

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

HLA systém
Bakalářská práce

2020

Veronika Vilišová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Vilišová**
Osobní číslo: **C17233**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **HLA systém**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se HLA systému.
2. V první části stručně popsat HLA systém obecně, jednotlivé molekuly patřící do tohoto systému (molekuly HLA 1, 2 a 3 třídy).
3. Druhou část věnovat popisu vlivu dědičnosti HLA systému a možným chorobám tohoto systému.
4. V poslední části věnovat pozornost typizaci HLA systému a zaměřit se na sérologické a molekulárně genetické metody.
5. V závěru popsat antigen HLA B27, jeho výskyt a obecnou charakteristiku.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 7. 2020

Veronika Vilišová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Mgr. Kataríně Svrčkové, Ph.D. a Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D., za cenné rady a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

ANOTACE

Bakalářská práce je věnována HLA systému. V první části byl popsán HLA systém obecně, jednotlivé molekuly patřící do tohoto systému (molekuly HLA I., II. a III. třídy), názvosloví a dále byl popsán polymorfismus. Ve druhé části bakalářské práce byl popsán vliv dědičnosti HLA systému, možné choroby, se kterými antigeny souvisí. V poslední části byla popsána typizace HLA systému, sérologické a molekulárně genetické metody, význam antigenů v transplantační medicíně a HLA protilátky. Na závěr byl popsán antigen HLA-B27, jeho výskyt a obecná charakteristika a jeho podtypy.

KLÍČOVÁ SLOVA

HLA systém; antigeny; nemoc; revmatoidní artritida; celiakie

TITLE

HLA system

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with the HLA system. The first part is focused on describing the HLA system in general, individual molecules belonging to this system (HLA class I, II and III molecules), nomenclature and polymorphism. The second part of the bachelor thesis described the effect of inheritance of the HLA system, possible diseases with which antigens are related to. The last part described the types of the HLA system, serological and molecular genetic methods, the importance of antigens in transplant medicine and HLA antibodies. Finally, the HLA-B27 antigen, its occurrence and general characteristics and its subtypes were described.

KEYWORDS

HLA system; antigens; disease; rheumatoid arthritis; celiac disease

OBSAH

ÚVOD	12
1. HISTORIE	13
2. ROZDĚLENÍ HLA MOLEKUL PODLE TŘÍD	14
2.1. Molekuly HLA I. třídy	14
2.1.1. Struktura molekul HLA I. třídy	14
2.1.2. Vztahy mezi strukturou a funkcí molekul HLA I. třídy	14
2.1.3. Funkce molekul HLA I. třídy	14
2.2. Molekuly HLA II. třídy	15
2.2.1. Struktura molekul HLA II. třídy	15
2.2.2. Funkce molekul HLA II. třídy	16
2.3. Molekuly HLA III. třídy	16
3. NOMENKLATURA	17
4. POLYMORFISMUS HLA MOLEKUL	18
5. DĚDIČNOST HLA SYSTÉMU	19
6. HLA SYSTÉM A CHOROBY	20
6.1. Celiakie	20
6.2. Diabetes mellitus I. typu	21
6.3. Ankylozující spondylitida	21
6.4. Roztroušená skleróza	22
6.5. Narkolepsie	23
6.6. Revmatoidní artritida	24
6.7. Systémový lupus erythematoses	26
6.8. AIDS	27
6.9. Sjögrenův syndrom	27
6.10. Autoimunitní hepatitida	28
7. TYPYZACE HLA SYSTÉMU	30

