů podle dalších imunohematologických parametrů, konkrétně Rh znaků, jsme se snažili najít možnou asociaci mezi RBC antigeny a aloimunizací. U takto rozdělených skupin pacientů jsme rovněž porovnali alelické frekvence a nosičství HLA variant II. třídy.

Tabulka 9 Rh status ve skupině multiresponderů v absolutních a relativních číslech

RhD status	multirespondeři (N=124)
RhD neg	61 (49,2 %)
RhD poz	63 (50,8 %)

Při dělení pacientů do skupin jsme vzali do úvahy i „historické“ protilátky, které nebyly v posledních testech již detekovány, přesto 27 % pacientů v naší skupině bylo testováno na našem oddělení pouze jednou a nelze tedy zcela vyloučit nesprávné zařazení multirespondera do skupiny monoresponseů z důvodu vymizení protilátky.

4.2.2 Skupina nonresponderů

Do skupiny nonresponderů jsme zařadili celkem 109 pacientů (50 žen a 59 mužů; poměr, 0,85; ve věku 19 – 87 let) bez RBC protilátek a transfundovaných minimálně 10 jednotkami EBR nebo ERD. Počet aplikovaných jednotek byl v rozmezí od 10 do 185; medián 21,5. Na základě indikace transfuzní léčby jsme nonresponduery profilovali do dvou podskupin 1) chronicky transfundovaných pacientů s hematologickými nebo hematonekologickými diagnózami (55 %) a 2) „obecně hospitalizovaných“ pacientů nejčastěji pro chirurgické výkony (45 %). Protože v našem souboru bylo celkem 30 pacientů s hematologickými malignitami, u nichž bylo referováno snížené riziko aloimunizace [78], porovnávali jsme navíc HLA frekvence mezi nonresponduery bez imunosuprimovaných pacientů (tj. 79 jedinců) a multiresponduery.

Podle počtu transfuzních epizod obdrželo 75 pacientů (68,8 %) léčbu erytrocytovými TP ve více než 12 epizodách a 34 pacientům (31,2 %) byla aplikace RBC přípravků rozdělena od 1 do 10 transfuzních epizod (medián 5,5). Screening nepravidelných protilátek proti RBC antigenům se standardně provádí před každou transfuzí, proto čím vyšší je počet transfuzních epizod, tím vyšší pravděpodobnost záchytu aloimunních protilátek.

Rozšířené typování RBC antigenů se u pacientů bez protilátek rutinně neprovádí, z těchto důvodů byla skupina nonresponderů rozdělena pouze podle RhD antigenu, který je spolu s AB0 antigeny běžně vyšetřován. RhD pozitivních bylo 96 pacientů (88,1 %), z toho 47 žen a 49 mužů; poměr 0,96. RhD negativní skupinu nonresponderů tvořilo 13 jedinců (11,9 %), z toho 3 ženy a 10 mužů; poměr 0,3.

Třinácti RhD negativním nonresponduerům byla provedena genotypizace *RHD/RHCE* genů, výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 10. Z celkového počtu 109 nonresponderů 11 pacientů, tj. 10,1 %, neslo ccee fenotyp.

Tabulka 10 Charakteristika podskupiny RhD negativních nonresponderů s uvedením jejich *RHCE* genotypu

Pohlaví, věk (roky)	Počet TP	<i>RHCE</i> genotyp
M, 73	45	ccee
Ž, 75	86	ccee
Ž, 68	31	Ccee
M, 77	10	ccee
M, 63	15	ccee
M, 54	35	ccee
M, 78	19	ccee
M, 56	16	ccee
M, 80	26	Ccee
Ž, 70	15	ccee
M, 78	18	ccee
M, 72	11	ccee
M, 77	11	ccee

M – muž, Ž – žena

4.2.3 Kontrolní soubor

Kontrolní skupinu tvořilo 375 zdravých členů ČNRDD. Kontrolní skupina byla získána z regionu Moravsko-slezského kraje a byla tedy etnicky a regionálně shodná s pacienty. Kohortu tvořilo 236 mužů s průměrným věkem 30,1 let (rozmezí: 19-40 let) a 139 žen s průměrným věkem 28,7 let (rozmezí: 19-45 roků). Výsledky genotypizací *HLA-DRB1* a *DQB1* variant nám pro všechny jedince v kontrolním souboru poskytl ČNRDD v Plzni.

4.3 Izolace DNA

Zbytky krevních vzorků pacientů s identifikovanými protilátkami byly shromažďovány a skladovány od března 2014 do prosince 2015. Při výběru jsme preferovali pacienty s nejméně dvěma specifitami (multirespondeři) nebo pacienty s anti-M protilátkou nebo s jednou anti-Rh protilátkou (monorespondeři). Třídění a skladování krevních vzorků pacientů s pozitivní transfúzní historií a negativním screeningem erytrocytových protilátek (nonrespondeři) probíhalo od června 2016 do června 2017. Před testováním jsme vyžadovali od pacientů informované souhlasy se zařazením do studie, která byla schválena etickou komisí FN Ostrava (č. 382/2014).

DNA byla izolována z rozmražených krevních vzorků kolonkovou centrifugační metodou s využitím proteinázy K (High Pure PCR Template Preparation Kit, výrobce Roche

Diagnostics GmbH, Germany) nebo automatizovanou technikou pomocí paramagnetických partikulí (Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit, výrobce Promega Corp., Wisconsin, USA). K izolaci DNA centrifugační metodou využívající mikrokolonky s křemičitými vlákny schopnými zachytit lyzát obsahující nukleové kyseliny bylo použito 200 µl plné krve a pro izolaci pomocí paramagnetických částic 300 µl plné krve. Obě metody poskytly templátovou DNA srovnatelných kvalitativních i kvantitativních parametrů (medián parametru čistoty DNA daný poměrem absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm byl > 1,8 u obou metod a medián koncentrace DNA byl > 30 ng /µl bez ohledu na metodu izolace). DNA responderů byly označeny kódem ve tvaru Gx, DNA nonresponderů kódem GNx, kde x znamená pořadové číslo vzorku. Protože výrobce genotypizačních kitů doporučoval vstupní templátovou DNA o koncentraci 20 ng /µl, koncentrovanější vzorky jsme ředili vodou v PCR kvalitě na požadovanou koncentraci. Pokud byla vstupní koncentrace DNA nižší, dávkovali jsme vyšší množství templátu do reakční směsi tak, aby výsledné množství DNA v PCR směsi bylo cca 2 ng. Při izolaci DNA jsme postupovali dle návodů výrobců kitů.

4.4 Genotypizace *HLA-DRB1* a *DQA1/DQB1*

Detekce alel / alelických skupin HLA II. třídy byla provedena metodou **polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými oligosondami (PCR-SSO)**. U této metody je samotná PCR specifická pro daný HLA lokus a odlišení HLA alel či alelických skupin vyžaduje postamplifikační fázi. Typizovali jsme pomocí diagnostických souprav LABType® SSO *DRB1* and LABType® SSO *DQA1/DQB1*, které vyrábí firma One Lambda, Thermo Fisher Scientific Brand, USA. Reagencie uváděné dále jsou součástí těchto komerčních souprav, pokud není uvedeno jinak. Po amplifikaci, při které je PCR produkt biotinylován, a následné denuraci byly PCR vzorky hybridizovány se sekvenčně specifickými sondami vázanými na fluorescenčně značených mikrokuličkách. Po odmytí nenavázané frakce se ke kuličkám přidal s phycoerythrinem (PE) konjugovaný streptavidin (SAPE). Streptavidin má vysokou afinitu k biotinu, kterým byl označen PCR produkt. Pozitivní reakce tedy detekuje alely/alelické skupiny hybridizující se specifickou sondou navázanou na určitou kuličku. Tato metoda využívá technologii Luminex®. Průtokový analyzátor Luminex® 200 (Luminex Corporation, USA) identifikuje fluorescenční intenzitu PE na každé mikrokuličce. HLA výsledek byl po odečtení fluorescence následně vygenerován pomocí software HLA Fusion™ (One Lambda,

A Thermo Fisher Scientific Brand, USA), který je založen na porovnání reakčních vzorců se vzorci asociovanými s publikovanými sekvencemi HLA genů.

Amplifikace. PCR reakční směs o objemu 20 μl obsahovala 13,8 μl D-mix, 4 μl primerové směsi (součást diagnostického kitu), 0,2 μl Taq polymerázy (5 U/ μl) a 2 μl vyšetřované DNA ([c] = 20 ng/ μl). PCR směs byla amplifikována v termocykléru C1000 (BIORAD, Německo) programem dle příbalové informace kitu LABType[®] SSO PCR (96 °C 3 min.; 5 cyklů: 96 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s; 30 cyklů: 96 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s; závěrečná elongace: 72 °C 10 min., chlazení: 4 °C). **Kontrola amplifikace.** Pomocí elektroforézy na 2 % agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem ([c] = 10 ng/ μl) v 0,5 x TBE pufru byla kontrolována přítomnost PCR produktu/-ů (jeden produkt při amplifikaci *DRB1*, dva při amplifikaci *DQA1/DQB1*). DNA jsme nechali dělit 25 min při 125-130 V. **Hybridizace.** Pokud jsme nezačali s hybridizací během hodiny po amplifikaci, PCR produkt jsme uchovávali při teplotě < -20 °C. Výrobce garantoval použití produktu do 1 měsíce od zmražení. Do PCR zkumavek jsme dávkovali 2,5 μl denaturačního pufru a 5 μl vzorku, promíchali pipetou a inkubovali 10 min při pokojové teplotě. K denaturovanému vzorku jsme přidali 5 μl neutralizačního pufru a zkumavku vložili do chladicího bločku. Přidali jsme 38 μl směsi mikrokuliček v hybridizačním pufru (4 μl mikrokuliček + 34 μl hybridizačního pufru), zkumavku jsme uzavřeli, promíchali na vortexu a vložili do termocykléru C1000 předehřátého na 60 °C a nechali hybridizovat 15 min. Po ukončení inkubace následovaly 3 promývací kroky: 100 μl promývacího pufru a centrifugace 5 min při 1000-1300 g odstředivkou C3.12 (JOUAN, Francie). Mezitím jsme si připravili barvicí roztok 1 x SAPE (0,5 μl SAPE + 49,5 μl pufru SAPE). Po posledním promytí jsme k sedimentu přidali 50 μl barvicí směsi, promíchali a vložili do termocykléru C1000 na 5 minutovou inkubaci při teplotě 60 °C. Poté jsme přidali 100 μl promývacího pufru a centrifugovali 5 min/1000-1300 g (odstředivka C3.12). Slili jsme supernatant a lehce osušili zkumavku papírovým ručníkem. Sediment jsme resuspendovali 80 μl promývacího pufru. Zkumavku se vzorkem jsme uchovávali při 4 °C do začátku analýzy. Během hybridizace jsme analyzátor Luminex[®] 200 připravili k analýze dat (předehřátí laserů, promytí dle návodu k přístroji Luminex[®], adjustace jehly) a nastavili protokol dle katalogového čísla produktu a čísla šarže. Vzorek jsme v PCR zkumavce několikrát opatrně promíchali pipetou a kvantitativně přepipetovali do destičky typu V. Nadefinovali jsme umístění vzorku v desce, zadali identifikační číslo vzorku a spustili analýzu. Z průměrné intenzity fluorescence (MFI) každé sondy je softwarem HLA Fusion[™] stanoven HLA genotyp vyšetřovaných lokusů, který byl pro komplexnost určování HLA alel vždy ručně kontrolován, případně upraven a schválen.

Malá část vzorků multiresponderů byla genotypizována technikou **polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)** s využitím diagnostických kitů (Olerup SSP® HLA-DR low res., Olerup SSP® HLA-DQ low res., Olerup SSP® *HLA-DQA1* high res.), výrobce Olerup SSP® AB, Švédsko. Metoda PCR-SSP pracuje na principu, při kterém jsou v průběhu PCR reakce zvýhodněny primery absolutně komplementární k templátové DNA před primery vyznačujícími se neshodami na 3' konci. Pokud PCR reakce probíhá za přesně definovaných podmínek, dávají tyto zcela komplementární primery vznik specifickým produktům. Tyto specifické pozitivní reakce definují HLA znaky vyšetřovaného vzorku. Diagnostické kity obsahovaly: **PCR zkumavky s vysušenou (lyofilizovanou) směsí primerů** alelově nebo skupinově specifických, párem primerů pro vnitřní kontrolu, kterou představuje segment genu pro lidský růstový hormon dávající vznik produktům o velikosti 800/1070 bp, respektive 515/430 bp a jednu zkumavku se směsí specifických primerů, která umožňuje zachytit případnou kontaminaci PCR mixu, tzv. negativní kontrola nebo kontrola kontaminace; a **PCR Master Mix (MM)** bez Taq polymerázy. Objem reakční směsi závisel na počtu reakcí použitého kitu, přičemž je třeba počítat s rezervou navíc kvůli drobným odchylkám při pipetování.

Složení PCR-SSP reakční směsi pro 10 reakcí (s rezervou) bylo: 45 µl Master Mix, 72,5 µl PCR H₂O, 1,0 µl Taq polymerázy (5U / µl). Po odpipetování 10 µl směsi do zkumavky označené jako negativní kontrola se přidalo 30 µl DNA vzorku ([c] = 20-30 ng/ µl) a z této směsi se dávkovalo 10 µl do každé zkumavky s primerovou směsí. Vzorky byly amplifikovány (termocyklér C1000) dle programu uvedeného v příbalové informaci kitů Olerup SSP® (94 °C 2 min.; 10 cyklů: 94 °C 10 s, 65 °C 60 s; 20 cyklů: 94 °C 10 s, 61 °C 50 s, 72 °C 30 s; chlazení: 4 °C). Před elektroforézou jsme amplifikovaný produkt uchovávali při 2-8 °C (24 hod.) nebo při < -20 °C (nejdéle 1 měsíc). Dělení PCR fragmentů probíhalo na 2 % agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem ([c] = 10 ng/ µl) v 0,5 x TBE pufru 25 min při 120-130 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na UV transiluminátor ECX – F20.M (Vilber Lourmat, Francie) poskytující záření o vlnové délce 260 nm ke zviditelnění DNA fragmentů a byla pořízena fotodokumentace gelu. Provedli jsme záznam pozitivních reakcí, tj. přítomnosti specifických produktů, které se jeví jako svítící proužek o očekávané velikosti a vyhodnocení pomocí softwaru HELMBERG-SCORE™ (poskytován zákazníkům kitů Olerup SSP® zdarma).

Výsledky HLA genotypizace jsme postupně zaznamenávali do databáze studie pod kódovým označením vzorků.

4.5 Vyšetření RH genotypu u skupiny nonresponderů

RH genotyp u 13 vzorků negativních pro RhD antigen ze skupiny nonresponderů byl určen vyšetřením *RHD* a *RHCE* genů metodou polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP, RH-TYPE, BAG Health Care GmbH, Germany). Součástí kitu byly PCR zkumavky s vysušenou primerovou směsí obsahující specifický a kontrolní primerový pár a PCR pufr (MM) 10 x koncentrovaný. Taq polymeráza od stejného výrobce (Happy Taq, 5U/ μ l) byla dodána zvlášť. Kity jsou optimalizovány pro DNA o koncentraci 50-100 ng/ μ l. V případě nižší nebo vyšší koncentrace byl adekvátně upraven objem vody a DNA při přípravě PCR reakční směsi.

PCR reakční směs o objemu 160 μ l (13 reakcí s rezervou) pro vyšetření RH typu obsahovala: 16 μ l 10 x PCR-buffer, 16 μ l DNA, 128 μ l H₂O v PCR kvalitě, 1,3 μ l Taq polymerázy. Po promíchání se směs dávkovala po 10 μ l do PCR zkumavek s lyofilizovanou směsí primerů, zkumavky se uzavřely víčkem a vložily do termocykléru C1000 a byl zahájen amplifikační program dle návodu výrobce kitu společný pro všechny kity BAGene SSP soupravy: (96 °C 5 min., 5 cyklů: 96 °C 10 s, 70 °C 60 s; 10 cyklů: 96 °C 10 s, 65 °C 50 s, 72 °C 45 s; 15 cyklů: 96 °C 10 s, 61 °C 50 s, 72 °C 45 s; 72 °C 5 min.; chlazení: 4 °C).

