

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



VÝSKYT HLA ZNAKŮ U PACIENTŮ PŘED TRANSPLANTACÍ KRVETVORNÝCH BUNĚK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vít Řeháček

Konzultant: Mgr. Kamila Synková

Hradec Králové, 2017

Lucie Moravcová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala MUDr. Vítu Řeháčkovi za vedení práce, ochotu a cenné rady. Mgr. Kamile Synkové za uvedení do dané problematiky a pomoc při získávání potřebných dat. Dále děkuji i MUDr. Pavlu Jindrovi, Ph.D. a Ing. Lucii Houdové, Ph.D. za poskytnutí údajů z Českého národního registru dárců dřeně. V neposlední řadě také doc. RNDr. Petru Klemmerovi, CSc. za pomoc se statistickým vyhodnocením získaných dat. Tato práce by nevznikla bez podpory mé rodiny a přátel, kterým chci tímto také poděkovat.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2017

Lucie Moravcová

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Abstrakt..... | 6 |
| 2. Abstract..... | 7 |
| 3. Zkratky | 8 |
| 4. Úvod..... | 9 |
| 5. Zadání bakalářské práce – cíl práce | 10 |
| 6. Teoretická část..... | 11 |
| 6.1 HLA systém..... | 11 |
| 6.1.1 Genový komplex HLA systému | 11 |
| 6.1.1.1 Vlastnosti HLA komplexu..... | 12 |
| 6.1.2 Dědičnost HLA systému | 12 |
| 6.1.2.1 Vazebná nerovnováha | 13 |
| 6.1.3 Struktura HLA antigenů..... | 14 |
| 6.1.3.1 Molekuly HLA I. třídy | 14 |
| 6.1.3.2 Molekuly HLA II. třídy | 15 |
| 6.1.4 Exprese HLA znaků na buňkách | 15 |
| 6.1.5 Biologická funkce – rozdíly mezi I. a II. třídou | 15 |
| 6.1.5.1 HLA restrikce..... | 16 |
| 6.1.5.2 Význam rozmanitosti HLA antigenů | 16 |
| 6.2 Asociace HLA systému s nemocemi | 17 |
| 6.3 Transplantace krevetvorných buněk..... | 17 |
| 6.3.1 Hledání dárce | 18 |
| 6.3.2 Důsledky genetické odlišnosti dárce a příjemce..... | 18 |
| 6.4 Typizace HLA antigenů a alel..... | 19 |
| 6.4.1 Sérologické metody typizace – princip | 19 |
| 6.4.2 Molekulárně genetické metody..... | 20 |
| 6.4.2.1 PCR-SSP – princip..... | 20 |
| 6.4.2.2 PCR-SSO – princip | 21 |
| 6.4.2.3 SBT – princip | 21 |
| 6.5 Nomenklatura HLA systému..... | 21 |
| 7. Experimentální část | 23 |
| 7.1 Materiál a metodika | 23 |
| 7.1.1 Zpracování a vyhodnocení dat..... | 23 |
| 7.1.2 Vyšetřovací metody | 24 |

| | | |
|---------|---|----|
| 7.1.3 | Pracovní postup | 24 |
| 7.1.3.1 | Molekulárně genetická typizace pomocí PCR-SSP | 24 |
| 7.1.3.2 | Sérologická typizace HLA znaků I. třídy | 25 |
| 7.1.4 | Vyšetřovaný materiál | 27 |
| 7.1.5 | Hodnocený soubor osob | 27 |
| 8. | Výsledky | 29 |
| 8.1 | Počet vyšetření v jednotlivých letech | 29 |
| 8.2 | Počet pacientů, kteří měli k dispozici rodinného příslušníka | 30 |
| 8.3 | Počet potenciálních vhodných dárců ve skupině rodinných příslušníků | 32 |
| 8.4 | Zastoupení HLA znaků u pacientů | 33 |
| 8.4.1 | Lokus HLA-A | 34 |
| 8.4.2 | Lokus HLA-B | 36 |
| 8.4.3 | Lokus HLA-DRB1 | 38 |
| 8.5 | Zastoupení fenotypů HLA-A, HLA-B a HLA-DRB1 u pacientů | 40 |
| 8.6 | Zastoupení HLA-DRB1 znaků u pacientů s akutní myeloidní leukémií | 41 |
| 9. | Diskuse | 43 |
| 10. | Závěr | 45 |
| 11. | Seznam tabulek | 46 |
| 12. | Seznam grafů | 47 |
| 13. | Použitá literatura | 48 |

1. ABSTRAKT

Autor: Lucie Moravcová

Název: Výskyt HLA znaků u pacientů před transplantací krvetvorných buněk

Bakalářská práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Cíl práce: Vypracovat přehled zastoupení HLA znaků u pacientů před transplantací krvetvorných buněk vyšetřovaných v letech 2014–2016 na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové. Porovnat data s údaji poskytnutými Českým národním registrem dárců dřeně.

Metody: HLA znaky pacientů byly určeny pomocí PCR–SSP metody. Typizace rodinných příslušníků proběhla sérologickou metodou. Následovalo komplexní statistické zpracování získaných dat.

Výsledky: V letech 2014 až 2016 bylo vyšetřeno 154 pacientů před transplantací krvetvorných buněk a 157 jejich rodinných příslušníků. Mezi pacienty bylo 85 mužů a 69 žen. Nejvíce pacientů se nacházelo ve věkovém rozmezí 61–70 let. Nejčastější diagnózou byla akutní myeloidní leukémie. Rodinná studie byla provedena u 92 pacientů. Mezi rodinnými příslušníky bylo nalezeno 36 potenciálních vhodných dárců. V lokusu HLA-A se u pacientů nevyskytoval žádný znak významně častěji. V lokusu HLA-B byl významně vyšší výskyt znaku HLA-B*15 (10,065 % vs. 6,800 %). Častější byl i znak HLA-DRB1*01 (13,961 % vs. 9,897 %). U pacientů s akutní myeloidní leukémií nebyl prokázán žádný vztah mezi znaky v HLA-DRB1 lokusu a nemocí.

Závěry: Zastoupení HLA znaků u pacientů se významně neodlišovalo od populace ČR s výjimkou znaků HLA-B*15 a HLA-DRB1*01, které se vyskytovaly významně častěji. Jako potenciální vhodný dárců bylo označeno 23 % z celkového počtu typizovaných rodinných příslušníků.

Klíčová slova: HLA systém. Typizace HLA antigenů. Transplantace krvetvorných buněk. Frekvence HLA znaků.

2. ABSTRACT

Author: Lucie Moravcová

Title: Frequency of HLA Antigens in Patients before Bone Marrow Transplantation

Bachelor's Thesis

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Field of study: Medical Laboratory Technician

Background: Elaborated overview of frequency of HLA antigens in patients before bone marrow transplantation who were examined from 2014 to 2016 in Transfusion Department of the University Hospital Hradec Kralove. Compare our data with data provided by Czech National Marrow Donors Registry.

Methods: Patient's HLA alleles were typed by PCR – SSP method. Family members were typed by serological method. After that was conducted a complex statistic processing of our data.

Results: 154 patients before bone marrow transplantation and 157 of their family members were examined from 2014 to 2016. There were 85 men and 69 women tested among the patients. Most patients were between 61 – 70 years of age. Acute myeloid leukaemia was the most common diagnose. A family study was conducted for 92 patients. 36 potential suitable donors were found among family members. No allele had significantly high frequency in the HLA-A loci of patients. In the HLA-B loci had significantly high frequency HLA-B*15 allele (10,065 % vs. 6,800 %). HLA-DRB1*01 allele was also more frequent (13,961 % vs. 9,897 %). There was no proof of association between antigens in the HLA-DRB1 loci of patients and acute myeloid leukaemia.

Conclusions: The frequency of HLA alleles in patients did not differ significantly from the population of the Czech Republic except HLA-B*15 and HLA-DRB1*01 alleles, which occurred significantly more frequently. 23 % of the total number of typed family members were identified as potential suitable donors.

Keywords: HLA system. Typing of HLA antigens. Bone marrow transplantation. Frequency of HLA antigens.

3. ZKRATKY

| | |
|------------|--|
| AML | akutní myeloidní leukémie |
| CD znaky | diferenciační antigeny |
| ČNRDD | Český národní registr dárců dřeně |
| ČR | Česká republika |
| ddNTP | dideoxyribonukleotid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| GvHD | reakce štěpu proti hostiteli |
| HLA | hlavní histokompatibilitní systém člověka |
| MHC | hlavní histokompatibilitní systém |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PCR-SSO | polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy |
| PCR-SSP | polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery |
| SBT | přímé sekvenování |
| SOP | standardní operační postup |
| <i>Taq</i> | polymeráza pocházející z bakterie <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-borát-EDTA pufr |
| UV | ultrafialové záření |

4. ÚVOD

Důvodů k transplantaci krvetvorných buněk (dříve označované jako transplantace kostní dřeně) je hned několik. Ať už se jedná o některou z hematologických malignit, jiné poruchy krvetvorby nebo závažné narušení funkce imunitního systému, je transplantace krvetvorných buněk často poslední nadějí na záchranu pacienta.

Díky své rafinovanosti dokáže imunitní systém rozpoznat buňky, které byly pozměněny například přítomností patogenního organismu nebo nádoru. Proti těmto buňkám pak začne imunitní systém ve většině případů bojovat. Jako obranný mechanismus je tato reakce prospěšná, ale velmi komplikuje přijetí transplantovaného orgánu či štěpu krvetvorných buněk. Buňky pocházející od druhého člověka jsou naším imunitním systémem vyhodnoceny jako potenciální hrozba a tělo se proti nim začne bránit a snaží se je zničit.

Na rozlišování cizích struktur od vlastních se v lidském těle podílejí HLA antigeny. Aby se zvýšila pravděpodobnost úspěšné transplantace, je třeba najít vhodného dárce, jehož HLA antigeny budou co nejvíce podobné HLA antigenům příjemce.

5. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

V této bakalářské práci bylo mým úkolem komplexně vyhodnotit data vyšetřovaných pacientů, u kterých byla indikována transplantace krvetvorných buněk. Data poskytnutá Transfuzním oddělením Fakultní nemocnice Hradec Králové pocházejí od 154 pacientů a jejich 157 rodinných příslušníků, kteří byli v letech 2014–2016 vyšetřováni v Laboratoři HLA systému a PCR diagnostiky.

Cílem práce je vyhodnotit zastoupení HLA znaků u pacientů před transplantací krvetvorných buněk a porovnat tyto údaje s daty poskytnutými Českým národním registrem dárců dřeně. Toto srovnání by mělo odhalit, zda se v testovaném souboru pacientů nevyskytuje některý HLA znak s vyšší frekvencí, než je běžné v populaci České republiky. Stejně bude vyhodnocen i HLA fenotyp pacientů a hodnocení bude vztaženo i na nejčastěji se vyskytující diagnózu ve skupině pacientů.

Dále se ve svém hodnocení zaměřím na to, u kolika pacientů byla provedena rodinná studie při hledání vhodného dárce a kolik procent rodinných příslušníků bylo označeno jako potenciální vhodný dárce krvetvorných buněk.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 HLA SYSTÉM

Molekuly hlavního histokompatibilitního komplexu (Major Histocompatibility Complex, MHC) hrají důležitou roli ve správné funkci našeho imunitního systému. Jejich úkolem je předkládat T lymfocytům antigenní fragmenty endogenního či exogenního původu. Tím umožňují organismu rozpoznat vlastní struktury od cizích. Komplex genů, který kóduje tyto molekuly, se obecně označuje jako MHC. U člověka byly jeho produkty poprvé detekovány na leukocytech, proto v případě lidského organismu hovoříme o HLA systému (Human Leukocyte Antigens) (Řeháček a kol., 2013), (Jílek, 2008).

