

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Genetické markery pro sledování  
posttransplatačního chimerismu**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Bc. Michaela Řehouňková

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 11. 5. 2017

.....

## Poděkování

Velmi ráda bych chtěla poděkovat na prvním místě svému školiteli, doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D., za veškerý věnovaný čas, odborné vedení, cenné rady, připomínky, a hlavně za velmi milou atmosféru při zpracovávání této práce. Velké díky právem patří i mé rodině a partnerovi za projevenou podporu a trpělivost po celou dobu studia. Dále bych ráda poděkovala i pracovnímu kolektivu úseku molekulární biologie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN v Hradci Králové za vstřícný přístup při zpracování praktické části diplomové práce.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Michaela Řehouňková

Školitel: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Název diplomové práce: Genetické markery pro sledování posttransplantačního chimerismu

Cíle práce: Zpracování dat pacientů, kteří prodělali alogenní transplantaci krvetvorných buněk v letech 2010 až 2014 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a jejich chimerismus byl sledován na Úseku molekulární biologie v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky. Po zpracování dat se studoval možný vztah mezi vybranými klinickými parametry a použitými genetickými markery k vyšetření chimerismu. Na závěr se zhodnotily vlivy vybraných parametrů na úspěšnost léčby a úmrtnost v potransplantačním období.

Metody: Pro vyšetření potransplantačního chimerismu byla použita metoda vyšetření lokusů krátkých tandemových repetitiv (STR), která využívá genetické variability mezi dárce a příjemcem transplantovaného štěpu. DNA dárce a příjemce je izolována pomocí kolonkové soupravy QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, SRN), k amplifikaci se využívá souprava AmpFlSTR Identifier Kit (Applied Biosystems, USA) a k separaci kapilární elektroforéza (analyzátor ABI 3130-4, Applied Biosystems, USA)

Závěr: Mezi nejinformativnější patřily markery D21S11, D2S1338, TH01, FGA a D3S1358, které jsou natolik informativní, že při jejich paralelní analýze lze najít pro každého pacienta ze souboru minimálně jeden informativní a zároveň vhodný (IV) genetický marker k analýze chimerismu. Páry se shodou 10 z 10 znaků v HLA systému a příbuzenské páry mají významně méně IV markerů. Jako negativní prognostický faktor z hlediska úspěšnosti léčby a úmrtnosti byl prokázán vyšší věk a diagnostikovaná chronická lymfatická leukémie.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Michaela Řehouňková

Supervisor: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Genetic markers for monitoring post-transplant chimerism

The aims of the thesis: Data processing of patients, who underwent allogenic hematopoietic stem cell transplantation in a period from 2010 to 2014 in University Hospital Hradec Kralove and whose state of chimerism was monitored at the Section of Molecular Biology at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics. Consequently, analysis of the possible relationship between selected clinical parameters and used genetic markers for chimerism quantification was carried out after the processing of acquired data. Finally, the possible influence of treatment success and mortality by chosen clinical parameters was evaluated.

Methods: Analysis of short tandem repeat loci, which uses genetic variability between donor and recipient of transplanted graft, was employed for quantification of post-transplant chimerism. DNA of donor and recipient was isolated by QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany), amplified by AmpFISTR Identifier Kit (Applied Biosystems, USA) and separated by capillary electrophoresis (analyzer ABI 3130-4, Applied Biosystems, USA).

Conclusion: Markers D21S11, D2S1338, THO1, FGA a D3S1358 were among the most informative ones. Proceeded parallelly, they were sufficient for finding at least one informative and useful marker for chimerism quantification in the patients from the analyzed group. Transplantation couples with the 10/10 antigens in HLA system had statistically less useful markers, as well as the relational couples. Higher age and diagnosis of chronic lymphatic leukemia were proven as a negative prognostic factor for treatment success and post-transplant mortality.

Klíčová slova: DNA, chimerismus, PCR, fragmentační analýza

Key words: DNA, chimerism, PCR, fragmentation analysis

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část .....	9
2.1. DNA.....	9
2.1.1. DNA - její struktura, výskyt a množství .....	9
2.1.2. Nejběžnější extrakční postupy získání DNA z tkání a tělesných tekutin.....	12
2.1.3. Kvantifikace extrahované DNA – metody, jejich principy.....	15
2.1.4. Stabilita DNA při jejím uchovávání v extraktech .....	17
2.2. Transplantace krvetvorných buněk .....	19
2.2.1. Krvetvorné buňky, hematopoéza.....	19
2.2.1. Princip a dělení transplantací krvetvorných buněk .....	20
2.2.2. Důvody transplantace KB .....	22
2.2.3. Úspěšnost a rizika transplantací .....	24
2.3. Laboratorní vyšetření buněčného chimerismu .....	26
2.3.1. Definice pojmů kompletní a smíšený chimerismus .....	26
2.3.2. Vyšetřovací metody při analýze chimerismu .....	27
2.3.4. Studie genetické variability použitých STR lokusů v populaci .....	33
3. Cíle práce .....	37
4. Metodická část .....	38
4.1. Vyšetřovaný soubor pacientů.....	38
4.1.1. Základní demografická data osob ve sledovaném souboru.....	38
4.1.2. Diagnózy .....	38
4.1.3. Počty transplantací ve sledovaném období .....	40
4.1.4. Příbuznost a shoda v HLA systému .....	40
4.1.5. Hodnocení příjemců a dárců z hlediska shody pohlaví.....	41
4.1.6. Retransplantace .....	42
4.1.7. Vyšetřovaný biologický materiál .....	42
4.2. Přístroje a pomůcky .....	43
4.3. Preanalytická a analytická část.....	44

4.3.1. Obecný popis vyšetření chimerismu .....	44
4.3.2. Izolace DNA.....	44
4.3.3. Amplifikace.....	45
4.3.4. Fragmentační analýza.....	46
4.4. Hodnocení výsledků chimerismu .....	46
4.5. Použitá statistika .....	48
4.5.1. Základní statistické funkce.....	48
4.5.2. Studentův test.....	49
4.5.3. Chí kvadrát test .....	50
5. Výsledky .....	51
5.1. Informativita a analytická vhodnost genetických markerů .....	51
5.2. Hodnocení spektra genetických markerů podle jejich informativity a vhodnosti.....	56
5.3. Hodnocení úspěšnosti transplantační léčby s ohledem na dosaženou aktivitu štěpu .....	58
5.4. Hodnocení úmrtí v potransplantačním období s ohledem na dosaženou aktivitu štěpu...	65
6. Diskuze.....	72
7. Závěr .....	77
Seznam zkratk .....	78
Zdroje.....	81



# 1. Úvod

Transplantace krvetvorných buněk jsou v dnešní době velmi hojně využívanou metodou pro léčbu hematologických malignit i nemaligních onemocnění krvetvorby a mimo to nacházejí své využití i mimo hranice hematologických oborů, např. při léčbě rakoviny prsu a ovárií, roztroušené sklerózy, nebo systémového lupus erythematodes. Využívání periferních kmenových buněk i štěpů kostní dřeně od dobrovolných dárců z registrů kostní dřeně zajišťuje lepší dostupnost transplantační léčby pro pacienty, kteří nemají vhodného dárce v rámci svých rodinných příslušníků. (1) (2)

V období po transplantaci hematopoetických buněk je nutné sledovat, jak se štěp vyvíjí, jak je aktivní a jestli se podařilo původní krvetvorbu úspěšně potlačit. K tomu slouží vyšetřování potransplantačního chimerismu, které má za úkol zjistit, jestli analyzované buňky patří svým genetickým původem dárci, nebo příjemci štěpu. Pokud v krevním řečišti a v kostní dřeni cirkulují buňky pocházející ze štěpu a současně i původní krvetvorné buňky příjemce, jedná se o smíšený chimerismus. Smíšený chimerismus se může dále vyvinout až do kompletní obnovy příjemcovy krvetvorby a vést relapsu původního onemocnění. Vysoké hodnoty dárcovského chimerismu naopak napovídají o vysoké aktivitě štěpu, která podmiňuje vznik akutní i chronické reakce štěpu proti hostiteli (GVHD – *graft versus host disease*). Existují různé metody pro analýzu chimerismu. Nejvíce se využívá postupů založených na genetické variabilitě mezi příjemcem a dárcem, která umožňuje procentuální kvantifikaci případného chimerismu. Tyto metody využívají jednonukleotidové polymorfismy či rozdílné délky tandemových repetit. (3) (4)

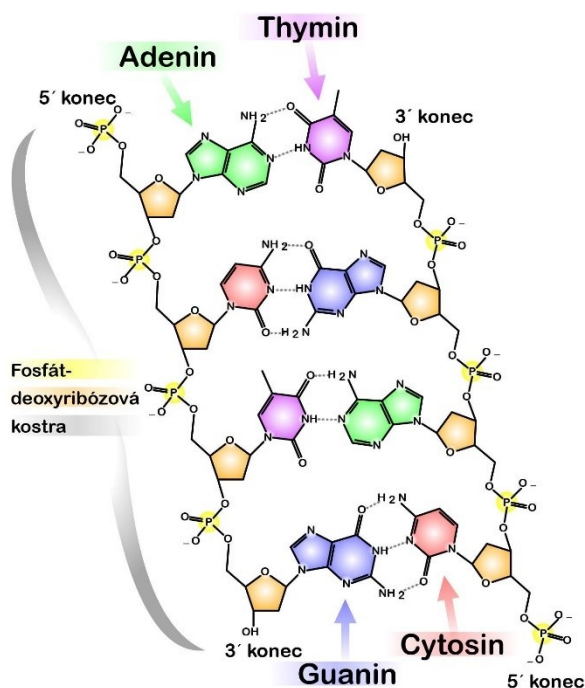
## 2. Teoretická část

### 2.1. DNA

#### 2.1.1. DNA - její struktura, výskyt a množství

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je základním nosičem genetické informace jednobuněčných i mnohobuněčných organismů a spolu s RNA (ribonukleová kyselina) patří do skupiny nukleových kyselin. Molekuly DNA se skládají z cukerného zbytku 2 - deoxyribózy a kyseliny fosforečné, svázané esterovou vazbou na uhlíku C5. Na uhlíku C1 cukerného zbytku se zpravidla vážou dusíkaté báze pyrimidinové (C - cytosin, T – thymin), nebo purinové (A - adenin, G - guanin) a v některých případech se mohou vázat i méně obvyklé báze, např.: 5-hydroxymethyluracin, 5-hydroxymethylcytosin, 5-methylcytosin, nebo 6-methylaminopurin. Takto navázaná kyselina fosforečná, cukerný zbytek a dusíkatá báze se nazývá deoxyribonukleotidem a tvoří monomer celého dlouhého a nerozvětveného řetězce molekuly DNA. Primární struktura řetězce vzniká tak, že 2-deoxyribóza s dusíkatou bází vytvoří deoxyribonukleosid, ke kterému se na C5 poutá fosforečnanový zbytek. Tento zbytek se zároveň na C3 pojí s vedlejším deoxyribonukleosidem a vzniká tak 3'-5' fosfodiesterová vazba, zodpovědná za zformování celého řetězce DNA. Tato vazba je graficky znázorněna v obrázku 1 (5) (6)

*Obrázek 1 - Grafické znázornění primární struktury DNA*



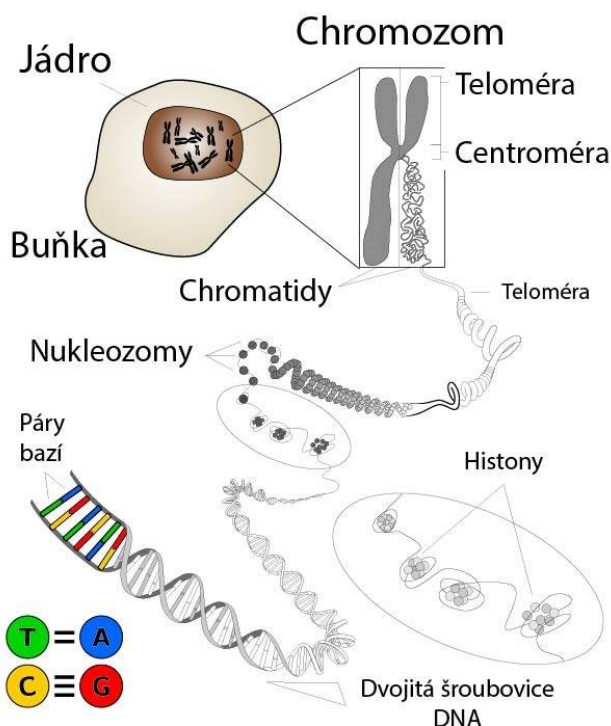
*Převzato, přeloženo a upraveno 9.4.2017 z:*

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_chemical\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg)

Molekula DNA je obvykle uspořádána do 2,0 nm široké dvojité šroubovice (pravotočivá B-forma helixu), jejíž otočku o délce 3,4 nm tvoří 10 nukleotidů. Dusíkaté báze směřují do vnitřku šroubovice a jsou spojeny vodíkovými vazbami podle Watson-Crickova párování: adenin s thyminem (A-T) a guanin s cytosinem (G-C). Podélně je molekula DNA stabilizována Van der Walsovými silami. (5) (6)

V eukaryotických buňkách je genetická informace uložena v jaderných chromosomech, které tvoří chromatin a jsou terciální strukturou DNA. Metafázický chromosom obsahuje 10 % DNA, 10-15 % RNA a 65-75 % proteinů. Struktura chromatinu je složená z nukleosomů, které mají v průměru 7–12 nm a mají jádro tvořené histonovými bílkovinami, které jsou obaleny dvoušroubovicí DNA. Celé vlákno nukleosomů se poté skládá do chromatinových filament, která tvoří chromatidy chromosomů. Přehledně je spojitost těchto struktur znázorněna v obrázku 2. Počet chromosomů se u diploidních buněk vyšších organismů pohybuje v rozmezí 2-500, u člověka je to 46 chromosomů rozdělených do 23 párů u somatických buněk a 23 chromosomů u haploidních pohlavních buněk. (5)

Obrázek 2 – Znázornění umístění genetické informace v buňce



Převzato, přeloženo a upraveno 9.4.2017 z:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosome\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosome_en.svg)

Dále může být DNA nalezena u eukaryotických buněk v jadérku, ale i v mitochondriích, kde tvoří kruhovou dvoušroubovici a odpovídá zhruba 1 % z celkového množství jaderné DNA. U rostlin a řas se DNA vyskytuje i v chloroplastech. (5)

DNA nižších organismů může být uspořádána v jednořetězcové i dvouřetězcové formě s různou délkou, v některých případech může být DNA bakterií nebo bakteriofágů i kruhová. Množství DNA, které obsahuje například bakterie *Escherichia coli* může zaujímat až 1 % z její celkové hmotnosti, tedy až  $4,2 \times 10^{-15}$  g což značí, že molekulová hmotnost DNA *E. coli* je okolo  $2 \times 10^9$ . Jednotlivé rody se od sebe vzájemně liší poměrem vazeb (A+T) / (C+G) nebo procentuálním vyjádřením C+G vazeb, a to až o desítky procent. Vyšší organismy se od sebe naopak tolik neodlišují, například u savců dosahuje procentuální vyjádření C+G vazeb zhruba 40 - 44 %. (5)

Primární sekvence DNA, tedy to, jak jsou na sebe postupně navázány A, T, C a G přesně určuje genetickou informaci. Veškerá genetická informace buňky, popřípadě celého člověka se nazývá genom a ten je tvořen 3,2 miliardami párů bází (bp). Dané

informace mohou být přepsány do RNA podle pravidel transkripce A→U, T→A, C→G, G→C, nebo přeloženy do proteinu podle translačního kódu, kde každé 3 báze v primární struktuře kódují 1 aminokyselinu. Genetický kód v tomto směru nazýváme degenerovaný, protože aminokyselin je méně než možných kombinací bází. Každá kombinace 3 bází proto může kódovat právě 1 aminokyselinu, ale 1 aminokyselina může být kódovaná více než jednou trojicí bází. (6).

### 2.1.2. Nejběžnější extrakční postupy získání DNA z tkání a tělesných tekutin

Genomová DNA může být izolována z tělních tekutin, jako je plná krev v kyselině etyhlendiamintetraoctová (EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*), citrátu i heparinu, samostatné sérum nebo plazma, moč a případně i stěr bukalní sliznice. Genetický materiál lze získat i z tkáňových vzorků. Extrakční metody nebo průmyslově vyráběné kity se od sebe liší podle původu požadovaného biologického materiálu. V izolačním postupu je také třeba brát ohled nejen na původ, ale i na stabilitu a množství DNA v daném materiálu, aby metoda byla co nejšetrnější a s vysokou výtěžností. Vzhledem ke složitosti biologické matrice vzorku a předpokladu, že DNA bude dále podrobena PCR reakci, při které je potřeba vysoká čistota vzorku, je nutné extrahovat DNA v co nejčistší formě, nebo jí ještě dále přečišťovat. (7) (8)

DNA je potřeba uvolnit z buňky či jejích organel, případně ještě před tím uvolnit buňky z tkáně. Buněčné membrány se poruší lyzačním roztokem nebo mechanicky (rozmělnění částicemi, ultrazvuk) aby se DNA uvolnila z vnitřních struktur do roztoku. Lyzační roztok obvykle obsahuje detergenty (SDS, žlučové soli, Triton X100) či surfaktanty pro porušení lipidových membrán a lipidů ve vzorku. Další důležitou složkou jsou činidla pro rozrušení proteinových struktur, jako je například fenol nebo proteolytické enzymy proteinkináza A (z *Tritirachium album*), nebo pronáza E (ze *Streptomyces griseus*). Podle potřeb dalšího zpracování je vhodné přidat ještě RNázu pro odstranění RNA ve vzorku, protože by mohla interferovat při dalším zpracování. Ještě před přidáním enzymu je ale nutné vzorek zahřát, aby se inaktivovaly proteázy, které by mohly RNázu rozložit. V neposlední řadě je potřeba ochránit DNA před působením DNáz, běžně se vyskytujících v buňce. K tomu se používají chelatační činidla, jako je

například EDTA, která na sebe váží dvojmocné kationty nezbytné pro působení DNáz.  
(7) (9) (8)

Ve vzorku se tedy nachází směs DNA a zbytků rozložených membrán, lipidů, proteinů a RNA, které je potřeba odstranit. Těchto zbytků je možno se zbavit několika separačními technikami. Mezi jednoduché separační techniky patří například vysolování v roztoku soli s vhodnou koncentrací, při které tyto sloučeniny vyprecipitují, DNA zůstane volně v roztoku a pomocí centrifugace lze tyto dvě složky od sebe oddělit. Při dalším zvyšování koncentrace soli se pak DNA zpětně vysolí. Nejčastěji se pro vysolování používá roztok síranu amonného. Dalšími technikami jsou teplotní denaturace nebo alkoholové srážení za pomoci ethanolu či polyethylenglykolu. (9) (8)

Jednou ze složitějších separačních metod je metoda fenol-chloroformové extrakce. Tato metoda je náročná na čas i zručnost laboranta, ale dosahuje vyšší výtěžnosti. Principem je rozdělení DNA mezi dvě fáze na základě její hydrofobních, či hydrofilních vlastností. Směs dvou rozpouštědel (chloroform a fenol 1:1) a vodného roztoku vzorku se spolu protřepává, což umožňuje fenolu vysrážet bílkoviny, které po centrifugaci vytvoří prstenec precipitátu mezi dvěma fázemi. Tento proces se opakuje, dokud se prstenec nepřestane objevovat, a tudíž ve vzorku nebudou už žádné bílkoviny, které by se srážely. Zbyde nám tedy DNA rozpuštěná ve vodné fázi, oddělená od organické. Dalším protřepáním ve směsi chloroformu a isoamylalkoholu, se odstraní zbytky fenolu, který by mohl interferovat při dalším zpracování vzorku. DNA ve vodné fázi se za nízké teploty (-20 °C) a přidavku iontů (Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, nebo Li<sup>+</sup>) vysráží alkoholem, jako je například ethanol nebo isopropylalkohol, a po centrifugaci sedimentuje na dně zkumavky. Po odstranění rozpouštědla odsátím nebo odpařením lze získat ze sedimentu vzorek čisté DNA, často nazývaný pelet nebo peleta, který lze dále rozpouštět a ředit do požadované koncentrace. (8) (10)

Další z metod nazvaná podle anglického slova resin (pryskyřice), tzv. RESIN metoda, je založena na principu iontové výměny. Ionty se vyměňují mezi kapalinou a pevnou fází, popř. gelem a vazebná místa mají různé afinity k jednotlivým iontům. Tato vlastnost je klíčová k odstranění nežádoucí matrice vzorku a získání co nejčistší DNA. K navázání DNA se využívají iontoměniče (tzv. katexy nebo anexy) které tvoří funkční skupiny jako například DEAE (diethylaminoethanol) na především organických polymerech, např. styren-divinylbenzenu, fenol-formaldehydové pryskyřice a epoxidové

pryskyřice. Na tento polymer s funkční skupinou, označované také jako resin se po inkorporaci iontu kovu do molekuly, výměnou za uvolnění vlastního iontu, naváže mobilní fáze do komplexu kovu s ligandem. Nejčastěji jsou resinové částice volně v roztoku, nebo organizované v membráně. Obecným postupem je nejdříve rozložení buněk lyzačním roztokem a následně nanášení lyzátu na kolonu, kde se negativně nabitě fosfáty DNA v přítomnosti vysoké koncentrace solí navážou na pozitivně nabitě DEAE skupiny na povrchu resinového iontoměniče. Zbytek nenavázaných částic a membrán z roztoku se z kolony odstraní, promyje a poté se elučním pufrům získá samotná DNA. Kolonka pak může být regenerována a opětovně použita. Tato metoda nevyžaduje pro svoji aplikaci centrifugy nebo HPLC vybavení a zároveň je použitelná v rozmezí pH 6-9 a koncentraci solí (0.1–1.6 molů). Je proto často používána v komerčně prodávaných kitech, např. QIAGEN Genomic-Tips, využívající technologii QIAGEN anion-exchange, zaměřená na rychlost provedení a vhodnost pro kombinaci s následnou PCR, protože efektivně odstraňuje její inhibitory. (8) (11)

Silikagelové kolony jsou v oblasti separace DNA také poměrně oblíbené, zejména pro svoji rychlost a jednoduchost. DNA musí být nejdříve uvolněna z buněk extrakčním pufrům a poté denaturována v přítomnosti chaotropních solí, např. guanidinium thiokyanátu. Takto denaturovaná DNA se adsorbuje na silikagelový povrch, zatímco ostatní složky se odmyývají a putují kolonkou dál. DNA se uvolní až po promytí elučním roztokem, což zaručuje purifikaci DNA od balastních látek. Principem metody je tedy kompetice polárních cukerných zbytků denaturované globulární DNA a méně polární mobilní fáze o vazebná místa na polárních a slabě kyselých silanolových skupinách (Si-O-Si a Si-OH) silikagelu. DNA pak ze silikagelu vytěsňuje ještě polárnější rozpouštědlo, například TE pufr nebo voda. Oproti výše uvedeným resinovým metodám existuje vyšší možnost kontaminace roztoku DNA látkami ze samotného separačního systému. Metoda je vhodná k automatizaci, nebo výrobě komerčních kitů, velmi často se ale metoda využívá na extrakci DNA z agarózových gelů. Tyto kity nabízí řada různých firem, např.: Thermo Fisher Scientific (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit), QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit), nebo Roche (Agarose Gel DNA Extraction Kit). (8) (12) (13) (14)

Další z moderních separačních technik je technika magnetických částic. Částice mohou mít různou velikost od nm až po  $\mu\text{m}$ , ale pro izolaci nukleových kyselin se nejvíce hodí velikost 20-450 nm. Mechanismus selektivní vazby DNA spočívá v přeměně

dvoušroubovice na globulární formu molekuly (za přítomnosti polyethylenglykolu a solí), což umožňuje vytvoření vodíkových můstků mezi magnetickou částicí a molekulou DNA. Za magnetickou orientaci částic je zodpovědné jejich magnetické, případně paramagnetické jádro, které obsahuje magnetické oxidy železa (magnetit, magnetit, ferrity zlata, kobaltu, manganu a mědi). Obal tohoto magnetického jádra je tvořen organickým polymerem s navázanými hydroxylovými skupinami, které zvyšují hydrofilitu částice a tím zároveň také afinitu DNA k částici, případně mohou být na jejím povrchu upevněny i sondy designované pro záchyt specifických molekul. Molekula DNA z roztoku se naváže na upravený povrch magnetické částice a po vložení zkumavky do magnetického pole, případně přiložení magnetu ke stěně, se částice uchytí na stěně zkumavky. Po promytí částic a odstranění magnetického pole zůstanou ve zkumavce jen molekuly DNA navázané na magnetické částice. Po promytí navázaných částic puřem bez ethylenglykolu a solí, přejde DNA zpět do své formy šroubovice a uvolňuje se do roztoku. Tímto postupem lze získat roztok přečištěné DNA a samostatné magnetické částice. Jedná se o elegantní metodu bez nutnosti centrifugace a používání organických rozpouštědel, která ovšem pro rutinní využití vyžaduje automatizaci z důvodu úspory času. (15) (8)

### 2.1.3. Kvantifikace extrahované DNA – metody, jejich principy

Další metody studia DNA, jako je například amplifikace, sekvenační analýza atd., vykazují specifické nároky na zpracovanou DNA. Zejména je potřeba určité minimální množství, popřípadě minimální koncentrace DNA v roztoku a také její čistota, hlavně v porovnání s bílkovinami a inhibitory PCR. V dnešní době se metody měření kvantity a čistoty DNA zakládají principech spektrofotometrické kvantifikace a UV fluorescenčního značení specifickými barvivy pro DNA. (16) (17)

Spektrofotometrická metoda je založená na principu, že nukleové kyseliny absorbují UV světlo o specifické vlnové délce  $\lambda$  ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) a fotodetektor zaznamená změnu intenzity procházejícího světla. Poměr mezi intenzitou zdrojem vyzařovaného světla a světla, které dopadá na detektor vyjadřuje transmitance  $T$ , která je záporným logaritmem absorbance  $A$ .