Po ukončení amplifikace bylo provedeno elektroforetické dělení PCR fragmentů na 2 % agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (10 ng/ μ l) v 0,5 x TBE pufru 25 min při 120-130 V. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na UV transiluminátor ECX – F20.M (záření o vlnové délce 260 nm) ke zviditelnění DNA fragmentů a byla pořízena fotodokumentace gelu. Vyhodnocení genotypu bylo provedeno pomocí odečítací tabulky, která je součástí vyhodnocovacího protokolu.

4.6 Imunohematologická vyšetření

Všechna imunohematologická vyšetření, tj. screening a identifikace erytrocytových protilátek a vyšetření krevních skupinových systémů AB0 a Rh byla provedena na úseku Imunohematologie v laboratoři Předtransfuzního vyšetření a laboratoři Speciální imunohematologie Krevního centra Fakultní nemocnice Ostrava. Výsledky vyšetření protilátek a krevní skupiny byly vloženy do informačního systému Krevního centra. Tato databáze byla zdrojem informací o aloimunizovaných pacientech a polytransfundovaných pacientech bez protilátek, kteří tvořili studovaný soubor.

4.6.1 Identifikace erytrocytových protilátek

Nepravidelné (v anglosaské literatuře uváděné jako non-AB0) protilátky byly identifikovány metodou sloupcové gelové aglutinace nepřímým antiglobulinovým testem v prostředí s nízkou iontovou silou (LISS-NAT) s využitím diagnostických karet (DG Gel®, Grifols, Španělsko) a diagnostického panelu 11 červených krvinek (Identisera Diana, Grifols, Španělsko). K rozlišení směsi protilátek anti-C+D od anti-G u gravidních pacientek bylo použito „in-house“ adsorpční metodiky.

4.6.2 Screening erytrocytových protilátek

Screening RBC protilátek se prováděl v rámci předtransfuzního vyšetření před každou transfuzí, respektive transfuzní epizodou. Podobně jako u identifikace byla použita metoda sloupcové gelové aglutinace s gelovými LISS-NAT kartami (DG Gel Coombs®, Grifols, Španělsko) a diagnostickým panelem 4 erytrocytů Serascan Diana 4 (Grifols, Španělsko).

4.6.3 Vyšetření krevní skupiny AB0 a antigenu RhD

Vyšetření krevního skupinového systému AB0 a antigenu RhD tvoří spolu se screeningem erytrocytových protilátek a zkouškou kompatibility předtransfuzní vyšetření pacientů. Pro vyšetření AB0 a RhD byly využity dvě techniky: 1. zkumavková aglutinační s diagnostickými séry (monoklonální anti-A, anti-B a anti-D IgM, anti-D IgG/IgM, Sanquin Reagents, Holandsko) a červenými krvinkami (Reagent Red Blood Cells, Immucor, USA), 2. metoda sloupcové gelové aglutinace na gelových kartách (DG Gel®, Grifols, Španělsko) s monoklonálními IgM diagnostickými séry (Diagnostic cards DG Gel AB0/Rh(2D), Grifols, Španělsko) a červenými krvinkami (Serigrup Diana A1/B, Grifols, Španělsko).

4.7 Statistická analýza

Ve vyšetřovaných souborech jsme určovali absolutní a relativní alelické a fenotypové (zastoupení nosičů) frekvence alelických skupin na lokusech *HLA-DRB1*, *DQB1* a *DQA1*. Zjištěné frekvence jsme porovnávali mezi pacienty, resp. podskupinami pacientů, a kontrolní skupinou Pearsonovým Chí-kvadrát testem. V případě malého počtu případů v podskupině jsme zvolili Fisherův exaktní test. Jelikož jsme v naší studii nemohli použít relativní riziko, protože

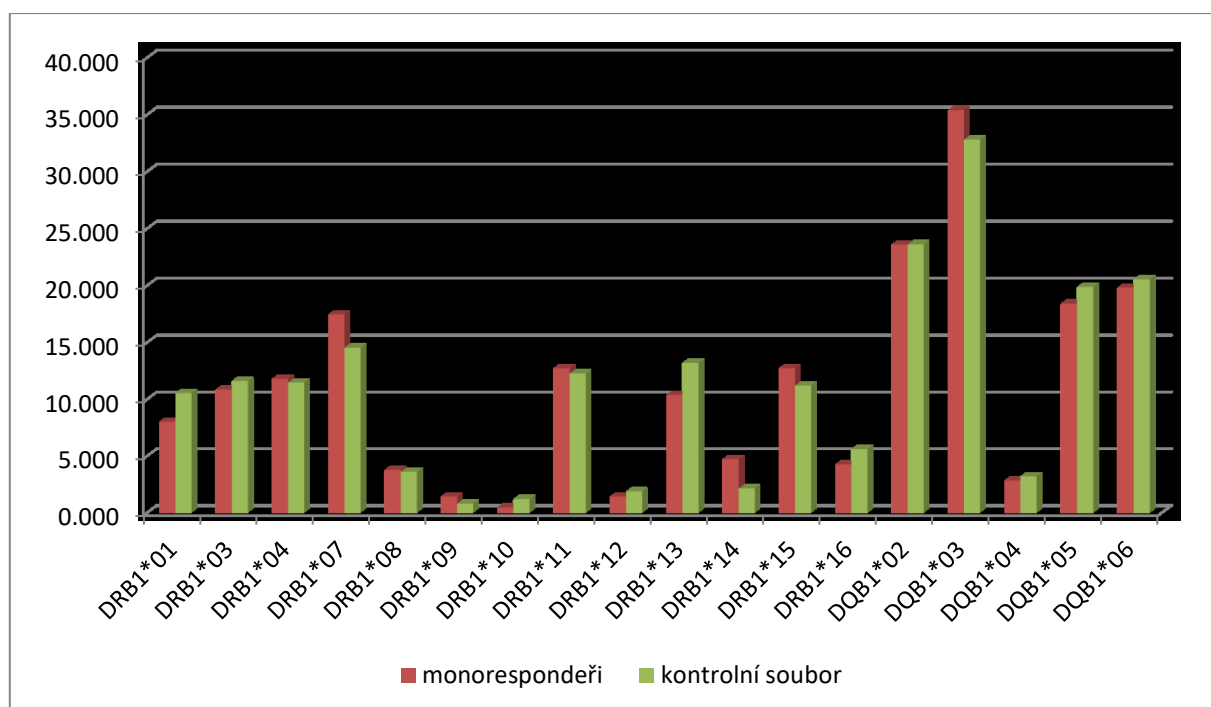
neznáme kumulativní incidenci, použili jsme pro kvantifikaci pravděpodobnosti expozice případů a pravděpodobnosti expozice kontrol **odds ratio** (OR), neboli poměr šancí při 95 % intervalu spolehlivosti (CI). Vypočtenou nominální hodnotu $P < 0,05$ jsme upravili pomocí Bonferroniho korekce pro vícečetná srovnání dle vzorce $P_c = P \times n$, kde n je počet srovnávaných alelických skupin pro jednotlivé HLA geny, tzn. pro lokus *DRB1* třináct a pro *DQB1* pět. P_c hodnoty $< 0,05$ byly hodnoceny jako statisticky signifikantní.

5 VÝSLEDKY

5.1 Monorespondeři a kontrolní soubor

V této části práce jsme se zaměřili na analýzu asociace mezi variantami HLA II. třídy a přítomností protilátek proti právě jednomu RBC aloantigenu (pacienti – monorespondeři). Frekvence *HLA-DRB1* a *DQB1* alelických skupin u celé skupiny monoresponderů jsou zpracovány graficky (Graf 1). Jak je patrné z grafického znázornění, zastoupení *HLA-DRB1* a *-DQB1* variant u responderů s monospecifickou protilátkou (Podskupina 1) bylo podobné jako u kontrolní skupiny. U monoresponderů byla pouze lehce zvýšená frekvence *DRB1*14* (4,7 % vs 2,1%; $P = 0,04$; OR, 2,2; 95 % CI, 1,0-5,1; po korekci nesignifikantní).

Graf 1 Alelické frekvence (%) *HLA-DRB1* a *-DQB1* alelických skupin v celém souboru monoresponderů (N=106) v porovnání s kontrolním souborem (N=375)



Podobně jsme nezachytili statisticky signifikantní asociaci variant HLA II. třídy u žádné z pěti podskupin monoresponderů dělených podle specificity protilátek, výsledky jsou prezentovány v Grafech 2 – 6 (frekvence *HLA-DRB1*) a Grafech 7-11 (frekvence *HLA-DQB1*). Frekvence *HLA-DRB1* a *-DQB1* variant u monoresponderů rozdělených podle specificity protilátek, u nichž byl zjištěn nominálně signifikantní rozdíl ($P < 0,05$; $P_c > 0,05$), jsou uvedeny v Tabulce 11.

Zaznamenali jsme trend k odlišným HLA frekvencím u anti-C, anti-c a anti-Cw podskupin pacientů. Alelická skupina *DRBI*04*, která byla téměř 2x častější u anti-C podskupiny než u kontrol (OR 2,2), zcela chyběla u kohorty pacientů s protilátkami anti-c a anti-Cw (0 %). Naopak *DRBI*07* byla více zastoupena v podskupině monoresponderů s anti-c (23,3 %) a anti-Cw (20,8 %) protilátkami ve srovnání s kontrolní skupinou (14, 5%), ale u anti-C pacientů byla zachycena pouze v jednom případě (2,8 %; OR, 0,17; 95% CI, 0,02-1,24; P = 0,047; nesignifikantní po korekci). Podobně v *DQBI* lokusu jsme pozorovali rozdíly v alelických frekvencích u jednotlivých podskupin, konkrétně *DQBI*02* byla četnější u pacientů s anti-Cw ve srovnání s kontrolním souborem (40,0 % vs. 23,6 %; OR, 2,2; P=0,04; nesignifikantní po korekci (Tabulka 11), ale ojedinělá u anti-C pacientů oproti kontrole (8,3 % vs. 23,6 %; OR, 0,3; 95% CI, 0,02-0,97; P = 0,02; nesignifikantní po korekci). Rozdíl frekvencí *HLA-DQBI*02* byl mezi skupinou anti-Cw a anti-C dokonce signifikantní (40,0 % vs. 8,3 %; P=0,003; Pc=0,015; OR, 7,3; 95% CI, 1,8-29,4), viz **Graf 12**.

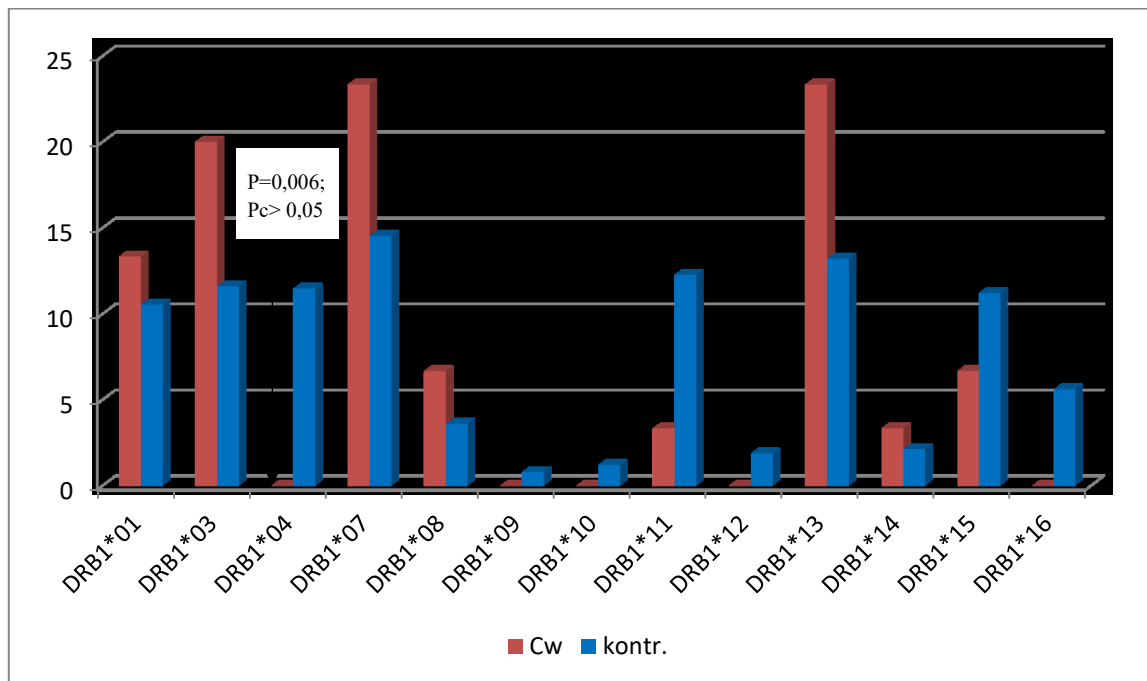
Přítomnost anti-E protilátek u monoresponderů nebyla signifikantně asociována s žádnou *DRBI* nebo *DQBI* alelou v porovnání s kontrolní skupinou, i když jsme zachytili určitou tendenci k vyšší přítomnosti alelické skupiny *DRBI*09* (**Tabulka 11**).

Tabulka 11 Nominálně signifikantní ($P < 0,05$) asociace *HLA-DRB1* a *DQB1* alel s výskytem aloprotilátek u monoresponderů rozdělených podle specifity protilátek.

Podskupiny monoresponderů dle specifity protilátky	Asociované alely	Pacienti frekvence (%)	Kontroly frekvence (%)	<i>P</i> hodnota [†]	OR	95% CI	<i>Pc</i> hodnota
Anti-C	<i>DRB1*04</i>	22,2	11,5	0,049	2,2	1,0-5,0	NS
	<i>DRB1*07</i>	2,8	14,5	0,047	0,17	0,02-1,24	NS
Anti-Cw	<i>DQB1*02</i>	40,0	23,6	0,039	2,2	1,0-5,0	NS
	<i>DRB1*04</i>	0	11,5	0,006	-	-	NS
Anti-c	<i>DRB1*15</i>	25,0	11,2	0,035	2,6	1,0-6,0	NS
	<i>DRB1*04</i>	0	11,5	0,016	-	-	NS
Anti-E	<i>DRB1*09</i>	3,8	0,8	0,01	5,0	1,2-20,2	NS
Anti-M	<i>DRB1*04</i>	22,5	11,5	0,037	2,2	1,0-4,8	NS
	<i>DRB1*01</i>	0	10,5	0,01	-	-	NS

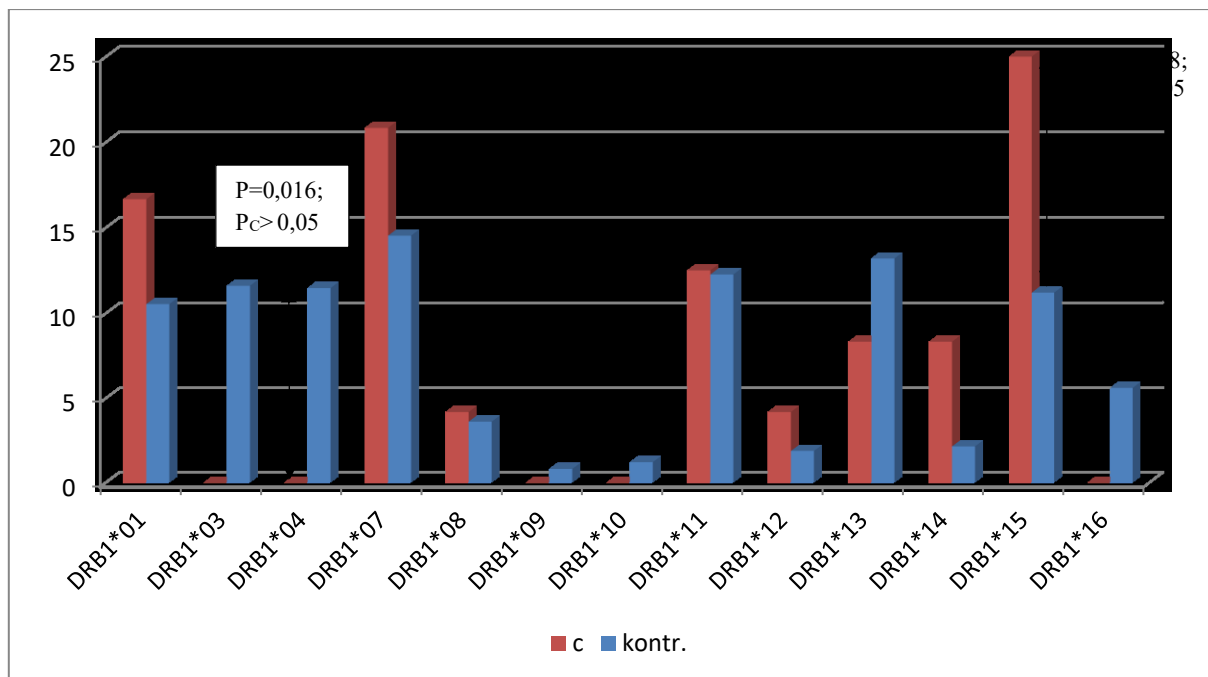
[†] Fisherův exaktní test
NS = nesignifikantní (*Pc* hodnota > 0,05)

Graf 2 Distribuce *HLA-DRB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseů s anti-Cw protilátkou (N=15) a v kontrolní skupině (N=375).