6.1.1 Genový komplex HLA systému

Geny pro HLA znaky jsou lokalizovány na krátkém raménku 6. chromozomu. Skupina přibližně 200 genů zde tvoří HLA komplex, jehož oblast můžeme rozdělit na tři podoblasti, které zároveň formují tři třídy genů. Z lokusů HLA-A, HLA-B, HLA-C jsou kódovány molekuly I. třídy a tato oblast se v HLA komplexu nachází nejbliže k telomeře. Oblast II. třídy se nachází nejbliže centromery a obsahuje lokusy HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Mezi I. a II. třídou se nacházejí geny III. třídy, které kódují například některé složky komplementu a další různorodé proteiny podílející se na regulaci imunitní odpovědi (Hillyer a kol., 2007), (Krejsek a Kopecký, 2004).

HLA geny jsou dále děleny na tzv. klasické a neklasické. Z hlediska prezentace antigenních fragmentů a transplantační medicíny jsou pro nás důležité již zmíněné geny klasické (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Mezi ty neklasické patří například geny I. třídy HLA-E, HLA-F a HLA-G (Krejsek a Kopecký, 2004).

6.1.1.1 Vlastnosti HLA komplexu

Z předchozí kapitoly vyplývá, že HLA systém je polygenní, což značí přítomnost více genů s příbuznou funkcí. Pro I. třídu například platí, že díky existenci 3 párů klasických genů může jedinec nést na svých buňkách 6 odlišných znaků I. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004).

Geny pro molekuly I. a II. třídy jsou navíc vysoce polymorfní. To znamená, že v populaci existuje velké množství alel, které se mohou vyskytovat v jednotlivých lokusech. Do konce dubna roku 2017 bylo popsáno 16 755 HLA alel (HLA Alleles Numbers, HLA Nomenclature). Tato skutečnost umožňuje existenci mnoha variant HLA molekul, které mohou být přítomny na povrchu buněk. Polymorfismus a polygenie HLA systému jsou společně příčinou existence nepřeborného množství fenotypů HLA molekul v rámci celé populace (Krejsek a Kopecký, 2004).

Další vlastností HLA systému je, že jednotlivé lokusy leží v těsné blízkosti vedle sebe a jejich geny tak vykazují těsnou genetickou vazbu. Jen v malém procentu případů dochází v této oblasti genetického kódu při meióze ke crossing-overu (Krejsek a Kopecký, 2004).

6.1.2 Dědičnost HLA systému

Z Mendelových zákonů a vlastností HLA komplexu vyplývají i principy, kterými se řídí dědičnost HLA znaků. Za předpokladu, že nedošlo ke crossing-overu, předá matka i otec svému potomkovi kompletní haplotyp HLA genů (kombinace alel přítomná na jednom chromozomu). Potomek tak nese jeden haplotyp od matky a druhý od otce. Mohou tak vzniknout 4 kombinace haplotypů. Protože geny HLA komplexu jsou kodominantní, fenotypově se projeví alely od obou rodičů. Pokud se nejedná o jednovaječná dvojčata, je mezi sourozenci šance 1:4, že budou sdílet stejné HLA znaky. Toho se využívá při hledání vhodného dárce pro transplantaci (Řeháček a kol., 2013), (Krejsek a Kopecký, 2004), (Jílek, 2008).

6.1.2.1 Vazebná nerovnováha

Při zachování principu volné kombinovatelnosti alel by vznikalo hojné množství fenotypových kombinací a zastoupení všech alel v celé populaci by bylo v rovnováze. Díky dědění v haplotypech však v praxi vzniká vazebná nerovnováha (angl. linkage disequilibrium) a některé alely a haplotypy se vyskytují častěji (Hillyer a kol., 2007). To je vysvětlováno tím, že určitá kombinace HLA znaků byla v minulosti pro své nositele výhodnější a mohla být předána dalším generacím (Jílek, 2008). Zatímco jeden znak může být obecně častější v celé populaci, jiný se může nacházet častěji pouze v určité menší populaci, například v některé etnické skupině (Murphy a kol., 2013).

V tabulce č. 1 jsou uvedeny nejčastěji se vyskytující HLA znaky v souboru dárců v Českém národním registru dárců dřeně (ČNRDD). Pro toto hodnocení je statisticky vždy vyhodnoceno cca 20 000 záznamů z každého lokusu. Takto velký soubor má vzhledem k diverzitě HLA antigenů výpovědní hodnotu pro celou Českou republiku.

Tabulka č. 1 Frekvence výskytu nejčastějších HLA znaků I. a II. třídy v České republice

| HLA znaky I. třídy | Frekvence znaku | HLA znaky II. třídy | Frekvence znaku |
|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| A*02:01 | 26,62 % | DQB1*03:01 | 19,50 % |
| A*01:01 | 16,15 % | DRB1*07:01 | 15,44 % |
| C*07:01 | 15,59 % | DQB1*06:02 | 12,67 % |
| A*03:01 | 14,20 % | DRB1*15:01 | 11,83 % |
| C*07:01 | 12,94 % | DQB1*02:01 | 10,86 % |
| C*04:01 | 12,53 % | DQB1*02:02 | 10,69 % |
| B*07:02 | 11,90 % | DQB1*05:01 | 9,98 % |
| C*06:02 | 11,60 % | DRB1*03:01 | 9,20 % |
| B*08:01 | 10,34 % | DQB1*03:02 | 8,04 % |

Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

V tabulce č. 2 jsou uvedeny předpokládané nejčastější haplotypy v souboru dárců v ČNRDD. Pravděpodobnost výskytu daného haplotypu je vypočítána ze zadaných hodnot frekvence jednotlivých HLA znaků.

Tabulka č. 2 Předpokládané nejčastější haplotypy v České republice

| HLA haplotyp | Podmíněná pravděpodobnost výskytu |
|---|-----------------------------------|
| A*01:01, B*08:01, C*07:01, DRB1*03:01, DQB1*02:01 | 5,2 % |
| A*03:01, B*07:02, C*07:02, DRB1*15:01, DQB1*06:02 | 2,2 % |
| A*02:01, B*13:02, C*06:02, DRB1*07:01, DQB1*02:01 | 1,3 % |
| A*23:01, B*44:03, C*04:01, DRB1*07:01, DQB1*02:01 | 1,2 % |
| A*02:01, B*07:02, C*07:02, DRB1*15:01, DQB1*06:02 | 1,2 % |

Dostupné z: <http://ccy.zcu.cz/registr/CZ-HANA.html>

6.1.3 Struktura HLA antigenů

Molekuly I. i II. třídy sdílí obdobnou strukturální stavbu. Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které lze rozdělit na tři základní oblasti – část extracelulární, transmembránovou a intracelulární. Molekuly obou tříd obsahují ve své struktuře vazebné místo, kam váží antigenní fragmenty (Řeháček a kol., 2013).

6.1.3.1 Molekuly HLA I. třídy

HLA antigeny I. třídy jsou tvořeny transmembránovým α řetězcem a druhým řetězcem tvořeným β_2 -mikroglobulinem. Ten je s α řetězcem nekovalentně asociovaný a neprochází membránou (Hořejší a kol., 2013). β_2 -mikroglobulinový řetězec je kódován z 15. chromozomu a jeho složení je stejné u všech antigenů HLA I. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004). Transmembránový α řetězec dělíme na 3 domény – α_1 , α_2 a α_3 . Nejvíce polymorfní je α_1 doména, která spolu s α_2 vytváří vazebné místo pro antigenní peptid, které má tvar uzavřeného žlábků. Mohou zde být prezentovány jen fragmenty o přesně dané velikosti 8-10 aminokyselin (Penka a kol., 2012), (Hořejší a kol. 2013).

6.1.3.2 Molekuly HLA II. třídy

Molekuly HLA II. třídy jsou oproti HLA antigenům I. třídy tvořeny dvěma transmembránovými glykoproteinovými řetězci, které jsou nekovalentně vázány. Oba řetězce jsou rozděleny na dvě domény. Řetězec α – členěný na domény α_1 a α_2 , řetězec β tvořený z domén β_1 a β_2 . Vazebné místo pro antigenní fragment leží mezi doménami α_1 a β_1 a je v tomto případě otevřené. Díky tomu zde mohou být předkládány fragmenty o délce 15–35 aminokyselin (Penka a kol., 2012), (Řeháček a kol., 2013).

6.1.4 Exprese HLA znaků na buňkách

HLA antigeny I. třídy najdeme na všech jaderných buňkách těla a na trombocytech. Největší zastoupení mají na buňkách imunitního systému. Zde se mohou vyskytovat v několika set tisícových počtech. Naopak malá hustota HLA molekul je na buňkách centrálního nervového systému, kosterní svaloviny a endokrinních buňkách (Murphy a kol., 2013), (Krejsek a Kopecký, 2004).

Molekuly II. třídy najdeme za fyziologických podmínek jen na buňkách prezentujících antigen. Jedná se o B lymfocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky (Hořejší a kol. 2013). Dále je můžeme najít na aktivovaných T lymfocytech a aktivovaných granulocytech (Murphy a kol., 2013).

6.1.5 Biologická funkce – rozdíl mezi I. a II. třídou

Největší rozdíl mezi HLA molekulami I. a II. třídy spočívá v jejich odlišné biologické funkci. Ta je dána právě expresí na různých typech buněk (Hillyer a kol., 2007). Všechny jaderné buňky našeho těla vystavují na svém povrchu prostřednictvím HLA antigenů I. třídy fragmenty z peptidů, které buňka sama produkuje. Pokud je buňka například napadena virem, dochází k produkci pozměněných peptidů. Komplex tvořený HLA molekulou a „cizím“ peptidem je rozpoznán cytotoxickými CD8+ T lymfocyty. Dojde k jejich aktivaci a po spuštění imunitní reakce je napadená buňka zničena (Jílek, 2008), (Krejsek a Kopecký, 2004).

Naopak uvnitř antigen prezentujících buněk vytvářejí molekuly II. třídy komplex s antigenními fragmenty exogenního původu. Ty pocházejí z vnějšího prostředí buňky a byly buňkou pohlceny a vhodně upraveny. Po vystavení komplexu na povrchu buňky jej rozpoznávají pomocné CD4+ T lymfocyty a tím dojde k jejich aktivaci a uvolnění cytokinů. To je signál pro zapojení dalších buněk imunitního systému do obranné reakce (Jílek, 2008), (Krejsek a Kopecký, 2004).

6.1.5.1 HLA restrikce

T lymfocyty nejsou schopny přímo reagovat na antigenní podněty, jak se původně myslelo. K jejich aktivaci dochází až po kontaktu s HLA molekulou, která nese navázaný peptidový fragment. Tento fakt je označován pojmem HLA restrikce. Její existence zabraňuje nepřetržité aktivaci specifické imunity, která není pro tělo žádoucí. HLA restrikce také brání rozvoji nepřiměřené imunitní reakce v místech, kde to není žádoucí. Této regulace je dosaženo pomocí nízké exprese HLA antigenů v těchto místech (Krejsek a Kopecký, 2004), (Řeháček a kol., 2013).

6.1.5.2 Význam rozmanitosti HLA antigenů

Polymorfismus vazebných míst a diverzita HLA molekul zvyšují pravděpodobnost úspěšného prezentování většiny antigenních fragmentů, se kterými se můžeme během života setkat. Z tohoto důvodu mají výhodu jedinci, kteří jsou ve všech HLA antigenech heterozygotní. Různorodá výbava HLA antigenů zvyšuje pravděpodobnost, že se jejich imunitní systém dokáže vypořádat s větším spektrem infekčních agens (Krejsek a Kopecký, 2004).

Velká rozmanitost HLA systému má však ochranný význam i na úrovni populace. Díky diverzitě HLA systému se zvyšuje pravděpodobnost, že v případě vzniku nového patogenu alespoň určité procento jedinců ponese HLA znak schopný prezentovat antigenní fragmenty nového patogenu. Pro potřeby transplantace medicíny je však velká rozmanitost HLA systému komplikací (Krejsek a Kopecký, 2004), (Hořejší a kol. 2013).