7.1.	Sérologické metody.....	30
7.2.	Molekulárně genetické metody.....	31
7.2.1.	Metoda PCR.....	31
7.2.2.	PCR se sekvenčně specifickými primery.....	33
7.2.3.	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy.....	34
7.2.4.	Sekvenování HLA alel.....	34
7.2.5.	Metoda mikročipu.....	35
7.2.6.	HLA typizace průtokovým analyzátozem (Luminex).....	36
8.	VÝZNAM HLA V TRANSPLANTAČNÍ MEDICÍNĚ.....	37
8.1.	Transplantace.....	37
8.1.1.	Autologní transplantace.....	37
8.1.2.	Alogenní transplantace.....	38
8.1.3.	Další typy transplantací.....	39
8.2.	Transplantace kostní dřeně.....	39
8.3.	Rejekce.....	40
9.	HLA PROTILÁTKY.....	42
9.1.	Metoda ELISA.....	42
9.2.	Průtoková cytometrie.....	43
10.	ANTIGEN HLA-B27.....	44
10.1.	Struktura a funkce.....	44
10.2.	Podtypy HLA-B27.....	45
10.3.	Výskyt antigenu.....	45
10.3.1.	HLA-B27 test.....	45
ZÁVĚR.....	47
POUŽITÁ LITERATURA.....	49

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Znázornění alel od roku 1987 do konce měsíce září 2019	13
Obrázek 2: Schéma názvosloví HLA molekul.....	17
Obrázek 3: Schéma haplotypů	19
Obrázek 4: Roztavení obratlů	22
Obrázek 5: Otok kloubu	25
Obrázek 6: Lupus	26
Obrázek 7: Srovnání zdravých jater a jater při AIH.....	28
Obrázek 8: Ilustrace znázorňující hlavní kroky PCR.....	32
Obrázek 9: Pásový vzorek pozitivních vzorků pro HLA-DRB1*15:01 pomocí PCR-SSP v agarózovém gelu se standardizovanou směsí	33
Obrázek 10: Pracovní postup PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy.....	34
Obrázek 11: Typizace HLA založené na sekvenování.....	35
Obrázek 12: Screening HLA protilátek pomocí technologie Luminex.....	36
Obrázek 13: Struktura HLA-B27	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Tabulka odlišnosti HLA I. a II. třídy na vybraných buněčných typech.....	15
Tabulka 2: Polymorfismus genů HLA I. a II. třídy.....	18

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AIDS	Syndrom získané imunodeficiencie (z angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AMK	Aminokyselina
AS	Ankylozující spondylitida
CD	Celiakie (z angl. Celiac Disease)
CD4 ⁺	Pomocné T-lymfocyty
CD8 ⁺	Cytotoxické T-lymfocyty
ddNTP	dideoxiribonukleotidy
HIV	Vir lidské imunodeficiencie (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HLA	Lidský leukocitový antigen (z angl. Human Leucocyte Antigen)
HLA-A	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-B	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-C	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-DQ	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQA	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQB	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DR	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-E	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
IgG	Imunoglobuliny
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility complex)
NT1	Narkolepsie typu 1
NT2	Narkolepsie typu 2
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

PCR-SSP	PCR se sekvenčně specifickými primery
RA	Revmatoidní artritida
RS	Roztroušená skleróza
SLE	Systemový lupus erythematoses
T1DM	Diabetes mellitus I. typu
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

ÚVOD

System nebo také nazýván lidský leukocytový antigen (HLA) je genový komplex, který kóduje hlavní proteiny histokompatibilního komplexu (MHC) u lidí. Tyto proteiny buněčného povrchu jsou zodpovědné za regulaci imunitního systému u jedinců. HLA geny jsou vysoce polymorfni, což znamená, že mají mnoho různých alel, které jim umožňují doladit adaptivní imunitní systém.

HLA antigeny jsou důležité při obraně proti chorobám. Jsou hlavní příčinou odmítnutí transplantace orgánů, mohou také chránit před rakovinou. Mutace v HLA mohou být spojeny s autoimunitním onemocněním, např. diabetes typu I, celiakie. Vzhledem k důležitosti HLA při transplantaci jsou HLA lokusy jedny z nejčastěji typizovaných sérologií a PCR (polymerázová řetězová reakce). Ukázalo se, že typizace HLA s vysokým rozlišením (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 a HLA-DPB1) může být při transplantaci relevantní pro identifikaci plné shody, i když je dárce příbuzný. Některá onemocnění zprostředkovaná HLA se přímo podílejí na rozvoji rakoviny. Častěji však molekuly HLA hrají ochrannou roli a rozpoznávají vzestup antigenů, které nejsou tolerovány kvůli nízkým hladinám v normálním stavu. Abnormální buňky mohou být cíleny na apoptózu, o které se předpokládá, že je ukazatelem rakoviny.