Souvislost absorbance  $A$  s intenzitou světla je dána následujícím vztahem, kde  $I$  je intenzita světla po průchodu vzorkem a  $I_0$  je počáteční intenzita světla. (16)

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I}$$

Výslednou koncentraci pak lze získat díky matematickému vyjádření Lambert-Beerova zákona, který popisuje přímou závislost absorbance na koncentraci roztoku  $c$ , délce vrstvy  $l$ , přes kterou paprsek světla prochází a molárním absorpčním koeficientu  $\epsilon$ . Matematické vyjádření Lambert-Beerova zákona:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Koncentrace se poté velmi často určuje i podle empirického vztahu, že 1 jednotka absorbance ( $\lambda = 260$  nm) odpovídá koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  dlouhých dvouřetězcových polynukleotidů. (18) (16)

Dalším z velmi často používaných principů měření koncentrace DNA v roztoku je metoda fluorescenčního značení prováděná ve zkumavkách, nebo v plošném uspořádání na gelu či membráně. Fluorescenční značkou jsou nejčastěji interkalační barviva jako je např. ethidiumbromid, bisbenzimid, PicoGreen®, nebo SYBR® Green. Oproti spektrofotometrii je tato metoda citlivější a vhodnější pro vzorky s nízkou koncentrací DNA, ale zároveň časově i finančně náročnější. V plošném uspořádání se fluorescenční značka (barva) přidá do agarózového, nebo polyakrylamidového gelu, případně se ukotví na membránu a teprve poté se aplikuje vzorek. Vedle fluorescenčně značené DNA ze vzorku je na gel aplikována i směs standardních koncentrací DNA, která slouží k porovnávání fluorescence s fluorescencí vzorků o neznámé koncentraci. Při dostatečném množství vzorku (cca 0.3  $\mu\text{l}$ ) jde metodu přenést i do kyvet či mikroděstiček, kde je fluorescence měřena fluorescenčním fotometrem, opět v porovnání se standardní koncentrací. (17) (19)

Extrakční a purifikační postupy neposkytují vždy zcela čistou DNA, proto se musí ještě po zjištění koncentrace DNA ověřit její čistota, aby zbytky proteinů s RNA neovlivňovaly následné analýzy, např. PCR. Čistota DNA v porovnání se zbytky proteinů

se spektrofotometricky určuje pomocí rozdílu mezi naměřenou absorbancí při  $\lambda = 260$  nm, kde mají svoje maximum nukleové kyseliny a absorbancí při  $\lambda = 280$ , kde mají svoje maximum naopak bílkoviny. Pro čistou DNA se tento poměr pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0, nižší hodnoty jsou způsobeny výskytem proteinů. (16) (17)

#### 2.1.4. Stabilita DNA při jejím uchovávání v extraktech

DNA je sice považována za stabilní molekulu, je ale náchylná k degradaci způsobené hydrolázami, DNázami, zářením nebo volnými radikály. Genetický materiál, který nebude nebo nemůže být použit pro okamžitou analýzu, například z ekonomických důvodů nebo organizačních potřeb laboratoře, je potřeba uchovat. Metody skladování se liší od použitého materiálu, mezi nejběžnější metody uchovávání patří zmrazování přečištěné DNA v pufru nebo ethanolu, skladování tkání a tělních tekutin v kapalném dusíku, konzervování buněk pomocí aplikace roztoku chitosanu, nebo uchovávání kapky krve (např. pro forenzní účely) na Whitmanových papírcích. (20)

Wu, et al. v roce 2009 studovali vliv teploty a rozmrazování na stabilitu DNA, která byla rozředěna TE pufrům do 2 koncentrací (cca 100  $\mu\text{g/ml}$  a 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Vzorby byly uchovávány při laboratorní teplotě, 4 °C, - 20 °C a - 80 °C a zkoumal se vliv opakovaného rozmrazování a zmrazování na stabilitu DNA při 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15 a 19 cyklech. Vzorby zmrazené na -20 °C a -80 °C byly stabilní více než 24 měsíců a ani po 19 rozmražení nevykazovala DNA (po následné amplifikaci PCR a detekci elektroforézou na agarózovém gelu) žádné známky degradace. Vzorby skladované při teplotě 4 °C vykazovaly různé stupně odpaření, ale byly stabilní i po 12 měsících. Vzorby, které byly skladovány při laboratorní teplotě, byly stabilní po dobu 9 měsíců, i když došlo k odpaření roztoku již po 6 měsících. Vysušená DNA, která byla skladována při laboratorní teplotě, degradovala již za 3 měsíce. (21)

Roder, et. al (2010) zkoumali možnosti uchovávání standardní DNA užívané v molekulární diagnostice. Vzorby genomické DNA byly uchovávány v PCR pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), v glycerolu + PCR pufru (1:1) a v glycerolu ve dvojité destilované vodě (1:1). Takto uchovávané vzorky byly skladovány při teplotě 4 °C a - 20 °C po dobu 100 dní a vyšetřeny metodou real-time PCR jednou týdně. Při porovnávání teploty skladování, vzorky skladované při teplotě -20 °C vykazovaly menší

odchylky od původní koncentrace a proto byla tato teplota zvolena za optimálnější. DNA ale měla při skladování v této teplotě tak výrazné odchylky od původní koncentrace, že by mohly výrazně ovlivnit výsledek při klinickém použití těchto standardů. Vzorky uchovávané v glycerolu s dvojitě destilovanou vodou při  $-20^{\circ}\text{C}$  vykazovaly nejlepší výsledky pro dlouhodobé uchovávání jak v porovnání se vzorky uchovávanými v glycerolu s PCR pufrem, tak i v porovnání s uchováváním v PCR pufriu. (22)

## 2.2. Transplantace krevetvorných buněk

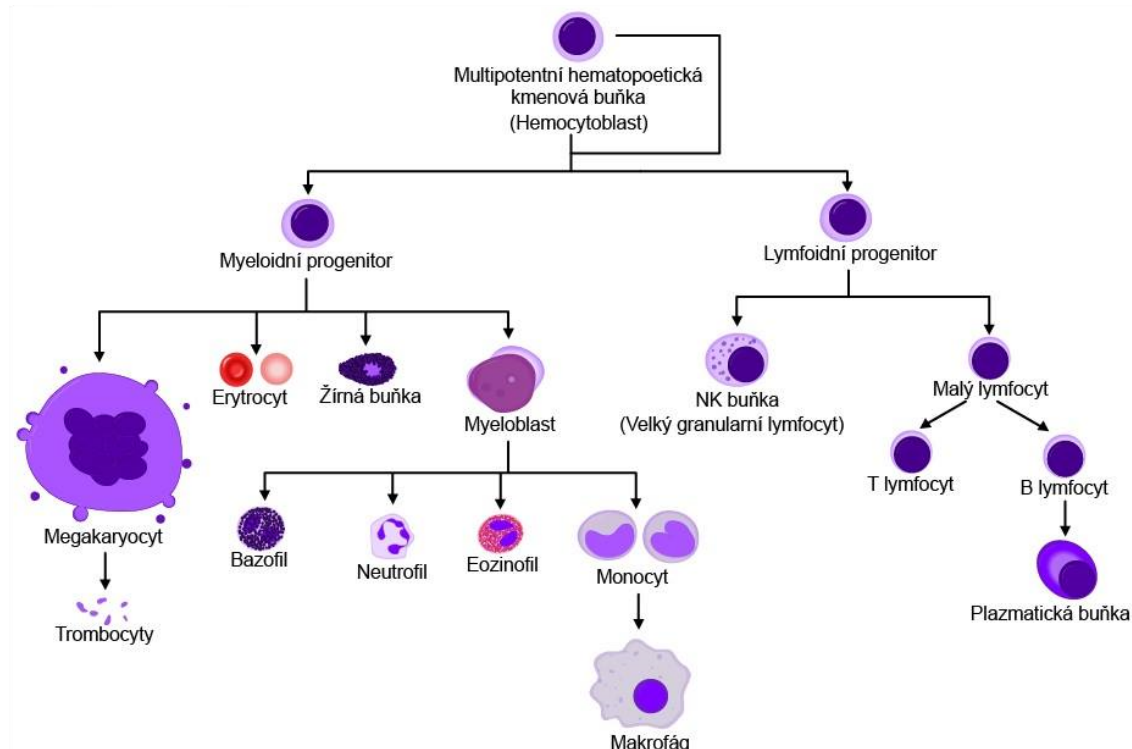
Jednou z hlavních vlastností krve je její schopnost udržovat stálé prostředí organismu, tzv. homeostázu. Homeostázu pomáhají udržovat jak krevní buňky, tak i ostatní složky krve, a to zejména díky transportu kyslíku a ostatních živin ke tkáním a od tkání naopak zajišťuje transport odpadních látek na místa dalšího zpracování. Neméně důležitou funkcí krve a krevních buněk je zprostředkování adekvátní imunitní reakce a udržování imunity, ale i hemostatické úlohy, jako je srážení krve a jeho regulace. Pokud je některá z funkcí krve narušena, důsledky tohoto poškození jsou velice závažné pro celý organismus, a kromě medikamentózní léčby či podávání krevních derivátů (transfúzí), je jedním z možných řešení i transplantace krevetvorných buněk. (23)

### 2.2.1. Krvetvorné buňky, hematopoéza

Neustálá tvorba nových krevních buněk neboli hematopoéza, je základem správné funkce krve. Hematopoéza je tedy postupné vyžívání hematopoetických kmenových buněk (HSC – hematopoietic stem cell) v konečné krevní buňky, jako jsou erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Hematopoéza dospělého člověka je soustředěna v kostní dřeni (KD) a to hlavně v obratlích a hrudní a pánevní kosti, dále pak probíhá i v thymu a v lymfatickém systému. Během prenatalního vývoje je hematopoéza situována nejdříve ve žloutkovém vaku, později se přesouvá do placenty a jater, kde zůstává částečná (“reziduální“) krvetvorba i po narození, a cca od 4. měsíce těhotenství se objevuje i medulární hematopoéza v kostní dřeni. Přesun hematopoézy do KD je zprostředkován díky chemotaktickým cytokinům a povrchovým adhezivním molekulám (selektiny, adresiny, integriny), které umožňují usídlení HSC v KD. Tohoto principu se využívá i při transplantaci HSC. (23)

Klasický model hematopoézy začíná HSC, která se diferencuje v lymfoidní nebo myeloidní progenitor a tvoří tak dvě různé cesty hematopoézy, v současné době ale existují i návrhy alternativních cest, které nejsou tak jednoznačné. Lymfoidní progenitor je základem pro B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK-buňky, myeloidní progenitor vede ke vzniku erytrocytů, granulocytů, monocytů, trombocytů a dendritických buněk. Obecné schéma vývoje těchto buněk je uvedeno na obrázku 3. (23)

Obrázek 3 – Zjednodušené schéma vývoje krve tvorby



*Převzato, upraveno a přeloženo 9.4.2017 z:*

*[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Hematopoiesis\\_simple.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_simple.svg)*

HSC je specifická svojí schopností sebeobnovy a zároveň diferenciaci do různých typů buněk. Stálá populace méně než 0,1 % HSC v kostní dřeni je zajištěna asymetrickým dělením, které je charakteristické tím, že jedna dceřiná buňka je přesnou kopií mateřské buňky a druhá dceřiná buňka je už diferenciovaná. Tuto schopnost sebeobnovy a diferenciaci mají pouze HSC a částečně i progenitory, patologicky se tyto schopnosti objevují i u leukemických buněk a jiných maligně pozměněných buněk. (23)

### 2.2.1. Princip a dělení transplantací krve tvorných buněk

Smyslem transplantace krve tvorných buněk je obnova zdravé krve tvorby pacienta, kterému se štěp dává. Pacientova vlastní krve tvorba je potlačena cytostatickou nebo radiační terapií a zárodečné buňky štěpu jsou potom schopné zahájit množení a diferenciaci.

Transplantace hematopoetických buněk se podle původu materiálu dělí na autologní, syngenní, alogenní a xenogenní. Z hlediska povahy buněk v transplantovaném štěpu dělíme tyto zákroky na transplantace kostní dřeně (KD) a převod periferních krvetvorných buněk (PKB). Aspirát KD se odebírá z dorzální a laterální části kyčelní kosti (popř. ventrální části kyčelní kosti nebo sterna) v celkové nebo epidurální anestezii. Odběr se provádí rychlým nasátím KD z jednoho kostního vpichu do houbovité části kosti v několika hloubkách. Kostních vpichů se provádí několik z jednoho kožního vpichu, aby se snížila traumatizace dárce jak z hlediska poškození kosti, tak z hlediska poškození kůže. Aspirát se poté ze stříkačky vstříkne do vaku s protisrážlivým činidlem a před podáním příjemci se ještě přefiltruje. PKB se odebírají plazmaferézou z periferní krve pomocí buněčných seperátorů, k odběru dostatečného množství buněk stačí 2-3 plazmaferézy. Protože se hematopoetické buňky v periferní krvi vyskytují za normálního stavu jen ve velmi nízkém počtu (0,2 % z jednojaderných buněk), je potřeba pacienta stimulovat. Ke stimulaci se využívá myelosupresivní chemoterapie (masivní vyplavení progenitorových buněk do periferie v rádech hodin až dnů), pomocí cytokinů (G-CSF, GM-CSF), nebo kombinací cytostatik a cytokinů. Metoda transplantace PKB je pro dárce lepší z důvodu menší traumatizace při odběru (ambulantně bez celkové anestézie) a malého výskytu nežádoucích účinků při stimulaci cytokiny, pro příjemce je naopak výhodnější protože rychleji upravuje hodnoty krevního obrazu a má menší riziko rejekce štěpu, protože se převádějí větší počty buněk. Mezi další možnosti získání hematopoetických buněk patří i využití pupečnickové krve, fetálních jaterních buněk, otázkou pro využití v budoucnosti jsou i hematopoetické buňky připravené *in vitro*. (2)

Autologní transplantace jsou převody vlastních kmenových buněk (PKB) pacienta z míst, která nejsou onemocněním zasažena a ze kterých byly PKB odebrány již před přípravným cytostatickým nebo radiačním režimem. Syngenní transplantace zahrnují převody PKB mezi jednovaječnými dvojčaty. Autologní a syngenní transplantace nevyvolávají reakci štěpu proti hostiteli a z důvodu snížení imunitní reakce na štěp je u nich menší výskyt reakce štěpu pro leukemickým buňkám (GVL efektu = *graft versus leukemia*) a vyšší riziko relapsu onemocnění. Alogenní transplantace využívají PKB od sourozenců, dalších členů rodiny či dobrovolných dárců, kteří jsou shodní v dostatečném množství antigenů HLA systému (HLA = *human leukocyte antigen*, systém antigenů na lidských leukocytech). Xenogenní transplantace je převod krvetvorných buněk mezi živočišnými druhy, který se ovšem klinicky nevyužívá. (2)

Dárci PKB a KD se vybírají podle shody antigenů v HLA systému: antigenů I. třídy A, B, C, a antigenů II. třídy DR, DP, DQ. Nejvýznamnější z nich jsou antigeny A, B a DR. Dalšími faktory pro volbu vhodného dárce jsou: věk, pohlaví, a pozitivita/negativita na cytomegalovirus (CMV). Krevní skupiny AB0 a Rh nejsou rizikovým faktorem pro výběr dárce, jen je třeba z transplantovaného štěpu odstranit erytrocyty a plasmu. (24)

Dárcům alogenních štěpů jsou kromě testů HLA, AB0 a Rh také vyšetřeny hodnoty krevního obrazu, screening krevních skupin a atypických protilátek a jsou povinni podstoupit testování na přítomnost patogenů přenositelných periferní krví nebo KD (HIV, CMV, hepatitis B+C, syfilis, *Herpes simplex virus*, *Varicella zoster virus*, toxoplazmóza a případně virus lidské T-buněčné leukémie HTLV-1). Dále do vyšetření dárce před odběrem KD spadá i měření EKG a RTG vyšetření plic. (24)

Příprava příjemce ke transplantaci PKB zahrnuje snahu o utlumení nemoci tumorablativní léčbou v případě maligního stavu a navození imunosuprese, aby se předešlo rejekci a vytvoření místa pro transplantát v houbových částech kostí. Vlastní předtransplantační přípravné režimy se liší mezi pacienty s ohledem na věk, stav, diagnózu a předchozí léčbu. Mezi cíle pro nové přípravné režimy patří snížení toxicity a zvýšení tumorablativního účinku. (2)

### 2.2.2. Důvody transplantace KB

Transplantace PKB je kurativní metodou nejen pro hematologické malignity, ale i pro solidní tumory, neonkologická onemocnění a dědičné choroby. Transplantace nemusí být vždy nejoptimálnějším řešením pro léčbu dané nemoci, a proto o vhodnosti jejího použití vždy rozhoduje tým odborníků, tzv. transplantační skupina. V České republice se transplantacemi hematopoetických buněk zabývá Transplantační sekce, spadající pod Hematologickou a Onkologickou společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně, kde jsou zastoupena transplantační pracoviště v Praze, Hradci Králové, Brně, Plzni a Olomouci. Tyto a podobná pracoviště z celé Evropy jsou sdružena v organizace European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT), která centrálně zpracovává všechna data o transplantacích hematopoetických buněk a vydává kritéria pro indikace transplantací a akreditace jednotlivých pracovišť. (1)

Nejčastěji se příbuzenská i nepříbuzenská alogenní transplantace hematopoetických buněk užívá u hematologických onemocnění, zejména u akutních leukémií (myeloidní i lymfoblastická). U Akutní lymfoblastické leukémie (ALL) se při výskytu rizikových faktorů doporučuje transplantace již v první remisi, a pokud rizikové faktory nejsou přítomny, je transplantace doporučena až při druhé remisi. U akutní myeloidní leukémie (AML) se alogenní transplantace doporučuje již v první remisi, u chronické myeloidní leukémie (CML) je dokonce považována za jedinou léčebnou metodu. Mezi další hematologická onemocnění kde se využívá transplantace PKB se řadí vybraní pacienti s myelodysplastickými syndromy, Hodgkinovým i non-Hodgkinovým lymfomem a mnohočetným myelomem. (1)

Mezi solidní tumory, kde se k léčbě taktéž využívá transplantace PKB patří např.: karcinomy prsu a ovarií, neuroblastom, testikulární tumory, malobuněčný karcinom plic, Grawitzův tumor ledviny. V těchto případech se ale většinou jedná o autologní transplantace PKB. Z nenádorových onemocnění, u kterých se používá kurativního účinku transplantace PKB lze uvést mozkomíšní roztroušenou sklerózu, systémovou sklerodermii, systémový lupus erythematozus, zástupci dědičných onemocnění pak jsou např.: vrozené enzymatické defekty a Fanconiova anémie. (1) Přehled indikací je uveden v tabulce 1.