6.2 ASOCIACE HLA SYSTÉMU S NEMOCEMI

Během několika let výzkumu bylo prokázáno, že výskyt konkrétních HLA antigenů zvyšuje relativní riziko rozvoje několika onemocnění, nejčastěji autoimunitního charakteru. Relativní riziko udává, kolikrát se zvětší šance rozvoje onemocnění v přítomnosti asociovaného HLA znaku. Nemoc se však může vyskytnout i u osob, které nenesou tento HLA antigen. V současné době je neznámější asociace znaku HLA-B27 s ankylozující spondylartritidou (Bechtěrevova choroba) (Penka a kol., 2012), (Řeháček a kol., 2013).

I přestože se asociace HLA systému s hematologickými malignitami běžně v literatuře neuvádí, některé studie tuto asociaci potvrdily. Jedná se například o zvýšený výskyt alely HLA-DQA1*01 u mužských pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukemií nebo vyšší frekvenci HLA-DRB1*01 u pacientů s difuzním velkobuněčným B-lymfomem (Singh a kol., 2016), (Taylor a kol., 1998), (Alcoceba a kol., 2013).

6.3 TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK

Počáteční snahy o provedení transplantace tkání či orgánů podpořily objev HLA antigenů. Molekuly na povrchu buněk byly obecně nazvány jako histokompatibilní antigeny, protože jejich odlišnost podmiňovala tkáňovou neslučivost. Kvůli genetickým rozdílům docházelo během prvních pokusů o transplantaci velmi často k odhojování transplantovaných orgánů (Jílek, 2008).

Stejně tak i první transplantace kostní dřeně byly provázeny velkými komplikacemi, které vedly dříve nebo později ke smrti pacientů. Spolu s rozvojem transplantační imunologie byla odhalena důležitost shody histokompatibilních antigenů dárce a příjemce. Pokroky v molekulárně genetických metodách usnadnily vyhledávání vhodných dárců jak mezi příbuznými, tak i nepříbuznými dárci (Juric a kol., 2016).

6.3.1 Hledání dárce

Pokud je vyloučena možnost autologní transplantace a příjemce nemá identické dvojče, je nutné najít alogenního dárce (geneticky neidentický člověk) (Hořejší a kol., 2013). Ten se nejdříve hledá mezi sourozenci, kde je pravděpodobnost shody největší. Pouze omezené procento pacientů má k dispozici HLA shodného sourozence, proto je ve většině případů nutné přistoupit k vyhledávání vhodného nepříbuzného dárce v registrech dárců krevetvorných buněk, a to nejdříve v rámci státu, poté i na mezinárodní úrovni (Indrák a kol., 2014).

Během vyhledávání se hodnotí shoda obou alel v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1. Cílem je najít dárce, který bude s příjemcem shodný v 10 znacích z 10. V závislosti na pacientově stavu a nízké pravděpodobnosti najít včas shodného nepříbuzného dárce je možné tolerovat odchylky v jednom nebo dvou znacích (9/10, 8/10). Každá odchylka však zvyšuje riziko rozvoje potransplantačních komplikací (Lee a kol., 2007), (Tiercy, 2016), (Nowak, 2008).

6.3.2 Důsledky genetické odlišnosti dárce a příjemce

Kromě rizika možného odvržení štěpu je každá alogenní transplantace krevetvorných buněk provázena větším či menším rizikem rozvoje reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease; GvHD). Během této reakce nově vznikající T lymfocyty netolerují tkáň příjemce a bojují proti nim. U akutní formy GvHD bývá nejčastěji postižena kůže, sliznice zažívacího traktu a játra. Během chronické formy GvHD dochází k postižení dalších tkání a orgánů a její klinický obraz je bohatší. Obě formy GvHD snižují kvalitu života, mohou vést k selhání orgánů a smrti pacienta (Indrák a kol., 2014).

Zajímavostí je, že na stejném principu je zřejmě založena i takzvaná reakce štěpu proti nádoru/leukémii (Graft versus Tumor; GvT, Graft versus Leukaemia; GvL), kdy nově produkované imunitní buňky působí proti zbylým nádorovým buňkám. Tento efekt je pro pacienta prospěšný a v současné době je hlavní snahou nalézt kompromis mezi oběma fenomény (Petersen, 2007). Klíč k vyřešení tohoto problému možná poskytl

Tie a kol. (2017), kteří potvrdili, že neshoda v HLA-DP1 lokusu výrazně chrání pacienta proti relapsu leukémie.

6.4 TYPIZACE HLA ANTIGENŮ A ALEL

Typizace HLA znaků se využívá v mnoha případech. Důležitou roli hraje při vyhledávání vhodného dárce orgánů nebo krvetvorných buněk. Dále se provádí při průkazu HLA antigenu asociovaného s daným onemocněním, nebo před podáním trombocytového transfuzního přípravku. Některé studie také prokázaly, že přítomnost určité HLA alely může pozitivně či negativně ovlivňovat reakci na podané léčivo. Klinická praxe využívá dva základní principy typizace, sérologický a molekulárně genetický (Řeháček a kol., 2013), (Fung a Benson, 2015).

6.4.1 Sérologické metody typizace – princip

Sérologická typizace je prováděna pomocí lymfocytotoxického testu. Pro typizaci I. třídy se používají lymfocyty izolované na hustotním gradientu, zatímco pro II. třídu je třeba mít k dispozici B lymfocyty. HLA antigeny na povrchu lymfocytů prokazujeme pomocí diagnostických sér, která obsahují protilátky proti HLA antigenům o známé specifitě. Tato séra jsou předkapána na mikrotitračních Terasakiho destičkách. Během inkubace s vyšetřovanými lymfocyty dochází v jednotlivých jamkách ke vzniku komplexů antigen – protilátka. Tento komplex vzniká pouze v případě, že protilátka našla antigen, proti kterému je namířena (Fung a Benson, 2015), (Krejsek a Kopecký, 2004).

Proběhlou reakci zviditelní králičí komplement, který je přidán v následném kroku. Pokud je na lymfocytu přítomný komplex antigen – protilátka, dojde k aktivaci komplementu, porušení buněčné membrány a lýze buňky. Pozitivní reakcí jsou mrtvé buňky, které mohou být po obarvení vitálním barvivem odlišeny při mikroskopickém hodnocení od buněk živých (Fung a Benson, 2015), (Krejsek a Kopecký, 2004).

6.4.2 Molekulárně genetické metody

Pokroky v molekulárně genetických metodách nám neustále umožňují prohlubovat naše znalosti o HLA systému a jeho genetickém kódu. Obecně můžeme tyto metody rozdělit do tří skupin. První skupina využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP), druhá skupina je založena na PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy (PCR-SSO) a třetí vychází z metody přímého sekvenování (Sequence-Based Typing, SBT) (Fung a Benson, 2015), (Řeháček a kol., 2013).

6.4.2.1 PCR-SSP – princip

Principem PCR je opakování tří kroků – denaturace, annealing (nasedání) a extenze (prodlužování). Během jednotlivých kroků dochází ke změnám nastavené teploty na hodnotu optimální pro průběh dané reakce. Dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina (DNA) je v prvním kroku rozdělena na jednotlivá vlákna. Ve druhém kroku dochází k nasednutí dvou krátkých, synteticky připravených oligonukleotidů (primerů) na obě komplementární sekvence DNA. Primery slouží jako začátky pro syntézu nových vláken DNA. Po několika opakováních získáme velké množství amplifikovaných molekul DNA, které jsou z obou stran ohraničeny primery (Alberts a kol., 1999).

PCR-SSP používá primery, které nasedají na konkrétní sekvenci DNA charakteristickou pro danou alelu/skupinu alel. Produkty jsou po amplifikaci v termocykleru přeneseny na agarózový gel, označeny fluorescenčním barvivem a po proběhnutí horizontální elektroforézy jsou detekovány pomocí UV záření. V případě pozitivní reakce se na gelu objeví svítící proužek. Ten je přítomen, pouze pokud je ve vyšetřované DNA komplementární úsek, na který může specifický primer nasednout (Řeháček a kol., 2013).

6.4.2.2 PCR-SSO – princip

Během PCR dojde pomocí primerů k amplifikaci celého vyšetřovaného lokusu. K určení přítomnosti dané alely se poté využívá hybridizace se značenými oligonukleotidovými sondami, které reagují se specifickým úsekem DNA. Tyto sondy jsou uchyceny na membráně nebo v jamkách mikrotitračních destiček. K detekci pozitivní reakce se využívá různých metod v závislosti na zvolené značící technice použité DNA sondy (Řeháček a kol., 2013), (Penka a kol., 2012).

6.4.2.3 SBT – princip

Pomocí těchto metod je určováno přesné pořadí nukleotidů v testovaném úseku DNA. Během Sangerova sekvenování vzniká směs různě dlouhých DNA fragmentů, které jsou zakončeny značeným dideoxyribonukleotidem (ddNTP). Tyto fragmenty jsou následně separovány podle své délky a značený ddNTP je detekován (Řeháček a kol., 2013), (Kayman Kürekçi a Dinçer, 2014).

V současné době se kromě principu Sangerova sekvenování využívá i metod označovaných jako sekvenování nové generace (next-generation sequencing). Jedná se o metody, které umožňují sekvenování velkého množství vzorků najednou, jsou rychlejší, spolehlivější a v neposlední řadě i levnější (Kayman Kürekçi a Dinçer, 2014).

6.5 NOMENKLATURA HLA SYSTÉMU

Existují dva systémy nomenklatury popisující HLA systém. První z nich se používá pro HLA antigeny na povrchu leukocytů, které byly určeny pomocí sérologické typizace. Druhý pak vychází z molekulárně genetických metod (Řeháček a kol., 2013).

Příkladem prvního systému je např. označení antigenu HLA-A2. Za pomlčkou je uvedený lokus, ze kterého je daný antigen kódován, číslo pak označuje sérologickou specifitu, která odpovídá úrovni nízkého rozlišení (vysvětleno dále) (Nunes a kol., 2011).

Druhý systém umožňuje popisovat přímo alely HLA genů, a to na dvou úrovních. První úroveň je tzv. nízké rozlišení (angl. low resolution), které popisuje skupinu alel spojovanou s jedním HLA antigenem (např. HLA-A*02, kde * označuje použití molekulárně genetické metody). Při vysokém rozlišení (angl. high resolution) již popisujeme konkrétní alelu a její specifickou sekvenci DNA, která je zodpovědná za kódování vazebného místa pro antigenní fragment. Příkladem je alela HLA-A*02:01:01:01, kde jsou po oddělení dvojtečkou uvedeny odlišnosti v různých místech DNA sekvence (Nunes a kol., 2011), (Řeháček a kol., 2013), (Fung a Benson, 2015).

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 MATERIÁL A METODIKA

7.1.1 Zpracování a vyhodnocení dat

Data pro moji bakalářskou práci jsem získala z výsledkových listů, které Laboratoř HLA systému a PCR diagnostiky archivuje v papírové podobě. Typizaci HLA znaků jsem přímo neprováděla, pouze jsem se seznámila s danou metodikou pozorováním práce laborantek, které typizaci prováděly. Tomu odpovídá i stručný pracovní postup, který uvádím dále.

Pro odhalení případné asociace mezi HLA znaky a hematologickými malignitami bylo třeba získaná data porovnat s údaji o zastoupení HLA znaků a výskytu HLA fenotypů v populaci České republiky (ČR). K tomuto srovnání posloužila data, která nám pro účely této bakalářské práce poskytl Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD). Údaje o nejčastějších HLA znacích u osob v registru pocházejí v případě jednotlivých lokusů z různého počtu záznamů. V případě lokusů HLA-A a HLA-B se jedná přibližně o 90 000 záznamů, v případě lokusu HLA-DRB1 o 135 000 záznamů a v případě HLA fenotypu je statisticky vyhodnoceno přibližně 45 000 záznamů

Komplexní hodnocení získaných dat jsme provedli v programu Excel pomocí jeho statistických a matematických funkcí. K porovnání zastoupení HLA znaků v populaci ČR a ve skupině pacientů jsme ve stejném programu použili i soubor vytvořený doc. RNDr. Petrem Klemrou, CSc. pro určení intervalového odhadu pravděpodobnosti. Tento soubor je dostupný na školní síti.