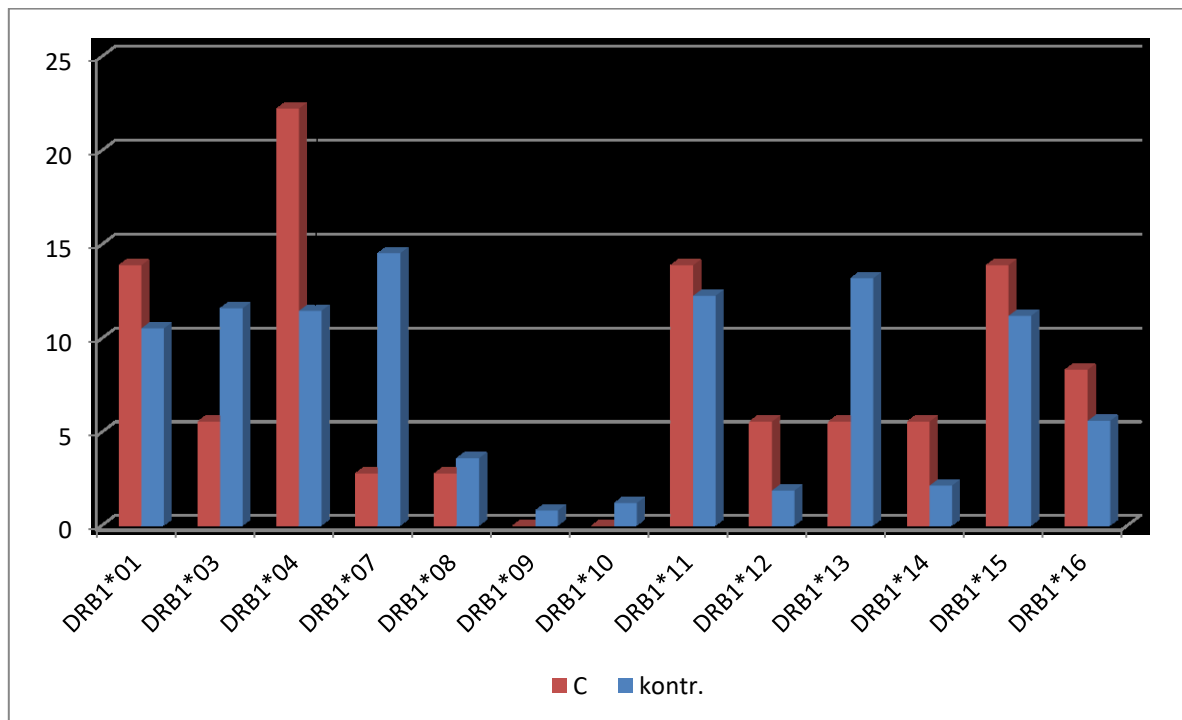
*HLA-DRB1*04* nebyla v podskupině monoresponseů s anti-Cw zachycena.

Graf 3 Distribuce *HLA-DRB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseů s anti-c protilátkou (N=12) a v kontrolní skupině (N=375).

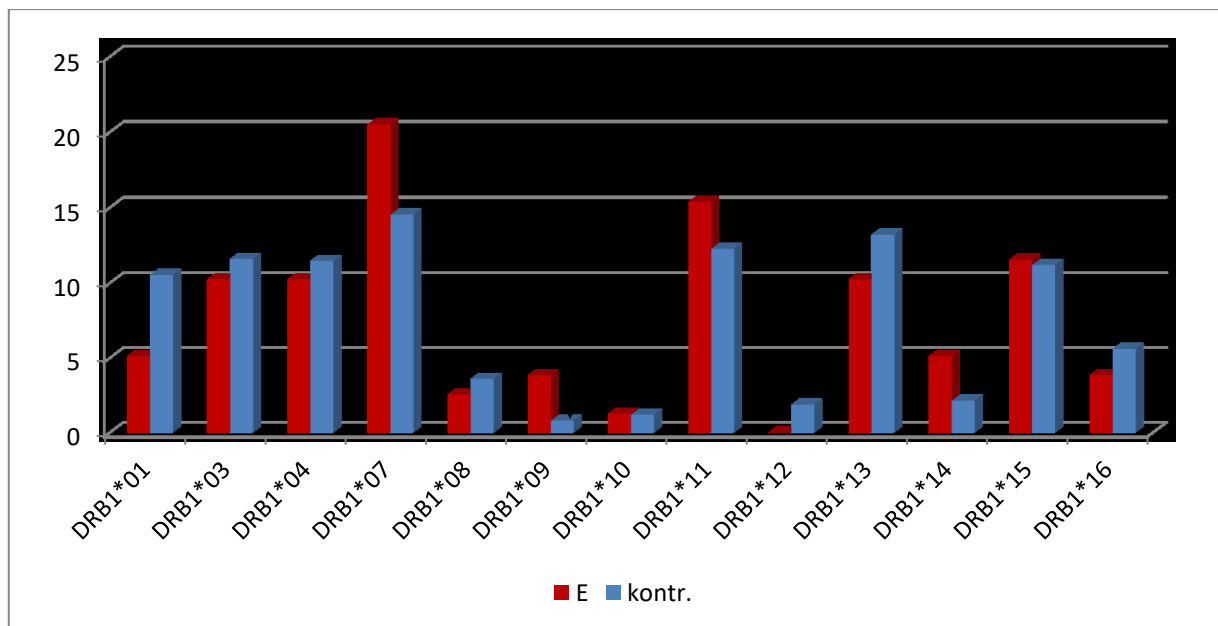


*HLA-DRB1*04* nebyla v podskupině monoresponseů s anti-c zachycena.

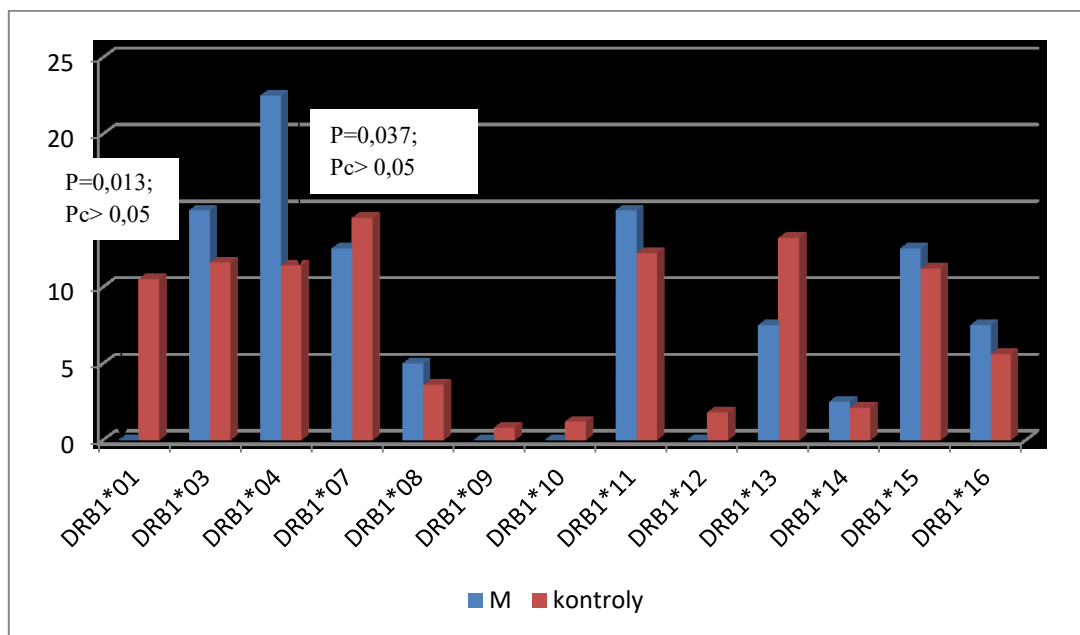
Graf 4 Distribuce *HLA-DRB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseďů s anti-C protilátkou (N=18) a v kontrolní skupině (N=375).



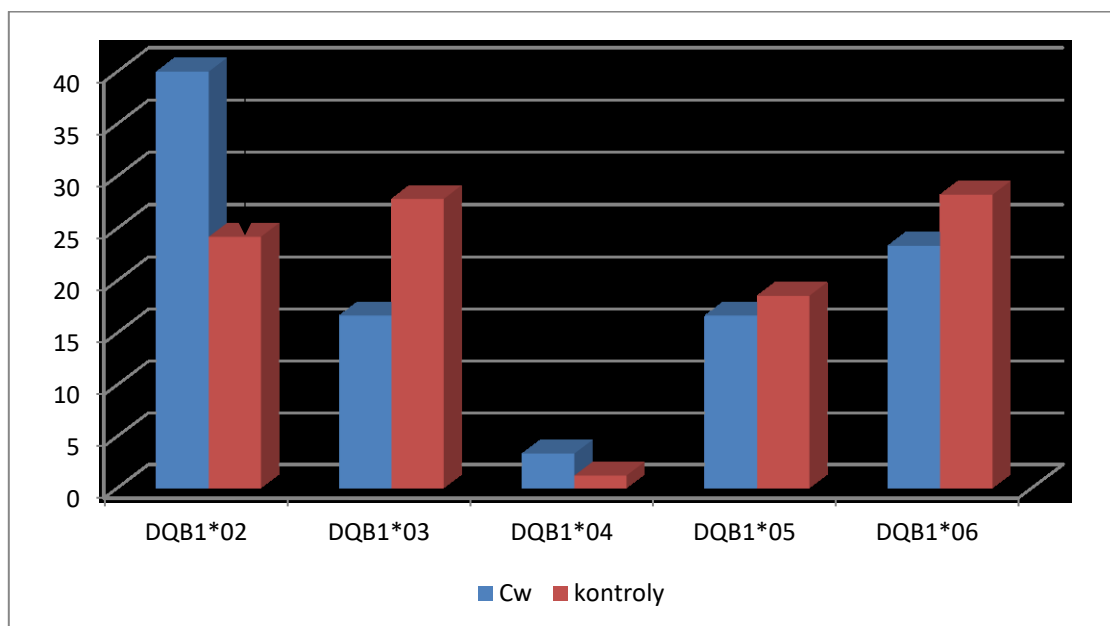
Graf 5 Distribuce *HLA-DRB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseďů s anti-E protilátkou (N=39) a v kontrolní skupině (N=375).



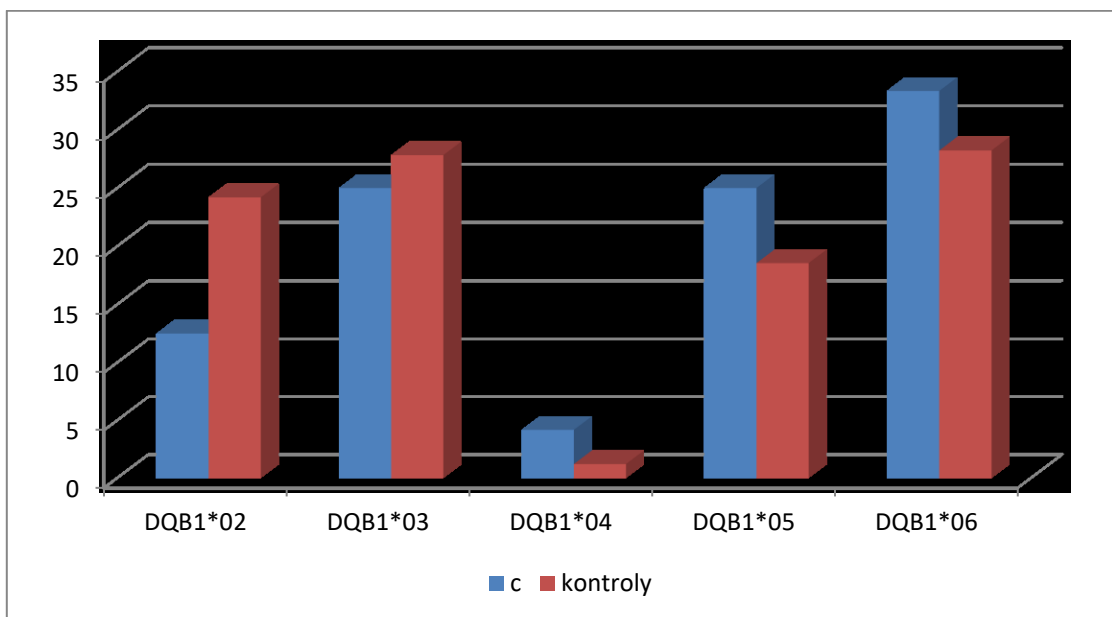
Graf 6 Distribuce *HLA-DRB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseřů s anti-M protilátkou (N=20) a v kontrolní skupině (N=375).



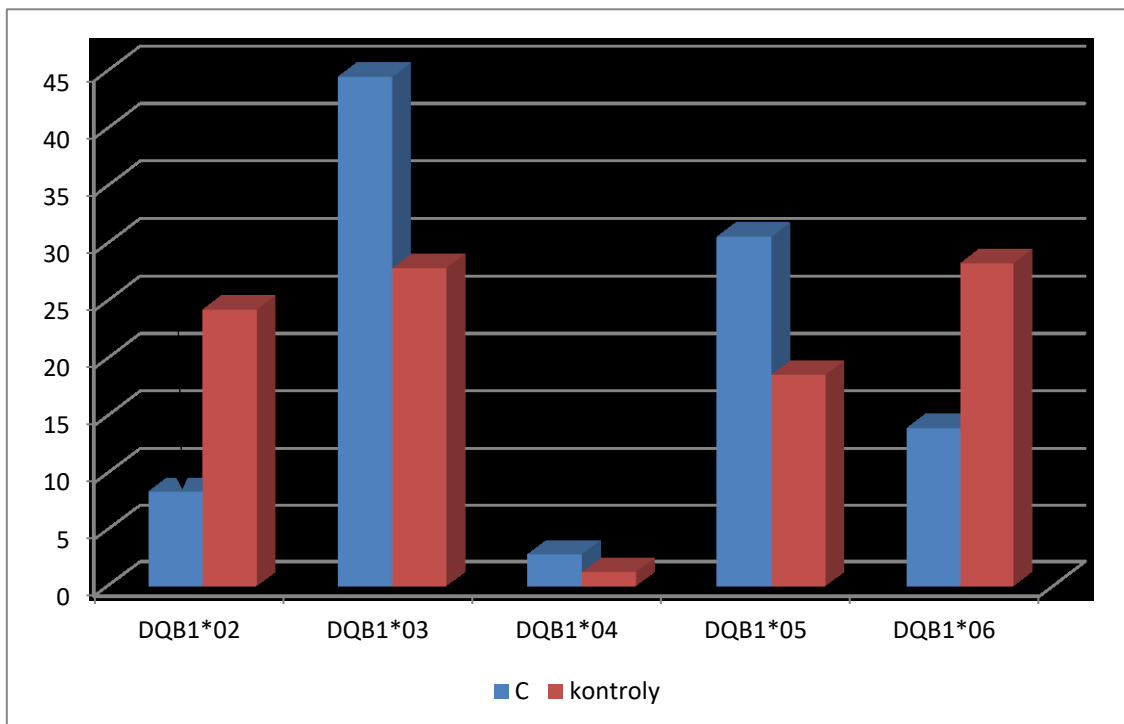
Graf 7 Distribuce *HLA-DQB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseřů s anti-Cw protilátkou (N=15) a v kontrolní skupině (N=375).