## Tabulka 1: Přehled indikací k transplantaci krvetvorných buněk

**Přehled indikací k transplantaci krvetvorných buněk**  
(modifikováno podle Anděla, 2001; Atkinsona, 1998 a Giralta, 2000) (1, 3, 8)

Typ transplantace krvetvorných buněk	Indikace
Alogenní transplantace krvetvorných buněk	těžká aplastická anémie u mladých pacientů neodpovídajících na imunosupresi chronická myeloidní leukémie v chronické fázi u pacientů pod 60 let věku akutní myeloblastová leukémie rizikového typu v první remisi u pacientů pod 60 let věku akutní myeloblastová leukémie ve druhé a následující remisi u pacientů pod 60 let věku akutní lymfoblastová leukémie s Ph-chromozomem u pacientů pod 60 let věku akutní lymfoblastová leukémie ve druhé remisi u pacientů pod 60 let věku myelodysplastický syndrom u pacientů pod 55 let věku těžké metabolické vady s imunitními deficity (m. Gaucher, adrenoleukodystrofie,...), Fanconiho anémie pokročilá stadia maligního Hodgkinova lymfomu i non-Hodgkinových lymfomů u pacientů pod 60 let věku
Autologní transplantace krvetvorných buněk	non-Hodgkinovy maligní lymfomy ve druhé remisi maligní Hodgkinův lymfom ve druhé remisi akutní myeloidní leukémie v první nebo druhé remisi mnohočetný myelom karcinom prsu testikulární tumory ve druhé remisi malobuněčný karcinom plic karcinom ovaria sclerosis multiplex systémový lupus erythematoses systémová sklerodermie

Převzato 8.4.2017 z:

[http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%203\\_4\\_2005/005-Slov%C3%A1cek.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%203_4_2005/005-Slov%C3%A1cek.pdf)

### 2.2.3. Úspěšnost a rizika transplantací

V časně potransplantační fázi se projevuje hlavně toxicita přípravného režimu, zvýšení hodnot krevního obrazu po alogenní transplantaci nastává za 2–3 týdny a může se projevit i akutní nemoc štěpu proti hostiteli. Nemoc štěpu proti hostiteli je způsobena vlastní imunitou pacienta, a to zejména díky HLA systému leukocytárních antigenů. Pacientovy imunitní buňky rozpoznají “cizí“ antigeny na dárcových buňkách a může dojít k rejekci štěpu, naopak imunitní buňky obsažené ve štěpu mohou působit proti vlastním buňkám příjemce což je podstatou GVHD. GVHD tedy vzniká, jsou-li ve štěpu přítomné kompetentní T-lymfocyty a příjemce je naopak schopen tvořit tkáňové antigeny, které jsou pak rozpoznány právě dárcovskými T-lymfocyty. Pacienti s akutní GVHD musejí být léčeni imunosupresivou, což ještě víc zvyšuje riziko vzniku oportunních infekcí a úmrtí pacienta. Nejčastěji je u akutní GVHD postižena kůže (exantém, deskvamace), imunitní systém, gastro-intestinální systém (anorexie, nauzea, průjemy) a jater (hyperbilirubinémie, vzestup transamináz). Mortalita způsobená akutní GVHD přímo i nepřímo, může dosahovat až 50 %. Akutní GVHD může být naopak i přínosem pro pacienta, a to zejména

díky protileukemickému efektu štěpu. GVL spočívá v imunitní reakci dárcovských lymfocytů proti zbytkům leukemických buněk příjemce, které zničí, a proto snižuje riziko relapsu původního onemocnění. Po 3. měsíci od transplantace se může rozvinout chronická GVHD, která se projevuje a poškozuje hlavně kůži (sklerodermie, deskvamace, erytém) a imunitní systém (velmi časté infekce), velmi často jsou postiženy i plíce chronickou obstrukční chorobou, oči, sliznice úst a játra. (2)

Andrykowski (1995) provedl multicentrovou studii na kvalitu života pacientů po autologní a alogenní transplantaci kostní dřeně. Mimo jiné se zabýval i tím, jak sami pacienti hodnotí návrat do života, resp. s jakou úspěšností, či vůbec jsou schopni zase zastávat své dřívější činnosti. Mezi tyto činnosti patří práce mimo domov, rekreační provozování svých koníčků, socializace s přáteli, sexuální aktivita, usilovná fyzická aktivita, práce na zahrádce, vnímání vlastního vzhledu a schopnost myšlení a zapamatování si. Nejvýraznější rozdíl mezi recipienty alogenní a autologní transplantace se projevil ve schopnosti práce mimo domov a ve vnímání vlastního vzhledu, a to ve prospěch autologních transplantací. Pacienti po alogenní transplantaci také měli vyšší procento ztráty zaměstnání, popř. předčasného důchodu (41 %), odůvodněné svými zdravotními problémy, oproti pacientům po autologní transplantaci (26 %). Tyto pacienti ale tvořili menšinu, většina pacientů (68 %) procent totiž nevedla žádné problémy s vykonáváním svého zaměstnání. Celkově pak většina pacientů zhodnotila svoji kvalitu života po transplantaci jako sníženou jak v porovnání se svými vrstevníky, tak i v porovnání se svým vlastním stavem před propuknutím nemoci, která byla důvodem transplantace kostní dřeně. (25)

## 2.3. Laboratorní vyšetření buněčného chimerismu

V průběhu posledních 30 let se transplantace kostní dřeně a periferních kmenových buněk stala velmi významnou a dobře zavedenou metodou pro léčbu maligních i nemaligních onemocnění. V období po samotné transplantaci štěpu hraje jednu z nejdůležitějších rolí správné určení, jestli nově vznikající krvetvorba je původem dárce, nebo příjemce. Určování původu nově vznikající hematopoézy na základě genotypové analýzy se nazývá vyšetřování buněčného chimerismu. Termín chimerismus pochází z řeckého slova *Chimaira* (Χίμαιρα), které označovalo mytologickou bytost, která měla tělo lva, hlavu kozy a hadí ocas. V medicíně byl tento výraz poprvé použit Andersonem v roce 1951. (3) Podle jeho „buněčné“ koncepce je chiméra organismus, který se skládá z buněk pocházejících ze dvou zygotických linií. V souvislosti s transplantacemi byl termín chimerismus poprvé použit Fordem v roce 1956 a označuje stav, kdy se po transplantaci kmenových buněk objevují v kostní dřeni a v cirkulaci jak buňky pocházející z dárce štěpu, tak i buňky příjemce. (3)

### 2.3.1. Definice pojmů kompletní a smíšený chimerismus

Pokud po transplantaci náleží všechny hematopoetické buňky svým původem dárce (všechna DNA v analyzovaném vzorku je svým původem dárce), jedná se o kompletní chimerismus a pacient může být nazván kompletní chimérou. V době, kdy se štěp přihojuje, jsou doporučována častá vyšetření chimerismu, aby se mohlo co nejdříve zakročit, pokud by se stav chimerismu začal měnit. (3)

V praxi je běžné, že potransplantační chimerismus více, či méně kolísá, jelikož se jedná o dynamický proces. Pokud všechny hematopoetické buňky nepocházejí z dárcovského štěpu a objevuje se částečná obnova původní krvetvorby, nazývá se tento stav částečným (neboli smíšeným) chimerismem (MC – *mixed chimerism*). Při stabilním MC, kdy se hodnoty nijak výrazně nemění, se v průběhu přihojování štěpu doporučuje monitorování chimerismu v subpopulacích (NK buňky, T-lymfocyty) a dvoutříměsíční kontroly chimerismu pro případ odhojování štěpu. Při zvyšování MC o více než 5 % se doporučuje preventivní imunoterapie pacientů s hematologickými malignitami a týdenní

kontroly po dobu 200 dnů od data transplantace pro zachycení relapsu choroby, který se objevuje právě v tomto období. (3)

Vyšší hodnoty smíšeného chimerismu v časně potransplantační fázi mohou být způsobeny původní příjemcovou krvetvorbou, ale jeho vzrůstající podíl může značit znovuobjevení původní nemoci. Ve svém důsledku smíšený potransplantační chimerismus znamená snížení GVL efektu, což ještě více zvyšuje riziko rozvoje původní nemoci. Konkrétně u pacientů s akutními leukémiemi a myelodysplastickým syndromem (MDS), bylo v několika studiích prokázáno, že zvyšující se podíl původní krvetvorby značí vysoké riziko relapsu onemocnění. (3)

Pokud byla transplantace použita pro léčbu nemaligních onemocnění, jako jsou např. aplastické anémie, talasémie, osteoporózy, imunodeficience, nebo syndromu selhání kostní dřeně, nemusí být vždy cílem dosažení kompletního chimerismu. Není potřeba zcela nahradit pacientovu vlastní krvetvorbu a tomu odpovídá i přípravný režim před transplantací, který narozdíl od léčby maligních onemocnění není tak myeloablativní a toxický. Pacientův stav a pocit pohody se může výrazně zlepšit i při současné existenci původní a dárcovské krvetvorby. (3)

Zajímavostí je, že se částečný chimerismus může objevit pouze v některých buněčných liniích (například T-lymfocyty, NK buňky) a potom je označován jako tzv. split chimerism (*split* = rozštěpený, puklý, prasklý). Vyšetření těchto linií se pak využívá při rozlišení, zda jsou reziduální buňky maligní nebo ne. Je důležitým kritériem pro výběr další terapie, která by měla předejít následné rejekci štěpu. Klinické studie vyšetření chimerismu v buněčných subpopulacích (T-lymfocyty, NK buňky) ukázaly mimo jiné i signifikantní rozdíly mezi dětskými a dospělými pacienty. (3)

V případě, že se v analyzovaném vzorku nachází pouze příjemcova DNA, jedná se o autologní obnovu původní krvetvorby a je potřeba pacienta připravit na retransplantaci.

### 2.3.2. Vyšetřovací metody při analýze chimerismu

Pro analýzu potransplantačního chimerismu existují různé vyšetřovací metody. Hlavním principem, který využívají, je variabilita různých biologických markerů

příjemce a dárce. Mezi tyto vyšetřovací metody patří např.: cytogenetika, fenotypizace erytrocytů, polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*), analýza tandemových repetitiv a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pohlavních chromosomů. Průlom pro klinickou aplikaci vyšetření chimerismu nastal po objevu polymerázové řetězové reakce (PCR – *polymerase chain reaction*). V důsledku toho byly v průběhu 90. let 20. století nejvíce využívány metody amplifikace oblastí variabilního počtu tandemových repetitiv (VNTR – *variable number of tandem repeats*) a charakterizace krátkých tandemových repetitiv (STR – *short tandem repeats*). Fluorescenční značení primerů a rozdělení PCR produktů pomocí kapilární elektroforézy pak umožnilo kvantifikaci chimerismu neboli číselné vyjádření stupně smíšeného chimerismu (pokud byl při analýze zachycen). Automatizace vyšetřovacího procesu a dostupnost potřebného přístrojového vybavení poté umožnilo vyšetřovat velká množství patientských vzorků za relativně krátký časový interval, což vedlo k významnému rozšíření klinické aplikace tohoto vyšetření. (3)

#### 2.3.2.1. RFLP

Principem RFLP metody je nasednutí restričního enzymu (např. *BclI*, *TaqI*, *EcoRI*, *HindIII*, *RsaI*, *BgIII*) na specifické místo v molekule DNA, které tvoří palindromovou sekvenci. Vlivem mutací toto místo může zaniknout a k rozštěpení nedojde, nebo naopak toto místo nově vzniká a molekula se rozštěpí. Pokud tyto palindromové sekvence leží v oblasti jednonukleotidových polymorfismů (SNP – *single-nucleotide polymorphism*), princip funguje stejně: pokud se polymorfismus projeví a vlákno nemá přesně požadovanou sekvenci, tak se nevytvoří palindrom a restriční enzym nemá kam nasednout, a vlákno se tudíž neštěpí. Výsledkem jsou pak různě dlouhé fragmenty patrné v elektroforetickém gelu, které umožňují v tomto případě identifikaci reziduální a nově vznikající křivky v potransplantačním období. (26) (4)

Dříve se pro toto vyšetření používal Southernův přenos fragmentované chromosomové DNA, která byla přenesena na nitrocelulózu papírky nebo filtry Genetrans či Zetabind a vyšetřena pomocí hybridizačních sond (např. pAW101, LAM4) (26). V současnosti se využívá kombinace metody RFLP s metodou PCR. Analyzuje se amplicon DNA (získaný díky PCR) o známé délce, který se následně na agarózovém gelu porovnává s velikostním standardem. Pokud DNA obsažená ve vzorku obsahuje

palindromovou sekvenci pro daný enzym, objeví se po restrikci na gelu dva fragmenty, které součtem svých velikostí budou odpovídat délce původního amplikonu. Pokud DNA neobsahuje palindromovou sekvenci, bude její délka shodná s původním PCR produktem. (26) (4)

RFLP metoda byla několika studii prověřena jako vhodná pro využití k analýze chimerismu v období po transplantaci PKB a je velmi dobře použitelná i v praxi. Je ovšem na druhou stranu časově náročná, pracná a s velmi nízkou citlivostí (5-10 %). (26) (3)

### 2.3.2.2. Cytogenetika

Cytogenetické metody využívají pro určení původu hematopoézy (dárce nebo příjemce) pohlavní chromosomy, pokud jsou dárce a příjemce opačného pohlaví, případně mohou k diagnostice využívat vizuálních rozdílů při G-, Q- a C-pruhování. G-pruhování se zakládá na metafázických chromosomech obarvených Giemsou, která barví především na úseky bohaté na adenin a thymin. Místa v chromosomu, které jsou bohatší na cytosin a guanin (jsou taktéž transkripčně aktivnější) zůstávají světlá, což vytváří efekt pruhování. Q-pruhování využívá k barvení chinakrin (angl. *Quinacrine*) a C-pruhování využívá tmavého zbarvení konstitutivního heterochromatinu (angl. *Constitutive heterochromatine*), který je tvořený především tandemovými repeticemi, minisatelitními a mikrosatelitními repeticemi a transpozonovými repeticemi. (27) (28)

Z jednotlivých nabarvených chromosomů se poskládá karyogram, který je typický pro daného pacienta. Pacientovi po transplantaci se v určitém časovém rozmezí (30, 90, 180, 365 dní) se provede cytogenecké vyšetření karyotypu a porovnáním s původním karyogramem příjemce a dárce lze zjistit, kterému z nich buňka svým původem náleží. Je potřeba vyšetřit více buněk (20-60 mitóz), aby se zamezilo falešně negativní nepřítomnosti příjemcových buněk, které by mohly být opomenuty. Tyto metody jsou málo používané zejména pro svou časovou náročnost a nízkou citlivost (5 %). (28) (3)

### 2.3.2.3. Fenotypizace erytrocytů

Velmi jednoduchou a přesnou metodou je fenotypizace červených krvinek (RCP – *red blood cell phenotyping*) s citlivostí 1-5 %, nevýhodou je však dlouhá doba latence, než erytrocyty z dárcovské linie vyzrají. Červené krvinky ze vzorku periferní krve dárce i příjemce jsou vyšetřeny (před transplantací, po transplantaci, ze zmrazených vzorků) na kompletní fenotyp antigenů: A, B, C, c, E, D, K, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, M, N, S a s. U vzorku po převodu hematopoetických buněk se už pak vyšetřují pouze tzv. diskriminační antigeny, tedy ty antigeny, které jsou rozdílné u dárce a příjemce. Erytrocyty ze vzorku krve z potransplantačního období se inkubují s IgG protilátkou přesně proti vyšetřovanému antigenu a po několika promytích jsou k nim přidány fluorescenčně značené mikročástice s navázanými antigeny proti lidskému IgG. Pro lepší navázání erytrocytů a fluorescenčně značených mikročástic se vzorek zcentrifuguje a následně je prohlédnut pod fluorescenčním mikroskopem. Metoda je dobře kombinovatelná i s detekcí pomocí průtokové cytometrie, což umožňuje automatizaci a aplikaci do rutinního provozu jak pro sledování chimerismu, tak i pro monitorování odpovědi na infúzi dárcovských leukocytů (DLI – *Donor leukocyte infusion*) po transplantaci KD chudé na T-lymfocyty. (29)

### 2.3.2.4. FISH analýza pohlavních chromosomů

Metoda fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH metoda) využívá pohlavní chromosomy, které pocházejí z nedělicích se buněk v interfázi a díky využívání vícebarevných sond se mohou najednou detekovat chromosomy X i Y. Vzorky periferní krve nebo kostní dřeně se centrifugují a pro další využití se odseparují pouze jednojaderné krevní buňky, které se inkubují s hybridizačními barevnými sondami. Při použití dvou barevných fluorescenčních sond, např. DXZ1 (zelená) specifické pro  $\alpha$ -satelitní sekvence chromosomu X a DYZ1 (červená) pro  $\alpha$ -satelitní sekvence chromosomu Y, se do vyšetřovaných buněk počítají pouze buňky se dvěma zelenými signály (žena), nebo s jedním zeleným signálem a jedním červeným (muži). Pro analýzu je minimální počet 300 správných interfázických jader, medián je 500 jader pro analýzu. Z poměru dárcovských a příjemcovských buněk se poté vyjadřuje potransplantační chimerismus procentuálně. (30)

FISH metoda pro pohlavní chromosomy X a Y je omezená pro klinické využití díky tomu, že je použitelná pouze pro transplantační dvojice, kde má příjemce a dárce jiné pohlaví. Oproti klasickým cytogenetickým, ale i ostatním metodám má vysokou citlivost (0,1 – 0,001 %) a nízkou falešnou pozitivitu. (30) (3)

#### 2.3.2.5. *Analýza tandemových repetice*

Tandemové repetice jsou genomové úseky, kde se jedna určitá sekvence nukleotidů pravidelně opakuje. Tato sekvence se nazývá repetitivní jednotka. Délka repetitivní jednotky je různá, mikrosatelity (STR lokusy – *short tandem repeats*) mají velikost do 10 bp a celková délka STR úseku je 50 – 300 bp, minisatelity (VNTR lokusy – *variable number of tandem repeats*) mají repetitivní jednotky v řádech desítek bp a celý úsek pak může mít délku až 20 kbp. Počet těchto opakujících se jednotek pro vybranou oblast je mezi jedinci různý, což se využívá při analýze chimerismu, ale například i pro paternitní spory a v kriminalistice. Tento polymorfismus může být způsoben vzájemným posunem řetězců při replikaci v oblasti repetice, nebo rekombinací v této oblasti při meióze. Pro analýzu STR lokusů je potřeba designovat primery, které nasednou na jedinečnou sekvenci v okolí repetitivní jednotky. Kdyby byly primery navrhnuty přímo na repetitivní sekvenci, mohly by nasednout na kteroukoliv z mnoha repetice a výsledná délka PCR produktu by pro analýzu nebyla průkazná, protože bychom dostali pouze směs různě dlouhých fragmentů. (4)

Principem vyšetření repetitivních sekvencí je výběr určitého genetického markeru (konkrétního úseku DNA, který obsahuje tandemové repetice) a vytvoření primerů pro PCR, které budou nasedat před a za příslušný STR nebo VNTR lokus. Po provedení PCR se pomocí elektroforézy zjišťuje délka fragmentu. Ta se porovnává se s druhým vzorkem (dárce s příjemcem, otec s potomkem, dva podezřelí z trestného činu). Protože nelze předem vyloučit, že délka fragmentů bude stejná u obou vzorků, je pro vyloučení falešné negativy potřeba vyšetřit a porovnat více genetických markerů.

Separace a určení délky namplifikovaných fragmentů se u analýzy STR lokusů dříve prováděla pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Dnes se využívá kapilární elektroforéza, která umožňuje automatizaci procesu vyšetření potransplantačního chimerismu. Jedná se o přenesení plošné elektroforézy do prostředí kapiláry. Vnitřní



prostor kapiláry je naplněn lineárním polymerem jako je např.: lineární polyakrylamid (LPA), deriváty celulózy, nebo dextran, který vytváří vhodné separační prostředí pro pohyb NK. Jako pufr se nejčastěji používá TBE pufr (Tris-borát-EDTA), ale lze využít i jiné pufrы dle doporučení výrobce analyzátoru. Do separačního gelu se ještě přidává denaturační činidlo (močovina, formamid), aby vznikla jednořetězcová forma amplikonů a jejich separace pak nebyla ovlivněna jejich sekundární strukturou. Pokud denaturační činidlo není přítomno přímo v gelu, může se aplikovat do vzorku před jeho nanesením do kapiláry, nebo se může vzorek denaturovat vlivem zvýšené teploty. Vzorek se do kapiláry dostane z dávkovače (je předem nepipetován do mikrotitrační destičky) díky elektrokinetickému nástřiku, který je způsoben pohybem nabitě NK ze vzorku k anodě. Elektroforetická pohyblivost NK je pak dána jejich délkou, daným separačním proudem, který elektroforetickou sestavou prochází, a vlastnostmi separačního média a pufru (koncentrace, iontová síla, teplota, pH, aj.). Fragменты jsou na 5' konci označeny fluoroforem a jsou detekovány u anodického konce kapiláry fluorescenčním detektorem, jako je např. detektor diodového pole nebo CCD kamera (zdrojem excitačního záření je argonový laser nebo helium-neonový laser). Výsledkem je pak elektroforeogram s píky, které vyjadřují jednotlivé fragmenty. Součástí aplikovaného vzorku je i velikostní marker, aby bylo možné určit velikost fragmentu podle migračního času. (4) (31)

Po elektroforetickém rozdělení fragmentů jsou z elektroforeogramu zaznamenány výšky a plochy píků a migrační časy. Migrační časy jsou dané délkou fragmentu a podle rozdílných délek fragmentů jsou určeny alely dárce a příjemce. Pro určení vhodných genetických markerů se před transplantací vyšetří STR lokusy dárce a příjemce. Po transplantaci se u vybraných lokusů sleduje, zda se ve vzorcích neobjevuje mimo alel dárce i část alel, které připadají příjemci. Pokud se objeví, je potřeba je kvantifikovat. Pro kvantifikaci se může použít výška píku i jeho plocha, přesnější je však ale plocha, vzhledem k možnému asymetrickému tvaru píků. Procentuální chimerismus neboli zastoupení příjemcovy DNA ve vzorku lze vypočítat podle následujícího vztahu, kde  $A_{R1}$  je plocha píku 1. alely příjemce,  $A_{R2}$  je plocha píku druhé alely příjemce,  $A_{D1}$  je plocha píku 1. alely dárce a  $A_{D2}$  je plocha píku 2. alely dárce: (31)

$$\%_R = (A_{R1} + A_{R2}) / (A_{R1} + A_{R2}) + (A_{D1} + A_{D2})$$

Řada laboratoří volí při kvantifikaci chimerismu vyjádření opačné, tedy počítá relativní zastoupení dárcovské krvetvorby (dárcovský chimerismus) podle analogického vztahu:

$$\%_D = (A_{D1} + A_{D2}) / (A_{R1} + A_{R2}) + (A_{D1} + A_{D2})$$

STR metoda v kombinaci s PCR a fluorescenčním značením je robustní a rychlou metodou s velmi dobrou aplikovatelností do praxe. Problémem i zde však může být její nižší citlivost (1-5 %). (3)

Metoda vyšetřování STR lokusů je vhodná pro analýzu reziduální krvetvorby a predikce relapsu onemocnění či rejekce štěpu, bez ohledu na původ leukémie. Metoda není dostatečně citlivá v případech, kdy hledané buňky zastávají méně než 1 % z leukocytické populace. V těchto případech se využívá analýzy STR lokusů v buněčných subpopulacích. Buňky jsou rozděleny průtokovým separátorem podle CD znaků na jejich povrchu a analýza STR lokusů je pak provedena pro každou subpopulaci zvlášť. Změny v původu subpopulací leukocytů pomáhají lepšímu pochopení imunologické podstaty rejekce či relapsu onemocnění a umožňují tak včasější zákrok či případnou retransplantaci. Vyšetření STR v subpopulacích je také dobře aplikovatelné do praxe a má i lepší citlivost (0,1 – 0,001 %), má ovšem vyšší finanční nároky a je to metoda pracná a časově náročná. (32) (3)

#### 2.3.4. Studie genetické variability použitých STR lokusů v populaci

Jednou z funkcí populační genetiky v souvislosti s populační genetickou variabilitou je i určování heterozygoty jednotlivých genetických markerů. Heterozygotita markeru udává poměr, kolik ze všech vyšetřených osob bylo v daném lokusu heterozygotních. Pokud má tedy například marker CSF1PO heterozygotitu 0,766 znamená to, že z 1000 analyzovaných osob má 766 pro daný lokus 2 různé alely (je heterozygotem). Dalším způsobem vyjádření heterozygoty je procentuální vyjádření. Heterozygotita se dělí na pozorovanou heterozygotitu  $H_O$ ,  $H_{obs}$  (*observed* = pozorovaný) a očekávanou heterozygotitu  $H_E$ ,  $H_{EXP}$  (*expected* = očekávaný), které se mezi sebou vzájemně porovnávají.  $H_E$  a  $H_O$  se vypočítají podle následujících vztahů, kde  $n$  = počet analyzovaných jedinců  $a_{i1}$ ,  $a_{i2}$  jsou alely daného lokusu,  $m$  = počet alel daného lokusu a  $f_i$  je frekvence dané alely lokusu: (33)

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m (f_i)^2 \quad H_o = \frac{\sum_{i=1}^n (1 \text{ if } a_{i1} \neq a_{i2})}{n}$$

Vysoká genetická variabilita STR lokusů může být daná geografickou polohou populace a historickými vlivy (migrace obyvatelstva, nájezdy, války atp.) a jednotlivé populační skupiny se mezi sebou mohou odlišovat právě ve variabilitě těchto lokusů. Populační data o heterozygotitě markerů vybraných pro praktickou část diplomové práce jsou souhrnně zpracovány do tabulky 2, uvedené na konci této kapitoly.