HLA protilátky se obvykle nevyskytují přirozeně. Většinou se vytvářejí v důsledku imunologického napadení cizím materiálem prostřednictvím krevní transfúze, těhotenství nebo transplantací orgánů nebo tkání.

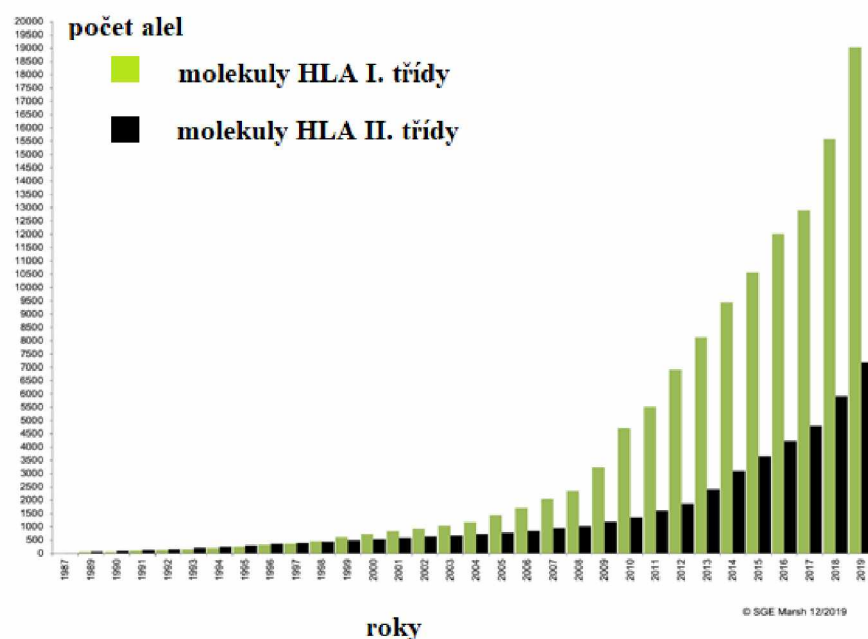
1. HISTORIE

Ve 30. letech minulého století byla objevena skupina bílkovinných molekul zodpovědných za rejekci štěpů u myši. [1]

V 50. letech minulého století byl detekován alloantigen, který je přítomný na lidských leukocytech. Alloantigen se definuje jako antigen přítomný pouze u některých jedinců druhu, který stimuluje tvorbu protilátek u těch, kteří jej nemají. Jedná se o „první“ lidský leukocytový antigen. U myši mluvíme o molekulách H2, u slepic o molekulách B atd. Obecně byly nazvány jako molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). U člověka je hlavním histokompatibilním systémem komplex HLA. [1]

V 60. a 70. letech minulého století bylo zjištěno, že geny komplexu se účastní imunitní odpovědi. Byly známy tři lokusy HLA molekul, tedy pozice jednoho nebo více genů na chromozomu. Jednalo se o HLA-A, HLA-B a HLA-C. Zanedlouho se ukázalo, že k produkci buněk B-lymfocytů je nutná účast buněk T-lymfocytů a HLA antigenů. V těchto letech byla objevena i schopnost cytotoxických T-lymfocytů likvidovat buňky, které vytlačují na svém povrchu cizí antigen. Antigen, který je vytlačován, patří do I. nebo II. třídy HLA molekul. [2,3]

V 80. letech se objevily další lokusy typu HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP a také se objevila hlavní funkce MHC systému v imunitní odpovědi. Postupný nárůst alel ukazuje obrázek 1. Antigeny, které řadíme do neklasických HLA molekul, například HLA-E, -F, -G, -H atd., byly objeveny až v 90. letech. [2,3]



Obrázek 1: Znázornění alel od roku 1987 do konce měsíce září 2019 [4]

2. ROZDĚLENÍ HLA MOLEKUL PODLE TŘÍD

2.1. Molekuly HLA I. třídy

Do skupiny molekul I. třídy řadíme HLA-A, HLA-B a HLA-C. Nacházejí se na buněčném povrchu všech jaderných buněk v tělech obratlovců. Vyskytují se rovněž na krevních destičkách, ale ne na červených krvinkách. [5]