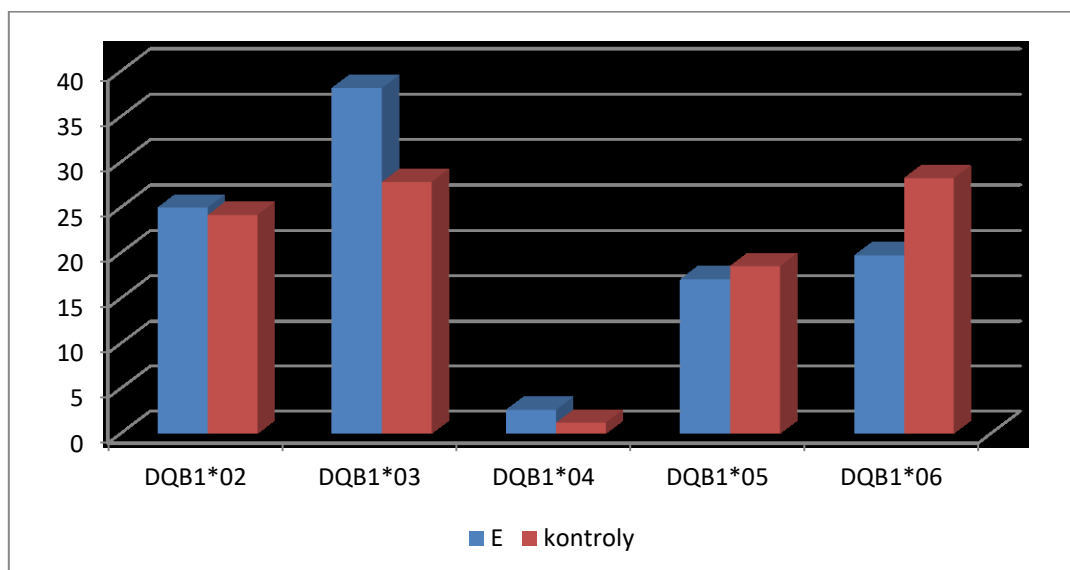
Graf 8 Distribuce *HLA-DQB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseů s anti-c protilátkou (N=12) a v kontrolní skupině (N=375).



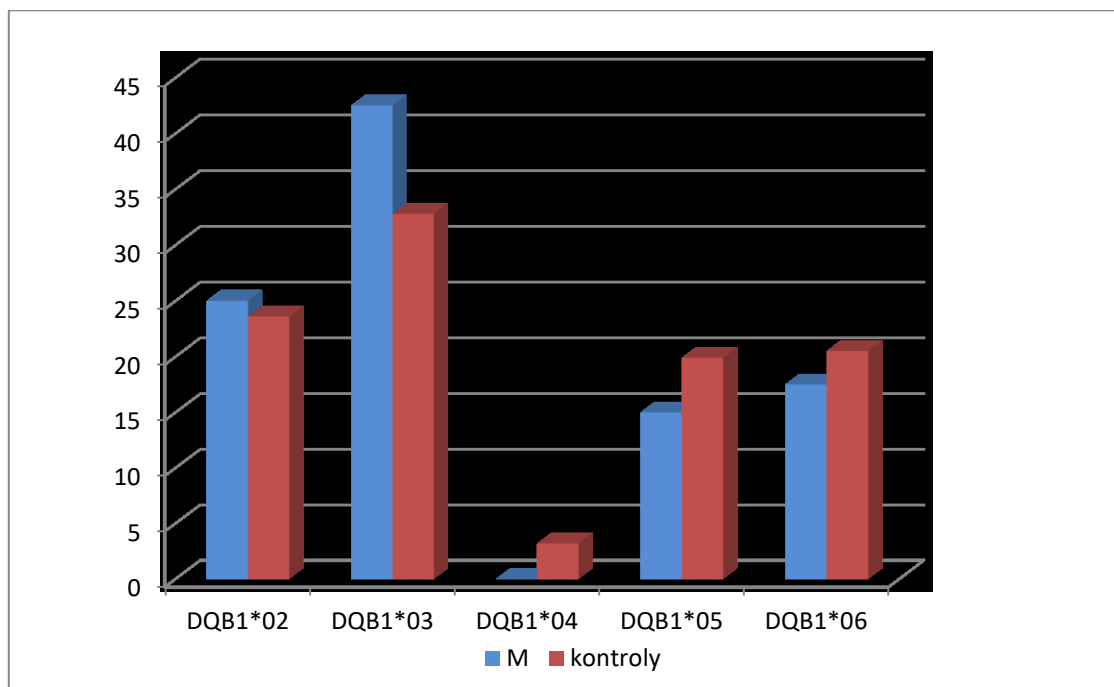
Graf 9 Distribuce *HLA-DQB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseů s anti-C protilátkou (N= 18) a v kontrolní skupině (N=375).



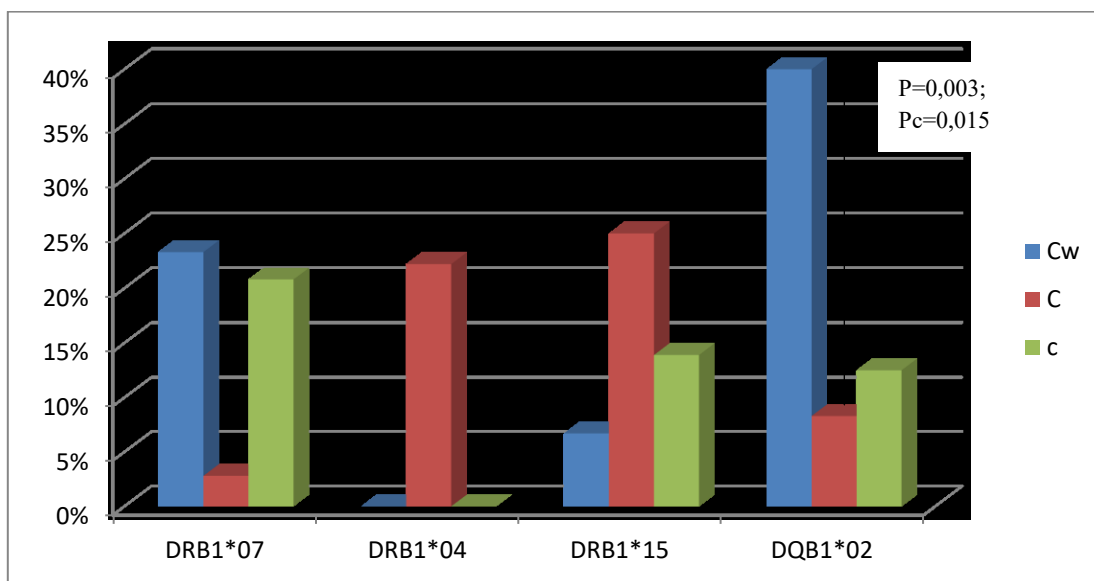
Graf 10 Distribuce *HLA-DQB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseřů s anti-E protilátkou (N=39) a v kontrolní skupině (N=375).



Graf 11 Distribuce *HLA-DQB1* alelických skupin (%) ve skupině monoresponseřů s anti-M protilátkou (N=20) a v kontrolní skupině (N=375).



Graf 12 *HLA-DRB1* a *DQB1* (nominálně) signifikantní rozdíly mezi anti-Cw, C a c podskupinami monoresponseřů (N=375).

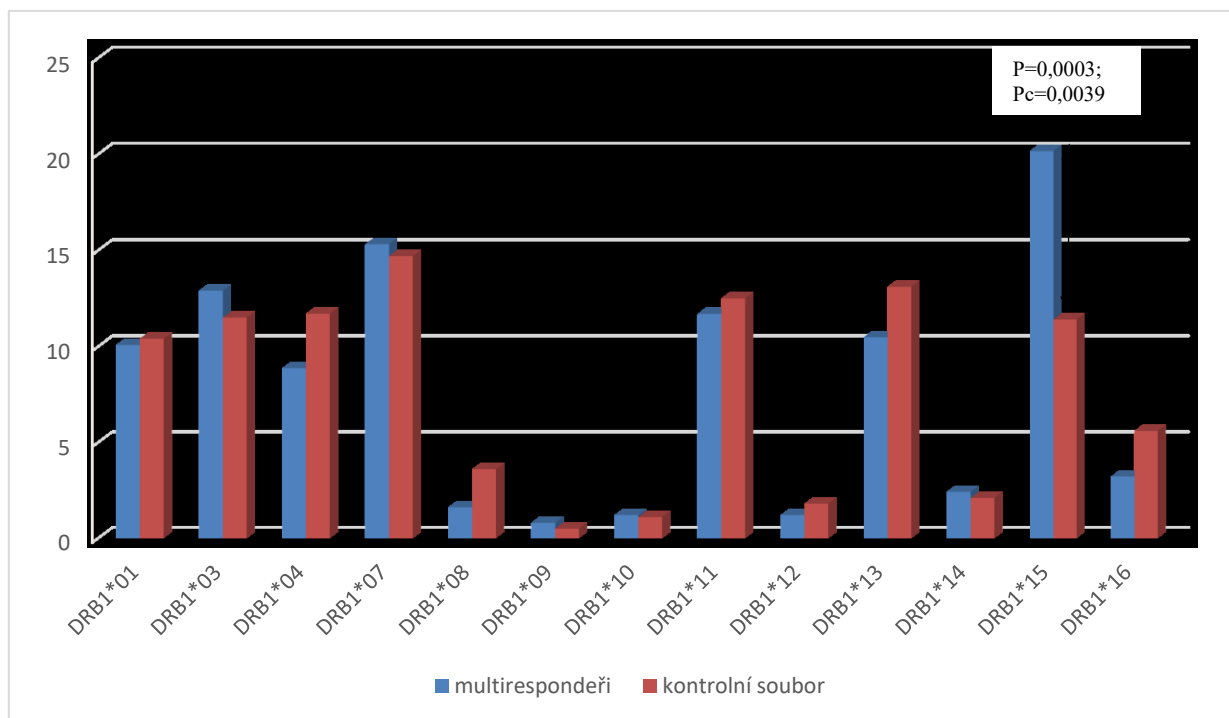


5.2 Multirespondeři a kontrolní soubor

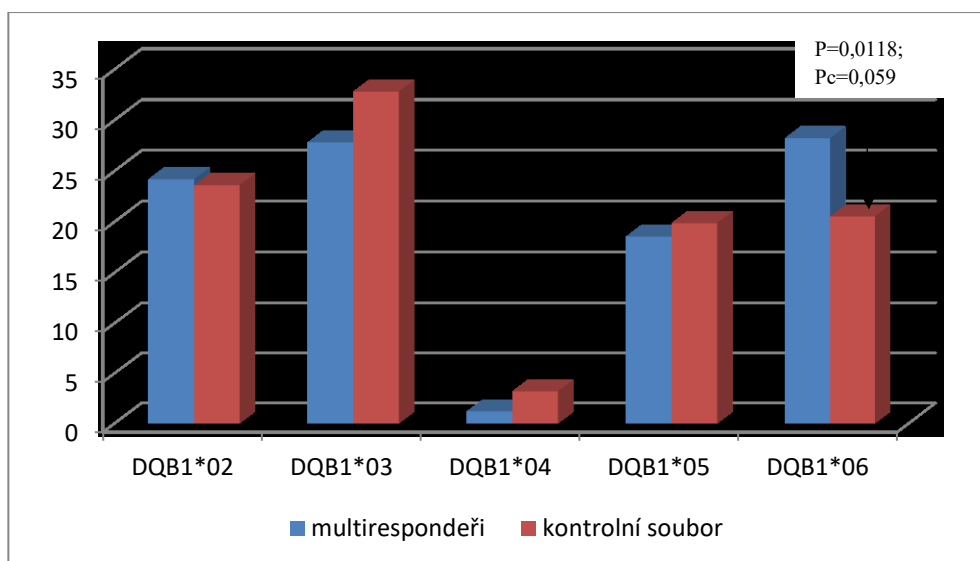
Do této části studie zaměřené na nalezení vztahu mezi aloimunizací proti antigenům červených krvinek a HLA antigeny II. třídy bylo zařazeno 124 responderů tvořících vícečetné RBC protilátky (Podskupina 2) a 375 jedinců kontrolního souboru. Popis souborů je uveden v kapitole 4.

Frekvence alelických skupin *HLA-DRB1*15* a *-DQB1*06* byla vyšší mezi jedinci s vícečetnými RBC protilátkami (Podskupina 2) než u kontrolní skupiny (**Tabulka 12**). Rozdíl mezi multirespondery a zdravými kontrolami byl statisticky signifikantní pro *HLA-DRB1*15* (20,2 % vs 11,2 %; $P = 0,0003$; OR, 2,0; 95 % CI, 1,4-2,9; **Pc = 0,0039**). Hraničně nesignifikantní hodnota Pc byla nalezena pro *HLA-DQB1*06* (28,2 % vs 20,5 %; $P = 0,0118$; OR, 1,5; 95 % CI, 1,02-1,8; **Pc = 0,059**). Frekvence všech *DRB1* a *DQB1* alelických skupin u multiresponderů a kontrolní skupiny byly zpracovány v **Grafech 13 a 14**.

Graf 13 Srovnání frekvence (%) alelických skupin *HLA-DRB1* u multiresponderů (N=124) a u kontrolní skupiny (N=375)



Graf 14 Srovnání frekvencí alelických skupin *HLA-DQB1* (%) u multiresponderů (N=124) a u kontrolní skupiny (N=375)



Zjistili jsme, že asociace *HLA-DRB1*15* a *-DQB1*06* je spojena především s multirespondery nesoucími aloprotilátky identifikované jako anti-C+D (jedinci s anti-G nemohli být vyloučeni z této podskupiny, protože rozlišení této specifacity se provádí pouze u gravidních, ne u příjemců transfuze), ale ne s multirespondery s protilátkami anti-E dopněnými o jakoukoli další specifacitu. V případě pacientů s anti-C+D (jen C+D nebo s příměsí dalších protilátek), byla pozorována signifikantní asociace s *DRB1*15* a *DQB1*06* (**Tabulka 12**). U pacientů s kombinací anti-E s jakoukoli další specifacitou jsme pozorovali trend k vyšší frekvenci *DRB1*03* (nesignifikantní po korekci). Avšak když jsme tuto podskupinu dále rozčlenili podle jednotlivých protilátek, zjistili jsme následující signifikantní asociace: *DRB1*13* a *DQB1*06* pro jedince s anti-E+c (≥ 2 Abs), *DRB1*03* a *DQB1*02* pro respondery s anti-E+Cw (≥ 2 Abs). Podskupina multiresponderů tvořící anti-e+C/D byla charakterizována vyšší frekvencí *DRB1*07* (33,3 %) než kontrolní skupina (14,5 %), ale rozdíl po korekci nebyl signifikantní (**Tabulka 12**).

Tabulka 12 Pozorované *HLA-DRB1* a *-DQB1* asociace na základě srovnání mezi multirespondery (Podskupina 2 s nejčastějšími kombinacemi protilátek) a kontrolním souborem

Podskupina 2 a nejčastější kombinace protilátek	Asociované alely	Pacienti frekvence %	Kontroly frekvence %	<i>P</i> hodnota	OR	95% CI	<i>Pc</i> hodnota ^a
multirespondeři (N=124)	<i>DRB1</i> *15	20,2	11,2	0,0003	2,0	1,4-2,9	0,0039
	<i>DQB1</i> *06	28,2	20,5	0,0118	1,5	1,1-2,1	0,059
C+D (= 2 Abs) ^b (N=33)	<i>DRB1</i> *15	30,0	11,2	0,0002	3,4	1,9-6,2	0,004
	<i>DQB1</i> *06	36,7	20,5	0,0035	2,2	1,3-3,9	0,018
C+D (≥ 2 Abs) ^c (N=46)	<i>DRB1</i> *15	31,0	11,2	<0,0001	3,6	2,1-6,0	<0,001
	<i>DQB1</i> *06	35,7	20,5	0,0015	2,2	1,3-3,5	0,008
E+c (≥ 2 Abs) (N=20)	<i>DRB1</i> *13	32,5	13,2	0,0007	3,2	1,6-6,3	0,009
	<i>DQB1</i> *06	40,0	20,5	0,0035	2,6	1,3-5,0	0,018
E+Cw (≥ 2 Abs) (N=14)	<i>DRB1</i> *03	34,6	11,6	0,0005	4,0	1,7-9,3	0,006
	<i>DQB1</i> *02	50,0	23,6	0,0021	3,2	1,5-7,1	0,011
E+any (≥ 2 Abs) (N=61)	<i>DRB1</i> *03	18,3	11,6	0,039	1,7	1,0-2,9	NS
e+C/D (N=8)	<i>DRB1</i> *07	33,3	14,5	0,027	2,9	1,1-8,0	NS

^a *Pc* hodnota < 0.05 je považována za signifikantní, NS = nesignifikantní

^b C+D (= 2 Abs) znamená podskupinu pacientů s právě dvěma (anti-C + anti-D) protilátkami, která byla vyčleněna ze skupiny C+D (≥ 2 Abs) ze statistických důvodů.