Údaj o frekvenci výskytu HLA znaku v ČR pochází z velkého množství záznamů, proto jej můžeme označit jako střední hodnotu, ke které budeme vztahovat naše hodnocení. Tato střední hodnota pak s 95 % pravděpodobností leží v určitém intervalu kolem hodnoty frekvence výskytu HLA znaku ve skupině pacientů. Pokud střední hodnota leží mimo tento interval znamená to, že se skupina pacientů v nějakém ohledu liší od populace ČR.

7.1.2 Vyšetřovací metody

Pacienti

- genotypizace HLA znaků I. a II. třídy pomocí PCR-SSP metody
- vyšetřovány lokusy HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1
- úroveň nízkého rozlišení

Rodinní příslušníci

- fenotypizace HLA znaků I. třídy sérologicky pomocí lymfocytotoxického testu
- určovány antigeny HLA-A, HLA-B, HLA-C
- v případě shody v HLA znacích I. třídy následuje vyšetření HLA-DRB1 lokusu pomocí PCR-SSP

7.1.3 Pracovní postup

7.1.3.1 Molekulárně genetická typizace pomocí PCR-SSP

Izolace DNA

K izolaci DNA je použito 200 µl plné krve. Tento objem je napipetován k proteáze v připravené mikrozkuhavce, poté je přidán lyzační pufr a směs je krátce promíchána. Vzorek je následně umístěn do temperované vodní lázně. Po vyjmutí z vodní lázně je přidán ethanol a celý objem je přenesen na izolační kolonku se sběrnou zkumavkou. Vzorek je centrifugován. Sběrná zkumavka s filtrátem je vyměněna za čistou a poté je přidán první promývací pufr. Po stočení je opět vyměněna sběrná zkumavka, přidán druhý promývací pufr a vzorek je centrifugován. V této fázi je vyizolovaná DNA zachycená na membráně izolační kolonky. K jejímu uvolnění do nové sběrné zkumavky je použit eluční pufr a vzorek je naposledy stočen v centrifuze. Následně je změřena koncentrace získané DNA.

Příprava master mixu

V laminárním boxu je připravena reakční směs pro PCR, tzv. master mix. Master mix je připraven smícháním dodaného PCR pufru, *Taq* polymerázy (polymeráza

pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*), vody a jako poslední je přidána vyizolovaná DNA. Poměr vody a DNA je zvolen tak, aby výsledná koncentrace DNA vyhovovala optimálnímu rozmezí typizačního kitu. Master mix bez DNA je použit jako negativní kontrola, která je napipetována do první mikrozkušavky testu. Po přidání DNA do master mixu je směs napipetována do zbylých mikrozkušavek. Ty obsahují na svém dně sekvenčně specifické primery.

Amplifikace pomocí PCR

Následuje amplifikace DNA v termocykleru. Přístroj umožňuje nastavit teploty v jednotlivých krocích amplifikace, jak dlouho má být daná teplota udržována i celkový počet opakování všech teplotních cyklů. Před vložením do termocykleru jsou mikrozkušavky uzavřeny a je zvolen vhodný amplifikační program.

Detekce produktů pomocí horizontální elektroforézy

Do elektroforetické vany s TBE (Tris-borát-EDTA) pufrém je vložen agarózový gel. DNA je po amplifikaci přenesena z mikrozkušavek do jamek připraveného gelu. Do poslední jamky jsou napipetovány délkové standardy DNA, aby bylo možné určit velikost separovaných fragmentů. Elektroforetická vana je uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Po ukončení separace je zdroj napětí vypnut, gel je přenesen do vany s ethidium bromidem a nechá se barvit. Gel je po uplynutí doby barvení umístěn do nádoby s vodou, aby došlo k odbarvení gelu.

Hodnocení

Připravený gel je vložen do UV transluminátoru, kde je pořízena jeho fotografie. Ta je pak vyhodnocena pomocí softwaru nebo přiloženého pracovního listu, se kterým jsou porovnávány pozice pozitivních reakcí, které se na fotografii jeví jako zářící proužky.

7.1.3.2 Sérologická typizace HLA znaků I. třídy

Izolace lymfocytů z periferní krve

Celý objem heparinované krve je smíchán s ředícím pufrém a opatrně přenesen do zkušavky s vrstvicím roztokem. Naředěnou krev je třeba pomalu pouštět po stěně

zkumavky, aby se navrstvila na hladinu vrstvicího roztoku. Takto připravená zkumavka je centrifugována. Po centrifugaci se ustálí na rozhraní plazmy a vrstvicího roztoku bílý prsteneček lymfocytů. Ten je třeba odsát do připravené prázdné zkumavky a doplnit jej ředícím roztokem a opět stočit. Po druhé centrifugaci je supernatant odlit, sediment je roztřepán, doplněn ředícím roztokem a vložen do centrifugy. Poté je supernatant odstraněn, sediment naposledy roztřepán a resuspendován Hankovým roztokem tak, aby měla suspenze lymfocytů správnou hustotu.

Lymfocytotoxický test

Získaná suspenze lymfocytů je napipetována do jamek komerčně dodávaných mikrotitračních destiček a nechá se inkubovat v termostatu. Z lyofilizovaného králičího komplementu je připraven roztok, který je přidán do každé jamky. Mikrotitrační destička se opět nechá inkubovat. Po uplynutí předepsané doby je destička vyjmuta z termostatu, do jamek je přidán vodný roztok eozinu a buňky se nechají barvit. Přebytek barviva je oklepnut a jamky jsou překryty parafinovým olejem.

Hodnocení

Destičky jsou prohlíženy jamku po jamce pod mikroskopem. Při pozitivní reakci jsou buňky mrtvé. Naopak o negativní reakci hovoříme, pokud buňky zůstaly živé. Oproti pozitivní reakci jsou buňky větší a jakoby září. Pro hodnocení je použit skórovací systém, který vyjadřuje procento usmrcených buněk.

Tabulka č. 3 Skórovací systém pro hodnocení lymfocytotoxického testu

| Skóre | % usmrcených buněk | Interpretace |
|-------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 0–10 | negativní reakce |
| 2 | 11–20 | sporná negativní reakce |
| 4 | 21–50 | slabě pozitivní reakce |
| 6 | 51–80 | pozitivní reakce |
| 8 | 81–100 | silně pozitivní reakce |
| 0 | - | nehodnotitelné |

Zdroj: převzato z SOP č.II.3.8.1

7.1.4 Vyšetřovaný materiál

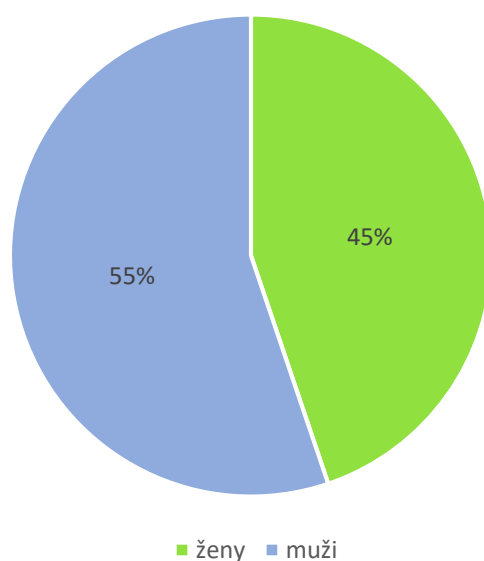
Pro vyšetření HLA I. a II. třídy pomocí PCR metody je používána nesrážlivá žilní krev ve zkumavce s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA činidlo). Sérologické určení HLA I. třídy se provádí z nesrážlivé žilní krve s příměsí heparinu.

7.1.5 Hodnocený soubor osob

Vyhodnocovaná data pocházejí od pacientů a jejich rodinných příslušníků, kteří byli typizováni v Laboratoři HLA systému a PCR diagnostiky na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2016. Celkově jsme do statistického hodnocení zahrnuli 154 pacientů před transplantací krvetvorných buněk (dále jen pacienti) a 157 jejich rodinných příslušníků (dále jen rodinní příslušníci). Nejčastěji se jednalo o sourozence, ve výjimečných případech byli typizováni bratrance a sestřenice, popřípadě děti pacientů.

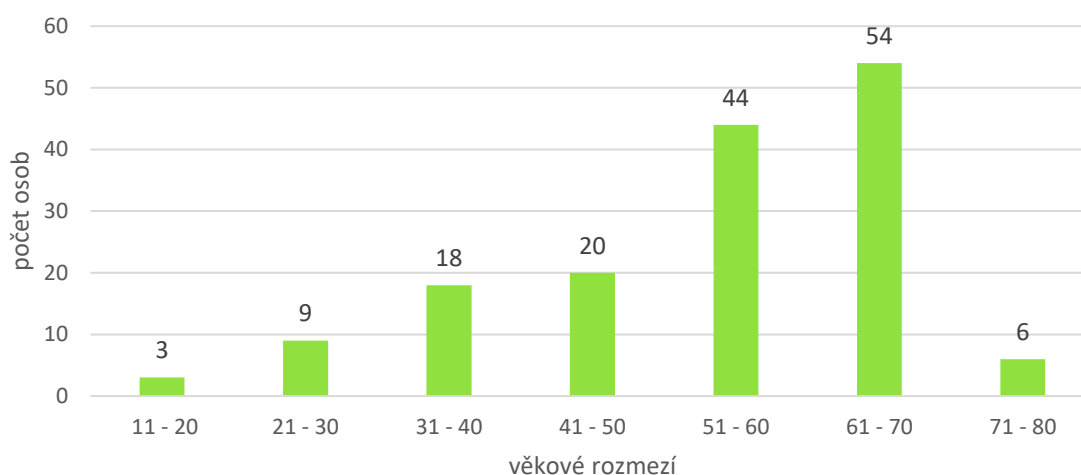
Mezi vyšetřovanými pacienty bylo 85 mužů a 69 žen. Jak můžeme vidět v grafu č. 1 mírnou převahu mezi pacienty mají muži.

Graf č. 1 Rozložení pohlaví ve skupině pacientů



Věkovou strukturu skupiny pacientů ukazuje graf č. 2. Pro zhodnocení jsme použili věk, kterého pacient dosáhl v roce, ve kterém bylo vyšetření provedeno. Počet osob spadajících do daného věkového rozmezí se postupně zvyšuje a dosahuje maxima ve věkovém rozmezí 61 až 70 let, do kterého spadá 54 osob. Následuje výrazný propad v počtu pacientů spadajících do věkového rozmezí 71 až 80 let.

Graf č. 2 Věková struktura osob ve skupině pacientů



Jednoznačně nejčastější diagnózou byla ve skupině pacientů akutní myeloidní leukémie. Touto nemocí trpěla přibližně třetina pacientů. Další diagnózy již nemají tak výrazné procentuální zastoupení. V posledním řádku tabulky č. 4 je uveden počet osob, jejichž diagnóza se ve skupině pacientů vyskytla méně než 4krát.