Malyarchuk, et al. (2007) provedl studii genetické variability na evropském území Ruska s počtem případů  $N = 176$ . DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou a STR lokusy byly amplifikovány pomocí souprav Amp-FISTR SGM Plus a AmpFISTR Profiler Multiplex, separovány elektroforeticky v genetickém analyzátoru ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) a velikost fragmentů byla určena pomocí softwarů Gene-Scan (v. 3.1) a Genotyper (v. 2.0.) od firmy Applied Biosystems. Výsledky studie korespondovaly s Hardy-Weinbergovým rozdělením a diskriminační síla PD ( $PD = \text{Power of Discrimination}$ ) dosahovala vysokých hodnot. Nejinformativnější lokusy byly D2S1338, D18SD51, D21S11 a FGA. Heterozygotita vybraných lokusů je uvedena v tabulce 2. Data byla porovnána se studii ostatních slovanských národů (Polsko, Slovensko, Srbsko a Bosna) a bylo zjištěno, že ruská etnická skupina se oproti uvedeným etnikům vyznačuje vyšší frekvencí alely 16 lokusu D3S158 a nižší frekvencí alely 12 lokusu D13S317, dále alely 18 lokusu D3S1358 a také alely 21 lokusu FGA. (34)

Parys-Proszek, et al. (2010) podrobili 154 nepříbuzných jedinců žijících na území jižního Polska s evropským původem analýze 10 standardních STR lokusů (D3S1358, vWA, D16S39, D2S1338, D8S1179, D19S433, TH01, FGA, D21S11 a D18S51). DNA byla separována pomocí magnetických částic kitem MagAttract Kit za pomoci robotické stanice Biorobot M48 (Qiagen, SRN). Pro amplifikaci byl použit systém AmpFISTR NGM (Applied Biosystems, USA) a termocyklér GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Amplifikované úseky byly separovány a detekovány pomocí ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer a data byla analyzována softwarem GeneMapper IDX v1.1.0 (Applied Biosystems, USA). Uvedené markery nevykazovaly žádné statisticky významné rozdíly od zbytku evropské populace. (35) Heterozygotita jednotlivých markerů je zanesena do tabulky 2.

V roce 2004 provedl Hara, et al. populační studii v Japonsku, zaměřenou na 15 STR lokusů: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, Penta D, CSF1PO, vWA, D8S1179, TPOX a FGA. DNA byla získána od 164 nepříbuzných Japonců, žijících v centrálním Japonsku, a následně extrahována fenol-chloroformovou metodou. Amplifikace byla provedena pomocí PCR kitu PowerPlex 16 System Kit (Promega) a naamplifikované úseky byly následně separovány kapilární elektroforézou v systému ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Výsledky byly analyzovány softwary GeneScan Analysis 3.1.a Genotyper 2.5 (oba Applied Biosystems, USA). Frekvence genotypů jednotlivých lokusů odpovídala Hardy-Weinbergově rozdělení. Lokus s největší PD (0,9782), průměrnou pravděpodobností vyloučení MEC = 0,8063 (MEC = mean exclusion chance) a informačním obsahem polymorfismu PIC = 0,8632 (PIC = polymorphism information content) byl lokus Penta E. (36) S ohledem na praktickou část své práce uvádím i druhý marker s nejvyššími dosaženými hodnotami, kterým je lokus FGA (PD = 0,9629, MEC = 0,7240, PIC = 0.8481), Heterozygotita vybraných markerů je zanesena do tabulky 2.

Data o heterozygotitě v evropské a americké populaci a v populaci z Afriky byla zpracována z on-line databáze pop.STR (dostupné z: [http://spsmart.cesga.es/popstr.php?dataSet=strs\\_local](http://spsmart.cesga.es/popstr.php?dataSet=strs_local) ), zpracované skupinou Amigo et al. pod záštitou University of Santiago de Compostela v roce 2009. Heterozygotita jednotlivých markerů je zaznamenána do tabulky 2. Data o evropské populaci byla získána od celkem 2135 osob, které svým původem pocházely z Francie, Itálie, Španělska, Ruska, Švédska, ale i z blíže nespécifikovaných oblastí. Populační studie STR lokusů na území Střední a Jižní Ameriky, konkrétně z Brazílie, Kolumbie, Dominikánské republiky a Mexika, čítala celkem 551 osob. U populační skupiny z Afriky bylo celkem 507 obyvatel z Konga, Keni, Namibie, Nigérie, Senegalu, Somálska a Bantu. (37)

STR lokusy s nejvyšší populační heterozygotitou jsou podle uvedených informací: D2S1338, D18S51 a FGA, lokusy s nejnižší heterozygotitou jsou TH01, CSF1PO a TPOX. Uvedená data jsou souhrnně zpracována včetně průměrných hodnot v tabulce 2.

Tabulka 2 - Heterozygotita vybraných STR lokusů v různých populacích

Lokus	Rusko		Polsko		Japonsko		Evropa		Amerika		Afrika		Průměr	
	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>	H <sub>OBS</sub>	H <sub>EXP</sub>
D2S1338	0,892	0,874	0,870	0,888	-	-	0,871	0,889	0,858	0,888	0,867	0,867	0,881	0,881
D18S51	0,903	0,870	0,825	0,877	0,848	0,844	0,870	0,880	0,891	0,887	0,891	0,895	0,859	0,864
FGA	0,875	0,858	0,896	0,859	0,866	0,863	0,861	0,871	0,837	0,876	0,867	0,864	0,879	0,860
D21S11	0,852	0,861	0,851	0,855	0,799	0,787	0,828	0,840	0,901	0,857	0,818	0,843	0,834	0,834
D8S1179	0,813	0,772	0,799	0,802	0,842	0,841	0,797	0,816	0,811	0,801	0,776	0,789	0,818	0,805
D13S317	0,830	0,800	-	-	0,768	0,802	0,786	0,793	0,741	0,781	0,707	0,737	0,799	0,801
vWA	0,784	0,808	0,812	0,795	0,823	0,785	0,809	0,813	0,785	0,797	0,796	0,807	0,806	0,796
D19S433	0,756	0,787	0,818	0,803	-	-	0,805	0,809	0,842	0,841	0,820	0,832	0,787	0,795
D7S820	0,778	0,799	-	-	0,689	0,768	0,801	0,813	0,791	0,791	0,750	0,750	0,734	0,783
D5S818	0,744	0,728	-	-	0,829	0,806	0,732	0,709	0,747	0,761	0,745	0,756	0,787	0,767
D3S1358	0,733	0,762	0,721	0,801	0,695	0,730	0,757	0,778	0,723	0,756	0,750	0,740	0,716	0,764
D16S539	0,778	0,762	0,760	0,752	0,781	0,765	0,776	0,789	0,762	0,802	0,797	0,786	0,773	0,760
TH01	0,784	0,772	0,740	0,769	0,781	0,682	0,761	0,794	0,745	0,783	0,709	0,734	0,768	0,741
CSF1PO	0,756	0,735	-	-	0,713	0,732	0,766	0,724	0,758	0,760	0,747	0,761	0,735	0,733
TPOX	0,597	0,604	-	-	0,640	0,642	0,609	0,610	0,715	0,731	0,717	0,737	0,618	0,623

### 3. Cíle práce

1. Provést retrospektivní analýzu dostupných klinických dat a laboratorních parametrů souvisejících s vyšetřením potransplantačního chimerismu v zadaném souboru pacientů.
2. Pokusit se najít a potvrdit v souboru pacientů možný vztah mezi vybranými klinickými parametry a sledovanými genetickými markery.
3. Posoudit vliv příbuznosti příjemce a dárce štěpu, shody v jejich systému znaků HLA a shody jejich pohlaví na spektrum použitelných genetických markerů.
4. Vyhodnotit úspěšnost léčby a úmrtnost pacientů v potransplantačním období v závislosti na aktivitě štěpu.

## 4. Metodická část

### 4.1. Vyšetřovaný soubor pacientů

V průběhu let 2010 až 2014 bylo ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FNHK) provedeno celkem 161 transplantací PKB a 7 z nich byly retransplantace. Vzhledem k neúplným informacím o některých pacientech, které nebylo možné v dokumentaci dohledat, byla pro hodnocení použita data 140 pacientů, kteří prodělali v daném období transplantaci PKB.

#### 4.1.1. Základní demografická data osob ve sledovaném souboru

Soubor 140 pacientů po alogenní transplantaci periferních kmenových buněk byl složen ze 77 mužů a 63 žen. Z procentuálního hlediska tvořilo sledovaný soubor 55 % mužů a 45 % žen. Pět z těchto pacientů podstoupilo v letech 2010-2014 retransplantaci.

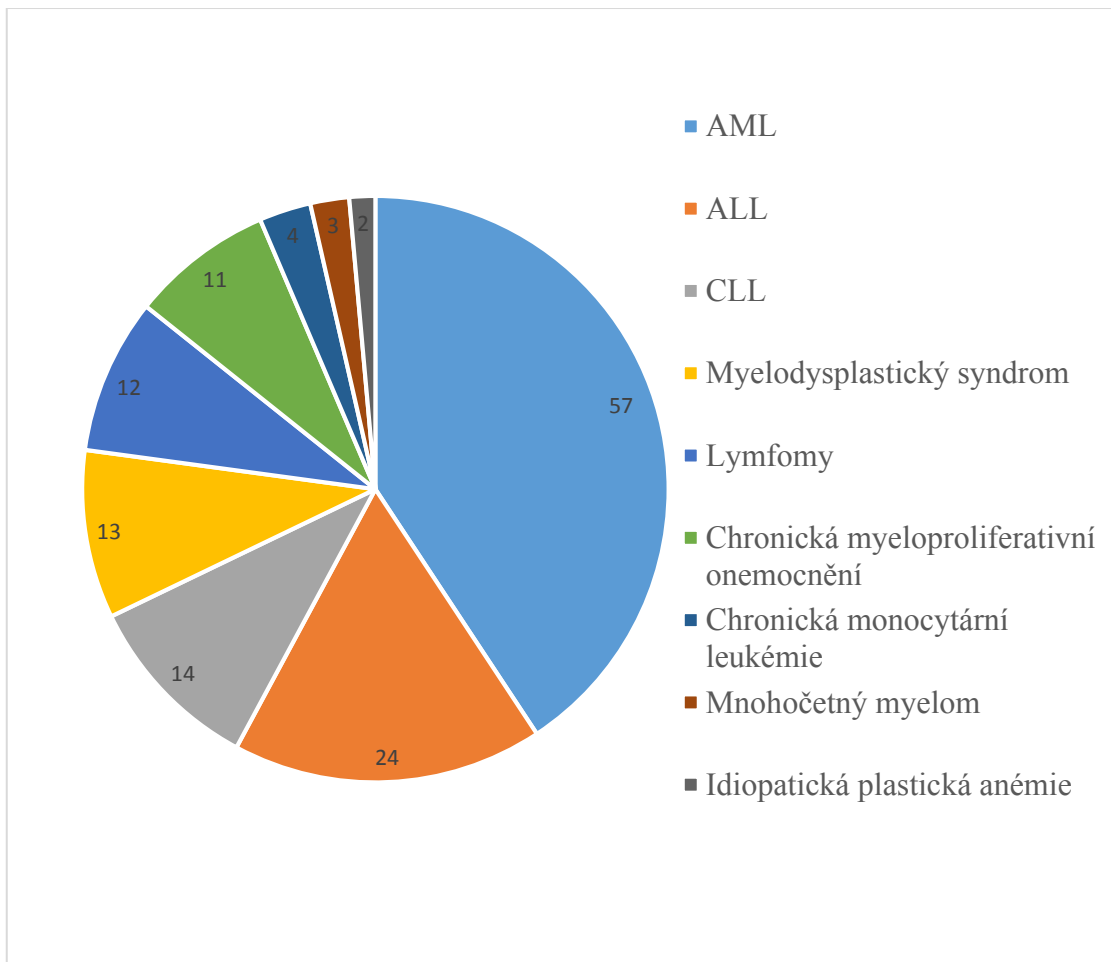
Průměrný věk pacientů byl 50 let (směrodatná odchylka SD = 13 let), s mediánem věku pacientů 54 let. Věkové rozpětí pacientů se pohybovalo od 18 let do 72 let. Průměrný věk mužů byl 50 let (SD = 14 let) s mediánem 54 let. Nejmladšímu pacientovi mužského pohlaví bylo v době transplantace 18 let a nejstaršímu 70 let. Průměrný věk žen byl 51 let (SD = 11 let) s mediánem 54 let. Nejmladší pacientce bylo v době transplantace 23 let a nejstarší 72 let. Soubory žen a mužů mezi sebou neměly statisticky významný věkový rozdíl (hodnocení bylo založené na Studentově t-testu blíže popsáném v kapitole 4.5.2.; testovací kritérium 0,44, stupně volnosti 138).

#### 4.1.2. Diagnózy

U sledovaných pacientů bylo prokázáno 25 různých diagnóz, a proto byli rozděleni do skupin se stejnou nebo podobnou diagnózou. Nejpočetnější skupinu tvořili pacienti s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (AML), kterých bylo celkem 57. Druhou nejpočetnější skupinou byli pacienti s akutní lymfatickou leukémií (ALL),

kterých bylo 24. Z celého souboru tedy pacienti s akutní formou leukémie tvořili 57 %. Pacientů s chronickou lymfatickou leukémií bylo 14 (10 %). Do skupiny myelodysplastických syndromů bylo zařazeno 13 pacientů, u kterých byla diagnostikována refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS), refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB) a jiné myelodysplastické syndromy. Do skupiny lymfomů bylo zařazeno 12 pacientů s podobnými diagnózami: T-buněčný lymfom, Hodgkinův lymfom, Non-Hodgkinův lymfom (difúzní i folikulární) a jiné blíže neurčené druhy Non-Hodgkinova lymfomu. Myeloproliferativní onemocnění bylo prokázáno u 11 pacientů, kterým byla diagnostikována chronická myeloidní leukémie (CML), subakutní myeloidní leukémie, polycythaemia vera, osteomyelofibróza nebo jiná chronická myeloproliferativní onemocnění. Chronická monocytární leukémie byla prokázána u 4 pacientů a další skupinu tvořili 3 pacienti mnohočetným myelomem. Poslední skupinu tvořili 2 pacienti s idiopatickou aplastickou anémií. Uvedená data byla souhrnně zpracována do grafu 1.

*Graf 1 - Zastoupení skupin diagnóz ve sledovaném souboru pacientů*

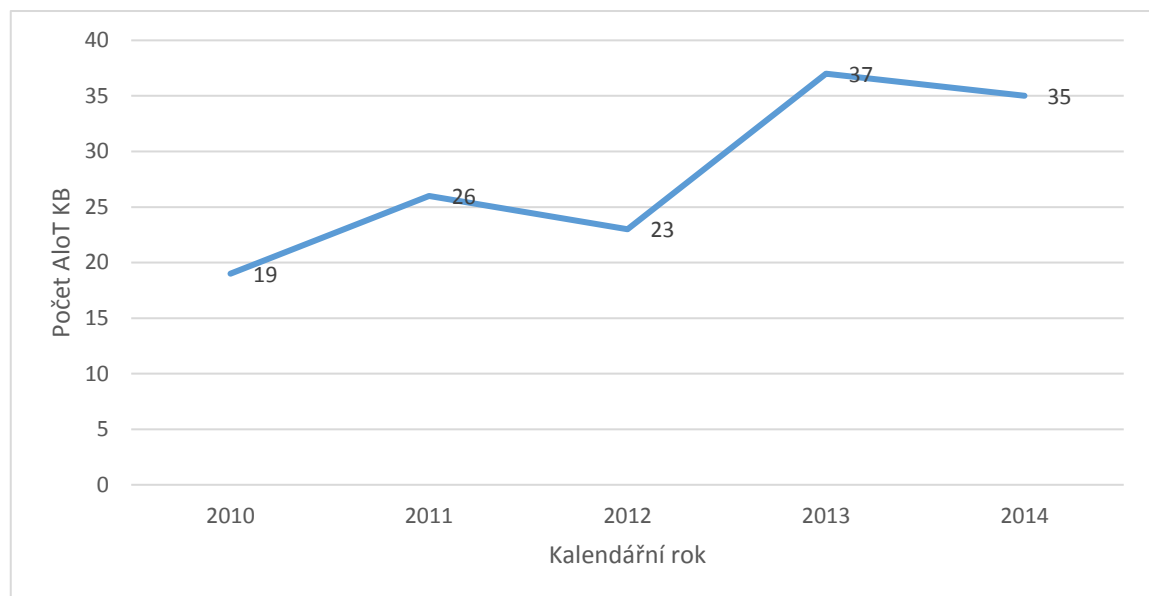




### 4.1.3. Počty transplantací ve sledovaném období

V roce 2010 bylo provedeno 19 transplantací (viz graf 2), v roce 2011 26 transplantací, tedy o 36 % více než v předchozím roce. V roce 2012 podstoupilo transplantaci 23 pacientů (počet oproti předchozímu roku klesl o 12 %) a jeden pacient v roce 2012 podstoupil retransplantaci. V roce 2013 bylo provedeno 37 transplantací a 2 retransplantace, což znamenalo 61% nárůst počtu transplantací. V roce 2014 bylo provedeno 35 transplantací a stejně jako v roce 2013 dvě retransplantace, což opět znamenalo mírný 5% pokles.

*Graf 2 – Celkový počet transplantací za jednotlivé kalendářní roky*



### 4.1.4. Příbuznost a shoda v HLA systému

Z celkového souboru 140 transplantací bylo 30 příbuzenských (21 %), kde byla ve všech případech potvrzena shoda jejich HLA systému ve všech deseti znacích (10/10). Nepříbuzenských transplantací bylo provedeno celkem 110, což představuje 79 % všech transplantací za roky 2010 až 2014. U 70 z těchto 110 nepříbuzenských transplantací (64 %) byla potvrzena shoda příjemce a dárce v HLA systému (10/10). U 40 případů (36 % ze všech nepříbuzenských transplantací) byla shoda 9 a méně HLA znaků. Ve

sledovaném souboru bylo tedy 28 % párů se shodou nižší než 10/10 a 72 % párů, které se plně shodovaly. Uvedená data jsou souhrnně zpracovaná v tabulce 3.

*Tabulka 3 – Počty příbuzenských a nepříbuzenských transplantací, shoda v HLA systému*

Příbuznost	celkem	[%]	10/10shoda	<10/10 shoda
Příbuzní	30	21	30	0
Nepříbuzní	110	79	70	40
Celkem	140	100	100	40

#### 4.1.5. Hodnocení příjemců a dárců z hlediska shody pohlaví

U 30 příbuzenských transplantací periferních kmenových buněk bylo u 13 případů (43 %) shodné pohlaví dárce a příjemce, v 6 případech se jednalo o transplantace muž-muž (šlo tedy o bratry) a v 7 případech o transplantace žena-žena (sestry). 17 (57 %) zbývajících příbuzenských párů nebylo pohlavně shodných.

U 110 nepříbuzenských transplantací byla pohlavní shoda u 65 (59 %) párů (55 transplantací proběhlo mezi bratry a 10 mezi sestrami). 45 (41 %) zbývajících nepříbuzenských transplantací PKB nebylo pohlavně shodných.

Nezávisle na příbuznosti tvořily pohlavně shodné páry 56 % všech transplantací, z toho transplantace mezi bratry byly zastoupeny ve 44 % a transplantace mezi sestrami v 12 %. Pohlavně neshodné páry nezávisle na příbuznosti tvořily 44 %. Uvedená data jsou souhrnně zpracována v tabulce 4.

Všech 5 retransplantací PKB bylo nepříbuzenských. Ve 3 případech se jednalo o páry, kde se pohlaví dárce a příjemce neshodovalo a ve 2 případech se jednalo o páry shodné, konkrétně šlo o páry muž-muž.

*Tabulka 4. - Shoda v pohlaví u příjemců a dárců PKB*

Typ AloT	Shoda pohlaví		Neshoda pohlaví
	muž-muž	žena-žena	
příbuzenská	6	7	17
nepříbuzenská	55	10	45
Celkem	61	17	62

#### 4.1.6. Retransplantace

Již výše zmíněných 5 retransplantací zahrnovalo 3 ženy a 2 muže. Věkové rozdělení těchto pacientů se pohybovalo v rozmezí 43-60 let, s průměrem 52 let (SD = 6 let) a mediánem 59 let. Dva pacienti byli diagnostikováni s AML, jeden s ALL, jeden pacient trpěl chronickou monocytární leukémií a jeden pacient spadal svou diagnózou do skupiny non-Hodgkinova lymfomu. Při uvedených retransplantacích byl vždy použit transplantát od nepříbuzného dárce. Při 3 retransplantacích byla shoda v HLA systému dárce a příjemce 10/10 a ve 2 případech bylo shodných 9 a méně znaků.