^c C+D (≥ 2 Abs) znamená všechny pacienty s anti-C + anti-D protilátkami, přičemž další specificity mohou být rovněž přítomny.

5.3 RhD negativní a RhD pozitivní multirespondeři

Analýza vícečetných aloprotilátek u multiresponderů a jejich Rh fenotypů odhalila dva hlavní vzory. Podle očekávání kombinace protilátek s anti-D byla asociována s RhD negativním fenotypem, zatímco kombinace protilátek zahrnující anti-E byla společná pro oba RhD fenotypy (RhD negativní i RhD pozitivní). Anti-E však byla produkována jedinci RhD negativními v nižší frekvenci než D pozitivními (27,9 % vs. 72,1 %). Anti-D byla častěji přítomna v kombinaci s dalšími běžnými specificitami zahrnujícími C+D (75,4 %) a D+E (19,7 %) a mnohem méně často kombinována s D+K nebo D+Le^a (3,3 %). V RhD negativní skupině dominovalo zastoupení žen (poměr 2,8), což nezbytně vede k úvaze, že příčinou aloimunizace bylo vedle transfuze i těhotenství. Některé kombinace protilátek byly obvyklé pouze u RhD pozitivních případů, jmenovitě E+c (30,2 %), e+C (12,7 %), E+ jiné (non-Rh) protilátky (17,5 %) a K+c/Cw/C (6,3 %). Jiné specificity se objevovaly u obou fenotypů, ale převážně u RhD pozitivních, např. kombinace E+Cw protilátky a směs protilátek non-E a non-D.

RhD negativní fenotyp neslo 49,2 % multiresponderů, poměr jedinců RhD pozitivních a RhD negativních byl 1,07 mezi ženami a 0,94 mezi muži. Kombinace anti-C+D protilátek byla asociována pouze s RhD negativním fenotypem (poměr Ž/M byl 2,6 včetně dvou gravidních žen) na rozdíl od kombinace anti-E s dalšími specificitami (c/Cw/C/D/K/Le^a/Fy^a/Jk^a/Jk^b/M atd.), jež se objevovaly u pacientů obou RhD fenotypů. Anti-C+D byla nejfrekventnější kombinací u RhD negativních jedinců (75,4 %). Kombinace anti-E+další specificity byla detekována v 61 případech (49,2 %) z celkového počtu 124 multiresponderů a z toho u 44 jedinců (69,8 %) RhD pozitivních (poměr Ž/M byl 2,8, včetně 10 gravidních žen).

Ve skupině 20 gravidních žen neslo 8 z nich RhD negativní a 12 RhD pozitivní fenotyp. Kombinace protilátek anti-E+c byla zjištěna u 5, anti-E+Cw u 4, po dvou se objevily anti-D+E, C+G, C+D a další kombinace se vyskytovaly jen jedenkrát (tj. E+Le^a, D+Le^a, C+E, e+C and c+K).

Jelikož poměr RhD negativních fenotypů byl ve skupině multiresponderů významně vyšší (49,2 %) než je reportován v kavkazoidní populaci (12 až 18 %) a byl srovnatelný s počtem RhD pozitivních multiresponderů, provedli jsme analýzu variant HLA II. třídy podle RhD statusu pacientů. V naší skupině multiresponderů jsme našli signifikantně vyšší fenotypovou frekvenci *HLA-DRB1*15* u D negativních pacientů ve srovnání s D pozitivními

jedinci ($P_c = 0,045$). Tento nález koreluje s počtem jedinců tvořících anti-C+D aloprotilátky (46), z nichž 28 (60,9 %) neslo alelickou skupinu *DRB1*15* a jen 3 jedinci *DRB1*15* pozitivní tvořili odlišnou kombinaci protilátek, viz **Tabulka 13**.

Mezi RhD pozitivními multirespondery jsme se detailněji zaměřili na fenotyp DCCee, který představoval nejčastější variantu RhD pozitivních případů (52,4 %; poměr Ž/M 2,0). Jedinci s tímto fenotypem by teoreticky mohli tvořit anti-E+c protilátku. Ve skutečnosti ze 33 pacientů s DCCee fenotypem dvacet (60,6 %) tvořilo kombinaci protilátek anti-E+c. Když jsme srovnali distribuci HLA variant II. třídy mezi pacienty DCCee a ostatními RhD pozitivními fenotypy, zjistili jsme, že jedinci s DCCee fenotypem měli signifikantně vyšší fenotypovou frekvenci alelických skupin *HLA-DRB1*13* ($P_c = 0,015$), *HLA-DQB1*06* ($P_c = 0,01$) a *HLA-DQA1*01* ($P_c = 0,002$), které jsou spolu ve vazebné nerovnováze (viz **Tabulka 14**). Tento nález je v souladu s nalezenými asociacemi mezi HLA variantami II. třídy a nejčastějšími kombinacemi protilátek (viz **Tabulka 12**).

Tabulka 13 Srovnání fenotypových frekvencí *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* a *HLA-DQAI* ve skupině RhD negativních (N=61) a RhD pozitivních (N=63) multiresponderů.

Alelická skupina	Procento u RhD negativních	Procento u RhD pozitivních	<i>P</i> hodnota	OR	95 % CI	<i>P</i> _c hodnota ^a
<i>DRB1</i> *01	22,9	22,2	1,0			
<i>DRB1</i> *03	19,7	28,6	0,2			
<i>DRB1</i> *04	11,5	22,2	0,1			
<i>DRB1</i> *07	29,5	30,2	1,0			
<i>DRB1</i> *08	3,3	3,2	1,0			
<i>DRB1</i> *09	3,3	0	0,8			
<i>DRB1</i> *10	3,3	1,6	1,0			
<i>DRB1</i> *11	21,3	20,6	1,0			
<i>DRB1</i> *12	3,3	1,6	1,0			
<i>DRB1</i> *13	16,4	28,6	0,1			
<i>DRB1</i> *14	1,6	6,3	0,2			
<i>DRB1</i>*15	50,8	25,4	0,0035	3,04	1,4–6,5	0,045
<i>DRB1</i> *16	1,6	7,9	0,1			
<i>DQB1</i> *02	42,6	46,0	0,7			
<i>DQB1</i> *03	39,3	47,6	0,4			
<i>DQB1</i> *04	1,6	1,6	1,0			
<i>DQB1</i> *05	32,8	39,7	0,4			
<i>DQB1</i> *06	55,7	44,4	0,2			
<i>DQAI</i> *01	75,4	74,6	1,0			
<i>DQAI</i> *02	29,5	30,2	1,0			
<i>DQAI</i> *03	14,7	22,2	0,3			
<i>DQAI</i> *04	3,3	1,6	0,6			
<i>DQAI</i> *05	37,7	50,8	1,1			
<i>DQAI</i> *06	0	1,6	0,2			

^a *P*_c hodnota <0,05 je považovaná za statisticky signifikantní.

Tabulka 14 Srovnání fenotypových frekvencí *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* a *HLA-DQAI* variant mezi multirespondery s DCCee fenotypem (N = 33) a ostatními D pozitivními fenotypy (N = 30)

Alelické skupiny	Procento u DCCee fenotypů	Procento u dalších RhD (+) fenotypů	P hodnota	OR	95% CI	Pc hodnota ^a
<i>DRB1</i> *01	24,2	20,0	0,8			
<i>DRB1</i> *03	30,3	26,7	0,8			
<i>DRB1</i> *04	9,1	36,7	0,013	0,17	0,04–0,7	NS
<i>DRB1</i> *07	24,2	36,7	0,4			
<i>DRB1</i> *08	0	6,7	0,2			
<i>DRB1</i> *09	0	0	1,0			
<i>DRB1</i> *10	0	3,3	0,5			
<i>DRB1</i> *11	21,2	6,7	0,2			
<i>DRB1</i> *12	0	3,3	0,1			
<i>DRB1</i>*13	45,5	3,3	0,0001	24	2,9–199	0,015
<i>DRB1</i> *14	3,0	10,0	0,3			
<i>DRB1</i> *15	27,3	23,3	0,8			
<i>DRB1</i> *16	9,1	6,7	0,4			
<i>DQB1</i> *02	42,4	50,0	0,8			
<i>DQB1</i> *03	39,4	56,7	0,3			
<i>DQB1</i> *04	0	3,3	0,5			
<i>DQB1</i> *05	39,4	40,0	1,0			
<i>DQB1</i>*06	63,6	23,3	0,002	5,8	1,9–17,3	0,01
<i>DQAI</i>*01	93,9	53,3	0,0003	13,5	2,7–67,2	0,002
<i>DQAI</i> *02	24,2	36,7	0,5			
<i>DQAI</i> *03	9,1	36,7	0,014	0,17	0,04–0,7	NS
<i>DQAI</i> *04	0	3,3	0,5			
<i>DQAI</i> *05	54,5	46,7	0,6			
<i>DQAI</i> *06	0	3,3	0,5			

^a Pc hodnota <0,05 je považovaná za statisticky signifikantní.

5.4 Nonrespondeři a kontrolní soubor

Čtvrtá část práce byla zaměřená na porovnání distribuce alelických skupin *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *-DQB1* mezi nonresponduery a kontrolní skupinou s cílem identifikovat protektivní HLA varianty, které by mohly chránit pacienty před imunizací proti aloantigenům exprimovaných na povrchu červených krvinek. Získané frekvence *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *-DQB1* alelických skupin byly podobné u nonresponderů a kontrolní skupiny (zdraví jedinci), zachytili jsme pouze trend ke zvýšené frekvenci *DRB1*15* u nonresponderů (17,9 % vs 11,2%; $P = 0.009$; OR, 1,7; 95% CI, 1,1-2,6; bez signifikance po korekci), viz **Tabulka 15**.

Tabulka 15 Srovnání alelických frekvencí *HLA-DRB1* a *-DQB1* variant u nonresponderů (Pacienti, N=109) a zdravých jedinců (Kontroly, N=375)

Aleické skupiny	Pacienti frekvence %	Kontroly frekvence %	<i>P</i> hodnota	OR	95% CI	<i>P</i> _c hodnota ^a
<i>DRB1*01</i>	11,5	10,5				
<i>DRB1*03</i>	11,9	11,6				
<i>DRB1*04</i>	8,2	11,4				
<i>DRB1*07</i>	14,2	14,5				
<i>DRB1*08</i>	2,3	3,6				
<i>DRB1*09</i>	0,5	0,8				
<i>DRB1*10</i>	0,5	1,2				
<i>DRB1*11</i>	11,5	12,2				
<i>DRB1*12</i>	1,8	1,8				
<i>DRB1*13</i>	10,1	13,2				
<i>DRB1*14</i>	3,7	2,1				
<i>DRB1*15</i>	17,9	11,2	0,009	1,7	1,1-2,6	0,12 - NS
<i>DRB1*16</i>	5,9	5,6				
<i>DQB1*02</i>	22,7	23,6				
<i>DQB1*03</i>	26,1	32,8				
<i>DQB1*04</i>	1,8	3,2				
<i>DQB1*05</i>	22,5	19,9				
<i>DQB1*06</i>	26,6	20,5				

^a *P*_c hodnota <0,05 je signifikantní, NS = nesignifikantní

5.5 Nonrespondeři a multirespondeři

Podobně jsme nenašli signifikantní rozdíly v distribuci *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *DQB1* alelických skupin mezi nonrespondery a multirespondery. Výsledky uvedeny v **Tabulce 16**.

Tabulka 16 Srovnání alelických frekvencí *HLA-DRB1*, *-DQB1* a *-DQA1* variant mezi nonrespondery (N=109) a multirespondery (N=124).

Alelické skupiny	nonrespondeři frekvence %	multirespondeři frekvence %	<i>P</i> hodnota
<i>DRB1</i> *01	11,5	10,1	0,6
<i>DRB1</i> *03	11,9	12,9	0,7
<i>DRB1</i> *04	8,2	8,9	0,8
<i>DRB1</i> *07	14,2	15,3	0,7
<i>DRB1</i> *08	2,3	1,6	0,6
<i>DRB1</i> *09	0,5	0,8	0,6
<i>DRB1</i> *10	0,5	1,2	0,3
<i>DRB1</i> *11	11,5	11,7	1,0
<i>DRB1</i> *12	1,8	1,2	0,5
<i>DRB1</i> *13	10,1	10,5	1,0
<i>DRB1</i> *14	3,7	2,4	0,4
<i>DRB1</i> *15	17,9	20,2	0,5
<i>DRB1</i> *16	5,9	3,2	0,15
<i>DQB1</i> *02	22,7	24,2	0,4
<i>DQB1</i> *03	26,1	27,8	0,6
<i>DQB1</i> *04	1,8	1,2	0,8
<i>DQB1</i> *05	22,5	18,6	0,3
<i>DQB1</i> *06	26,6	28,2	0,7
<i>DQAI</i> *01	49,1	46,8	0,6
<i>DQAI</i> *02	14,2	15,3	0,7
<i>DQAI</i> *03	8,7	9,7	0,7
<i>DQAI</i> *04	1,8	1,6	0,8
<i>DQAI</i> *05	25,7	26,2	1,0
<i>DQAI</i> *06	0,4	0,4	0,7

5.6 RhD negativní a RhD pozitivní nonrespondeři

Kvůli nízkému počtu RhD negativních jediců (N=13) v souboru nonresponderů, který byl v nepoměru k počtu RhD pozitivních nonresponderů, nebylo srovnání HLA variant II. třídy mezi nonrespondeři dle RhD statusu dostatečně informativní, viz **Tabulka 17**.

Tabulka 17 Srovnání alelických frekvencí HLA-DRB1, -DQB1 a -DQA1 variant mezi RhD negativní (N=13) a RhD pozitivní (N=96) podskupinou nonresponderů.

Alelické skupiny	RhD neg nonrespondeři frekvence %	RhD poz nonrespondeři frekvence %	<i>P</i> hodnota
<i>DRB1</i> *01	7,7	12,0	0,7
<i>DRB1</i> *03	15,4	11,5	0,5
<i>DRB1</i> *04	7,7	8,3	1,0
<i>DRB1</i> *07	15,4	14,1	0,8
<i>DRB1</i> *08	0	2,6	1,0
<i>DRB1</i> *09	0	0,5	1,0
<i>DRB1</i> *10	0	0,5	1,0
<i>DRB1</i> *11	3,9	12,5	0,7
<i>DRB1</i> *12	3,9	1,6	0,4
<i>DRB1</i> *13	11,5	9,9	0,7
<i>DRB1</i> *14	3,9	3,7	1,0
<i>DRB1</i> *15	19,2	17,7	0,8
<i>DRB1</i> *16	11,5	5,2	0,2
<i>DQB1</i> *02	26,9	22,4	0,6
<i>DQB1</i> *03	19,2	27,1	0,5
<i>DQB1</i> *04	0	2,1	1,0
<i>DQB1</i> *05	23,0	22,4	1,0
<i>DQB1</i> *06	30,8	26,0	0,6
<i>DQA1</i> *01	53,9	48,4	0,7
<i>DQA1</i> *02	15,4	14,1	0,7
<i>DQA1</i> *03	7,7	8,9	1,0
<i>DQA1</i> *04	0	2,1	1,0
<i>DQA1</i> *05	23,1	26,0	1,0
<i>DQA1</i> *06	0	0,5	1,0

6 DISKUZE A ZÁVĚR

Tato dizertační práce byla zaměřena na hledání asociace mezi aloimunizací proti určitým erytrocytovým antigenům a přítomností konkrétních variant HLA II. třídy (*HLA-DRB1* a *-DQB1*) v české populaci. Hlavním nálezem práce je zjištění, že status multirespondera, a to především s přítomností anti-C+D (nebo anti-G) protilátek, je asociován s *HLA-DRB1*15* a *DQB1*06* alelickými skupinami. Dále jsme našli signifikantně vyšší frekvenci *DRB1*13* a *DQB1*06* skupin u multiresponderů s anti-E+c protilátkami a u pacientů s anti-E+Cw protilátkami statisticky významně častější přítomnost *DRB1*03* a *DQB1*02* variant.