Tabulka č. 4 Nejčastější diagnózy ve vyšetřované skupině pacientů

| Diagnóza | Počet pacientů | Procentuální zastoupení |
|---|----------------|-------------------------|
| Akutní myeloidní leukémie | 52 | 33,77 % |
| Akutní lymfoblastická leukémie | 8 | 5,19 % |
| Akutní leukémie neurčeného buněčného typu | 7 | 4,55 % |
| Refrakterní anémie s přebytkem blastů | 7 | 4,55 % |
| Mnohočetný myelom | 7 | 4,55 % |
| Chronická myeloproliferativní nemoc | 6 | 3,90 % |
| Aplastická anémie NS | 4 | 2,60 % |
| Ostatní | 63 | 40,91 % |

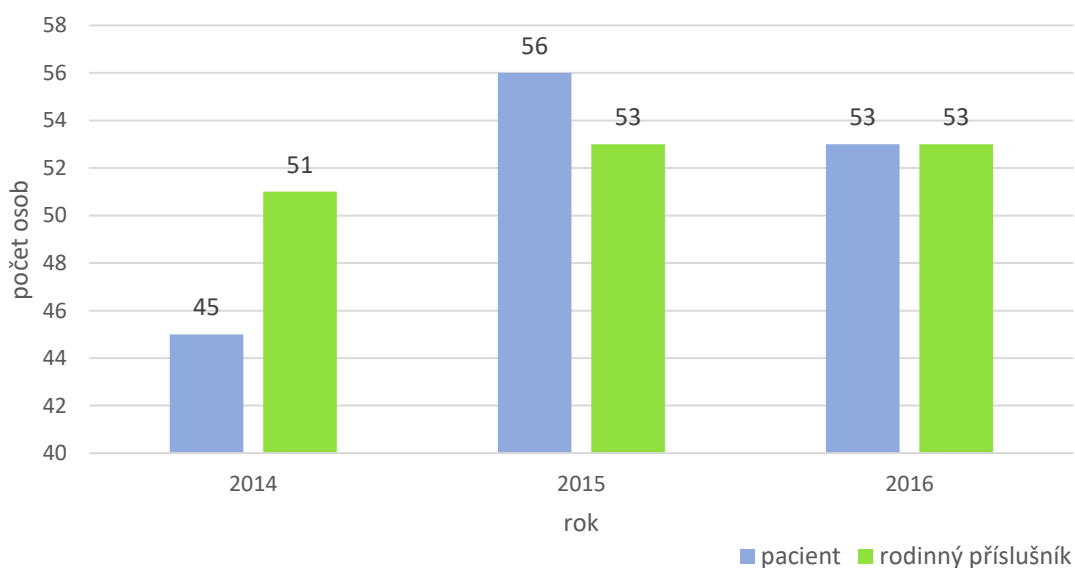
8. VÝSLEDKY

8.1 POČET VYŠETŘENÍ V JEDNOTLIVÝCH LETECH

V roce 2014 bylo vyšetřeno 45 pacientů a 51 rodinných příslušníků. V roce 2015 se počet typizovaných pacientů zvýšil na 56 pacientů a 53 rodinných příslušníků. V roce 2016 pak bylo vyšetřeno 53 pacientů i rodinných příslušníků (graf č. 3).

Vyšší nepoměr mezi počtem pacientů a rodinných příslušníků v roce 2014 je zapříčiněn vyšetřením sedmi rodinných příslušníků z širší rodiny u jednoho pacienta. V ostatních případech byli pro jednoho pacienta typizováni nejčastěji 1 až 3 rodinní příslušníci.

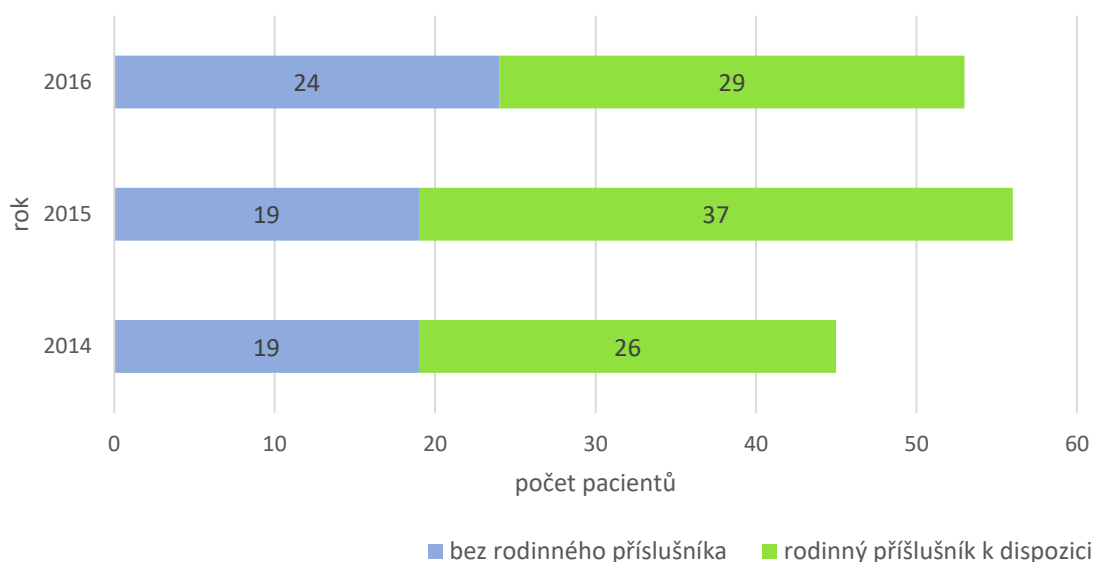
Graf č. 3 Počet HLA typizovaných pacientů a rodinných příslušníků v jednotlivých letech



8.2 POČET PACIENTŮ, KTEŘÍ MĚLI K DISPOZICI RODINNÉHO PŘÍSLUŠNÍKA

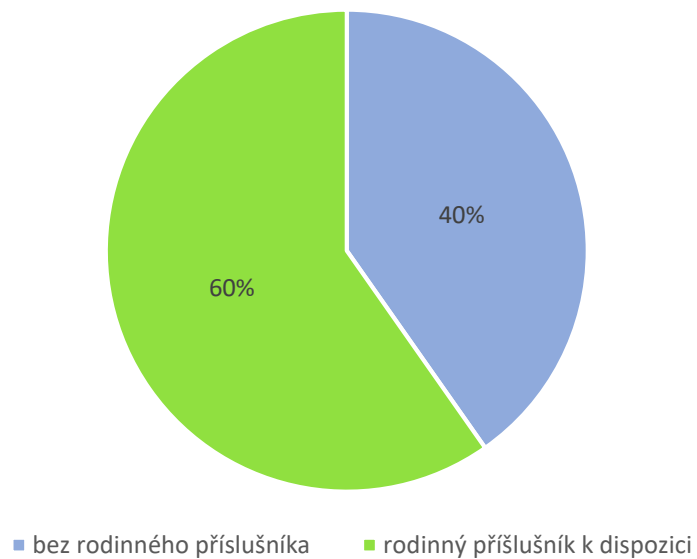
V grafu č. 4 vidíme poměr mezi pacienty, kteří měli v jednotlivých letech k dispozici alespoň jednoho rodinného příslušníka a pacienty, u kterých chyběl rodinný příslušník vhodný k typizaci. Nejčastěji byli typizováni bratři a sestry pacientů. Pouze u šesti pacientů byli do vyšetření zahrnuti i bratřanci a sestřenice, popřípadě dcery pacientů.

Graf č. 4 Počet pacientů s vyšetřovaným rodinným příslušníkem



Souhrnný údaj za všechny tři roky vyjadřuje graf č. 5. U 60 % pacientů bylo možné hledat potenciálního dárce mezi rodinnými příslušníky. Naopak u zbylých 40 % pacientů bylo při hledání vhodného dárce přistoupeno přímo k vyhledávání v registrech.

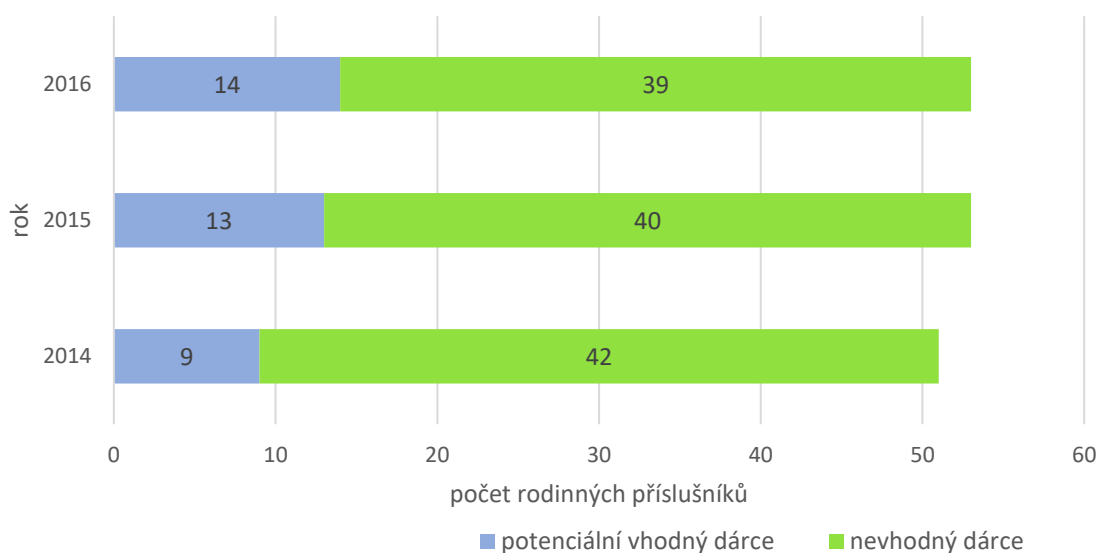
Graf č. 5 Poměr pacientů s rodinným příslušníkem k dispozici a bez rodinného příslušníka vhodného k typizaci



8.3 POČET POTENCIÁLNÍCH VHODNÝCH DÁRCŮ VE SKUPINĚ RODINNÝCH PŘÍSLUŠNÍKŮ

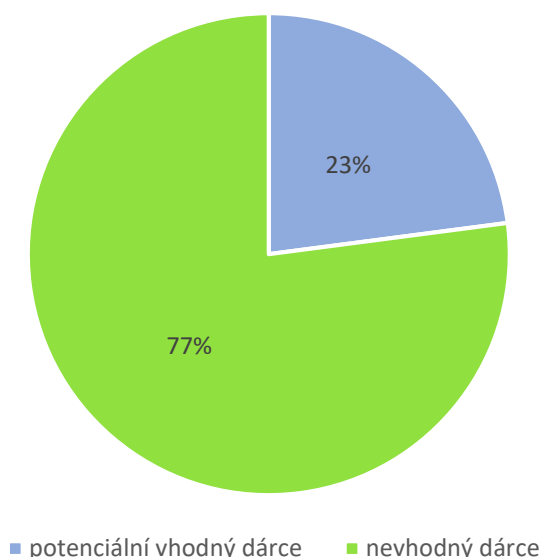
Celkem bylo v letech 2014–2016 vyšetřeno 157 rodinných příslušníků. Graf č. 6 zobrazuje, kolik z nich bylo v jednotlivých letech na základě HLA typizace označeno jako potenciální vhodný dárcce krvinek. U těchto osob byla prokázána shoda ve všech 6 vyšetřovaných HLA znacích.

Graf č. 6 Počet potenciálních vhodných dárců ve skupině vyšetřovaných rodinných příslušníků



Jak ukazuje graf č. 7, celkově bylo v letech 2014–2016 mezi rodinnými příslušníky nalezeno 23 % potenciálních vhodných dárců krvinek.

Graf č. 7 Poměr potenciálních vhodných dárců a nevhodných dárců z řad rodinných příslušníků



8.4 ZASTOUPENÍ HLA ZNAKŮ U PACIENTŮ

Tato kapitola obsahuje údaje o zastoupení HLA znaků v lokusech HLA-A, HLA-B a HLA-DRB1 u pacientů před transplantací krvinek. Data poskytnutá ČNRDD mají vzhledem k diverzitě HLA systému výpovědní hodnotu pro celou populaci ČR. Následující hodnocení proto bude vztahováno přímo k populaci ČR, se kterou budeme porovnávat frekvence HLA znaků ve skupině pacientů. K tomuto porovnání jsme využili intervalový odhad pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %. Frekvence HLA znaků uvedená v procentech je vztažena na celkový počet HLA znaků ve skupině pacientů. 154 osob ve skupině pacientů nese celkem 308 HLA znaků z každého lokusu.

8.4.1 Lokus HLA-A

Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-A znaků v populaci ČR je uvedena v tabulce č. 5. Pro toto hodnocení je v ČNRDD statisticky vždy vyhodnoceno cca 90 000 záznamů. V tabulce č. 6 je uvedeno všech 16 HLA-A znaků vyskytujících se u pacientů. Menší počet HLA-A znaků ve skupině pacientů je způsoben malou velikostí této hodnocené skupiny. Konkrétně chybí znaky HLA-A*69, HLA-A*34, HLA-A*80 a HLA-A*36, které mají nízkou frekvenci výskytu v populaci ČR.