#### 4.1.7. Vyšetřovaný biologický materiál

Standardním materiálem pro předtransplantační vyšetření byl vzorek venózní krve příjemce a část progenitorových krvetvorných buněk dárce. U příjemce lze případně použít i buňky setřené z bukální sliznice. Pro potransplantační analýzu se preferuje vzorek kostní dřeně odebraný sternální punkcí. Vzorky krve a kostní dřeně byly do laboratoře transportovány ve zkumavce s EDTA za teploty okolního prostředí. Stabilita materiálu pro vyšetření chimerismu je při laboratorní teplotě (20-25 °C) 72 hodin, při chladničkové teplotě (4-8 °C) 7 dní a při uchovávání v mrazícím boxu (-20 °C) 3 měsíce.

## 4.2. Přístroje a pomůcky

### Izolace a kvantifikace DNA:

kolonková souprava QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, SRN)

izolační systém MagCore Super (RBC BioScience, Taiwan)

pipety Finnpiette (ThermoFisher Scientific, USA)

termoblok DRY BATH INCUBATOR (MajorScience, USA)

centrifuga MICROFUGE 18 MICROCENTIFUGE (Beckman Coulter, USA)

spektrofometr NANODROP 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA)

### Amplifikace:

AmpFISTR Identifier Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA)

pipety Finnpiette (ThermoFisher Scientific, USA)

termocyklér Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA)

### Fragmentační analýza:

Denaturační činidlo Hi-Di Formamide Genetic Analysis (Applied Biosystems ThermoFisher Scientific, USA)

pipety Finnpiette (ThermoFisher Scientific, USA)

termocyklér GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA)

analyzátor ABI 3130-4 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA)

## 4.3. Preanalytická a analytická část

### 4.3.1. Obecný popis vyšetření chimerismu

Vyšetření potransplantačního chimerismu se provádí na úseku Molekulární biologie v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové metodou fragmentační analýzy polymorfních STR lokusů. Vychází se přitom z předtransplantačního vyšetření STR lokusů pro dárce i příjemce. Při amplifikaci (multiplexní PCR) amplifikační primery nasedají v těsné blízkosti repetitivních sekvencí a jeden z primerů je značen na 5' konci fluorescenční značkou, což umožňuje následnou detekci produktů pomocí argonového laseru po tom, co se rozdělí kapilární elektroforézou s tekutou polymerní náplní. Pokud se ve vzorku z potransplantačního období objeví i fragmenty, které svojí délkou odpovídají alelám dárce i příjemce, jedná se o MC. Poměr mezi dárcovskou krvetvorbou a obnovenou krvetvorbou příjemce lze vypočítat porovnáním intenzity fluorescence mezi dárcovskými a příjemcovskými alelami.

### 4.3.2. Izolace DNA

Izolace DNA ze vzorku probíhá na kolonkové soupravě QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), Hilden, SRN), případně pomocí systému MagCore Super (RBC BioScience, Taiwan).

200 µl nesrážlivé (EDTA) krve vytemperované na laboratorní teplotu se napipetuje pomocí pipet Finnpiptette (ThermoFisher Scientific, USA) do zkumavek a následně s k nim přidá 20 µl QIAGEN proteasy a 200 µl AL pufru. Po promíchání se směs inkubuje (10 min, 56 °C) v termobloku DRY BATH INCUBATOR (MajorScience, USA) a poté se ke směsi přidá 200 µl ethanolu o koncentraci 96 %. Tato směs se zcentrifuguje na centrifuze MICROFUGE 18 MICROCENTIFUGE (Beckman Coulter, USA) a je připravená k aplikaci na kolonky, které jsou umístěné ve sběrných tubách. Po přelití vzorku na kolonky se tuby zcentrifugují (1 min, 6000xg) a QIAmp kolonky se přemístí do nových, čistých tub. Na kolonky se napipetuje nejdříve promývací pufr AW1 a po centrifugaci (1 min, 6000xg) a opětovné výměně kolonek i pufr AW2. Opět se zcentrifuguje (3 min, maximální otáčky) a kolonky se přemístí do čisté zkumavky, kam

se po přidání předeřátého (70 °C) elučního pufru AE a zcentrifugování (1 min, 6000xg) sbírá eluát obsahující DNA.

Po izolaci se pomocí spektrofometru NANODROP 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA) změří čistota DNA a její koncentrace. Čistota DNA vůči proteinům se určuje podle poměru specifické absorbance pro nukleotidy (260 nm) a absorbance specifické pro proteiny (280 nm). Koncentrace se určuje podle empirického vztahu: 1 jednotka absorbance odpovídá koncentraci 50 µg/ml dlouhých dvouřetězcových polynukleotidů. DNA se ve zkumavce uloží do mrazicího boxu a skladuje se zde do doby analýzy. DNA po analýze je bankována při -80 °C.

### 4.3.3. Amplifikace

K amplifikaci pomocí PCR se používá AmpFISTR Identifier Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) a naředěná DNA o finální koncentraci 0,18 ng/ul. K 6,4 µl reakčního mixu AmpFISTR PCR Reaction Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) se přidá 3,3 µl setu primerů AmpFISTR Identifier Primer Set (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) a 0,3 µl AmpliTaq Gold DNA polymerázy. Z takto získané směsi se odpipetuje 9 µl a k nim se přidá 6 µl DNA naředěné na požadovanou koncentraci. Takto získaný mastermix aplikujeme do termocykléru Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) s nastaveným programem pro PCR – STR IDENT (94 °C 11 min --- 94 °C 60 s – 59 °C 60 s – 72 °C 60 s /28x/ --- 60 °C 60 min --- 4 °C). Vyšetřované STR lokusy a jejich fluorescenční značky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 - Fluorescenční značení použitých STR lokusů

Značka	6-FAM	VIC	NED	PET
Lokus	CSF1PO	D2S1338	D18S51	D5S818
	D7S820	D3S1358	D19S433	FGA
	D8S1179	D13S317	TPOX	
	D21S11	D16S539	vWA	
		THO1		

#### 4.3.4. Fragmentační analýza

PCR produkt se musí pro fragmentační analýzu dále upravit. Nejprve se připraví detekční směs: 28,1  $\mu$ l Hi-Di Formamide (sloužící jako denaturační činidlo) a 0,4  $\mu$ l velikostního standardu GeneScan -500 LIZ Size Standard. Tato směs se rozpipetuje do zkumavek po 28,5  $\mu$ l. Do takto připravených zkumavek pipetujeme 2,8  $\mu$ l PCR produktu. Do jedné samostatné jamky se místo PCR produktu pipetuje 2,0  $\mu$ l alelického ladderu. Alelický ladder a velikostní standart jsou součástí kitu AmpFlSTR Identifier Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA). Zkumavky vložíme do termocykléru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) a denaturujeme na programu denatur-seq (5 min při 95 °C). Zdenaturované vzorky se rozpipetují do jamek mikrotitrační destičky pro fragmentační analýzu po 22  $\mu$ l.

Samotná fragmentační analýza potom probíhá na analyzátoru ABI 3130-4 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA) kam se vzorek aplikuje elektrokinetickým nástřikem při 1,2 kV po dobu 16 vteřin. Separace probíhá 40 minut při 15 kV a je schopná rozdělit analyzované produkty o délce 100-400 bp s obvyklou fluorescencí produktů 5000-10000 fluorescenčních jednotek.

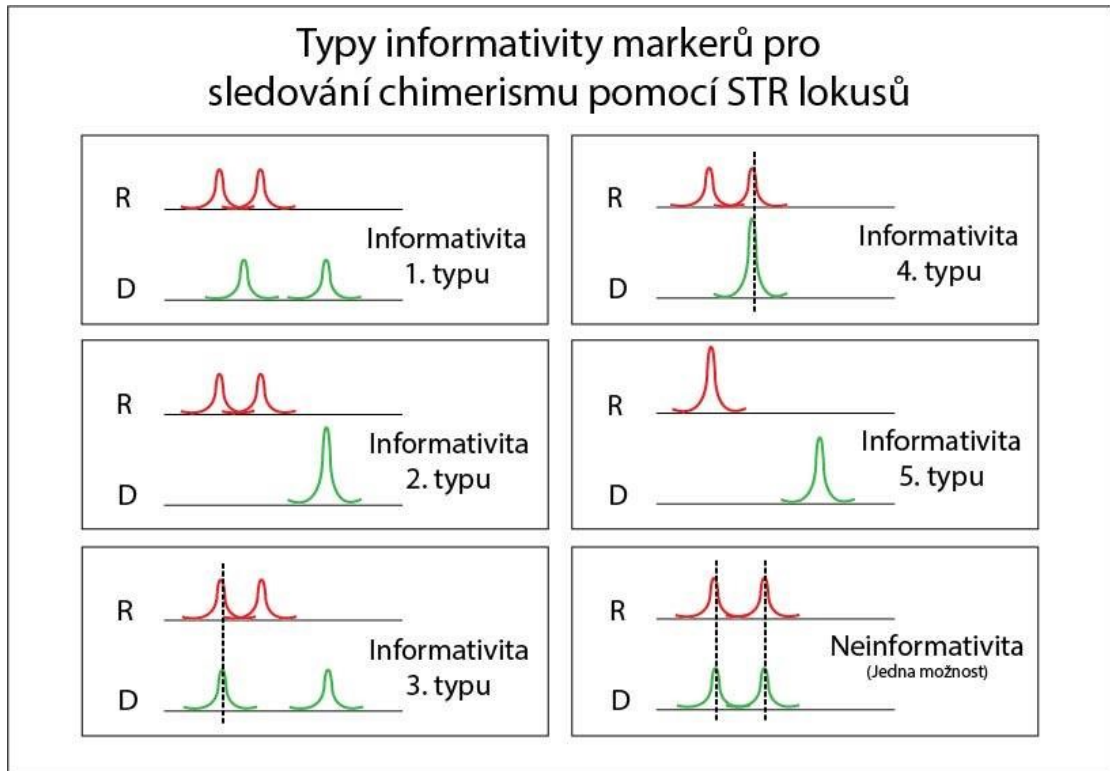
### 4.4. Hodnocení výsledků chimerismu

Před hodnocením potransplantačního chimerismu je nutné nejdříve vyšetřit STR lokusy dárce a příjemce zvláště pro určení informativity těchto lokusů. Data jsou zpracována programem GeneMapper ID-X v1.4 (Applied Biosystems, USA), který díky velikostnímu standardu identifikuje nalezené píky fragmentů. Po identifikaci vybere analytik z 15 STR lokusů 3-4 nejvhodnější informativní markery pro daný pár příjemce/dárce.

Zjednodušeně lze říci, že markery jsou informativní, pokud podle polohy alel od sebe lze odlišit DNA dárce a příjemce. Alely příjemce a dárce musí být vůči sobě v takové pozici, aby se v případě homozygotity či heterozygotity vzájemně nepřekrývaly. Pokud by totiž alely byly v pozici, kde by se překrývaly, nebylo by možné při smíšeném

chimerismu zjistit zastoupení příjemcovské/dárčovské složky. Příklad 5 vhodných typů informativních pozic píků pro alely dárce a příjemce je zobrazen na obrázku 4.

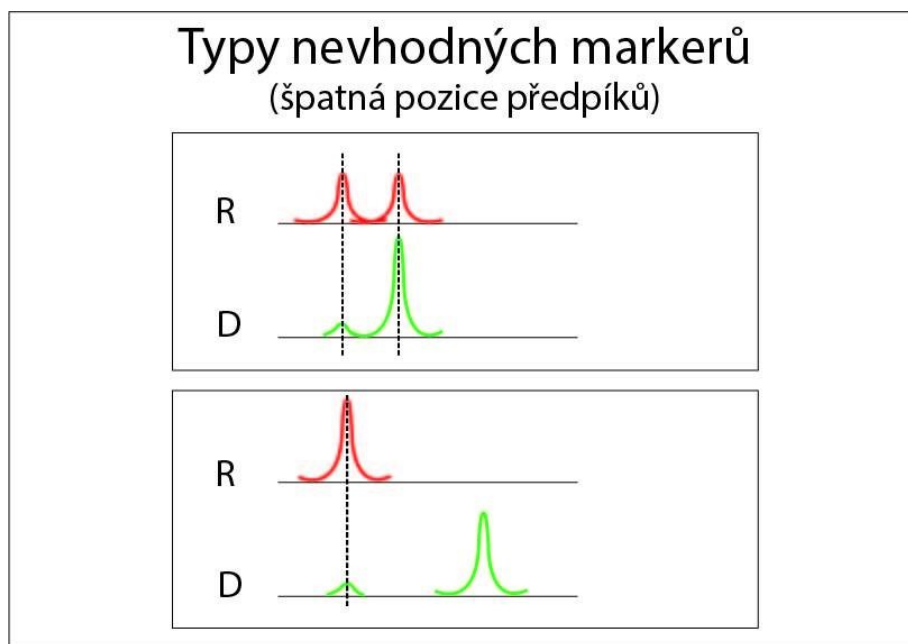
*Obrázek 4 – Typy informativity markerů*



Dalším kritériem je vhodnosť markeru. Alela príjemce musí ležet nejen mimo alelu dárce (marker je tedy informativní), ale zároveň musí ležet i mimo oblast předpíku, pokud se předpík vyskytuje u alely dárce. Předpík je v porovnání s klasickým píkem menší a je typicky umístěn o jednu repetitivní jednotku před samotným píkem. Pokud tedy např. homozygotní dárce bude mít alelu 14 markeru CSF1PO s předpíkem v pozici alely 13 a příjemce by byl také homozygot s alelou 13 markeru CSF1PO, tak tento marker je sice informativní, ale není vhodný. Grafické znázornění zákrytu píku alely příjemce a předpíku alely dárce je naznačeno v obrázku 5. Marker není vhodný pro analýzu chimerismu, protože dárce i příjemce sice lze od sebe odlišit, ale v předpíku dárčovské alely se může skrývat částečný pík příjemcovské alely, kterou není možné rozpoznat ani kvantifikovat, což by mohlo vést k falešné negativitě.



Obrázek 5 – Znáznornění nevhodných markerů



Pokud je marker označen za informativní a zároveň vhodný a je vybrán mezi 3-4 markery nejvhodnější, používá se zpravidla pro všechna vyšetření potransplantačního chimerismu. Procentuální vyjádření relativního zastoupení dárcovské krvetvorby se počítá podle vztahu uvedeného v kapitole 2.3.2.5. Výsledný procentuální chimerismus je průměrem pro všechny použité markery. Pokud je chimerismus 100 %, tak je označen jako kompletní, pokud je nižší, jedná se o smíšený chimerismus (MC).

## 4.5. Použitá statistika

### 4.5.1. Základní statistické funkce

Mezi základní statistické funkce použité k vyhodnocení výsledků patří aritmetický průměr, medián získaných hodnot a směrodatná odchylka průměru.

Aritmetický průměr  $\bar{x}$  je matematickou hodnotou průměru. Průměr je poloha v intervalu naměřených hodnot, která vyjadřuje typickou hodnotu daného souboru. Jedná se o součet všech hodnot, vydělený počtem hodnot. Aritmetický průměr má tu vlastnost,

že součet odchylek naměřených hodnot od průměru je roven nule. Matematicky lze aritmetický průměr vyjádřit následujícím vztahem, kde  $n$  je celkový počet hodnot (měření) a  $x_1, x_2, \dots, x_n$  jsou hodnoty prvního, druhého až  $n$ -tého měření: (38) (39)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i.$$

Další charakteristikou polohy je medián. Pokud seřadíme naměřené hodnoty podle velikosti, je pak medián hodnotou, která leží uprostřed. V případě lichého počtu hodnot je medián hodnotou ležící přesně uprostřed, v případě sudého počtu hodnot je medián součet dvou prostředních, vydělený dvěma. Z toho důvodu je stejný počet hodnot menších než medián, jako počet hodnot větších. Oproti aritmetickému průměru má medián tu výhodu, že není tolik ovlivněn extrémními hodnotami. (39)

Směrodatná odchylka SD (angl. *standard deviation*) je nejpoužívanější charakteristikou variability. Je vyjádřením, do jaké míry jsou hodnoty rozptýleny od charakteristické polohy (např. průměru). Směrodatná odchylka je ve stejných jednotkách jako naměřené hodnoty a jejich průměr. Matematicky ji lze definovat následujícím vztahem, kde  $s$  je hledaná směrodatná odchylka,  $n$  je celkový počet hodnot (měření) a  $x_i$  jsou hodnoty jednotlivých měření a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr naměřených hodnot: (39)

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

#### 4.5.2. Studentův test

Studentův t-test je velmi často používaným parametrickým testem pro testování dvou středních hodnot. Pro zhodnocení získaných dat pacientů v souboru byl použit dvouvýběrový nepárový Studentův t-test. Nulovou hypotézou je tvrzení, že dva soubory (kontrolní vs. experimentální skupina, muži vs. ženy) mezi sebou nemají statisticky významné rozdíly, např. ve věku, koncentraci hledaného léku, atp, která je pomocí testové statistiky zamítnuta nebo nezamítnuta. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria podle aritmetického průměru a SD se porovná s tabulkovou hodnotou testovacího kritéria pro vypočítané stupně volnosti a zvolenou hladinu významnosti  $\alpha$ . Pokud vypočítaná hodnota

pro zvolené dva soubory překročí tabulkovou hodnotu testovacího kritéria, je nulová hypotéza zamítnuta a je potvrzen statistický významný rozdíl mezi vybranými dvěma soubory. Hodnoty testovacího kritéria a stupně volnosti byly vypočítány pomocí excelového souboru Studentův t-test dostupného z: <http://www.beranek.webzdarma.cz/vypocty.html> (dostupné 23.4.2017) a porovnány s tabulkami dostupnými z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/tabulky-1-1316614942.pdf> (dostupné 23.4.2017). (40). Jako statisticky významnou jsme určili jakoukoliv změnu na hladině významnosti  $< 0,05$ .

### 4.5.3. Chí kvadrát test

Chí kvadrát test dobré schody se používá pro ověření, jestli má náhodná veličina ve zkoumaném souboru stejné rozdělení pravděpodobnosti, jako v jiném, předem daném souboru. Toto rozdělení se nazývá chí-kvadrát rozdělení a náhodná veličina nabývá hodnot  $\chi^2$ . Jako příklad lze uvést například pacienty s akutní myeloidní leukémií (AML). Náhodná veličina bude počet pacientů s AML a vybraný soubor budou pacienti do 30 let, který by se porovnával se souborem pacientů s AML ve všech věkových skupinách. Nulovou hypotézou by pak bylo tvrzení, že mezi souborem pacientů do 30 let a souborem pacientů bez věkového omezení, není statisticky významný rozdíl ve výskytu AML. Pro analýzu dat ze sledovaného souboru pacientů byl použit chí-kvadrát test 3x2 pro 3 skupiny dostupný z: <http://www.beranek.webzdarma.cz/vypocty.html> (dostupné 23.4.2017) a porovnan s tabulkami kritického rozdělení  $\chi^2$  hodnot dostupných z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/tabulky-1-1316614942.pdf> (dostupné 23.4.2017). Vypočítaná hodnota testovacího kritéria  $\chi^2$  se porovná s tabulkovou hodnotou testovacího kritéria (stupně volnosti = 2 a hladinu významnosti  $\alpha$ ). Pokud vypočítaná hodnota  $\chi^2$  překročí hodnotu tabulkovou, vyvrátí se nulová hypotéza a potvrdí se statisticky významný rozdíl v rozdělení pravděpodobného výskytu mezi soubory. (41). Jako statisticky významnou jsme určili jakoukoliv změnu na hladině významnosti  $< 0,05$ .

## 5. Výsledky

### 5.1. Informativita a analytická vhodnost genetických markerů

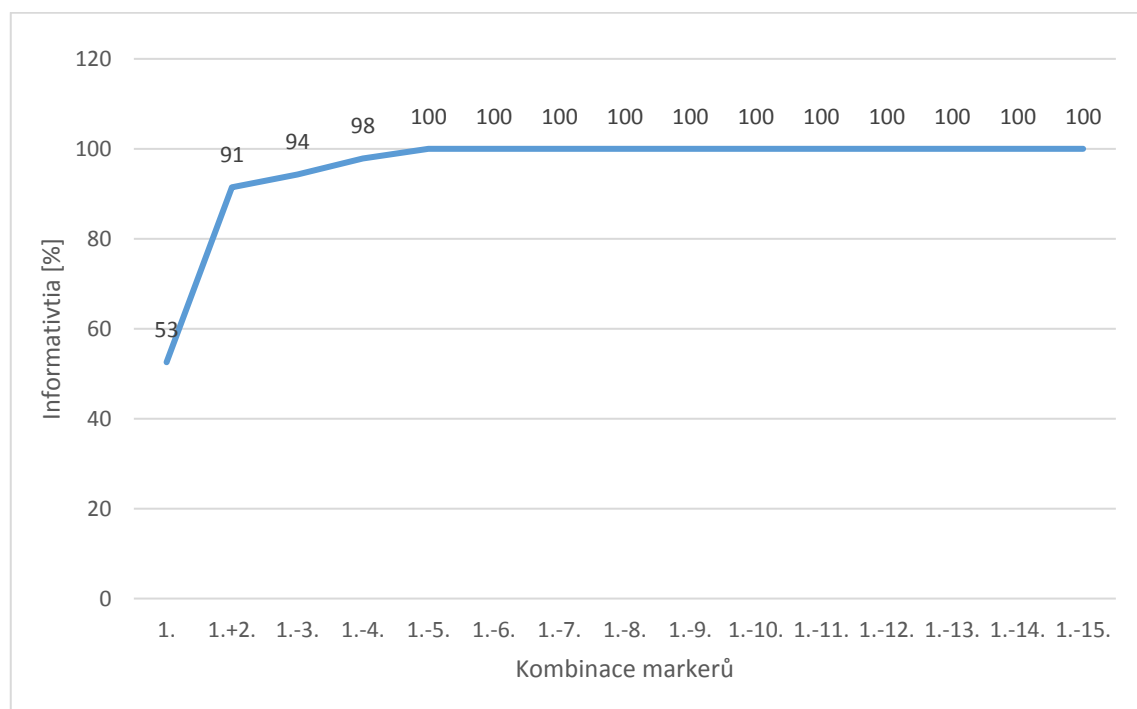
Každý klinicky použitelný genetický marker, který byl pro daný pár dárce a příjemce určen jako informativní a současně analyticky vhodný, byl označen jako „informativní a vhodný“ (tj., IV). U všech patnácti markerů byla poté vypočítána míra jejich IV vztažená na celkový počet transplantací a vyjádřena v procentech. Mezi první 3 markery s nejvyššími IV, seřazené sestupně patří: D21S11 (74 %), D2S1338 (74 %) a THO1 (71 %). Naopak mezi 3 markery s nejnižšími IV, vzestupně seřazené, patří: CSF1PO (46 %), D5S818 (47 %) a TPOX (56 %). Uvedená data jsou souhrnně zpracována v tabulce 6.