V minulosti bylo publikováno několik prací demonstrujících odlišnosti ve frekvencích HLA-DRB1 u jedinců aloimunizovaných proti erytrocytovým aloantigenům. Částečně diskrepantní výsledky ukázaly na nízkou úroveň HLA restrikce u pacientů s anti-K protilátkami [52, 54]. *HLA-DRB1*01* alelická skupina byla signifikantně častěji zastoupena u pacientů s anti-Jk^a oproti kontrolám (OR= 5,9) [54]. Výskyt anti-Fy^a protilátek byl asociován s *HLA-DRB1*04* fenotypem (OR= 12,9, resp. 4,2) [53, 55] a s *DRB1*15* fenotypem (OR= 4,3) [55]. V recentně publikované práci byly v souvislosti s anti-Fy^a aloimunizací definovány dva asociované rizikové haplotypy: *HLA-DRB1*04, DQB1*03:02* a *DRB1*15, DQB1*06:02* a současně protektivní haplotyp: *HLA-DRB1*03, DQB1*02:01* [56]. Na protektivní efekt *HLA-DQB1*02* bylo poukázáno i v publikované studii autorů Tatari-Calderone et al. [60] provedené u aloimunizovaných pacientů se srpkovitou anémií bez ohledu na specifitu protilátky. Některé z výše uvedených nálezů jsou v souladu s velkou studií 941 pacientů, kterou provedl nizozemský tým vedený Schonewillem [57], konkrétně asociace *DRB1*04* s anti-Fy^a (OR=7,9) a *DRB1*01* s anti-Jk^a (OR= 3,1) a anti-D. Autoři také našli nové asociace mezi anti-E a *DRB1*09* a mezi anti-S a *DRB1*07* (OR= 3,7; respektive 8,7). Navíc se studie zaměřila na pacienty s vícečetnými protilátkami s cílem najít asociaci s *DRB1* variantami. Autoři zjistili, že *HLA-DRB1*15* alelická skupina byla přítomna téměř u 40% multiresponderů (fenotypová frekvence) ve srovnání s 25 % v kontrolní skupině.

Naše výsledky potvrdily několik klíčových nálezů práce nizozemského týmu [57]. Shodně jsme našli signifikantní asociaci *HLA-DRB1*15* se statusem multirespondera (OR, 2.0). Výsledky obou prací tedy spojily alelickou skupinu *HLA-DRB1*15* s rizikem tvorby vícečetných protilátek proti erytrocytovým antigenům. Nově jsme zaznamenali vyšší frekvenci *HLA-DQB1*06* (OR, 1,5) u multiresponderů [58].

Shodně s Schonewillem jsme u pacientů s anti-E+c zachytili signifikantně vyšší frekvenci *DRBI*13* varianty (OR, 3,2) a nově *DQBI*06* varianty (OR, 2,6). Dále jsme poprvé identifikovali u pacientů s anti-E+Cw signifikantní asociaci s *DRBI*03* (OR 4,0) a *DQBI*02* (OR 3,2). Zajímavé bylo, že když jsme analyzovali pacienty s anti-E a jakoukoliv další specificitou, vyšší frekvenci jsme zaznamenali pouze u varianty *DRBI*03*, rozdíl ale nebyl signifikantní po korekci na vícečetná srovnání.

Naše výsledky nepotvrdily nálezy autorů Schonewille et al. týkající se podskupiny pacientů s anti-C+D, u nichž reportovali asociaci s *HLA-DRBI*01* a *12. My jsme našli signifikantní asociaci s *DRBI*15* (OR= 3,6) a *DQBI*06* (OR= 2,2). Tyto alelické skupiny byly frekventnější u anti-C+D jedinců podskupiny multiresponderů, ale ne u pacientů s jinými kombinacemi protilátek v rámci podskupiny multiresponderů [58]. Nezjistili jsme žádnou signifikantní asociaci mezi anti-e+C/D pacienty a kontrolami, ale toto srovnání bylo limitováno nízkým počtem jedinců s touto kombinací aloprotilátek. Výsledky naší práce jsou v souladu se závěry článku Schonewille et al., že HLA asociace u multiresponderů nerepresentují sumu jednotlivých specificit nalezených u mono-responderů.

Při analýze mono-responderů jsme se zaměřili převážně na jedince s protilátkami proti RBC antigenům, u kterých nebyly dosud publikovány asociace s HLA (anti-C, -Cw, -c, -e- and -M) a skupinu pacientů s protilátkou anti-E, u které byla referována signifikantní asociace s *HLA-DRBI*09* [57]. V souladu s tím jsme našli vyšší frekvenci varianty *DRBI*09* u pacientů s anti-E a potvrdili tak výsledek reportovaný v práci Schonewille et al., avšak pravděpodobně kvůli nižšímu počtu pacientů byl rozdíl po korekci nesignifikantní. Z výsledků u mono-responderů rozdělených podle specificity protilátky bychom mohli usuzovat na odlišnou schopnost různých HLA molekul vázat peptidy odvozené z těchto RBC antigenů. Například, *HLA-DRBI*04* byla frekventnější u pacientů s anti-C (22 %), ale zcela chyběla u jedinců s anti-c a anti-Cw protilátkami. Naopak *HLA-DRBI*07* byla častější u anti-c a anti-Cw pacientů (21 %, respektive 23 %), ale byla velmi vzácná u anti-C jedinců (2,8 %). Rozdíl ve frekvenci alelické skupiny *DQBI*02* u pacientů s anti-Cw a anti-C protilátkami byl dokonce signifikantní (40 % vs. 8,3 %; OR 7,3; Pc= 0,015).

Na základě subanalýzy variant HLAII. třídy mezi dvěma skupinami multiresponderů rozdělených dle RhD statusu jsme zjistili signifikantní asociaci mezi *HLA-DRBI*15* a RhD negativním fenotypem u multiresponderů (Pc= 0,045; OR= 3,04). Jinými slovy, multirespondeři s RhD negativním fenotypem nesli *DRBI*15* variantu dvakrát častěji než multirespondeři RhD pozitivní (50,8 % vs. 25,4 %). Tento poznatek odpovídá nalezené asociaci mezi *DRBI*15* a přítomností anti-C+D aloprotilátek u multiresponderů (u všech potvrzen

Rhccee fenotyp). Z našich výsledků vyplývá, že vyšší riziko vzniku polyspecifických protilátek proti aloantigenům červených krvinek u pacientů RhD negativních nebo Rhccee fenotypu je ještě zvýšeno současnou přítomností *HLA-DRB1*15*.

Při podrobnější analýze RhD pozitivní podskupiny multiresponderů jsme zjistili, že u jedinců s CCDee fenotypem byla statisticky významně vyšší frekvence variant *HLA-DRB1*13* ($P_c=0,015$; OR= 24), *DQB1*06* ($P_c=0,01$; OR= 5,8) a *DQA1*01* ($P_c=0,002$; OR= 13,5) oproti multiresponderům s jinými RhD pozitivními fenotypy (tj. CDcee, CcDEe, ccDEe a ccDEE).

V poslední části práce jsme se soustředili na stanovení HLA variant II. třídy u opakovaně transfundovaných pacientů s negativním screeningem RBC protilátek (nonresponderi). Ze srovnání nonresponderů se zdravými jedinci a s multirespondery jsme neobjevili žádné statisticky signifikantní rozdíly ve frekvencích HLA II. třídy. Vzhledem k málo početné podskupině RhD negativních nonresponderů nebylo srovnání HLA frekvencí s RhD pozitivní podskupinou nonresponderů statisticky vypovídající.

Alelická skupina *HLA DRB1*15* je spojena nejen s tvorbou vícečetných RBC aloprotilátek [57, 58], ale rovněž s tvorbou anti-HLA protilátek [59] a dokonce s vnímavostí k autoimunitním chorobám [70,71]. Naše výsledky vykazují určitou paralelu s dobře známými genetickými predispozicemi podmíněnými HLA systémem, např. s autoimunitními onemocněními (např. diabetes 1. typu nebo celiakie). Přítomnost určitých HLA molekul je pro rozvoj těchto onemocnění nezbytná, avšak nedostačující, a proto se musejí brát do úvahy další geny participující v tomto procesu, a především faktory vnějšího prostředí. Na rozdíl od těchto "klasických" HLA asociací jsou naše vědomosti o dědičném pozadí a molekulárním mechanismu asociací mezi HLA variantami a vnímavostí k RBC aloimunizaci velmi omezené.

Dosud bylo publikováno několik článků zabývajících se vztahem mezi *HLA-DRB1*15* a vnímavostí k tvorbě antierytrocytových protilátek. Moritz s kolektivem autorů potvrdili asociaci mezi *HLA-DRB1*15* a zvýšeným rizikem aloimunizace proti Rh antigenům [95]. Přesný mechanismus asociace mezi *DRB1*15* a imunizací proti polyspecifickým aloantigenům však stále není znám. Někteří autoři spekulují, že by tyto nálezy neměly být považovány za výsledek účinnější antigenní prezentace prostřednictvím *DRB1*15*, ale že by se o této alelické skupině mělo uvažovat jako o součásti susceptibilního haplotypu zesilujícího imunitní odpověď, např. ve vhodném cytokinovém prostředí [59, 96, 97]. Asociace *HLA-DRB1*15* s tvorbou vícečetných protilátek byla studována i v několika pozdějších pracích. Darvishi s kolektivem autorů na souboru 264 pacientů s thalasémií našel signifikantně zvýšenou

frekvenci *HLA-DRB1*15:03* u responderů a multiresponderů ve srovnání s nealoimunizovanými transfundovanými pacienty (OR = 4,2). Navíc byla tato alela asociována s produkcí protilátek anti-D, anti-C a anti-K [98]. K podobným závěrům došel i Ebrahimi s kolegy, kteří potvrdili asociaci *HLA-DRB1*15* s tvorbou vícečetných protilátek, a navíc i monospecifických protilátek, především s anti-K a anti-E u 106 pacientů s thalasémií. Nepotvrdili asociaci *HLA-DRB1*01* a anti-K, protože v souboru pacientů nebyl žádný nositel této varianty [99].

V dřívějších studiích bylo zjištěno, že některé diagnózy jsou spojeny s nižší mírou aloimunizace proti RBC antigenům. Evers a jeho tým zjistili, že u hematologických pacientů je snižené riziko RBC aloimunizace ve srovnání s pacienty se solidními nádory [100]. Tomuto zjištění by odpovídal rozdíl v počtu pacientů s některou z hematologických malignit v naší skupině multiresponderů (6,5 %) a nonresponderů (36,7%). Provedli jsme tedy porovnání frekvencí *HLA-DRB1*, *-DQB1* a *DQA1* alelických skupin u 79 nonresponderů (podskupina zmenšená o pacienty s hematologickými malignitami) s distribucí HLA variant u multiresponderů, ale ani u těchto dvou skupin jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl v distribuci zkoumaných HLA alel. Jedním z možných vysvětlení sníženého rizika aloimunizace u pacientů s hematologickými malignitami může být utlumení reakce proti aloantigenům z různých příčin. Zda může v ojedinělých případech hrát roli ztráta exprese nebo heterozygosity HLA na nádorových buňkách, a tedy i snížený repertoár jejich HLA variant schopných prezentovat odvozené peptidy [101], není jasné. V případě diagnózy MDS se naopak uvádí vyšší míra aloimunizace opět ve spojení s *DRB1*15* fenotypem [102]. V naší studii jsme zjistili, že z celkového počtu 39 *DRB1*15* pozitivních nonresponderů byli 4 pacienti s diagnózou MDS (10,2%) a mezi 50 *DRB1*15* pozitivními multirespondery byla zachycena tato diagnóza pouze jedenkrát (2%). Uvedený rozdíl však nebyl statisticky významný.

Náchylnost k tvorbě erytrocytových protilátek u pacientů RhD negativních, resp. Rhccee fenotypu byla potvrzena v recentní práci reportující výsledky velké srovnávací studie zabývající se epidemiologií příjemců a dárců („Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study” - REDS-III). V publikaci se uvádí, že míra aloimunizace RhD negativních pacientů byla o 45 % vyšší než u RhD pozitivních [103]. V souladu s tímto nálezem jsme pozorovali signifikantně vyšší frekvenci RhD negativních v souboru 124 multiresponderů (49,2 %) než v souboru 109 nonresponderů (11,9 %; $p < 0,0001$). Pokud vycházíme z faktu, že v kavkazoidní populaci je zastoupeno 15 % RhD negativních jedinců převážně Rhccee fenotypu (98,4 %), můžeme považovat vysoké procento aloimunizovaných RhD negativních multiresponderů za

další důkaz, že transfundovaní pacienti RhD negativní s predominantním Rhccee fenotypem jsou ve vyšším riziku tvorby polyspecifických erytrocytových aloprotilátek. Interpretace tohoto nálezu však může být v DP limitována výběrem pacientů do studie; zastoupení jednotlivých kombinací protilátek nemusí v našem souboru zcela odpovídat skutečné distribuci multiresponderů mezi pacienty tvořícími protilátky proti erytrocytům (podrobněji v kapitole 4).

I přes úsilí pochopit genetické pozadí imunizace proti antigenům červených krvinek je hlavní klinický zájem směřován na prevenci tvorby aloprotilátek. Lin a jeho spolupracovníci demonstrovali, že se míra Rh/K aloimunizace signifikantně snížila z 22 % na 7 % po zavedení profylaktické transfuze erytrocytů shodných v systémech Rh a Kell [104]. Tato strategie je aplikována v mnoha zemích u pacientů s hemoglobinopatiemi. V již zmiňované studii REDS-III provedené v USA na více než 300 tisících pacientech Karafin spolu s pracovním týmem publikovali zajímavé výsledky: míra imunizace činila 2,07 % a z imunizovaných pacientů 75 % tvořilo aloprotilátky proti některému z antigenních systémů Rh nebo Kell. Aloimunizace byla signifikantně častější u žen (2,38 %) než u mužů (1,68 %) a u RhD negativních (2,82 %) než u RhD pozitivních (1,94 %). U dětských pacientů od 6 do 12 měsíců byla signifikantně nižší míra aloimunizace ve srovnání s ostatními věkovými kategoriemi. Rozdělení pacientů dle diagnóz ukázalo, že OR pro status respondera bylo signifikantně vyšší u SCD, SLE, RA a MDS. Při srovnání míry aloimunizace podle etnické příslušnosti překvapivě našli vyšší pravděpodobnost responderství u bělochů než u černochů a asiátů [103].

Studie provedená v této DP má určité limitace. Soubor pacientů použitý ve výzkumné části práce byl sestavován retrospektivně na základě výsledků imunohepatologických vyšetření uložených v informační databázi Krevního centra FN Ostrava. Byl tvořen jedinci s různými diagnózami léčenými odlišnými transfuzními protokoly. Tato heterogenita souborů transfundovaných pacientů může být považována za částečnou limitaci této DP. Při výběru responderů jsme se řídili aktuálními i historickými výsledky identifikace erytrocytových protilátek, u multiresponderů s anti-C+D protilátkami jsme použili záznamy o výsledku vyšetření Rh fenotypu. U nealoimunizovaných pacientů jsme sledovali počet aplikovaných TU, počet transfuzních epizod a negativní screening RBC aloprotilátek prováděný v rámci předtransfuzního vyšetření. V souboru nonresponderů jsme měli šest pacientů, kteří obdrželi transfuzní přípravky pouze v jedné až třech transfuzních periodách, a proto u těchto jedinců nelze zcela vyloučit vymizení protilátek z důvodu chybění opakovaného screeningového testování. Problém s chybným zařazením pacienta do konkrétní skupiny mohl tedy teoreticky vzniknout buď falešně negativním screeningem protilátek (vymizení protilátek pro

nedostatečný aloimunizační dohled), nebo neznalostí celé transfuzní historie pacienta kvůli nepropojení databází jednotlivých transfuzních zařízení. Méně početná skupina nonresponderů v druhé části naší studie neměla dostatečnou statistickou sílu pro identifikaci možného mírného až středního protektivního efektu určitých HLA molekul II. třídy na RBC aloimunizaci.