Tabulka č. 5 Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-A znaků v populaci ČR

| HLA-A znak | frekvence výskytu |
|------------|-------------------|
| 02 | 28,665 % |
| 01 | 15,530 % |
| 03 | 13,969 % |
| 24 | 9,660 % |
| 11 | 5,348 % |
| 26 | 4,893 % |
| 25 | 3,989 % |
| 68 | 3,588 % |
| 32 | 3,181 % |
| 23 | 2,884 % |
| 30 | 2,244 % |
| 31 | 2,145 % |
| 29 | 1,968 % |
| 33 | 1,039 % |
| 66 | 0,726 % |
| 69 | 0,099 % |
| 34 | 0,035 % |
| 74 | 0,028 % |
| 80 | 0,005 % |
| 36 | 0,005 % |

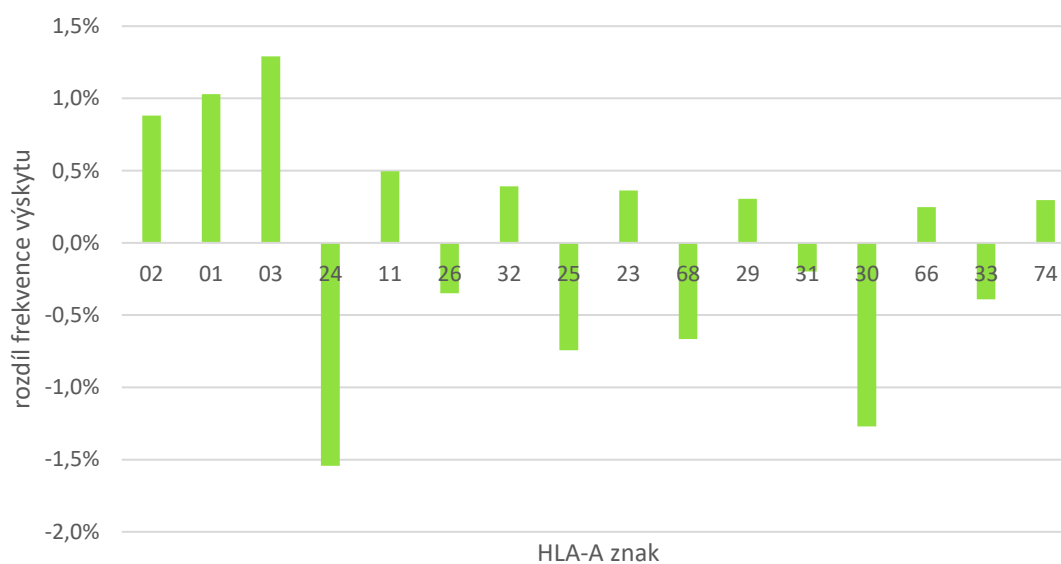
Tabulka č. 6 Frekvence výskytu HLA-A znaků ve skupině pacientů

| HLA-A znak | frekvence výskytu |
|------------|-------------------|
| 02 | 29,545 % |
| 01 | 16,558 % |
| 03 | 15,260 % |
| 24 | 8,117 % |
| 11 | 5,844 % |
| 26 | 4,545 % |
| 32 | 3,571 % |
| 25 | 3,247 % |
| 23 | 3,247 % |
| 68 | 2,922 % |
| 29 | 2,273 % |
| 31 | 1,948 % |
| 30 | 0,974 % |
| 66 | 0,974 % |
| 33 | 0,649 % |
| 74 | 0,325 % |

Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

Rozdíly v procentuálním zastoupení HLA-A znaků u pacientů v porovnání s populací ČR jsou uvedeny v grafu č. 8. Kladný rozdíl značí, že se daný znak vyskytuje častěji v souboru pacientů než v ČR, záporná hodnota rozdílu frekvence výskytu naopak znamená, že daný znak měl u pacientů nižší frekvenci výskytu. U žádného HLA-A znaku neležela hodnota frekvence výskytu mimo povolený interval určený intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %. Nebyl tedy prokázán významný rozdíl v zastoupení HLA-A znaků v populaci ČR a v hodnoceném souboru pacientů.

Graf č. 8 Rozdíly mezi frekvencí HLA-A znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR



8.4.2 Lokus HLA-B

Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-B znaků v ČR je uvedena v tabulce č. 7. Pro toto hodnocení je v ČNRDD statisticky vždy vyhodnoceno cca 90 000 záznamů. V tabulce č. 8 je uvedeno 22 nejčastějších HLA-B znaků v souboru pacientů. 22 HLA-B znaků uvádíme z důvodu stejné frekvence některých znaků ve skupině pacientů. Celkově bylo v souboru pacientů přítomno 27 různých HLA-B znaků. Mezi 22 nejčastějšími HLA-B znaky pacientů se vyskytly i ty, které v ČR nepatří mezi 20 nejčastějších HLA-B znaků. Jedná se o znaky HLA-B*56, HLA-B*58 a HLA-B*73.

Tabulka č. 7 Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-B znaků v populaci ČR

| HLA-B znak | frekvence výskytu |
|------------|-------------------|
| 07 | 12,084 % |
| 44 | 11,708 % |
| 35 | 10,030 % |
| 08 | 9,746 % |
| 15 | 6,800 % |
| 18 | 6,630 % |
| 40 | 5,555 % |
| 51 | 5,360 % |
| 13 | 5,078 % |
| 27 | 5,021 % |
| 38 | 3,774 % |
| 57 | 3,456 % |
| 14 | 1,993 % |
| 39 | 1,942 % |
| 49 | 1,692 % |
| 41 | 1,465 % |
| 37 | 1,233 % |
| 52 | 1,166 % |
| 50 | 1,149 % |
| 55 | 1,116 % |

Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

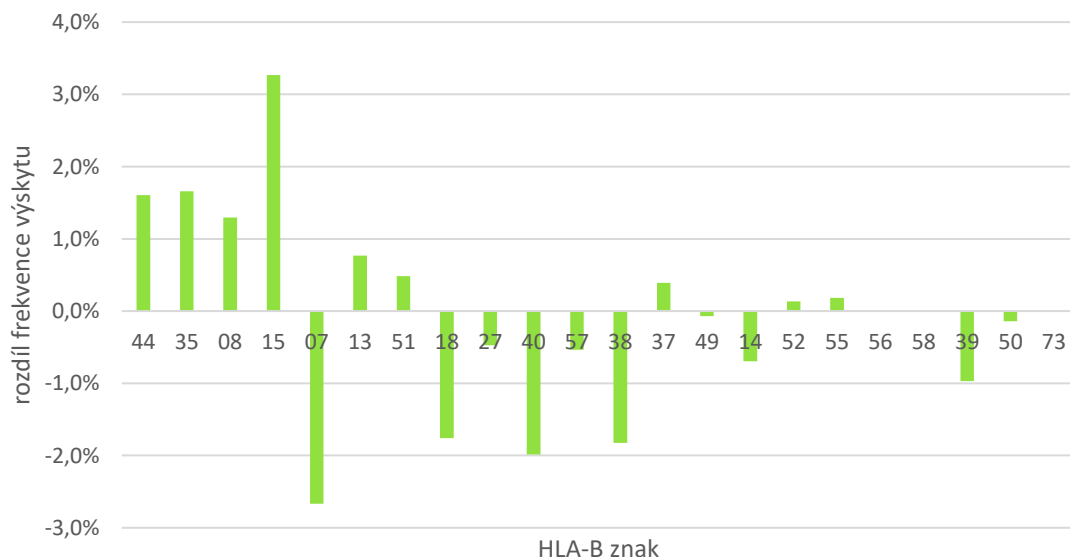
Tabulka č. 8 Frekvence výskytu 22 nejčastějších HLA-B znaků ve skupině pacientů

| HLA-B znak | frekvence výskytu |
|------------|-------------------|
| 44 | 13,312 % |
| 35 | 11,688 % |
| 08 | 11,039 % |
| 15 | 10,065 % |
| 07 | 9,416 % |
| 13 | 5,844 % |
| 51 | 5,844 % |
| 18 | 4,870 % |
| 27 | 4,545 % |
| 40 | 3,571 % |
| 57 | 2,922 % |
| 38 | 1,948 % |
| 37 | 1,623 % |
| 49 | 1,623 % |
| 14 | 1,299 % |
| 52 | 1,299 % |
| 55 | 1,299 % |
| 56 | 1,299 % |
| 58 | 0,974 % |
| 39 | 0,974 % |
| 50 | 0,974 % |
| 73 | 0,974 % |

Rozdíly v procentuálním zastoupení HLA-B znaků u pacientů v porovnání s populací ČR jsou uvedeny v grafu č. 9. Kladný rozdíl značí, že se daný znak vyskytuje častěji ve skupině pacientů než v populaci ČR. Záporná hodnota rozdílu výskytu naopak znamená, že daný znak měl ve skupině pacientů nižší frekvenci výskytu. Znaky HLA-B*56, HLA-B*58 a HLA-B*73 mají nulovou hodnotu rozdílu frekvence výskytu, protože jejich hodnotu nebylo možné porovnat s frekvencí v populaci ČR, neboť nám ČNRDD neposkytl údaje o více než 20 nejčastějších HLA-B znacích.

Rozdíly ve frekvenci výskytu HLA-B znaků ve skupině pacientů a v populaci ČR nepřesahují $\pm 3\%$ s výjimkou znaku HLA-B*15, který se vyskytoval o více než 3 % častěji. Frekvence výskytu HLA-B*15 v populaci ČR (6,800 %) leží mimo povolený interval 6,942 % – 13,982 % kolem hodnoty 10,065 %. Tento interval byl určen intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %. Znak HLA-B*15 se tedy vyskytuje ve skupině pacientů s významně vyšší frekvencí. Hodnoty frekvence výskytu ostatních HLA-B znaků neleží mimo povolený interval určený intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %.

Graf č. 9 Rozdíly mezi frekvencí HLA-B znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR



8.4.3 Lokus HLA-DRB1

V tabulce č. 9 jsou uvedeny frekvence výskytu všech 13 HLA-DRB1 znaků, které se vyskytují v populaci ČR. Pro toto hodnocení je v ČNRDD statisticky vyhodnoceno vždy cca 135 000 záznamů. V souboru pacientů byly zastoupeny všechny HLA-DRB1 běžné pro populaci ČR a jejich frekvence výskytu je uvedena v tabulce č. 10.