*Tabulka 6 - Seřazení genetických markerů dle informativnosti a vhodnosti*

Pořadí	Marker	Počet IV párů	Informativita a vhodnost [%]
1.	D21S11	103	74
2.	D2S1338	103	74
3.	THO1	99	71
4.	FGA	96	69
5.	D3S1358	91	65
6.	D7S820	89	64
7.	D13S317	89	64
8.	D8S1179	87	62
9.	D18S51	86	61
10.	D19S433	85	61
11.	D16S539	82	59
12.	vWA	81	58
13.	TPOX	79	56
14.	D5S818	66	47
15.	CSF1PO	65	46

Žádný z markerů nedosáhl samostatně plné informativity a vhodnosti pro všechny pacienty. Z toho vyplývá, že pokud by byl ke sledování postransplantačního chimerismu použit pouze jeden genetický marker, nebylo by možné vůbec hodnotit neinformativní pacienty. V klinické praxi je proto nutné používat několik genetických markerů současně. Pokud bychom z výše uvedené tabulky 5 postupně sčítali jednotlivé markery podle jejich klesající hodnoty IV, došli bychom postupně k počtu markerů, které zajistí, že bude možno hodnotit všechny pacienty. Tento počet se bude vyznačovat IV markerů 100 % při dané kombinaci markerů a bude znamenat, že všichni pacienti mají alespoň jeden informativní a zároveň vhodný genetický marker. V grafu 3 je tento postup znázorněn na základě reálných dat k jednotlivým markerům a lze z nich vyčíst, že informativity 100 % při hledání alespoň jednoho IV markeru pro naši populaci lze teoreticky dosáhnout při kombinaci nejméně prvních 5 nejneinformativnějších markerů: D21S11, D2S1338, TH01, FGA a D3S1358.

Graf 3 – Vzestup informativity a vhodnosti kombinací genetických markerů



### 5.2.1. Informativita a vhodnost markerů u příbuzenských a nepříbuzenských transplantací

Příbuzenské transplantace měly průměrně 7 vhodných markerů,  $SD = 2$  a s mediánem 6; nepříbuzenské transplantace měly průměrně 10 vhodných markerů,  $SD = 2$ , medián 10. Nulová hypotéza, že soubory příbuzenských a nepříbuzenských transplantací mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla dále hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.5.2. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se rovnala 9,25 (hodnota stupňů volnosti 42,94,  $\alpha = 0,95$ ) a přesáhla kritickou hodnotu 1,648 Studentova t rozdělení pro vypočítanou hodnotu stupně volnosti. Soubory příbuzenských a nepříbuzenských transplantací se tedy mezi sebou významně liší počtem použitelných IV markerů. Proto se při rozdělení souboru na příbuzenské a nepříbuzenské transplantace projeví statisticky nižší počet IV markerů u příbuzenských transplantací.

Informativita jednotlivých markerů se u příbuzenských transplantací pohybovala od 33 % do 57 % s průměrem 42 % ( $SD = 6$  %) a mediánem 40 %. U nepříbuzenských párů bylo jejich rozmezí od 49 % do 81 %, průměr 67 % ( $SD = 9$  %) a medián 67 %. Porovnání hodnot IV pro jednotlivé markery u příbuzenských a nepříbuzenských transplantací je souhrnně zpracováno a seřazeno podle klesající informativity v tabulce 7.

Z tabulky 7 je patrné, že markery D21S11, D2S1338 a D3S1358 se drží u obou skupin na pěti horních místech tabulky, ovšem s rozdílnou informativitou, která je u příbuzenských transplantací vždy nižší. Stejně tak markery TPOX, CSF1PO a D5S818 si zdrží přibližně stejná místa na spodních příčkách.

Nejrozdílnější postavení v obou tabulkách má marker FGA, který má u nepříbuzenských transplantací informativitu 78 % a je tak 4. nejinformativnějším markerem. U příbuzenských má marker FGA informativitu jen 33 % a je na posledním místě tabulky. Výrazné změny v postavení v obou tabulkách má také marker THO1, který má informativitu u nepříbuzenských transplantací 80 % a stojí si tak na 2. místě, a u příbuzenských jen 37 % s umístěním na 12. místě. Další výrazně rozdílné postavení v tabulkách má marker D7S820, který se u skupiny příbuzenských transplantací ocitl na prvním místě s informativitou 57 % a u nepříbuzenských na 9. místě s informativitou 65 %.

*Tabulka 7 – Porovnání hodnot IV u příbuzenských a nepříbuzenských transplantací*

Pořadí	Příbuzenské			Nepříbuzenské		
	Marker	IV páry	Informativita [%]	Marker	IV páry	Informativita [%]
1.	D7 S820	17	57	D21S11	89	81
2.	D2S1338	15	50	THO1	88	80
3.	D21S11	14	47	D2S1338	88	80
4.	D3S1358	14	47	FGA	86	78
5.	D13S317	14	47	D3S1358	77	70
6.	D19S433	14	47	D8S1179	75	68
7.	vWA	13	43	D13S317	75	68
8.	D8S1179	12	40	D18S51	74	67
9.	D16S539	12	40	D7S820	72	65
10.	D18S51	12	40	D19S433	71	65
11.	D5S818	12	40	D16S539	70	64
12.	THO1	11	37	vWA	68	62
13.	TPOX	11	37	TPOX	68	62
14.	CSF1PO	10	33	CSF1PO	55	50
15.	FGA	10	33	D5S818	54	49

### 5.2.2. Informativita a vhodnost markerů v souvislosti s pohlavní shodou příjemce/dárce

Po rozdělení souboru transplantovaných párů na ty, kde měli příjemce i dárce shodné pohlaví a kde naopak pohlaví shodné nebylo, byla data o markerech souhrnně zpracována a seřazena podle klesající informativity do tabulky 8. První 4 markery s nejvyšší informativitou (D21S11, D2S1338, THO1 a FGA) si drží obdobné pozice v obou podsouborech. Marker D7S820 má sice v obou podsouborech přibližně stejné počty informativních párů (45 a 44), ale jeho informativita dosáhla u pohlavně shodných párů jen na 56 % (12. místo v tabulce), na rozdíl od jeho informativity u pohlavně neshodných párů (73 %, 2. místo v tabulce). Na posledních místech tabulky se v obou

případech ocitají markery D5S818 a CSF1PO, které ani v jednom případě nemají informativitu vyšší než 50 %.

Pohlavně shodné páry měly v našem souboru průměrně 9 IV markerů, SD = 3 markery, medián 10 markerů. Neshodné páry měly průměrně 10 markerů, SD = 2 markery a medián taktéž 10 markerů. Nulová hypotéza, že soubory shodných a neshodných párů příjemce/dárce mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.5.2. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se rovnala 0,88 (hodnota stupňů volnosti 137,  $\alpha = 0,95$ ). Soubory shodných a neshodných párů příjemce/dárce proto mezi sebou neměly statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů.

*Tabulka 8 – Porovnání informativity markerů u párů se shodným/neshodným pohlavím dárce a příjemce*

Pořadí	Shodné v pohlaví			Neshodné v pohlaví		
	Marker	IV páry	Informativita [%]	Marker	IV páry	Informativita [%]
1.	D21S11	58	74	D21S11	45	73
2.	D2S1338	58	74	D7S820	45	73
3.	THO1	56	72	D2S1338	45	73
4.	FGA	53	68	THO1	43	69
5.	D3S1358	52	67	FGA	43	69
6.	D13S317	49	63	D18S51	41	66
7.	D19S433	49	63	D8S1179	40	65
8.	D8S1179	47	60	D13S317	40	65
9.	D16S539	47	60	D3S1358	39	63
10.	TPOX	45	58	vWA	38	61
11.	D18S51	45	58	D19S433	36	58
12.	D7S820	44	56	D16S539	35	56
13.	vWA	43	55	TPOX	34	55
14.	D5S818	38	49	CSF1PO	28	45
15.	CSF1PO	37	47	D5S818	28	45



## 5.2. Hodnocení spektra genetických markerů podle jejich informativity a vhodnosti

Genomická variabilita mezi příjemcem a dárcem (tzv. transplantačního pár) je vyjádřena počtem IV markerů, tedy počtem markerů, které jsou informativní pro daný pár a zároveň vhodné pro analýzu postransplantačního chimerismu. Na reálném počtu IV markerů pro každý pár se může hypoteticky podílet více faktorů, jako například příbuznost dárce a příjemce, shoda či neshoda v pohlaví nebo míra shody v HLA systému. Za účelem zjištění reálného vlivu uvedených faktorů byla data všech 140 pacientů a dárců jejich transplantovaného štěpu zpracována a podrobena statistické analýze.

### 5.2.1. Vliv příbuznosti na počet IV markerů

V průměru měly všechny transplantační páry devět IV markerů (SD = 2 markery) a medián 10 markerů. Příbuzenské transplantace (n = 30) měly nižší počty sledovaných IV markerů, průměrně sedm (SD = 2 markery) s mediánem 6 markerů. Nepříbuzenské transplantace (n = 110) dosahovaly podobných hodnot jako celý soubor, průměrně měly deset IV markerů (SD = 2 markery) a medián 10 markerů.

Při vyslovení nulové hypotézy, že příbuzenské a nepříbuzenské transplantace mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.5.2. Vypočítané hodnoty testovacího kritéria se rovnaly 8,41 (hodnota stupňů volnosti 42,94;  $\alpha = 0,0005$ ). Příbuzenské a nepříbuzenské transplantace mezi sebou mají statisticky významný rozdíl v průměrném počtu IV markerů. Příbuzenské transplantace poskytují významně méně sledovatelných genetických markerů.

### 5.2.2. Vliv vyšší a nižší shody znaků v HLA systému na počet IV markerů

Mezi hodnocenými páry příjemců a dárců bylo 100 párů se shodou 10/10 znaků HLA systému a 40 párů s nižší shodou. Páry s 10 shodnými znaky měly průměrně devět IV markerů (SD = 3 markery) a medián taktéž 9 markerů. Oproti nim měly páry s 9 a méně shodnými znaky v HLA systému vyšší počty IV markerů, průměrně 11 (SD = 2

markery) s mediánem 11 markerů. Všechny páry dohromady měly v průměru devět IV markerů (SD = 2 markery) a medián byl 10 markerů.

Při vyslovení nulové hypotézy, že páry s vyšší a nižší shodou znaků v HLA systému mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.5.2. Vypočítané hodnoty testovacího kritéria se rovnaly 4,09 (hodnota stupňů volnosti 94,14;  $\alpha = 0,0005$ ). Páry s vyšší a nižší shodou znaků v HLA systému mezi sebou tedy mají statisticky významný rozdíl v počtu použitelných IV markerů.

Transplantační páry se shodou 10 z 10 znaků HLA systému mají významně méně sledovatelných genetických markerů.

### 5.2.3. Vliv shody pohlaví příjemce a dárce na počet IV markerů

Ze všech 140 pacientů mělo 77 pacientů (55 %) stejné pohlaví s dárce svého transplantovaného štěpu a 63 pacientů (45 %) získalo štěp od dárce opačného pohlaví. Průměrně měly shodné páry devět IV markerů (SD = 3 markery) a neshodné páry deset IV markerů (SD = 2 markery), obě skupiny měly stejný medián 10 markerů. Všichni pacienti bez rozdělení měli v průměru devět IV markerů (SD = 2 markery) s mediánem 10 markerů.

Při vyslovení nulové hypotézy, že páry se stejným pohlavím a páry s pohlavím rozdílným mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.8. Vypočítané hodnoty testovacího kritéria se rovnaly 0,64 (hodnota stupňů volnosti 137,29;  $\alpha = 0,25$ ). Páry se stejným pohlavím a páry s pohlavím rozdílným mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů.

Na počet použitelných genetických markerů nemá vliv, zda byl dárce a příjemce štěpu shodného pohlaví.

### 5.3. - Hodnocení úspěšnosti transplantační léčby s ohledem na dosaženou aktivitu štěpu

Za účelem hodnocení aktivity transplantovaného štěpu v potransplantačním období byli pacienti v souboru rozděleni do 3 skupin. Skupina A (n = 66) obsahovala příjemce štěpu, kteří jsou naživu a jejich štěp vykazuje dlouhodobě optimální aktivitu bez kolísání chimerismu pod 95 %, proto byla pro další hodnocení použita jako skupina referenční. Skupinu B (n = 49) tvořili pacienti s nízkou aktivitou štěpu, kteří jsou naživu nebo po smrti a jejich chimerismus dosahoval hodnot nižších než 95 %. Poslední skupinu C (n = 25) tvořili pacienti s vysokou aktivitou štěpu bez kolísání chimerismu pod 95 %, ale oproti referenční skupině jsou tito pacienti po smrti, nebo byli retransplantováni například z důvodu výskytu GVHD. Následující hypotézy 1-7 se pokusí prokázat některé faktory, které by mohly podmiňovat různou aktivitu štěpu v organismu a ovlivnit tak úspěšnost transplantační léčby.

#### 5.3.1. Ověření hypotézy 1: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje diagnóza příjemce

Hypotézou 1 je tvrzení, že skupiny A, B a C se vzájemně liší poměrným zastoupením jednotlivých skupin diagnóz. Data pacientů, rozdělená podle příslušnosti do dané skupiny, byla souhrnně zpracována v tabulce 9.

U všech 3 skupin je nejvíce zastoupená AML, s nejvýraznějším procentuálním zastoupením u skupiny A (47 %). U skupiny A jsou po AML dále nejvíce zastoupené ALL (18 %) a myelodysplastické syndromy (11 %), nejméně naopak mnohočetné myelomy (2 %) a idiopatické aplastické anémie (3 %). Jedině v této skupině se objevuje idiopatická aplastická anémie, a naopak se vůbec neobjevuje chronická monocytární leukémie. Ve skupině B jsou po AML nejvíce zastoupené ALL (20 %) a CLL (10 %), nejméně naopak mnohočetné myelomy (2 %). Ve skupině C má CLL (24 %) podobný výskyt jako v ostatních skupinách velmi častá AML (28 %). Velmi často se zde oproti ostatním skupinám vyskytují také myelodysplastické syndromy a lymfomy (oboje 12 %). Nejméně jsou ve skupině C zastoupeny mnohočetné myelomy a chronické monocytární leukémie, oboje ve 4 %.

*Tabulka 9 – Procentuální zastoupení skupin diagnóz ve skupinách A, B a C*

Skupina diagnóz	A	[%]	B	[%]	C	[%]
AML	31	47	19	39	7	28
ALL	12	18	10	20	2	8
Myelodysplastické syndromy	7	11	3	6	3	12
Lymfomy	5	8	4	8	3	12
Chronické myeloproliferace	5	8	4	8	2	8
CLL	3	5	5	10	6	24
Idiopatická aplastická anémie	2	3	0	0	0	0
Mnohočetné myelomy	1	2	1	2	1	4
Chronické monocytární leukémie	0	0	3	6	1	4
Celkem	66		49		25	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Kritické hodnoty  $\chi^2$  a hladiny významnosti p jsou pro jednotlivé diagnózy (při stupni volnosti 2) uvedeny v tabulce 10. U této hypotézy nebyly posuzovány mnohočetné myelomy, idiopatická aplastická anémie a chronické monocytární leukémie pro malý počet pacientů a nízkou spolehlivost statistické analýzy. Z výsledků je patrné, že u CLL byl prokázán její statisticky významný rozdíl v zastoupení v jednotlivých skupinách.

*Tabulka 10 – Hodnoty chí-kvadrátového testu pro dané skupiny diagnóz*

Skupina diagnóz	$\chi^2$	P
AML	2,821	0,25
ALL	1,889	0,5
Myelodysplastické syndromy	0,937	0,5
Lymfomy	0,469	0,5
Chronické myeloproliferace	0,014	0,5
CLL	7,628	0,025

Závěr: U diagnózy CLL je statisticky významnější riziko vzniku GVHD nebo úmrtí při vysoce aktivním štěpu.

### 5.3.2. Ověření hypotézy 2: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje věk příjemce

U hypotézy 2 ověřujeme tvrzení, že skupiny A, B a C se mezi sebou liší v průměrném věku příjemce v době transplantace. Průměrný věk pacientů ve skupině A byl 48 let (SD = 13 let) s mediánem věku pacientů 52 let a pohyboval se v nejširším věkovém rozmezí od 21 do 70 let. Věk pacientů ve skupině B se pohyboval naopak v nejužším věkovém rozmezí, nejmladšímu pacientovi bylo 30 let a nejstaršímu 69 let, průměrně dosažený věk pacientů byl 54 let (SD = 11 let) a medián 57 let. Věk pacientů v poslední skupině C se pohyboval ve věkovém rozmezí od 18 do 65 let s průměrem 51 let (SD = 13 let) a mediánem věku 55 let.

Při vyslovení nulové hypotézy, že skupiny A, B a C mezi sebou nemají statisticky významný věkový rozdíl, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsáním v kapitole 4.5.2. Skupiny B a C byly hodnoceny proti referenční skupině A. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se pro skupinu B rovnala 2,68 (hodnota stupňů volnosti = 111,01;  $\alpha = 0,995$ ) a pro skupinu C 1,53 (hodnota stupňů volnosti 67,21;  $\alpha = 0,95$ ). Mezi skupinou B a skupinou referenční byl nalezen statisticky významný rozdíl v průměrném věku příjemce štěpu.

Závěr: Nízkou aktivitu štěpu statisticky významně ovlivňuje vyšší věk příjemce transplantovaného štěpu.

### 5.3.3. Ověření hypotézy 3: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje pohlaví příjemce

U této hypotézy ověřujeme, zda se dané skupiny lišily zastoupením mužů a žen. 66 pacientů zařazených do skupiny A tvořilo 56 % mužů a 44 % žen. Skupinu B, která obsahovala celkem 49 pacientů, tvořilo 51 % mužů a 49 % žen, a proto byla nejvyrovnanější skupinou s ohledem zastoupení obou pohlaví. Poslední skupinu C (n = 25) tvořili z 56 % muži a ze 44 % ženy a byla proto napohled nejrozdílnější skupinou. Uvedená data včetně absolutních počtů pacientů jsou souhrnně zpracována v tabulce 11.

*Tabulka 11 – Procentuální zastoupení mužů a žen ve skupinách A, B a C*

Pohlaví	A	[%]	B	[%]	C	[%]
muži	37	56	25	51	15	60
ženy	29	44	24	49	10	40
celkem	66		49		25	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 0,60 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). V zastoupení mužů a žen mezi jednotlivými skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

Závěr: Pohlaví příjemce nemá významný vliv na dosaženou aktivitu štěpu.

#### 5.3.4. Ověření hypotézy 4: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje příbuznost příjemce a dárce

U hypotézy 4 se ověřuje tvrzení, že dané skupiny se liší v zastoupení příbuzenských a nepříbuzenských alogenních transplantací PKB. Ve skupině A bylo 74 % nepříbuzenských a 26 % příbuzenských transplantací a byla proto nejvyrovnanější skupinou s ohledem na výskyt příbuzenských a nepříbuzenských párů. Ve skupině B bylo 82 % nepříbuzenských a 18 % příbuzenských transplantací PKB. Tato skupina nejvíce odpovídala rozdělení příbuzenských a nepříbuzenských transplantací v celém souboru, uvedeném v kapitole 4.1.4. Poslední skupina C byla nejrozdílnější, protože byla zastoupena z 84 % nepříbuzenskými a z 16 % příbuzenskými transplantacemi. Uvedená data i s absolutními počty pacientů v uvedených skupinách jsou souhrnně zpracována v tabulce 12.

*Tabulka 12 – Rozložení příbuzenských a nepříbuzenských transpl. ve skupinách A, B a C*

Příbuznost	A	[%]	B	[%]	C	[%]
Příbuzné	17	26	9	18	4	16
Nepříbuzné	49	74	40	82	21	84
celkem	66		49		25	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 1,44 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). Mezi jednotlivými skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v zastoupení vzájemně příbuzných a nepříbuzných párů.

Závěr: Příbuzenský, popřípadě nepříbuzenský vztah dárce a příjemce nemá vliv na aktivitu transplantovaného štěpu.

### 5.3.5. Ověření hypotézy 5: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje pohlavní shoda mezi příjemcem a dárce

Základem hypotézy 5 je tvrzení, že uvedené skupiny se liší počtem pohlavně shodných transplantací oproti počtu pohlavně neshodných. Průměrnému rozložení v celém souboru (56 % shodných a 44 % neshodných transplantací PKB), uvedenému v kapitole 4.1.5. přesně odpovídá rozložení v referenční skupině A. Nejvyšší výskyt pohlavně neshodných párů oproti ostatním skupinám byl ve skupině B, kde jich bylo 47 %, oproti 53 % pohlavně shodných párů. Naopak nejvyšší výskyt pohlavně shodných párů byl ve skupině C, kde jich bylo 60 %; 40 % párů bylo pohlavně neshodných. Uvedená data i s absolutními počty pacientů jsou souhrnně zpracována v tabulce 13.

*Tabulka 13 – Rozložení pohl. shodných a neshodných transplantací ve skupinách A,B,C*

Shodnost	A	[%]	B	[%]	C	[%]
Shodné	37	56	26	53	15	60
Neshodné	29	44	23	47	10	40
Celkem	66		49		25	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 0,33 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v zastoupení pohlavně shodných a neshodných párů.

Závěr: Shodnost pohlaví dárce a příjemce nemá vliv na dosaženou aktivitu transplantovaného štěpu.

### 5.3.6. Ověření hypotézy 6: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje shoda HLA znaků mezi příjemcem a dárce

U hypotézy 6 testujeme tvrzení, že uvedené skupiny se liší shodou počtu HLA znaků, která byla buď 10/10 znaků, nebo méně než 10/10 znaků. Ve skupině A bylo 78 % párů se shodou 10/10 znaků v systému HLA a 22 % párů s méně než 10 shodnými znaky. Skupina A byla skupinou s nejvyšším procentem párů se shodou 10/10 znaků v HLA systému. Ve skupině B bylo 71 % párů shodných 10/10 v HLA systému a 29 % párů, které měly méně než 10 shodných znaků. Tato skupina nejvíce odpovídala rozdělení shodných a neshodných párů v celém souboru (72 % a 28 %), uvedenému v kapitole 4.1.4. Ve skupině C bylo 67 % párů shodných v HLA systému a 33 % párů s méně než 10 shodnými znaky, a byla proto skupinou s nejvyšším procentem párů s méně než 10 shodnými znaky v HLA systému. Uvedená data i absolutní počty pacientů jsou souhrnně zpracovány v tabulce 14.

*Tabulka 14 – Shoda ve znacích HLA systému ve skupinách A, B a C*

Shoda	A	[%]	B	[%]	C	[%]
10/10	48	73	35	71	17	68
<10/10	18	27	14	29	8	32
Celkem	66		49		25	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 0,20 (hodnota stupňů



volnosti 2,  $p = 0,5$ ). Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v zastoupení párů s HLA shodou 10/10 a párů se shodou nižší.