Závěrem lze shrnout, že naše práce nezávisle a poprvé v české populaci potvrdila dříve pozorovanou asociaci mezi *HLA-DRB1*15* a statusem multirespondera produkujícího vícečetné protilátky v reakci na RBC aloantigeny. Nově jsme našli signifikantní asociace mezi antigeny HLA II.třídy a třemi častými protilátkovými kombinacemi: anti-C+D, anti-E+c a anti-E+Cw. Je třeba dále ověřit, jsou-li příčinou těchto asociací přímo námi nalezené alelické skupiny *HLA-DRB1*15*, *DRB1*03* a *DRB1*13*, nebo jsou jen odrazem vazby s jinými „kauzálními“ HLA variantami nebo dokonce vázanými nonHLA alelami v širší genové oblasti HLA systému. Ač se nám nepodařilo identifikovat HLA variantu s protektivním účinkem vůči aloimunizaci, z našich závěrů vyplývá, že přítomnost *HLA-DRB1*15* u RhD negativních a *HLA-DRB1*13* (spolu s *DQB1*06* a *DQAI*01*) u jedinců s RhDCCee fenotypem může dále zvýšit vnímavost k tvorbě vícečetných protilátek proti RBC aloantigenům [105]. Tento poznatek by mohl přispět k výběru pacientů opakovaně transfundovaných a ve vysokém riziku aloimunizace (RhD negativní/ *DRB1*15* pozitivní a RhCCDee/ *DRB1*13* pozitivní), u kterých by stálo za úvahu zavedení vhodně načasovaného potransfuzního vyšetření protilátek a zajištění vyšší míry kompatibility RBC antigenů v podaných TP. Cílení na vyšší míru shody v RBC antigenech u rizikových pacientů by mělo významně přispět ke snížení rizika aloimunizace, zvýšit bezpečnost transfuzí a předejít případným nežádoucím reakcím v podobě DHTR [106, 107].

7 SOUHRN

Úvod. Aloimunní protilátky proti antigenům červených krvinek, které se u vnímavých jedinců (responderů) tvoří po transfuzi, v těhotenství nebo po transplantaci, mohou způsobit závažné komplikace. Existuje však početná skupina pacientů, u kterých se netvoří protilátky ani po opakované transfuzní terapii.

Cíle. Dizertační práce se zaměřila na 1) určení asociace mezi aloimunizací proti konkrétním RBC antigenům a HLA variantami II. třídy; 2) nalezení možné asociace mezi nonresponderstvím a alelami HLA II. třídy a 3) analýzu HLA alel II. třídy asociovaných s RBC multiresponderstvím podle Rh fenotypu.

Metody. Do studie bylo zahrnuto celkem 230 responderů (106 monoresponderů a 124 multiresponderů) a 109 pacientů bez RBC aloprotilátek, kterým bylo aplikováno minimálně 10 erytrocytových jednotek (nonrespondeři). Imunohematologická vyšetření byla provedena standardními postupy. Varianty *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *-DQB1* byly stanoveny molekulárně genetickou metodou (PCR-SSO) a jejich frekvence byly srovnány mezi pacienty, populačními kontrolami (375 členů ČNRDD) a mezi nonrespondery a multirespondery dle Rh statusu.

Výsledky. Tvorba vícečetných erytrocytových protilátek u pacientů byla asociována s *HLA-DRB1*15* a *-DQB1*06* alelickými skupinami, přičemž tato souvislost byla nejzřejmější v případě anti-C+D protilátek. Navíc jsme pozorovali zvýšenou frekvenci *DRB1*13* a *DQB1*06* u multiresponderů s anti-E+c a *DRB1*03* a *DQB1*02* u pacientů s anti-E+Cw protilátkami. Aloimunizace byla podle očekávání asociována s RhD negativním fenotypem, protože RhD negativní jedinci byli signifikantně častější mezi multirespondery (49,2 %) než mezi nonrespondery (11,9 %). Analýza *HLA-DRB1*, *-DQA1* a *DQB1* alelických skupin u nonresponderů neidentifikovala varianty protektivní ve vztahu k RBC aloimunizaci. Ze srovnání HLA variant na základě Rh fenotypů vyplývá, že jedinci *HLA-DRB1*15* pozitivní byli signifikantně častější mezi RhD negativními než mezi RhD pozitivními multirespondery (*DRB1*15*: 50,8 % vs. 25,4 %, $P_c = 0,045$) a alelická skupina *HLA-DRB1*13* (spolu s vázanými *DQB1*06* a *DQA1*01* variantami) byla častější u RhCCDee multiresponderů než u ostatních RhD pozitivních fenotypů (45,5 % vs. 3,3 %, $P_c = 0,015$).

Závěr. V naší studii jsme jako první nezávisle potvrdili asociaci *HLA-DRB1*15* s tvorbou vícečetných protilátek proti RBC aloantigenům a našli jsme asociace variant HLA II. třídy pro tři časté kombinace těchto protilátek. Naše data spolu s dostupnými literárními údaji podporují závěr, že HLA variabilita hraje důležitou roli v odpovědi na RBC aloantigenní podnět. Nalezené asociace s *HLA-DRB1*15* a *DRB1*13* byly potvrzeny i ve vztahu k Rh

fenotypům, což může v budoucnu pomoci při výběru pacientů ve vyšším riziku RBC aloimunizace.

8 SUMMARY

Introduction. Alloimmune antibodies against red blood cell (RBC) antigens induced in susceptible individuals (responders) by transfusion, pregnancy or transplantation may have serious clinical consequences. Nevertheless, there is a high proportion of patients who do not form RBC alloantibodies despite the repeated transfusion therapy.

Aims. The aims of this study were 1) to investigate the association of alloimmunization against selected RBC antigens with HLA-Class II; 2) to investigate possible association between the unresponsiveness to RBC alloantigens and HLA-Class II alleles and 3) to stratify HLA-Class II alleles associated with RBC multi-responsiveness according to the Rh phenotype.

Methods In total, 230 responders (106 monoresponders and 124 multiresponders) and 109 patients without RBC alloantibodies who were administered with minimally 10 RBC units (“non-responders”) were enrolled into the study. Immunohaematological tests were performed by standard procedures. *HLA-DRB1*, *-DQA1* and *-DQB1* variants were determined by molecular-genetic approach (PCR-SSO) and their frequencies were compared between the patients (patient subgroups) and 375 ethnically and regionally matched controls and among non-responders and multi-responders according to their Rh status.

Results Development of multiple RBC antibodies was associated with *HLA-DRB1**15 and *-DQB1**06 allelic groups in the patients, with the relationship being particularly apparent in those with anti-C+D antibodies. Furthermore, *DRB1**13 and *DQB1**06 were more frequent in multiresponders with anti-E+c antibodies and *DRB1**03 and *DQB1**02 in those with anti-E+Cw. As expected, alloimmunization was associated with RhD negative phenotype because RhD negative individuals were significantly more frequent among multi-responders (49.2 %) than in non-responders (11.9 %). Analysis of *HLA-DRB1*, *DQA1* and *DQB1* allelic groups in non-responding patients did not reveal any HLA variant protective against RBC alloimmunization. Importantly, *HLA-DRB1**15 carriers were significantly overrepresented among RhD negative multi-responders by comparison to RhD positive multi-responders (50.8 % vs. 25.4 %; $P_c = 0.045$) and *HLA-DRB1**13 together with linked *HLA-DQB1**06 and *HLA-DQA1**01 variants were more frequent in individuals with the DCCee phenotype than in other RhD-positive phenotypes (45.5 % vs. 3.3 %; $P_c=0.015$).

Conclusion For the first time, we confirmed here independently the association of *HLA-DRB1**15 with the RBC antibody multiresponder status and found HLA-class II associations for three frequent RBC antibody combinations. Our data together with available literary reports support the concept that HLA variability plays an important role in the response to RBC

alloantigens. Observed *HLA-DRB1*15* and *DRB1*13* associations were confirmed also when the patients were stratified according to Rh phenotypes and this finding may perspectivevely contribute to the identification of patients at a higher risk of multiple RBC alloimmunization.

9 Seznam použitých zkratk

aa – aminokyselina

Abs – protilátky

Ag – antigen

APC – antigen prezentující buňka

BCR - buněčný receptor B lymfocytů

CD - cluster of differentiation

CD4+ T lymfocyty – T lymfocyty CD4 pozitivní

CMV - cytomegalovirus

CTLA4 – s cytotoxickými lymfocyty asociovaný protein 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

ČNRDD – Český národní registr dárců dřeně

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DHTR – pozdní hemolytická potransfuzní reakce

DP – dizertační práce

DSP – doktorský studijní program

EBR – erytrocyty bez buffy coatu resuspendované

ERD – erytrocyty resuspendované deleukotizované

FMAITP – fetomaternální aloimunní trombocytopenie

FNO – Fakultní nemocnice Ostrava

GATA-1 - transkripční faktor erytrocytů

GPA - glykoforin

Hb β S – mutací změněná molekula hemoglobinu (v β -řetězci záměna Glu za Val) vedoucí k srpkovité anémii

HLA – hlavní histokompatibilní systém člověka MHC (human leukocyte antigens)

HON – hemolytické onemocnění novorozence a plodu

HPA – human plateles antigens

HSP 70 – jeden z nejběžnějších proteinů teplotního šoku (Heat shock protein 70)

HTR – hemolytická potransfuzní reakce

IF – Impact factor

IL - interleukin

ISBT – International Society of Blood Transfusion

K - Kell

KIR - receptory NK buněk (Killer-cell immunoglobulin-like receptors)

MSD – myelodysplastický syndrom

MHC - Major Histocompatibility Complex

N – počet

NK – Natural killer

OR - odds ratio

PCR - polymerázová řetězová reakce

PCR SSO – PCR se sekvenčně specifickými oligosondami

PCR SSP - PCR se sekvenčně specifickými primery

PLT – trombocyty

RA – revmatoidní artritida

RBC – červené krvinky

RhD – antigen D (RhD protein)

RHD – gen kódující RhD protein

SA – srpkovitá anémie

SAPE - Streptavidin R-Phycoerythrin konjugát

SLE – systémový lupus erythematosus

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

TAP protein - Transporter associated with antigen processing protein

Taq – DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE – pufr (Trometamolium – Boric acid – EDTA)

TCR - buněčný receptor T lymfocytů

Th – pomocné T lymfocyty

Tfh – folikulární Th lymfocyty

TNF - faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)

TP – transfuzní přípravek

TRALI - akutní poškození plic vyvolané transfuzí (Transfusion-related acute lung injury)

Treg – regulační T lymfocyty

TU – transfuzní jednotka

WBC – bílé krvinky

10 PŘEHLED LITERATURY

1. Prigent A, Maillard N, Absi L, Aloui Ch, Cognasse F, Laradi A, Mariat Ch, Garraud O. From Donor to Recipient: Current Questions Relating to Humoral Alloimmunization. *Antibodies* 2014; 3:130-152.
2. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology- Table of blood group systems v6.0_6th August 2019. Dostupné z <http://www.isbtweb.org/>
3. Yazer MH, Triulzi DJ. Detection of anti-D in D-recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion* 2007; 47:2197-2201.
4. Frohn C, Dumbgen L, Brand JM, Gorg S, Luhn J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion* 2003; 43:893-898.
5. Urbaniak SJ, Robertson AE. A succesful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. *Transfusion* 1981; 21:64-69.
6. Redman M, Regan F, Contreras M. A prospective study of the incidence of red cell alloimmunisation following transfusion. *Vox Sang* 1996; 71:216-220.
7. Alves VM, MARTINS PR, Soares S, Araujo G, Schmidt LC, Costa SS, Langhi DM, Moraes-Souza H. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012; 34:206-211.
8. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999; 39:763-771.
9. Higgins JM, Sloan SR: Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood* 2008; 112:2546–2553.
10. Tormey CA, Fisk J, Stack G: Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. *Transfusion* 2008; 48:2069–2076.
11. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al.: Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990; 76:1431–1437.
12. Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, et al.: RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. *Transfusion* 2003; 43:1604–1610.
13. Wang LY, Liang DC, Liu HC, et al.: Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. *Transfus Med* 2006; 16:200–203.
14. Natukunda B, Schoenwille H, Ndugwa C, Brand A. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. *Transfusion* 2010; 50:20-25.

15. Aly R, EJ-Sharnoby MR, Hapag AA. Frequency of red cell alloimmunization in patients with sickle cell anemia in an Egyptian referral hospital. *Transfus Apher Sci* 2012; 47:253-257.
16. Ben Amor I, Louati N, Khemekhem H, Dhieb A, Rekik H, Mdhaftar M, Gargouri J. Red blood cell immunization in haemoglobinopathies about 84 cases (in French). *Transfus Clin Biol* 2012; 19:345-352.
17. Drasar E, Igbineweka N, Vasavda N, et al. Blood transfusion usage among adults with sickle cell disease - A single institution experience over ten years. *Br J Haematol* 2011; 152:766–770.
18. Torney CA, Stack G. The Characterization and classification of concurrent blood group antibodies. *Transfusion* 2009; 49:2709-2718.
19. Schonewille H, Brand A. Does an alloimmune response to strong immunogenic red blood cell antigens enhance a response to weaker antigens? *Transfusion* 2008; 48:958-963.
20. Zalpuri S, Zwaginga JJ, le Cessie S et al. Red Blood Cell alloimmunization and number of red blood cell transfusions. *Vox Sang* 2012; 102: 144-149.
21. Boateng LA, Schoenwille H, Sackey B. et al. Prevalence of Red Blood Cell antibodies among transfused patients at Komfo Anokye Teaching Hospital, Ghana. *J of Science and Technology* 2014; 34 (3): 27-34.
22. Sarnaik S, Schornack J, Lusher JM: The incidence of development of irregular red cell antibodies in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 1986; 26:249–252
23. Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, et al.: Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens* 1987; 0:161–166
24. Sins JW, Biemond BJ, van den Bersselaar SM. Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol* 2016;91(8):763-769
25. Caamaño J, Musante E, Contreras M. Frequency and specificity of red blood cell alloimmunization in Chilean transfused patients. *Transfus Med Hemother* 2015;42(1):4-7.
26. Hendrickson JE, Torney ChA, Shaz BH. Red Blood Cell Alloimmunization Mitigation Strategies. *Transfusion Medicine Reviews* 2014; 28:137–144.
27. Zimring JC, Spitalnik SL. Pathobiology of transfusion reactions. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2015; 10:83-110.
28. Řeháček V, Masopust J a kol. *Transfuzní lékařství*. 2013; 166-170. ISBN 978-80-247-4534-3.

29. Harm SK, Yazer MH, Monis GF, Triulzi DJ, Aubuchon JP, Delaney M. A centralized recipient database enhances the serologic safety of RBC transfusions for patients with sickle cell disease. *Am J Clin Pathol* 2014; 141:256–261.
30. Reverberi R. The persistence of red cell alloantibodies. *Blood Transfus* 2008; 6:225–34.
31. Tormey CA, Stack G. The persistence and evanescence of blood group alloantibodies in men. *Transfusion* 2009; 49:505–512.
32. Unni N, Peddinghaus M, Tormey CA, Stack G. Record fragmentation due to 1.transfusion at multiple health care facilities: a risk factor for delayed hemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2014; 54:98–103.
33. Sloan SR. The importance of antibody screens after transfusions. *Transfusion* 2016; 56:2653-2654.
34. Mehra NK. *The HLA Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. 2010, ISBN 978-81-8448-870-8.
35. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, Špišek R. *Základy imunologie*. 2017, ISBN 978-80-7553-250-3.
36. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. 2004, ISBM 80-86255-50-X.
37. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* 2015; 43: D423-431.
38. Décary F L'Abbé D, Tremblay L, Chartrand P. The immune response to the HPA-1a antigen: association with HLA-DRw52a. *Transf Med* 1991, 1:55.
39. Kuijpers RWAM, von dem Borne AEGK, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Wates AH, Zupanska B, Barz D, Taaning E, Termijtelen A, Ouwehand WH. Leucine33-Proline33 substitution human platelet glycoprotein IIIa determines HLA-DRw52a (Dw24) association of the immune response against HPA-1a (Zwa/PI^{A1}) and HPA-1b (Zwb/PI^{A2}). *Hum Immunol* 1992; 34:253-356.
40. L'Abbé D, Tremblay L, Filion M, Busque L, Goldman M, Décary F, Chartrand P. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Hum Immunol* 1992; 34(2):107-114.
41. Sarab G A, Michael Moss, Barker R N, Urbaniak S J. Naturally processed peptides spanning the HPA-1a polymorphism are efficiently generated and displayed from platelet glycoprotein by HLA-DRB3*0101-positive antigen-presenting cells. *Blood* 2009; 3;114(9):1954-7.