Tabulka č. 9 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků v populaci ČR

| HLA-DRB1 znak | Frekvence výskytu |
|---------------|-------------------|
| 07 | 14,875 % |
| 11 | 13,744 % |
| 15 | 13,568 % |
| 13 | 12,996 % |
| 04 | 11,011 % |
| 03 | 10,271 % |
| 01 | 9,897 % |
| 16 | 4,073 % |
| 08 | 3,129 % |
| 14 | 2,747 % |
| 12 | 1,959 % |
| 10 | 0,918 % |
| 09 | 0,811 % |

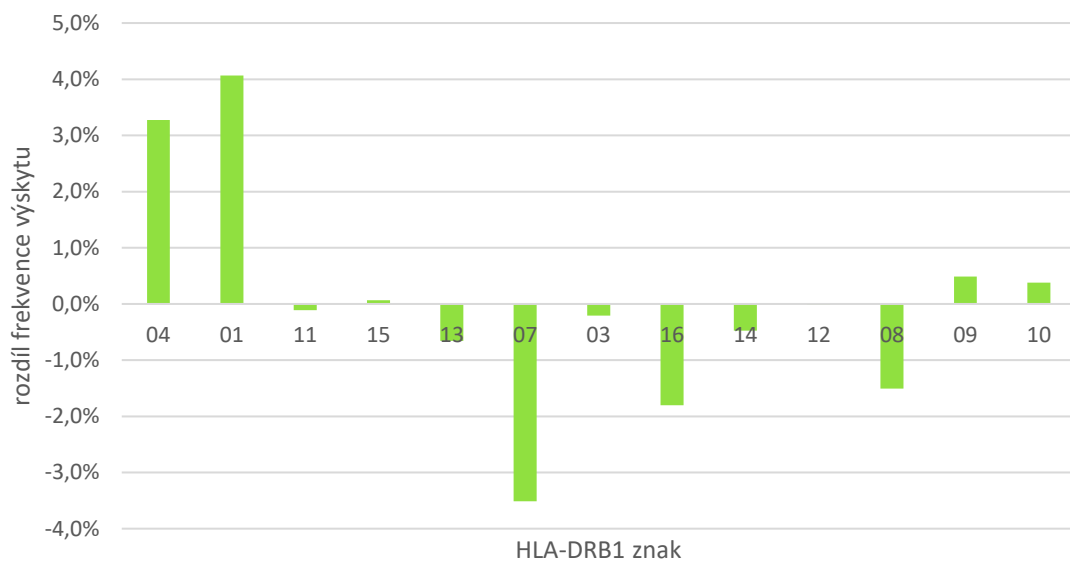
Tabulka č. 10 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků ve skupině pacientů

| HLA-DRB1 znak | frekvence výskytu |
|---------------|-------------------|
| 04 | 14,286 % |
| 01 | 13,961 % |
| 11 | 13,636 % |
| 15 | 13,636 % |
| 13 | 12,338 % |
| 07 | 11,364 % |
| 03 | 10,065 % |
| 16 | 2,273 % |
| 14 | 2,273 % |
| 12 | 1,948 % |
| 08 | 1,623 % |
| 09 | 1,299 % |
| 10 | 1,299 % |

Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

Rozdíly v procentuálním zastoupení HLA-DRB1 znaků u pacientů v porovnání s populací ČR jsou uvedeny v grafu č. 10. Kladný rozdíl značí, že se daný znak vyskytuje častěji v souboru pacientů než v populaci ČR, záporná hodnota rozdílu výskytu naopak znamená, že daný znak měl u pacientů nižší frekvenci výskytu. Frekvence výskytu HLA-DRB1*01 v populaci ČR (9,897 %) leží mimo povolený interval 10,291 % – 18,341 % kolem hodnoty 13,961 %. Tento interval byl určen intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %. Znak HLA-DRB1*01 se ve skupině pacientů vyskytuje významně častěji. Hodnoty frekvence výskytu ostatních HLA-DRB1 znaků neleží mimo povolený interval určený intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %.

Graf č. 10 Rozdíly mezi frekvencí HLA-DRB1 znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR



8.5 ZASTOUPENÍ FENOTYPŮ HLA-A, HLA-B A HLA-DRB1 U PACIENTŮ

Dalším cílem mé bakalářské práce bylo ověřit, zda neexistuje souvislost mezi HLA fenotypem pacientů a některou z hematologických malignit. V tabulce č. 11 je uvedeno 10 nejčastějších fenotypů v populaci ČR. Pro toto hodnocení je v ČNRDD statisticky vždy vyhodnoceno cca 45 000 záznamů.

Tabulka č. 11 Nejčastější fenotypy v populaci ČR

| HLA-A | | HLA-B | | HLA-DRB1 | | frekvence výskytu |
|-------|----|-------|----|----------|----|-------------------|
| 01 | 01 | 08 | 08 | 03 | 03 | 0,360 % |
| 01 | 03 | 07 | 08 | 03 | 15 | 0,309 % |
| 01 | 02 | 07 | 08 | 03 | 15 | 0,213 % |
| 01 | 02 | 08 | 44 | 03 | 04 | 0,173 % |
| 01 | 02 | 08 | 13 | 03 | 07 | 0,161 % |
| 01 | 03 | 08 | 35 | 01 | 03 | 0,159 % |
| 01 | 23 | 08 | 44 | 03 | 07 | 0,152 % |
| 01 | 01 | 08 | 57 | 03 | 07 | 0,150 % |
| 01 | 02 | 08 | 18 | 03 | 11 | 0,124 % |
| 01 | 25 | 08 | 18 | 03 | 15 | 0,119 % |

Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

Jak vidíme, frekvence jednotlivých fenotypů jsou v populaci ČR velmi malé. Není proto překvapující, že v souboru pacientů se nevyskytoval žádný fenotyp dvakrát. Po vyhodnocení jsme získali 154 odlišných fenotypů, a proto zde neuvádíme tabulku nejčastějších fenotypů.

8.6 ZASTOUPENÍ HLA-DRB1 ZNAKŮ U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ

Na závěr jsme provedli vyhodnocení zastoupení HLA-DRB1 znaků pouze u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Frekvence HLA znaků uvedená v procentech je vztažena na celkový počet HLA znaků ve skupině pacientů trpících AML. 52 osob ve skupině pacientů s AML nese celkem 104 HLA znaků z každého lokusu. Pro přehlednost znovu uvádíme tabulku č. 9 s frekvencí výskytu HLA-DRB1 znaků v populaci ČR. Frekvenci výskytu HLA-DRB1 znaků ve skupině pacientů trpících AML uvádí tabulka č. 12. Mezi HLA-DRB1 znaky pacientů trpících AML chyběl znak HLA-DRB1*08. Pravděpodobně to bylo způsobeno zmenšením vyhodnocované skupiny osob.

Tabulka č. 9 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků v České republice

| HLA-DRB1 znak | frekvence výskytu |
|---------------|-------------------|
| 07 | 14,875 % |
| 11 | 13,744 % |
| 15 | 13,568 % |
| 13 | 12,996 % |
| 04 | 11,011 % |
| 03 | 10,271 % |
| 01 | 9,897 % |
| 16 | 4,073 % |
| 08 | 3,129 % |
| 14 | 2,747 % |
| 12 | 1,959 % |
| 10 | 0,918 % |
| 09 | 0,811 % |

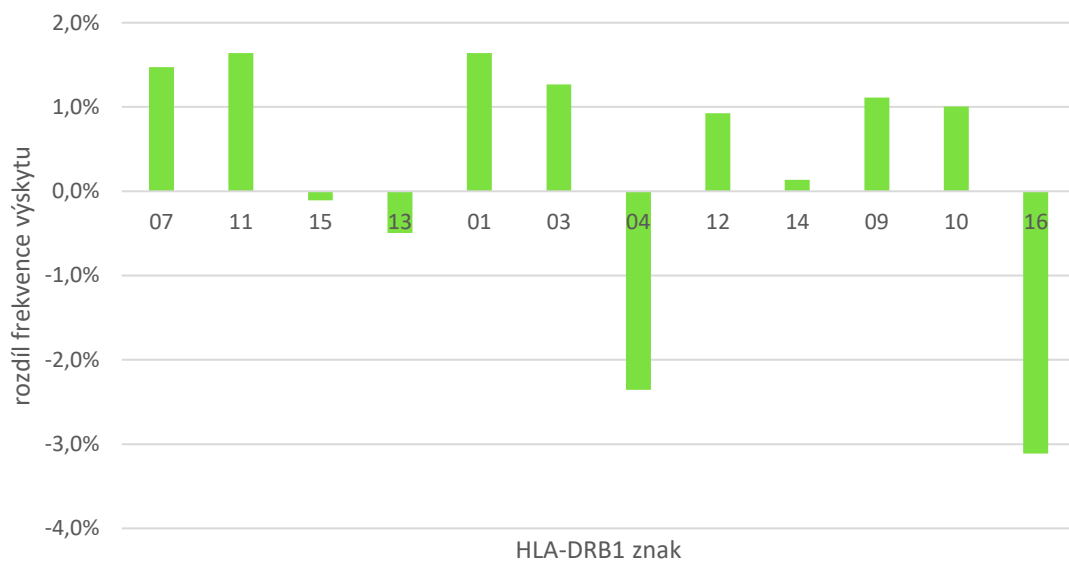
Zdroj: Data byla pro účely bakalářské práce poskytnuta ČNRDD

Tabulka č. 12 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků u pacientů s akutní myeloidní leukémií

| HLA-DRB1 znak | frekvence výskytu |
|---------------|-------------------|
| 07 | 16,346 % |
| 11 | 15,385 % |
| 15 | 13,462 % |
| 13 | 12,500 % |
| 01 | 11,538 % |
| 03 | 11,538 % |
| 04 | 8,654 % |
| 12 | 2,885 % |
| 14 | 2,885 % |
| 09 | 1,923 % |
| 10 | 1,923 % |
| 16 | 0,962 % |

Rozdíly v procentuálním zastoupení HLA-DRB1 znaků u pacientů s AML v porovnání s populací ČR jsou uvedeny v grafu č. 11. Kladný rozdíl značí, že se daný znak vyskytuje častěji v souboru pacientů s AML než v populaci ČR, záporná hodnota rozdílu frekvence výskytu naopak znamená, že daný znak měl u pacientů trpících AML nižší frekvenci výskytu. Znaky HLA-DRB1*04 a HLA-DRB1*16 jako jediné překročily hranici -2 %. Rozdíly ve frekvenci zastoupení ostatních znaků se pohybovaly v rozmezí ± 2 %. Vzhledem k malé velikosti této hodnocené skupiny nepřekročila žádná hodnota frekvence výskytu HLA-DRB1 znaku v ČR povolený interval určený intervalovým odhadem pravděpodobnosti se spolehlivostí 95 %. Nebyl tedy prokázán významný rozdíl ve frekvenci výskytu HLA-DRB1 znaků v populaci ČR a ve skupině pacientů s akutní myeloidní leukémií.

Graf č. 11 Rozdíly mezi frekvencí HLA-DRB1 znaku u skupiny pacientů s akutní myeloidní leukémií a populací ČR



9. DISKUSE

Počet typizovaných rodinných příslušníků se mezi jednotlivými lety příliš neměnil, ve všech letech se pohyboval mírně nad počtem 50 osob. U pacientů můžeme pozorovat skok mezi roky 2014 a 2015, kdy se počet typizovaných pacientů zvýšil z 45 na 56. Z tohoto vzestupu však nemůžeme vyvodit žádný závěr, neboť v roce 2016 poklesl počet typizovaných pacientů na 53. Abychom mohli určit trend, s jakým se vyvíjejí počty vyšetřovaných pacientů a rodinných příslušníků, museli bychom mít k dispozici data z více let.

Během let 2014–2016 mělo celkem 92 pacientů z celkového počtu 154 k dispozici alespoň jednoho rodinného příslušníka vhodného k typizaci. Nejčastěji se jednalo o bratra či sestru. Fakt, že převažují pacienti s rodinným příslušníkem vhodným k typizaci, hodnotíme kladně, neboť obecně zvyšuje pravděpodobnost nalezení vhodného dárce krvevorných buněk pro pacienta.

Dále jsme se zaměřili pouze na skupinu rodinných příslušníků. Zjistili jsme, že ze 157 jich bylo jako potenciální vhodný dárce označeno pouze 36 (23 % z celkového počtu). Ve všech případech se jednalo buď o bratra nebo sestru pacienta. Ve třech případech byli pro jednoho pacienta mezi rodinnými příslušníky nalezeni dva potenciální vhodní dárce. Naopak v několika případech nastala situace, že pacientovi sourozenci měli shodné HLA znaky mezi sebou, ale od pacientových se lišily. Přestože jsou v naší skupině rodinných příslušníků zahrnuti i jiní rodinní příslušníci než sourozenci, můžeme potvrdit, že šance na nalezení vhodného dárce mezi sourozenci je přibližně 1:4.

Vyhodnocení zastoupení HLA znaků ve skupině pacientů jsme provedli nejdříve v lokusu HLA-A. V tomto lokusu se u pacientů vyskytovalo 16 HLA-A znaků. Menší počet HLA-A znaků oproti populaci ČR je způsoben malou velikostí této hodnocené skupiny. Konkrétně chyběly znaky HLA-A*69, HLA-A*34, HLA-A*80 a HLA-A*36, které mají nízkou frekvenci výskytu v populaci ČR. V hodnoceném souboru pacientů i v populaci ČR je nejčastější znak HLA-A*02. Stejně tak i rozložení ostatních znaků ve skupině pacientů se výrazně neliší od rozložení znaků v populaci ČR. Neodhalili jsme tedy žádný vztah mezi znaky lokusu HLA-A a indikací pro transplantaci krvevorných buněk.