Závěr: Výslednou aktivitu štěpu nelze predikovat na základě počtu shodných znaků v HLA systému.

### 5.3.7. Ověření hypotézy 7: Aktivitu štěpu v organismu ovlivňuje variabilita genomu příjemce a dárce vyjádřená počtem IV genetických markerů

U této hypotézy ověřujeme tvrzení, že uvedené skupiny se liší průměrným počtem všech IV markerů zjištěných u jednotlivých párů příjemce/dárce štěpu. Referenční skupina A měla průměrný počet IV markerů 9 (SD = 2) a medián 10 markerů. Skupina B byla v počtu IV markerů totožná s referenční skupinou, měla průměrně devět IV markerů (SD = 2) a medián 10 markerů. Ve skupině C měli pacienti průměrně deset IV markerů (SD = 3) a medián 11 markerů.

Při vyslovení nulové hypotézy, že skupiny A, B a C mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsáním v kapitole 4.5.2. Skupiny B a C byly hodnoceny proti referenční skupině A. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se pro skupinu B rovnala 0,56 (hodnota stupňů volnosti = 107,34;  $\alpha = 0,75$ ) a pro skupinu C se rovnaly 0,96 (hodnota stupňů volnosti = 39,77;  $\alpha = 0,75$ ). Skupiny B a C neměly v porovnání s referenční skupinou A statisticky významný rozdíl v průměrném počtu IV genetických markerů.

Závěr: Počet IV genetických markerů pro jednotlivé páry, a tedy přeneseně variabilita jejich genomů, neovlivňují aktivitu štěpu v potransplantační období.

## 5.4. Hodnocení úmrtí v potransplantačním období s ohledem na dosaženou aktivitu štěpu

Ze souboru 140 pacientů zemřelo v potransplantačním období 55 osob (39 %). Pro hodnocení hypotéz o úmrtí v postransplantačním období, byli pacienti s ohledem na dosaženou aktivitu štěpu rozděleni do 3 skupin. Skupina D obsahovala 32 úmrtí, u nichž chimerismus kolísal pod 95 %. Ve skupině E bylo 23 pacientů, kteří zemřeli s vysoce aktivním štěpem a jejich chimerismus dosahoval hodnot 95-100 %. Jako referenční skupina byla určena skupina F s 66 pacienty, kteří jsou naživu a mají štěp s optimální aktivitou. Jejich chimerismus kolísal v rozmezí 95-100 % a neklesl pod hranici 95 %.

Do hodnocení nebyli zahrnuti pacienti s nízkou aktivitou štěpu, kteří jsou naživu (n = 17) a dále pak pacienti, kteří byli určeni k retransplantaci z důvodu vysoké aktivity štěpu (n = 2). Cílem následujících hypotéz 1-7 je snaha pokusit se definovat určité faktory, které by mohly určit a predikovat různou dobu přežití pacientů v potransplantačním období. Tyto faktory by v budoucnu mohly sloužit k úpravě potransplantační léčby.

### 5.4.1. Ověření hypotézy 1: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje diagnóza příjemce

U hypotézy 1 jsme ověřovali tvrzení, že skupiny D, E a F se vzájemně liší v procentuálním zastoupení jednotlivých skupin diagnóz. Data pacientů, rozdělená podle příslušnosti do dané skupiny, jsou souhrnně zpracována v tabulce 15.

U všech 3 skupin je nejvíce zastoupená AML, nejvíce u skupiny F (47 %), u skupiny D byla diagnostikována v 38 % případů, a nejméně se vyskytovala ve skupině E (29 %). U skupiny D se kromě AML velmi často objevuje ALL (25 %), která má v této skupině své nejvýraznější zastoupení. Nejméně se naopak vyskytují mnohočetné myelomy a chronická monocytární leukémie (oboje 3 %). Ve skupině E je po AML nejvíce zastoupena CLL (25 %), která se na první pohled v ostatních skupinách tolik nevyskytuje. Obecně nejméně se vyskytují mnohočetné myelomy, idiopatická aplastická anémie (oboje 4 %). ALL se v této skupině na rozdíl od ostatních skupin nevyskytuje vůbec. Skupina F se od skupin D a E nejvýrazněji odlišuje ve vysokém záchytu AML (47 %) a nižším výskytu CLL (5 %). V této jediné skupině se vyskytuje idiopatická aplastická anémie (3 %). Data jsou včetně absolutních počtů souhrnně zpracována v tabulce 15.

*Tabulka 15 – Procentuální zastoupení skupin diagnóz ve skupinách D, E a F*

Diagnóza	D	[%]	E	[%]	F	[%]
AML	12	38	7	29	31	47
ALL	8	25	0	0	12	18
CLL	3	9	6	25	3	5
Myelodysplastické syndromy	3	9	3	13	7	11
Lymfomy	2	6	3	13	5	8
Chronické myeloproliferativní nemoci	2	6	2	8	5	8
Mnohočetné myelomy	1	3	1	4	1	2
Chronické monocytární leukémie	1	3	1	4	0	0
Idiopatická aplastická anémie	0	0	0	0	2	3
Celkem	32		24		66	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Kritické hodnoty  $\chi^2$  a hladiny významnosti p jsou pro jednotlivé diagnózy (stupeň volnosti = 2) uvedeny v tabulce 16. Při testování diagnóz nebyly posuzovány mnohočetné myelomy, idiopatická aplastická anémie a chronické monocytární leukémie pro malý počet pacientů a nízkou spolehlivost statistické analýzy. V zastoupení ALL a CLL v jednotlivých skupinách byl zjištěn statisticky významný rozdíl, viz tabulka 16.

*Tabulka 16 – Hodnoty chí-kvadrátového testu pro dané skupiny diagnóz*

Skupina diagnóz	$\chi^2$	P
AML	2,524	0,25
ALL	6,350	0,025
CLL	8,313	0,025
MDS	0,141	0,5
lymfomy	0,786	0,5
CMN	0,095	0,5

Závěr: U diagnózy CLL je statisticky významnější riziko vzniku GVHD nebo úmrtí při vysoce aktivním štěpu. U diagnózy ALL je naopak toto riziko statisticky nižší.

#### 5.4.2. Ověření hypotézy 2: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje věk příjemce

U hypotézy 2 jsme se snažili prokázat, zda se skupiny D, E a F mezi sebou liší z hlediska průměrného věku při transplantaci. Věkové rozmezí pacientů bylo ve skupině D nejvyšší, nejmladšímu pacientovi bylo 31 let a nejstaršímu 66 let, průměrně 55 let (SD = 10 let), s mediánem věku 57 let. Ve skupině E byl průměrný věk pacientů 51 let (SD = 12 let), medián věku 53 let a věk pacientů se pohyboval ve věkovém rozmezí od 23 do 65 let. Průměrný věk pacientů v referenční skupině F byl 48 let (SD = 13 let) s mediánem věku pacientů 52 let při nejširším věkovém rozmezí (v rámci daných tří skupin) od 21 do 70 let.

Při vyslovení nulové hypotézy, že skupiny D, E a F mezi sebou nemají statisticky významný věkový rozdíl, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsáným v kapitole 4.5.2. Skupiny D a E byly hodnoceny proti referenční skupině F. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se pro skupinu D rovnala 2,85 (hodnota stupňů volnosti = 80,41;  $\alpha = 0,9975$ ) a pro skupinu E 0,46 (hodnota stupňů volnosti 40,34;  $\alpha = 0,75$ ). Mezi skupinou D a referenční skupinou F byl potvrzen statisticky významný rozdíl ve věku příjemce.

Závěr: Úmrtí při nízké aktivitě štěpu ve sledovaném potransplantačním období bylo statisticky významně ovlivněno vyšším věkem příjemce v době transplantace.

#### 5.4.3. Ověření hypotézy 3: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje pohlaví příjemce

U této hypotézy jsme ověřovali, zda se dané skupiny lišily zastoupením mužů a žen. 32 pacientů zařazených do skupiny D tvořilo 44 % mužů a 56 % žen. Skupinu E, která obsahovala celkem 23 pacientů, tvořilo 57 % mužů a 43 % žen, a proto byla svým rozložením více podobná referenční skupině. Tuto referenční skupinu F (n = 66) tvořili z 56 % muži a ze 44 % ženy a byla proto napohled nejvyrovnanější skupinou z hlediska

zastoupení mužů a žen. Uvedená data včetně absolutních počtů pacientů jsou souhrnně zpracována v tabulce 17.

*Tabulka 17- Procentuální zastoupení mužů a žen ve skupinách D, E a F*

Pohlaví	D	[%]	E	[%]	F	[%]
Muži	14	44	13	57	37	56
Ženy	18	56	10	43	29	44
Celkem	32		23		66	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovací kritéria byla 1,46 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). V zastoupení mužů a žen mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl.

Závěr: Úmrtnost pacientů není statisticky ovlivněna pohlavím příjemce.

#### 5.4.4. Ověření hypotézy 4: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje příbuznost příjemce a dárce

U hypotézy 4 se ověřovalo tvrzení, že dané skupiny pro hodnocení úmrtnosti se liší v zastoupení příbuzenských a nepříbuzenských alogenních transplantací PKB. Ve skupině D bylo 84 % nepříbuzenských a 16 % příbuzenských transplantací. Ve skupině E bylo 87 % nepříbuzenských a 13 % příbuzenských transplantací PKB. Referenční skupina F byla relativně nejvyrovnanější skupinou z hlediska rozložení příbuzenských a nepříbuzenských transplantací, protože byla zastoupena ze 74 % nepříbuzenskými a z 26 % příbuzenskými transplantacemi a na první pohled se odlišovala svým rozložením od prvních 2 skupin. Uvedená data i s absolutními počty pacientů v daných skupinách jsou souhrnně zpracována v tabulce 18.

*Tabulka 18 - Rozložení příbuzenských a nepříbuzenských transp. ve skupinách D, E a F*

Příbuznost	D	[%]	E	[%]	F	[%]
Příbuzenské	5	16	3	13	17	26
Nepříbuzenské	27	84	20	87	49	74
Celkem	32		23		66	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 2,36 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,25$ ). V zastoupení příbuzných a nepříbuzných párů mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl.

Závěr: Příbuzenský, popřípadě nepříbuzenský vztah dárce a příjemce nemá vliv na úmrtnost pacientů po transplantaci.

#### 5.4.5. Ověření hypotézy 5: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje pohlavní shoda mezi příjemcem a dárce

Základem hypotézy 5 bylo tvrzení, že uvedené skupiny se liší počtem pohlavně shodných transplantací oproti počtu pohlavně neshodných. Průměrnému rozložení v celém souboru (56 % shodných a 44 % neshodných transplantací PKB), uvedenému v kapitole 4.1.5. přesně odpovídá rozložení v referenční skupině F. Ve skupině D bylo naprosto vyrovnané rozložení transplantačních párů se shodným pohlavím a párů s neshodným pohlavím. Výskyt pohlavně neshodných párů ve skupině E (39 %) více odpovídá rozložení v referenční skupině. Uvedená data i s absolutními počty pacientů jsou souhrnně zpracována v tabulce 19.

*Tabulka 19 – Rozložení pohlavně shodných/neshodných transpl. ve skupinách D, E a F*

Shoda	D	[%]	E	[%]	F	[%]
Shodné	16	50	14	61	37	56
Neshodné	16	50	9	39	29	44
Celkem	32		23		66	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 0,67 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). V zastoupení pohlavně shodných a neshodných párů mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl.

Závěr: Shodnost pohlaví dárce a příjemce nemá vliv na úmrtnost pacientů ve sledovaném potransplantačním období.

#### 5.4.6. Ověření hypotézy 6: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje shoda HLA znaků mezi příjemcem a dárce

U hypotézy 6 jsme testovali tvrzení, že skupiny D, E a F se mezi sebou liší shodou počtu HLA znaků, která byla buď 10/10 znaků, nebo méně než 10/10 znaků. Ve skupině D bylo 63 % párů se shodou 10/10 znaků v systému HLA a 38 % párů se shodou nižší než 10/10. Skupina 1 byla skupinou s nejvyšším procentem párů se shodou 9 a méně znaků v HLA systému. Ve skupině E bylo 70 % párů shodných 10/10 znaků v HLA systému a 30 % párů, které měli méně než 10 shodných znaků. Tato skupina byla svým rozložením shodných a neshodných párů v HLA systému více podobná referenční skupině F, než skupina D. V referenční skupině F bylo 73 % párů shodných v 10 znacích HLA systému a 27 % párů s méně než 10 shodnými znaky a byla proto skupinou s nejvyšším procentem párů s 10 shodnými znaky v HLA systému. Tato skupina zároveň spolu se skupinou E odpovídala rozdělení shodných a neshodných párů v celém souboru (72 % a 28 %), uvedenému v kapitole 4.1.4. Uvedená data i absolutní počty pacientů jsou souhrnně zpracovány v tabulce 20.

*Tabulka 20 – Shoda ve znacích HLA systému ve skupinách D, E a F*

Shoda	D	[%]	E	[%]	F	[%]
10/10	20	63	16	70	48	73
<10/10	12	38	7	30	18	27
Celkem	32		24		66	

Hypotéza byla testována pomocí chí-kvadrátového testu 3x2, popsaného v kapitole 4.5.3. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla 1,06 (hodnota stupňů volnosti 2,  $p = 0,5$ ). Mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v zastoupení párů se shodou 10/10 znaků HLA systému a párů s nižší shodou.

Závěr Na základě počtu shodných znaků v HLA systému nelze predikovat, zda pacient časněji zemře v potransplantačním období.

#### 5.4.7. - Ověření hypotézy 7: Úmrtnost po transplantaci ovlivňuje variabilita genomu příjemce a dárce vyjádřená počtem IV genetických markerů.

U této hypotézy jsme analyzovali, zda se uvedené skupiny pro hodnocení úmrtnosti liší průměrným počtem IV markerů zjištěných u jednotlivých párů příjemce/dárce štěpu. Referenční skupina F měla průměrný počet devět IV markerů (SD = 2) a medián 10 markerů. Skupina E byla v počtech IV markerů totožná s referenční skupinou, měla průměrně devět IV markerů (SD = 2) a medián 10 markerů. Ve skupině D měli pacienti průměrně deset IV markerů (SD = 3) a medián 11 markerů.

Při vyslovení nulové hypotézy, že skupiny D, E a F mezi sebou nemají statisticky významný rozdíl v počtu IV markerů, byla data hodnocena Studentovým t-testem, popsaným v kapitole 4.5.2. Skupina D testována nebyla, protože má stejné hodnoty jako referenční skupina F. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se pro skupinu E rovnala 1,52 (hodnota stupňů volnosti 30,75;  $\alpha = 0,05$ ). Skupiny D a E neměly statisticky významný rozdíl v průměrném počtu IV genetických markerů v porovnání s referenční skupinou F.

Závěr: Variabilita genomů jednotlivých párů vyjádřená počtem jejich IV markerů, neovlivnila úmrtnost pacientů ve sledovaném potransplantačním období.



## 6. Diskuze

Použití vysoce variabilních genetických markerů pro sledování potransplantačního chimerismu se v mnoha studiích a na mnoha klinických pracovištích potvrdilo jako vhodné, s tím, že každá z využívaných metod má své pro a proti s ohledem na citlivost vyšetření, finanční a časové nároky a proveditelnost v klinické praxi. Jednou z nejrozšířenějších metod v klinické praxi je vyšetření chimerismu pomocí analýzy genetické variability STR lokusů. (3)

Pro správné provedení vyšetření chimerismu metodou analýzy STR lokusů je nutné počáteční vyšetření dárce i příjemce, kdy se určí vzájemná informativita a vhodnost markerů. Pokud je k vyšetření chimerismu zvolen špatný marker, tedy neinformativní nebo nevhodný, může dojít k falešné negativitě výsledku, například označení chimerismu za kompletní, i když v organismu současně existuje dárcova i příjemcova krvetvorba, která nebyla tímto vyšetřením spolehlivě odhalena. Chybné označení chimerismu za kompletní pak může vést k mylné představě, že štěp funguje optimálně. To pak ve svém důsledku může vést až k relapsu onemocnění či úmrtí pacienta, protože nebyla včas léčebně potlačena obnova původní krvetvorby.

Odriozola et al. provedli v roce 2012 studii, která se zabývala možnostmi vyšetření chimerismu v případě, že genetický materiál dárce a/nebo příjemce není dostupný. Jejich vyšetření je založeno na klasické metodě vyšetření STR lokusů, ale pro kvantifikaci chimerismu byl navržen jiný postup. Zakládá se na předpokladu, že dvě heterozygotní alely jednoho lokusu vykazují na elektroforeogramu stejnou intenzitu signálu (plochu, popřípadě výšku píku), a tudíž se v případě obnovení dárcovské složky krvetvorby změní poměr jejich intenzit. Vytvořením algoritmu, který porovnává výšky (plochy) píků se všemi možnými kombinacemi alel dárce a příjemce, lze procentuálně vypočítat přítomný chimerismus. Pro aplikaci algoritmu na daný genový lokus je nutné, aby aspoň jeden z páru příjemce/dárce byl heterozygotní a sdílené alely nebyly zahrnuty do algoritmu. Predikované hodnoty chimerismu pomocí algoritmu odpovídaly hodnotám dosaženým při klasické interpretaci a algoritmus byl navržen jako vhodný pro využití i do klinické praxe. (42)

Pro vyšetření chimerismu metodou analýzy STR lokusů existují komerčně vyráběné kity, které umožňují rychlejší a snazší přípravu vzorku k analýze i samotnou analýzu. Mezi jedny z nejpoužívanějších slouží souprava AmpFISTR Identifier Kit (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, USA) určená pro analýzu 15 STR lokusů, která byla použita i pro praktickou část této diplomové práce. Z těchto 15 markerů analytik vybere vždy 3–4 markery nejvhodnější pro daný transplantační pár. Při požadavku určit alespoň jeden IV marker, je podle provedené analýzy získaných dat nutné vyšetřit minimálně 5 markerů. Kdybychom hledali alespoň dva IV markery pro každého ze 140 transplantovaných jedinců, museli bychom vyšetřit minimálně prvních 12 markerů. A konečně, pokud hledáme minimálně tři IV markery, tak jak je to běžné i v klinické praxi, musí se vyšetřovat alespoň prvních 13 markerů, seřazených podle klesající informativity. Graficky je vyjádřena závislost minimálního počtu potřebných markerů, které je nutné použít k vyšetření, na počtu klinicky požadovaných IV markerů v grafu 4.

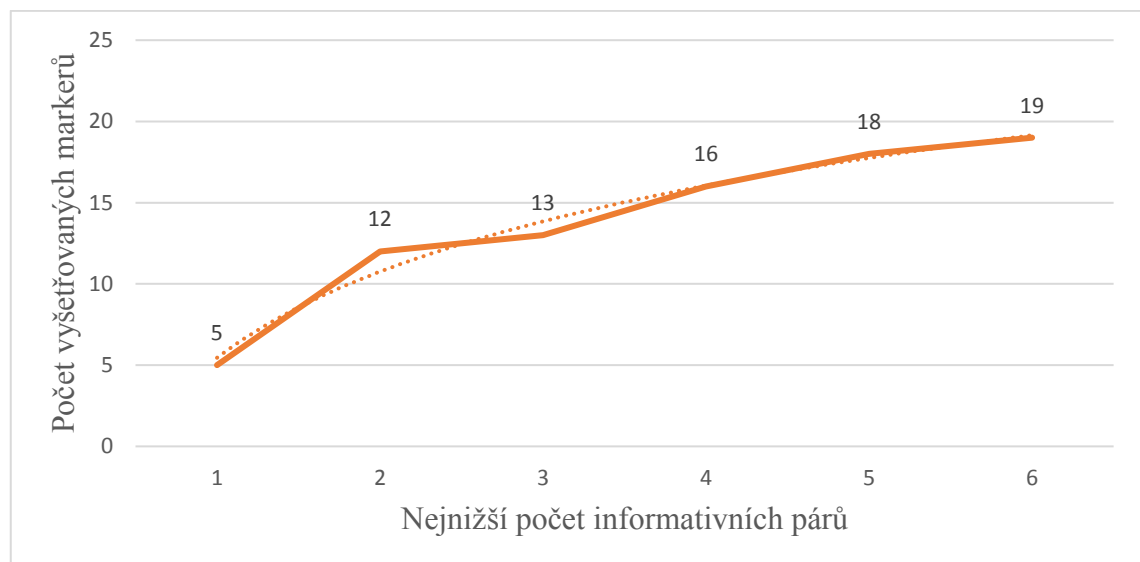
Mezi nejinformativnějšími markery ve sledovaném souboru pacientů patřily markery D21S11, D2S1338, TH01, FGA a D3S1358. Markery D2S1338 a FGA také patří mezi nejvíce geneticky variabilní podle populačních studií uvedených v kapitole 2.3.4. a zpracovaných v tabulce 2.

Jak bylo uvedeno výše, v reálné klinické praxi jsou pro vyšetřování potransplantačního chimerismu na úseku molekulární biologie UKBD FNHK požadované minimálně 4 IV markery. Z mnou sledovaného souboru byly v jednom případě použity pro vyhodnocení pouze 3 markery, protože více jich nebylo označeno za informativní a zároveň vhodné. Jednalo se o příbuzenskou transplantaci, kde jsou počty vhodných markerů obecně statisticky nižší. Aby se tedy dosáhlo úplné informativity v celém souboru při požadavku na 4 IV markery, muselo by se využít více než 15 v současnosti používaných markerů.

Při proložení naměřených hodnot křivkou, lze získat její rovnici, podle které lze predikovat množství potřebných markerů při požadavku vyšších počtů IV markerů pro daný transplantační pár. Porovnáním korelačních koeficientů  $R$  křivky byla určena jako logaritmického charakteru ( $R^2 = 0,9346$ ) s rovnicí křivky  $y = 7,5852\ln(x) + 5,4697$ , kde  $y$  náleží počtu genetických markerů, které je potřeba vyšetřit a  $x$  náleží minimálnímu počtu IV markerů, které jsou požadované. V grafu 4 jsou proto také uvedeny vypočítané

hodnoty teoretického minimálního počtu potřebných markerů k vyšetření, pokud bychom požadovali vyšší počet IV markerů a sledovali bychom logaritmický trend grafu. Pokud by byly požadovány alespoň 4 IV markery pro jakýkoliv transplantační pár, tak by byla potřeba vyšetřit minimálně 16 markerů. A samozřejmě platí, že pokud by se požadavek na počet sledovaných markerů nadále zvyšoval, tak by pro alespoň 5 IV markerů bylo potřeba vyšetřit minimálně 18 markerů a pro minimálně 6 IV markerů by bylo potřeba vyšetřit alespoň 19 markerů.