42. Phelps RG, Turner AN, Rees AJ. Direct identification of naturally processed autoantigen-derived peptides bound to HLA-DR15. *J Biol Chem* 1996; 271(31):18549-18553.
43. Peakman M, Stevens EJ, Lohmann T, et al. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autiantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J Clin Invest* 1990; 104(10):1449-1457.
44. Hunt D, Michel H, Dickinson T, et.al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science* 1992; 256(5065):1817-1820.
45. Rudensky AY, Preston-Hurburt P, al-Ramadi BK, Rotbard J, Janeway CA Jr. Truncation variants of peptides isolated from MHC clas II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 1992; 359(6394):429-431.
46. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Kroll H, Mueller-Eckhardt G. HLA-DRw6, a new immune response marker for immunization against the platelet alloantigen Bra. *Vox Sang* 1989; 57(1):90-1.
47. Semana G, Zazoun T, Alizadeh M, Morel-Kopp MCh, Genetet B, Kaplan C. Genetic Susceptibility and anti-human Platelet Antigen 5b alloimmunization Role of HLA class II and TAP genes. *Hum Immunol* 1996; 46: 114-119
48. Westman P, Hashemi-Tavoularis S, Blanchette V, Kekomäki S, Laes M, Porcelijn L, Kekomäki R. Maternal DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 haplotype in fetomaternal alloimmunization against human platelet alloantigen HPA-6b (GPIIIa-Gln489). *Tissue Antigens* 1997; 50:113-118.
49. Valentin N, Gagne K, Kerdudou N, Hallé L, Kaplan C, Killie M K, Skogen B, Muller J Y, Bignon J D. The alloimmune response to the human platelet antigen-1a is not related to maternal-fetal killer immunoglobulinlike receptor/HLA-Cw combinations. *Transfusion* 2007; 21;47(12):2322-9.
50. Brantley SG, Ramsey G: Red cell alloimmunization in multitransfused HLA-typed patients. *Transfusion* 1988; 28: 463–466
51. Shankar Kumar U, Ghosh K, Gupte S S, Gupte S C, Mohanty D. Role of HLA antigens in Rh (D) alloimmunized pregnant women from Mumbai, Maharashtra, *India. J. Biosciences* 2002; 27(2): 135-41.
52. Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, de Micco P, Reviron D. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunisation. *Br J Haematol* 2006; 132(3):374-8.

53. Noizat-Pirenne F, Tournamille Ch, Bierling P, Roudot – Thoraval F, Le Penne P Y, Rouger P a Ansart – Pirenne H. Relative immunogenicity of Fy^a and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006; 46: 1328-1333.
54. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, de Micco P, Chiaroni J. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion* 2005;45(6):956-9.
55. Picard C, Frassati C, Basire A, Buhler S, Galicher V, Ferrera V, Reviron D, Zappitelli JP, Bailly P, Chiaroni J. Positive association of DRB1*04 and DRB1*15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. *Transfusion* 2009; 49(11):2412-7.
56. Raos M, Zunec R, Mocibob B, Gojceta K, Lukic M, Cepulic BG. Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQX alleles for Fy^a alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion* 2019; 59:1118-24.
57. Schonewille H, Doxiadis I I N, Levering W H B M, Roelen D L, Claas F H J, Brand A. HLA-DRB1 association in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies. *Transfusion* 2014; 54:1971-78.
58. Maluskova A, Mrazek F, Pauliskova M, Kovarova P, Koristka M, Jindra P, Cermakova Z. Association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 with red-blood-cell alloimmunization in the Czech population. *Vox Sang* 2017; 112: 156-162.
59. Verduin EP, Brand A, van de Watering LM, et al.: The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion* 2016;56:1849–1856.
60. Tatari-Calderone Z, Gordish-Dressman H, Fasano R, et al.: Protective effect of HLA-DQB1 alleles against alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Hum Immunol* 2016; 77:35–40
61. Dean L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 2, Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>.
62. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.*2000; 14:44-61.
63. Appelman Z, Lurie S, Juster A, Borenstein R. Severe hemolytic disease of the newborn due to anti-c. *Int J Gynaecol Obstet.* 1990; 33:73-5
64. Daniels G. *Human Blood Groups* 2002. ISBN 0-632-056460.
65. Řeháček V, Masopust J a kol. *Transfuzní lékařství* 2013; 166-170. ISBN 978-80-247-4534-3.
66. Urbaniak SJ. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfus Clin Biol.* 2006 Mar-Apr;13(1-

- 2):19-22.
67. Stott L M, Barker R N, Urbaniak S J. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood* 2000; 96(13): 4011-19.
 68. Lerut E, van Damme B, Mizat – Pirenne F, Emonds MP, Rouger P, Vanrenterghem Z, Pirenne J, Anssart – Pirenne H. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion* 2007; 47: 28-40.
 69. Branch D R, Scofield T L, Moulds J J, Swanson J L. Unexpected suppression of anti-Fy^a and prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn after administration of Rh immune globulin. *Transfusion* 2011; 51:816-19.
 70. Tatari-Calderone Z, Luban N L C, Vukmanovic S. Genetics of Transfusion Recipient Alloimmunization: Can Clues from Susceptibility to Autoimmunity Pave the Way? *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2014; 41:436-445.
 71. Padyiar A, Augustine JJ, Bodziak KA, Aeder M, Schulak JA, Hricik DF. Influence of African-American ethnicity on acute rejection after early steroid withdrawal in primary kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; 42:1643-1647.
 72. Sippert EA, Visentainer JEL, Alves HV, et al. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion* 2017; 57:379-389.
 73. Park Y. J, Chung H. K, Park D. J, Kim W. B, Kim S. W, Koh, J J, Cho B. Y. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid* 2000, 10, 453–459.
 74. Ryder, A. B., Hendrickson, J. E., & Tormey, C. A. Chronic inflammatory autoimmune disorders are a risk factor for red blood cell alloimmunization. *British Journal of Haematology* 2016, 174, 483–485.
 75. Oliveira VB, Dezan MR, Gomes FCA et al. -318C/T polymorphism of the CTLA-4 gene is an independent risk factor for RBC alloimmunization among sickle cell disease patients. *Int J Immunogenet.* 2017; 44:219-224.
 76. Howe JG, Stack G. Relationship of epitope glycosylation and other properties of blood group proteins to the immunogenicity of blood group antigens. *Transfusion* 2018; 00:1-13.
 77. Zalpuri S, Zwaginga J J, van der Born J G. Risk Factors for Alloimmunisation after red blood Cell Transfusions (R-FACT): a case cohort study. *BMJ Open* 2012;2e001150.

78. Gehrie EA, Tormey ChA. The Influence of Clinical and Biological Factors on Transfusion-Associated Non-ABO Antigen Alloimmunization: Responders, Hyper-Responders and Non-Responders. *Transfus Med Hemother* 2014; 41:420-429.
79. Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, et al.: Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion* 2006; 46:1526–1536.
80. Hendrickson JE, Hod EA, Spitalnik S: Storage of murine red blood cells enhances alloantibody responses to an erythroid-specific model antigen. *Transfusion* 2010; 50:642–648.
81. Patel SR, Bennett A, Girard-Pierce K, Maier CL, et al. Recipient priming to one RBC alloantigen directly enhances subsequent alloimmunization in mice. *Blood advances* 2018; 2(2):105-115.
82. Yazer MH, Triulzi DJ, Shaz B, et al.: Does a febrile reaction to platelets predispose recipients to red blood cell alloimmunization? *Transfusion* 2009; 49:1070–1075.
83. Schonewille H, Brand A: Does an alloimmune response to strong immunogenic red blood cell antigens enhance a response to weaker antigens? *Transfusion* 2008; 48:958–963.
84. Bilgin YM, van de Watering LM, Brand A. Clinical effects of leucoreduction of blood transfusions. *Neth J Med* 2011; 69:441-450.
85. Desai PC, Deal AM, Pfaff ER, et al.: Alloimmunization is associated with older age of transfused red blood cells in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2015;90:691–695.
86. Schonewille H, Brand A: Alloimmunization to red blood cell antigens after universal leucodepletion. A regional multicentre retrospective study. *Br J Haematol* 2005; 129:151–156.
87. Seftel MD, Growe GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee ChY, Spinelli JJ, Sutherland HJ, Tsang P, Hogge DE. Universal prestorage leukoreduction in Canada decrease platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 2004; 103:333-339.
88. Yazer MH, Triulzi DJ: Receipt of older RBCs does not predispose D-negative recipients to anti-D alloimmunization. *Am J Clin Pathol* 2010; 134:443–447.
89. Zalpuri S, Schonewille H, Middelburg R, et al.: Effect of storage of red blood cells on alloimmunization. *Transfusion* 2013; 53:2795–2800.
90. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F: Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood* 2012; 120:528–537.

91. Hod EA, Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfus.Clin.Biol.* 2012; 19:84-89.
92. Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B. HLA and disease. *European Journal of Epidemiology* 2005; 20:475-88.
93. Noble J A, Valdes A M. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2011; 11(6): 533-42.
94. Guarene M, Capittini C, De Silvestri A, Pasi A, Baduli C, Sbarsi I, Cremaschi L, Garlaschelli F, Pizzochero C, Monti M C, Montecucco C, Corazza G R, Larizza D, Bianchi P F, Salvaneschi L, Martinetti M. Targeting the Immunogenetic Diseases with the Appropriate HLA Molecular Typing: Critical Appraisal on 2666 Patients Typed in One Single Centre. *BioMed Res Int* 2013; 2013: ID 904247.
95. Moritz E, Souza CP, Cruz B, et al. HLA-DRB1*12 and HLADRB1*15 are associated with antibody response to RHD antigen in Brazilians. *Vox Sang* 2015;109 Suppl.1:376.
96. Zota V, Nemirovsky A, Baron R, et al. HLA-DR alleles in amyloid beta-peptide autoimmunity: a highly immunogenic role for the DRB1*1501 allele. *J Immunol* 2009; 183:3522-30.
97. Hendrickson JE, Tormey ChA, Shaz BH. Red Blood Cell Alloimmunization Mitigation Strategies. *Transfusion Medicine Reviews* 2014; 28:137–144.
98. Darvishi P, Sharifi Z, Azarkievan A, Akbari A, Pourfathollah AA. HLA-DRB1*15:03 and HLA-DB1*11: useful predictive alleles for alloantibody production in thalassemia patients. *Transfusion Med* 2019; Jun;29(3):179-184.
99. Ebrahimi M, Dayer D, Jalalifar MA, Keikhaei B, Tahan Nejadi Asadi Z. Association between HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*15 with alloimmunization in transfusion-dependent patient wit thalassemia. *Transfusion Med* 2020; 1-6.
100. Evers D, Zwaginga JJ, Tijmensen J. Treatments for hematologic malignancies in contrast to those for solid cancers are associated with reduced red cell alloimmunization. *Heamatologica* 2017; 102(1): 52–59.
101. Königova N, Skoumalova I, Onderkova J, Ambruzova Z, Szotkowski T, Koristek Z, Maluskova A, Raida L, Mrazek F. HLA-B gene somatic insertion/deletion mutations in patients with acute myelogenous leukemia. *Int J Immunogenet* 2018; 45:323-328.
102. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syntrome. *Blood* 2002; 100(5):1570-4.

103. Karafin MS, Westlake M, Hauser RG et al. Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. *British J of Haematology* 2018; 181(6):713-8641-10
104. Lin Y, Saskin A, Wells RA et al. Prophylactic RhCE and Kell antigen matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Vox Sang* 2016; 112:79-86.
105. Maluskova A, Mrazek F, Kozelska R, Koristka M, Cermakova Z. Association of multispecific red blood cell alloimmunization with HLA-Class II variants is related to Rh phenotypes. *Bratisl Med J* 2021; 122(3):179-183.
106. Siddon AJ, Kenney BC, Hendrickson JE, Tormey CA. Delayed haematolytic and serologic transfusion reactions: pathophysiology, treatment and prevention. *Transf Med and Immunohematol* 2018; 25(00):1-9.
107. Castro O, Oneal P, Medina A, et al. Preventing delayed hemolytic transfusion reactions in sickle cell disease. *Transfusion* 2016; 50:1465-70.

11 SEZNAM PUBLIKACÍ A ABSTRAKT

V této kapitole je uveden seznam publikací a abstrakt vzniklých v průběhu doktorského studia.

11.1 Práce související s dizertační prací (Přílohy dizertační práce)

Publikace v časopisech s IF:

1. **Maluskova A**, Mrazek F, Pauliskova M, Kovarova P, Koristka M, Jindra P, Cermakova Z. Association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 with red-blood-cell alloimmunization in the Czech population. *Vox Sang* 2017; 112: 156-162. (IF 2017: 2,107)
2. **Maluskova A**, Mrazek F, Kozelska R, Koristka M, Cermakova Z. Association of multispecific red blood cell alloimmunization with HLA-Class II variants is related to Rh phenotypes. *Bratisl Med J* 2021; 122(3):179-183. (IF 2020: 1,2).
3. Königova N, Skoumalova I, Onderkova J, Ambruzova Z, Szotkowski T, Koristek Z, **Maluskova A**, Raida L, Mrazek F. HLA-B gene somatic insertion / deletion mutations in patients with acute myelogenous leukaemia. *Int J Immunogenet.* 2018; 45:323-328. (IF 2018: 1,13).

Publikace v ostatních recenzovaných časopisech:

1. **Malušková A**, Kovářová P, Kořístka M, Mrázek F, Čermáková Z. Imunogenetické faktory ovlivňující aloimunizaci proti antigenům krevních skupinových systémů. *Transfuze Hematol. dnes* 2016, 22;3: 157-167.

11.2 Publikovaná abstrakta

Abstrakta v časopisech s IF:

1. **Maluskova A**, Kovarova P, Mrazek F, Paulišková M, Rudinská J, Jindra P, Čermáková Z. Association of HLA-DRB1 and -DQB1 with the red blood cell alloimmunization in the Czech population. (30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Kos, 11.-14.5.2016). *HLA Meeting Abstract 2016 Apr.* 87(4):319-320 (P213).
2. **Malusková A**, Mrazek F, Kozelska R, Rudinska J. Lack of association between the protection from red blood cell alloimmunization and HLA-Class II variants in the Czech population. (32nd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Venice, 9-12. 5.2018). *HLA Meeting Abstract 2018 May;*91(5):470-470 (P253).

Abstrakta v ostatních časopisech:

1. **Malušková A**, Mrázek F, Paulišková M, Kozelská R, Rudinská J, Kovářová P, Fizková D, Jindra P, Čermáková Z. Asociace HLA-DRB1 a -DQB1 s aloimunizací proti červeným krvinkám v České populaci. (XXXIII. sjezd českých a slovenských

alergologů a klinických imunologů, Plzeň, 12.-15.10.2016). *Alergie- Supplementum* 1/2016.

2. **Malušková A**, Mrázek F, Kozelská R, Paulišková M, Rudinská J, Kovářová P, Čermáková Z. Distribuce HLA antigenů II. třídy u pacientů v závislosti na výskytu protilátek proti aloantigenům erytrocytů. (I. český hematologický a transfuziologický sjezd, Praha, 16. - 19.9.2018, Přednáška). *Transfuze a hematologie dnes* 2018. Supplement 2, (O13).

Abstrakta ve sbornících z konference:

1. **Maluskova A**, Kovarova P, Fizkova D, Pauliskova M, Rudinska J, Kozelska R, Cermakova Z. The degree of HLA matching in kidney transplantation – a retrospective single center study. (11th East West Immunogenetics Conference, Olomouc, 10-11.3.2017).

12 PŘÍLOHY - PUBLIKACE V SOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ (SEPARÁTNÍ VÝTISKY)