V lokusu HLA-B jsme pozorovali vyšší odchylky mezi pacienty a populací ČR, než tomu bylo v případě lokusu HLA-A. Nejčastějším znakem v hodnocené skupině pacientů byl znak HLA-B*44, který je v populaci ČR druhým nejčastějším. Celkově bylo v souboru pacientů přítomno 27 různých HLA-B znaků. Významně vyšší byla frekvence výskytu znaku HLA-B*15. Zvýšený výskyt u pacientů před transplantací krevetvorných buněk by mohl mít jistý význam a naznačovat možnou asociaci daného znaku s hematologickými malignitami. Pro potvrzení této hypotézy by bylo nutné provést vyhodnocení HLA-B znaků u většího počtu pacientů.

V případě lokusu HLA-DRB1 se u pacientů vyskytovaly všechny znaky jako v populaci ČR. V hodnocené skupině pacientů se nejčastěji vyskytoval znak HLA-DRB1*04, který je v populaci ČR až pátý nejčastější. Nejzásadnější je prokazatelně vyšší frekvence výskytu znaku HLA-DRB1*01 ve skupině pacientů. Mohl by to tak být další důkaz, že existuje asociace mezi znakem HLA-DRB1*01 a hematologickými malignitami (Alcoceba a kol., 2013). Ovšem vzhledem k malé velikosti skupiny pacientů je třeba tuto hypotézu ověřit na větším počtu osob.

Porovnání frekvence jednotlivých HLA fenotypů nebylo možné provést, protože skupina pacientů nebyla dostatečně velká, aby se v ní některý fenotyp mohl opakovat. V tomto ohledu jsme tedy nebyli úspěšní.

Jako poslední jsme provedli vyhodnocení HLA-DRB1 znaků u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Vzhledem k opravdu malé velikosti této skupiny se nepodařilo prokázat žádný významný vztah mezi HLA-DRB1 znaky a výskytem akutní myeloidní leukémie. Znak HLA-DRB1*01 se zde nevyskytoval tak často, jako ve skupině pacientů (5. nejčastější s frekvencí 11,538 % vs. 2. nejčastější s frekvencí 13,961 %)

Závěrem bych chtěla dodat, že v celé práci jsme se při vyhodnocování záměrně vyhnuli termínu „statisticky významné“, neboť intervalový odhad pravděpodobnosti nemá za úkol potvrdit určitou statistickou hypotézu, ale pouze s jistou spolehlivostí vymezuje interval, ve kterém může ležet daná hodnota.

10. ZÁVĚR

V letech 2014–2016 byla v Laboratoři HLA systému a PCR diagnostiky na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové provedena sérologická či PCR typizace celkem 311 osob. Jednalo se o 154 pacientů před transplantací krvetvorných buněk a 157 jejich rodinných příslušníků. Ve skupině pacientů bylo 85 mužů a 69 žen. Nejvíce osob se nacházelo ve věkovém rozmezí 61–70 let. Nejčastější diagnózou byla akutní myeloidní leukémie.

Rodinná studie byla provedena u 92 pacientů (60 % z celkového počtu pacientů). Mezi rodinnými příslušníky bylo nalezeno 36 potenciálních vhodných dárců (23 % z celkového počtu typizovaných rodinných příslušníků).

Porovnání HLA znaků u pacientů před transplantací krvetvorných buněk s populací České republiky jsme provedli v lokusech HLA-A, HLA-B a HLA-DRB1. V lokusu HLA-A se u pacientů nevyskytoval žádný znak významně častěji. V lokusu HLA-B byl vyšší výskyt znaku HLA-B*15 (10,065 % vs. 6,800 %). Častější byl i znak HLA-DRB1*01 (13,961 % vs. 9,897 %).

Vyhodnocení HLA fenotypů pacientů nebylo možné provést, protože v hodnoceném souboru pacientů se žádný fenotyp neopakoval.

U pacientů s akutní myeloidní leukémií nebyl prokázán žádný vztah mezi znaky v HLA-DRB1 lokusu a nemocí.

11. SEZNAM TABULEK

| | |
|--|-------|
| Tabulka č. 1 Frekvence výskytu nejčastějších HLA znaků I. a II. třídy v České republice | 13 |
| Tabulka č. 2 Předpokládané nejčastější haplotypy v České republice..... | 14 |
| Tabulka č. 3 Skórovací systém pro hodnocení lymfocytotoxického testu | 26 |
| Tabulka č. 4 Nejčastější diagnózy ve vyšetřované skupině pacientů | 28 |
| Tabulka č. 5 Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-A znaků v populaci ČR..... | 34 |
| Tabulka č. 6 Frekvence výskytu HLA-A znaků ve skupině pacientů | 34 |
| Tabulka č. 7 Frekvence výskytu 20 nejčastějších HLA-B znaků v populaci ČR | 36 |
| Tabulka č. 8 Frekvence výskytu 22 nejčastějších HLA-B znaků ve skupině pacientů | 36,41 |
| Tabulka č. 9 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků v populaci ČR..... | 38 |
| Tabulka č. 10 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků ve skupině pacientů | 38 |
| Tabulka č. 11 Nejčastější fenotypy v populaci ČR..... | 40 |
| Tabulka č. 12 Frekvence výskytu HLA-DRB1 znaků u pacientů s akutní myeloidní leukémií | 41 |

12. SEZNAM GRAFŮ

| | |
|--|----|
| Graf č. 1 Rozložení pohlaví ve skupině pacientů | 27 |
| Graf č. 2 Věková struktura osob ve skupině pacientů | 28 |
| Graf č. 3 Počet HLA typizovaných pacientů a rodinných příslušníků v jednotlivých letech | 29 |
| Graf č. 4 Počet pacientů s vyšetřovaným rodinným příslušníkem | 30 |
| Graf č. 5 Poměr pacientů s rodinným příslušníkem k dispozici a bez rodinného příslušníka vhodného k typizaci | 31 |
| Graf č. 6 Počet potenciálních vhodných dárců ve skupině vyšetřovaných rodinných příslušníků | 32 |
| Graf č. 7 Poměr potenciálních vhodných dárců a nevhodných dárců z řad rodinných příslušníků | 33 |
| Graf č. 8 Rozdíly mezi frekvencí HLA-A znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR..... | 35 |
| Graf č. 9 Rozdíly mezi frekvencí HLA-B znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR..... | 37 |
| Graf č. 10 Rozdíly mezi frekvencí HLA-DRB1 znaku ve skupině pacientů a v populaci ČR | 39 |
| Graf č. 11 Rozdíly mezi frekvencí HLA-DRB1 znaku u skupiny pacientů s akutní myeloidní leukémií a populací ČR..... | 42 |

13. POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A. a kol.: Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1999, s. 332–335. ISBN 80-902906-0-4.

ALCOCEBA, M., SEBASTIAN, E., MARIN, L. a kol.: HLA specificities are related to development and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* [online]. 2013, 122(8), 1448-1454 [cit. 16. 2. 2017]. DOI: 10.1182/blood-2013-02-483420. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-02-483420>

FUNG, M. K. a BENSON, K.: Using HLA typing to support patients with cancer. *Cancer Control* [online]. 2015, 22(1), 79-86. [cit. 27. 2. 2017] Dostupné z: <https://moffitt.org/File%20Library/Main%20Nav/Research%20and%20Clinical%20Trials/Cancer%20Control%20Journal/v22n1/79.pdf>

HILLYER, Ch., SILBERSTEIN, L., NESS, P. a kol.: Blood banking and transfusion medicine: Basic principles & practice. 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier, 2007, s. 129, 131, 134. ISBN 978-0-443-06981-9.

HLA ALLELES NUMBERS. HLA Numbers @ hla.alleles.org [online]. [cit. 30. 4. 2017]. Dostupné z: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T. a kol.: Základy imunologie. 5. vyd. Praha: Triton, 2013, s. 72, 74, 205. ISBN 978-80-7387-713-2.

INDRÁK, K., (ed.) a kol.: Hematologie a transfuzní lékařství. Lékařské repetitorium. Praha: Triton, 2014, s. 116–119, 404–415. ISBN 978-80-7387-722-4.

JÍLEK, P.: Základy imunologie. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008, s. 28–33. ISBN 978-80-254-2422-3.

JURIC, M. K., GHIMIRE, S., OGONEK, J. a kol.: Milestones of hematopoietic stem cell transplantation – from first human studies to current developments. *Frontiers in Immunology* [online]. 2016, 7, - [cit. 18. 2. 2017]. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00470. ISSN 1664-3224.

Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00470/full>

KAYMAN KÜREKÇI, G. a DINCER, P.: Next-Generation DNA Sequencing Technologies. *Erciyes Tıp Dergisi/Erciyes Medical Journal* [online]. 2014, 36(3), 99-103 [cit. 1. 3. 2017]. DOI: 10.5152/etd.2014.7803. ISSN 1300199x. Dostupné z: <http://erciyesmedj.com/eng/makale/3253/246/Full-Text>

KREJSEK, J. a KOPECKÝ, O.: *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, s. 123–129, 133–138, 703–705. ISBN 80-86225-50-X.

LEE, S. J., KLEIN, J., HAAGENSON, M. a kol.: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* [online]. 2007, 110(13), 4576-4583 [cit. 22. 2. 2017]. DOI: 10.1182/blood-2007-06-097386. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-06-097386>

MURPHY, M. F., PAMPHILON, D. H. a HEDDLE, N. M.: *Practical transfusion medicine*. 4th ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2013, s. 33–34. ISBN 978-0-470-67051-4.

NOWAK, J.: Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2008, 42, S71–S76; [cit. 22. 2. 2017] DOI:10.1038/bmt.2008.288. ISSN: 0268-3369. Dostupné z: <http://www.nature.com/bmt/journal/v42/n2s/full/bmt2008288a.html>

NUNES, E., HESLOP, H., FERNANDEZ-VINA, M. a kol.: Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood* [online]. 2011, 118(23), e180-e183 [cit. 5. 3. 2017]. DOI: 10.1182/blood-2011-05-353490. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-05-353490>

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. a kol.: *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012, s. 70, 71, 78, 79, 86. ISBN 978-80-247-3460-6.

PETERSEN, S. L.: Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. *Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning*, *Danish Medical Bulletin* [online]. 2007, 54(2), 112-3; [cit. 25. 2. 2017]. Abstrakt databáze PubMed

ŘEHÁČEK, V., MASOPUST, J. a kol.: *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013, s.180–189. ISBN 978-80-247-4534-3.

SINGH, S. K., LUPO, P. J., SCHEURER, M. E. a kol.: A childhood acute lymphoblastic leukemia genome-wide association study identifies novel sex-specific risk variants. *Medicine* [online]. 2016, 95(46), e5300-. [cit. 16. 2. 2017]. DOI: 10.1097/MD.0000000000005300. ISSN 0025-7974. Abstrakt databáze PubMed

SYNKOVÁ, K.: Typizace genů HLA systému metodou PCR SSP SOP č.II.3.8.21. Hradec Králové, 2016.

SYNKOVÁ, K.: Sérologická typizace HLA antigenů I. třídy SOP č.II.3.8.1. Hradec Králové, 2015.

TAYLOR, G. M., DEARDEN, S., PAYNE N. a kol.: Evidence that an HLA-DQA1-DQB1 haplotype influences susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia in boys provides further support for an infection-related aetiology. *British Journal of Cancer* [online]. 1998, 78(5), 561–565 [cit. 16. 2. 2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063058/?page=1>

TIE, R., ZHANG, T., YANG, B. a kol.: Clinical implications of HLA locus mismatching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation: a meta-analysis. *Oncotarget* [online] 2017, 8, 27645-27660; [cit. 25. 2. 2017]. DOI: 10.18632/oncotarget.15291. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/abstract/15291>

TIERCY, J.-M.: How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica* [online]. 2016, 101(6), 680-687 [cit. 22. 2. 2017]. DOI: 10.3324/haematol.2015.141119. ISSN 0390-6078. Dostupné z: <http://www.haematologica.org/content/101/6/680>