Graf 4. - Závislost nejnižšího počtu hledaných informativních párů na počtu vyšetřovaných markerů



Každý transplantační pár příjemce a dárce má svojí vlastní kombinaci a počet IV markerů, který se pár od páru liší. V testovaném souboru se z několika hledisek posuzovaly různé vlivy na množství IV markerů a bylo prokázáno, že významně méně sledovatelných genetických markerů se objevuje u příbuzenských transplantací než u nepříbuzenských a u transplantací, kde se dárce a příjemce shodují v 10 vybraných znacích HLA systému v porovnání s páry se shodou nižší. Naopak s ohledem na počet sledovatelných genetických markerů se neprokázal vliv různého/stejného pohlaví dárce a příjemce.

Podle Balona et al. (2005) jsou z hlediska času kritické zejména první 3 měsíce po provedené transplantaci, které mají velký vliv i na dlouhodobý průběh zdravotního

stavu pacienta. Sledování chimerismu v delším období po transplantaci je ale pro pacienta také velmi přínosné. Lze zjišťovat dynamiku chimerismu, tedy to, jestli se v průběhu času zvedá procento dárcovské krvetvorby, nebo zůstává na stejné úrovni. Sledování chimerismu v průběhu času se ukazuje jako spolehlivý prediktivní faktor celkové délky přežití a doby přežití bez nemoci. Na oba tyto parametry má velmi kladný vliv procentuálně se zvyšující dárcovský chimerismus (procento dárcovské krvetvorby narůstá), a naopak dárcovský chimerismus s klesajícími hodnotami je pro obě délky přežití nepříznivý (procento dárcovské krvetvorby klesá, a naopak zastoupení původní příjemcovy krvetvorby se zvyšuje). Dlouhodobé sledování trendu chimerismu se také projevilo jako lepší prognostický faktor nežli samostatné určování stupně chimerismu (kompletní x částečný) nebo absolutní hodnoty bez časového kontextu. (43) (44)

Kvantitativní hodnocení dárcovského chimerismu lze využít nejen pro hodnocení obnovení původní krvetvorby, ale stejným způsobem i pro hodnocení aktivity štěpu. Pro pacienta mohou být totiž kritické nejen nízké hodnoty chimerismu, které souvisí s nízkou aktivitou štěpu, ale naopak i hodnoty vysoké, které mohou značit riziko vzniku GVHD. Podle statistických testů provedených na sledovaném souboru pacientů může být aktivita štěpu ovlivněna i diagnózou, např. pacienti s chronickou lymfatickou leukémií mají dlouhodobou vysokou aktivitu štěpu a s tím související vyšší riziko vzniku GVHD. Naopak méně aktivní jsou štěpy transplantované pacientům v pokročilejším věku. Aktivitu štěpu neovlivnilo pohlaví, příbuzenský vztah příjemce a dárce, shoda dárce a příjemce z hlediska pohlaví, shoda v HLA znacích ani míra genetické variability mezi příjemcem a dárce.

Socié et al. publikovali v roce 1999 studii o dlouhodobém přežití a úmrtnosti po alogenní transplantaci PKB, provedené na více než 6000 pacientech. U 25 % pacientů se vyvinula GVHD a u 43 % přešla i do chronické fáze. I po uplynutí 2 let po transplantaci stále trpělo 25 % pacientů chronickou GVHD. Pacienti, u kterých se po dobu 2 let po transplantaci neprojevila primární nemoc, se v 89 % dožili i následujících 5 let. U pacientů, kteří podstoupili transplantaci z důvodu výskytu leukemického onemocnění a ve dvouletém potransplantačním období se u nich neprojevila žádná nemoc, měli v průměru 11 % pravděpodobnost, že u nich v následujících 5 letech dojde k relapsu onemocnění a z něj vyplývající 6 % riziko úmrtí. V celém souboru pacientů byla pravděpodobnost výskytu nového maligního onemocnění 2 %. Jako hlavní důvody smrti v pozdějším období ve studovaném souboru pacientů pak Socié et al. určili

znovuobjevení původní nemoci a chronickou GVHD. Po dvou letech bez propuknutí původní nemoci mají z hlediska původní nemoci nejvyšší míru rizika úmrtí pacienti s aplastickou anemií a osoby s ALL. Mezi rizikové faktory z hlediska mortality a rizika pozdního úmrtí byla zařazena transplantace provedená v pokročilé fázi choroby, rozvinutí chronické GVHD a vyšší věk příjemce v době transplantace. (45)

V našem studovaném souboru pacientů se jako statisticky významný faktor pro úmrtí projevil také vyšší věk příjemce, kdy pacienti zemřeli při nízké aktivitě štěpu. Úmrtí bylo ovlivněno relapsem původní nemocí, pro kterou se transplantace PKB prováděla. U pacientů s CLL bylo toto riziko statisticky vyšší, a naopak u pacientů s ALL bylo prokázáno jako riziko nižší. Úmrtnost pacientů nebyla ovlivněna pohlavím příjemce, příbuzenským vztahem příjemce a dárce, shodností pohlaví ani genetickou variabilitou použitých markerů.

## 7. Závěr

Transplantace hematopoetických buněk jsou účinnou metodou pro léčbu leukémií, ostatních hematologických malignit i řady neonkologických onemocnění. Pro zajištění kvality života pacienta a odpovídající léčby je důležité sledovat aktivitu transplantovaného štěpu a včas zjistit případný relaps původního onemocnění. Vhodnou analytickou metodou je proto vyšetření potransplantačního chimerismu, tedy zjištění genetického původu krevních buněk v kostní dřeni a cirkulaci. Podle zjištěného původu buněk se pak vypočítá procentuální zastoupení příjemcovské a dárcovské krvinek. Při obnově a nárůstu podílu původní příjemcovy krvinek pak hrozí riziko relapsu onemocnění a je důležité co nejdříve zakročit a nasadit farmakologickou léčbu. Metody pro stanovení chimerismu se zakládají na různých principech, v dnešní době se ale nejčastěji využívá genetických markerů jako jsou STR a VNTR lokusy.

Cílem této práce bylo vyhledání možného vztahu mezi vybranými klinickými parametry a genetickými markery v daném souboru pacientů. Hodnotila se informativita a vhodnost markerů z hlediska příbuznosti, pohlaví a shody v HLA systému. Mezi nej informativnějšími markery s ohledem na vyjmenovaná hlediska patřily markery D21S11, D2S1338, TH01, FGA a D3S1358. Pokud by se vyšetřovalo pouze těchto 5 markerů, u všech transplantačních párů ze sledovaného souboru by se našel vždy alespoň 1 informativní a zároveň vhodný genetický marker k analýze chimerismu.

Dalším cílem práce bylo posouzení vlivu příbuznosti příjemce a dárce, shody v systému znaků HLA a shody pohlaví příjemce a dárce štěpu na spektrum použitelných genetických markerů. Podle získaných dat ze souboru testovaných pacientů nemá na výsledný počet IV markerů vliv shoda v pohlaví. Významně méně IV markerů ale mají páry se shodou 10 z 10 znaků v HLA systému a také příbuzenské páry.

Posledním cílem této práce bylo hodnocení úspěšnosti léčby a úmrtnosti v potransplantačním období. Ze souboru 140 pacientů zemřelo v potransplantačním období 55 osob (39 %). Ve studovaném souboru pacientů nebyla úmrtnost ovlivněna pohlavím, příbuzností, pohlavní shodou mezi dárce a příjemcem, shodou v HLA systému ani genetickou variabilitou vyjádřenou počtem IV markerů. Jako negativní prognostický faktor z hlediska úspěšnosti léčby a úmrtnosti byl prokázán vyšší věk a diagnostikovaná CLL.

## Seznam zkratek

A – adenin

ALL – akutní lymfoblastická leukémie

AML – akutní myeloidní leukémie

C – cytosin

CCD – zařízení s vázanými náboji (*Charge-Coupled Device*)

CD – diferenciační skupina (*Cluster of Differentiation*)

CLL – chronická lymfatická leukémie

CML – chronická myeloidní leukémie

CMV – *Cytomegalovirus*

DEAE – diethylaminoethanol

DLI – infúze dárcovský leukocytů (*Donor-leukocyte Infusion*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*Deoxyribonucleic Acid*)

EBMT – Evropská skupina pro transplantaci KD (*European Group for Bone Marrow Transplantation*)

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EKG – elektrokardiograf

FISH – fluorescenční *in-situ* hybridizace

G – guanin

G-CSF – faktor stimulující kolonii granulocytů (*Granulocyte Colony-stimulating Factor*)

GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (*Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor*)

GVHD – nemoc štěpu proti hostiteli (*Graft Versus Host Disease*)

GVL efekt – efekt štěpu proti leukémii (*Graft versus Leukaemia Effect*)

H<sub>E</sub> – očekávaná heterozygotita (*Expected Heterozygosity*)

HIV – virus lidské imunodeficiency (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA – antigeny lidských leukocytů (*Human Leukocyte Antigens*)

H<sub>O</sub> – pozorovaná heterozygotita (*Observed Heterozygosity*)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*)

HSC – hematopoetická kmenová buňka (*Hematopoietic Stem Cell*)

HTLV – virus lidské T-buněčné leukémie (*Human T-cell Leukaemia Virus*)

IV marker – informativní a zároveň vhodný marker

KD – kostní dřev

LPA – lineární polyakrylamid

MC – smíšený chimerismus (*Mixed Chimerism*)

MDS – myelodysplastický syndrom

MEC – průměrná pravděpodobnost vyloučení (*Mean Exclusion Rate*)

NK – nukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)

PD – diskriminační síla (*Power of Discrimination*)

PIC – informační složka polymorfismu (*Polymorphism Information Content*)

PKB – periferní krvetvorné buňky

RAEB – refrakterní anémie s nadbytkem blastů (*Refractory Anemia with Excess of Blasts*)

RARS – refrakterní anémie prstenčitých sideroblastů (*Refractory Anemia with Ring Sideroblasts*)

RCP – fenotypizace erytrocytů (*Red Blood Cell Phenotyping*)

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)



RNA – ribonukleová kyselina (*Ribonucleotic Acid*)

RTG – rentgenové záření

SD – směrodatná odchylka (*Standard Deviation*)

SDS – dodecylsírán sodný (*Sodium Dodecylsulphate*)

SNP – polymorfismus jednotlivých nukleotidů (*Single-nucleotide Polymorphism*)

SRN – Spolková republika Německo

STR – krátké tandemové repetice (*Short Tandem Repeats*)

T – thymin

TBE pufr – Tris/borát/EDTA pufr

TE pufr – Tris/EDTA pufr

USA – Spojené státy americké (*United States of America*)

UV – ultrafialové (*Ultra-violet*)

VNTR – tandemové repetice o různém počtu (*Variable Number of Tandem Repeats*)

## Zdroje

1. SLOVÁČEK, L., JEBAVÝ, L., BLAŽEK, M., KMONÍČEK, M., ŽÁK, P. Transplantace kostní dřeně. Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy*, 2005, roč. 74, č. 3-4, s. 125-132
2. VAŇÁSEK, J., STARÝ, J., KAVAN, P., VAŇÁSEK, J. JR. *Transplantace kostní dřeně*. Praha : Galén, 1996. ISBN 80-85824-35-3.
3. BADER, P., NIETHAMMER, D., WILLASCH, A., KREYENBERG, H., KLINGEBIEL, T. Review: How and when we monitor chimerism after allogenic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation*. 2005, vol. 35, s. 107-119.
4. BERÁNEK, M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha : Karolinum - Univerzita Karlova v Praze, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
5. ŠKODA, J., ŠKODOVÁ, H. *Molecular Genetics - An Outline for Food Chemists and Biotechnologists*. Praha : Elsevier, 1987. ISBN 0-444-41688-9.
6. BRDIČKA, R. *Genetika v klinické praxi I*. Praha : GHC Praha ve spolupráci s vydavatelstvím Galén, 2014. ISBN 978-80-106-3.
7. *Wikiskripta: Izolace DNA*. [Online], [Citace: 1. 3 2017], dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Izolace\\_DNA](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Izolace_DNA)
8. JANOCHOVÁ, J. *Izolace DNA: Výtěžnost a kvalita*. Brno, 2009, 48 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity na Ústavu biochemie. Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
9. *Wikipedia: Extraction*. [Online], [Citace: 27.2.2017], dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_extraction](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction)
10. *LabGuide: Fenol-chloroformová extrakce*. [Online], [Citace: 3.3.2017], dostupné z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>
11. *QIAGEN: Purification technologies*. [Online], [Citace: 16.3.2017], dostupné z: <https://www.qiagen.com/dk/resources/technologies/plasmid-resource-center/qiagen-purification-technologies/?akamai-feo=off#QIAGEN>

12. *Thermo Fisher Scientific: Silica Bead DNA Extraction Kit*. [Online], [Citace: 17.3.2017], dostupné z:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0513>
13. *QIAGEN: Agarose Gel Analysis Of The Purification Procedure*. [Online], [Citace: 17.3.2017], dostupné z:  
<https://www.qiagen.com/dk/resources/technologies/plasmid-resource-center/agarose%20gel%20analysis%20of%20the%20purification%20procedure/?akamai-feo=off>
14. *Roche: Agarose Gel Extraction Kit*. [Online], [Citace: 17.3.2017], dostupné z:  
<https://shop.roche.com/shop/products/agarose-gel-dna-extraction-kit>
15. HÚSKA, D., BALOUN, J., TRNKOVÁ, L., ADAM, V., KIZEK, R. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín.*, 2008, roč. 18, č. 3, s. 6-7
16. *Wikipedia: DNA quantitation*. [Online] [Citace: 2.4.2017], dostupné z:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic\\_acid\\_quantitation](https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_quantitation)
17. ŠMÍD, J. *Identifikace DNA rostlinných a živočišných druhů v potravinách použitím polymerázové řetězové reakce*. Brno : 2015, 125 s. Dizertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, na Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí disertační práce: RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.
18. *Wikiskripta: Lambert-Beerův zákon*. [Online] [Citace: 1. 4. 2017], dostupné z:  
[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Lambert-Beer%C5%AFv\\_z%C3%A1kon](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Lambert-Beer%C5%AFv_z%C3%A1kon)
19. *Invitrogen by ThermoFisher Scientific: The Molecular Probes™ Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. [Online] [Citace: 1.4.2017], dostupné z:  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular%20Probes%20Handbook/chapter-pdfs/Ch-8-Nucleic-Acid-Detection-Analysis.pdf?icid=WE216841>
20. PAVLIŠTOVÁ, IVA. *Porovnávání metod vhodných pro uchovávání DNA a biologických vzorků*. Brno : 2010, 31 s. Bakalářská práce na Fakultě agronomické Mendelovy Univerzity v Brně, na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. Vedoucí bakalářské práce: Ing. Petra Šrubařová.
21. WU, J., CUNANAN, J., KIM, L., KULATUNGA, T., HUANG, C., ANEKELLA, B. Poster: *Stability of Genomic DNA at Various Storage Conditions*. [Online] [Citace: 5.4.2017], dostupné z:

[http://www.colorado.edu/ecenter/sites/default/files/attached-files/seracare\\_stability\\_of\\_genomic\\_dna\\_at\\_various\\_storage\\_conditions\\_isber2009.pdf](http://www.colorado.edu/ecenter/sites/default/files/attached-files/seracare_stability_of_genomic_dna_at_various_storage_conditions_isber2009.pdf)

22. RÖDER, B., FRÜHWIRTH, K., VOGL, C., WAGNER, M., ROSSMANITH, P. Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, vol. 48, 2010, no. 11, s. 4260–4262.
23. POSPÍŠILOVÁ, Š., DVOŘÁKOVÁ, D., MAYER, J. *Molekulární hematologie*. Praha : Galén, 2013. ISBN 978-7262-942-8.
24. *Kostní dřevěň*. [Online], [Citace: 2.3.2017], dostupné z: [http://www.kostnidren.cz/registr2014/1\\_jaksedrendaruje\\_2.html](http://www.kostnidren.cz/registr2014/1_jaksedrendaruje_2.html)
25. ANDRYKOWSKI, M.A., GREINER, C.B., ALTMAIER, E.M., BURISH, T.G., ANTIN, J.H., GINGRICH, R., MCGARIGLE, C., HENSLEE-DOWNEY, P.J. Quality of Life Following Bone Marrow Transplantation: Findings from a Multicentre Study. *British Journal of Cancer*, 1995, vol. 71, s. 1322-1329.
26. YAM, P., PETZ, L., KNOWLTON, R., WALLACE, B., STOCK, D., DE LANGE, G., BROWN, V., DONIS-KELLER, H., BLUE, K. Use of DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms to Document Marrow Engraftment and Mixed Hematopoietic Chimerism Following Bone Marrow Transplantation. *Transplantation*, 1987, vol. 43, no. 3, s. 399-407.
27. *Wikipedia: G-banding*. [Online], [Citace: 10.4.2017], dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/G\\_banding](https://en.wikipedia.org/wiki/G_banding)
28. RIBEIRO, E., CAVALLI, I., SCHMID, A., CORNÉLIO, D., TOKUTAKE, A., SPERANDIO-ROXO, V., RODRIQUEZ, J., PASQUINI, R. Cytogenetic Analysis in Human Bone Marrow Transplantation. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1996, vol. 89, s. 21-26.
29. SCHAAP, N., SCHARRENBURG A., BAR, B., MENSINK, E., DE MAN, A., GEURTS VAN KESSEL, A. Red Blood Cell Phenotyping is a Sensitive Technique for Monitoring Chronic Myeloid Leukaemia Patients after T-cell Depleted Bone Marrow Transplantation and after Donor Leucocyte Infusion. *British Journal of Haematology*, 2000, vol. 108, s. 116-125.
30. TURKIEWICZ, D., GORCZYNSKA, E., TOPORSKI, J., KALWAK, K., RYBKA, B., NOWOROLSKA, D. BOGUSŁAWSKA-JAWORSKA, J., CHYBICKA, A. Monitoring of Hematopoietic Chimerism after Sex-mismatched

- Allogenic Stem Cell Transplantation (alloSCT) by Dual-color FISH Analysis. *Leukemia Research*, 2003, vol. 27, s. 993-998.
31. HANCOCK, J.P., GOULDEN, N.J., OAKHILL, A., STEWARD, C.G. Quantitative Analysis of Chimerism after Allogenic Bone Marrow Transplantation Using Immunomagnetic Selection and Fluorescent Microsatellite PCR. *Leukemia*, 2003, vol. 17, s. 247-251.
32. LION, T. Analysis of Chimerism within Specific Leukocyte Subsets for Detection of Residual or Recurrent Leukemia in Pediatric Patients after Allogenic Stem Cell Transplantation: Concise Report. *Leukemia*, 2001, vol. 15, s. 307-310.
33. *Wikipedia: Zygosity*. [Online], [Citace: 15.4.2017], dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zygosity#Heterozygous>
34. MALYARCHUK, B.A., WOZNIAK, M. Variation of 15 Autosomal Microsatellite DNA Loci in the Russian Population. *Molecular Biology*, 2007, vol. 41, no. 1, s. 1-4.
35. PARYS-PROSZEK, A., KUPIEC, T., WOLANSKA-NOWAK, P., BRANICKI, W. Genetic Variation of 15 Autosomal Loci in a Population Sample from Poland. *Legal Medicine*, 2010, vol 12, s. 246-248.
36. HARA, M., YAMAMOTO, Y., TAKADA, A., SAITO, K., KIDO, A., OYA, M., KAMEYAMA, H. Population data for 15 STR loci D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX and FGA in Japanese. *International Congress Series*, 2005, no. 1261, s. 204-206.
37. AMIGO J., PHILLIPS C., SALAS T., FERNÁNDEZ FORMOSO L., CARRACEDO A., LAREU M. pop.STR - An Online Population Frequency Browser for Established and New Forensic STRs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, vol. 2, no. 1, s. 361-362
38. *Wikipedia: Aritmetický průměr*. [Online] [Citace: 20.4.2017], dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Aritmetick%C3%BD\\_pr%C5%AFm%C4%9Br](https://cs.wikipedia.org/wiki/Aritmetick%C3%BD_pr%C5%AFm%C4%9Br)
39. TVRDÍK, J. *Základy pravděpodobnosti a statistiky*. Ostrava : Učební texty Ostravské univerzity, 2010. [Online] [Citace: 20.4.2017], dostupné z: <https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwispCLUrdzTAhVC1iwKHdJPBmQQFggmMAA&url=https%3A%2F%2Fpubli.cz%2Fdownload%2Fpublication%2F41%3Fpc%3D1>

<http://cit.vfu.cz/stat/fvl/teorie/predn3/ttest.htm>  
<http://iastat.vse.cz/CHikvadr.htm>

40. BEDÁŇOVÁ, I. *Biostatistika - multimediální výukový text pro studenty VFU Brno*. [Online] [Citace: 20.4.2017], dostupné z:  
<http://cit.vfu.cz/stat/fvl/teorie/predn3/ttest.htm>
41. ŘEZANKOVÁ, H., MAREK, L., VRABEC, M., KALENSKÝ, L., ŘEZANKA, P. Iastat - interaktivní učebnice statistiky. [Online] [Citace: 23.4.2017], dostupné z:  
<http://iastat.vse.cz/CHikvadr.htm>
42. ODRIOZOLA, A., RIANCHO, J.A., NOZAL, R., BERMÚDEZ, A., SANTURÍN, A., AROZAMENA, J., ZARRABEITIA, M.T. Chimerism Analysis in Transplant patients: A Hypothesis-free Approach in the Absence of Reference Genotypes. *Clinica Chimica Acta*, 2012, vol. 414, s. 85-90.
43. TANG, X., ALATRASH, G., NING, J., JAKHER, H., STAFFORD, P., ZOPE, M., SHPALL, E.J., JONES, R.B., CHAMPLIN, R.E., THALL, P.F., ANDERSSON, B.S. Increasing Chimerism after Allogenic Stem Cell Transplantation Is Associated with Longer Survival Time. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2014, vol. 20, no 8, S. 1139-1144.
44. BALON J., HAŁABURDA K., BIENIASZEWSKA M., REICHERT M., BIENIASZEWSKI L., PIEKARSKA A., PAWŁOWSKI R., HELLMANN A. Early Complete Donor Hematopoietic Chimerism in Peripheral Blood Indicates the Risk of Extensive Graft-versus-host Disease. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, vol. 35, s. 1083-1088.
45. SOCIÉ, G., VEUM STONE, J., WINGARD, J.R., WEISDORF, D., HENSLEEDOWNEY, P.J, BREDESON, C., CAHN, J.Y., PASSWEG, J.R., ROWLINGS, P.A., SCHOUTEN, H.C., KOLB, H.J., KLEIN, J.P. Long-term Survival and Late Deaths after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 1999, vol. 341, no. 1, s. 14-21.
46. ŠKODA, J., ŠKODOVÁ, H. *Molecular Genetics - An Outline for Food Chemists and Biotechnologists*. Praha : Elsevier, 1987. ISBN 0-444-41688-9.
47. *Tabulky kritických hodnot*. [Online], [Citace: 13.3.2017], dostupné z:  
<http://ach.upol.cz/user-files/intranet/tabulky-1-1316614942.pdf>