2.1.1. Struktura molekul HLA I. třídy

Jedná se o heterodimery, které se skládají ze dvou polypeptidových řetězců, α a β_2 -mikroglobulin. Řetězec alfa, také se mu říká těžký řetězec, je polymorfní glykoprotein určený geny v komplexu HLA na 6. chromozomu a je nekovalentně vázán k β_2 -mikroglobulinu, nepolymorfnímu proteinu. Antigenní peptid je spojen s touto strukturou, a to vede ke komplexu MHC I. třídy. [5]

Extracelulární oblast těžkého řetězce se rozděluje do tří domén, které se nazývají α_1 , α_2 a α_3 . Drážka vázající peptid je vytvořena jako mezikmenový dimer skládáním α_1 a α_2 domén, tak se vytvoří dlouhý rozštěp a polymorfní aminokyselinové (AMK) zbytky se shlukují. Drážka, která je vytvořena doménami, ukotvuje peptid rozpoznávaný receptorem T-buněk. [5]

2.1.2. Vztahy mezi strukturou a funkcí molekul HLA I. třídy

Doména α_3 s β_2 -mikroglobulinem mají strukturu skládaného listu beta, která je podobná struktuře imunoglobulinové domény a tvoří spodní část molekuly. [6]

Polymorfismus molekul I. třídy, o kterém je zmíněno v kapitole 4. se většinou lokalizuje v části skládaného listu β , který tvoří základnu této rýhy a je lokalizován v šroubovicích α . Tak se vazebné místo pro antigen liší od jedné molekuly k druhé. Daná molekula I. třídy může vázat jen omezený počet peptidových fragmentů. [6]

2.1.3. Funkce molekul HLA I. třídy

Všechny lidské geny A, B a C mají 5 'vedoucí exon, který kóduje krátký signální peptid následovaný 5ti nebo 6ti exony kódující řetězec molekuly I. třídy [7]

HLA I. třídy představují peptidy zevnitř buňky. Například, pokud je buňka infikována virem, HLA systém přenese fragmenty viru na povrch buňky, tím pádem buňka může být imunitním systémem zničena. Tyto peptidy jsou produkovány z proteinů, které se štěpí v proteazomech. Obecně jsou tyto konkrétní peptidy malé polymery o délce asi 9 AMK. [7]

2.2. Molekuly HLA II. třídy

Do skupiny molekul II. třídy řadíme HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP. Jedná se také o dvou řetězové struktury. Oba řetězce jsou kódovány geny uvnitř komplexu HLA, tedy jinak než molekuly HLA I. třídy. Na podrobnější odlišnost poukazuje tabulka 1. [6]

Tabulka 1: Odlišnosti HLA I. a II. třídy na vybraných buněčných typech [7]

Typ buňky, tkáň	Exprese	
	HLA I. třídy	HLA II. třídy
buňky imunitního systému		
dendritické buňky	+++	+
Makrofágy	+++	++
T lymfocyty	+++	+
B lymfocyty	+++	+++
jiné jaderné buňky		
neutrofilní granulocyty	+++	-
eozinofilní granulocyty	+++	-
epitelové buňky	+++	-
Hepatocyty	+	-
nervové buňky	+	-
buňky ledvin	+	-
nejaderné buňky		
Trombocyty	++	-
Erytrocyty	-	-

2.2.1. Struktura molekul HLA II. třídy

Každá molekula II. třídy je heterodimer a skládá se ze dvou glykoproteinových řetězců. Jedná se o řetězce α a řetězce β , které jsou nekovalentně vázané. Struktura všech molekul II. třídy je podobná. HLA-DR je popsána jako prototyp. Jsou organizovány do řad exonů a intronů, které odrážejí doménovou strukturu řetězců α a β . Krystalická struktura molekul II. třídy

doposud není známa. Protože drážka vázající antigen molekul HLA II. třídy je otevřená na obou koncích, zatímco odpovídající drážka na molekulách I. třídy je uzavřena na každém konci, antigeny II. třídy jsou delší, a to obvykle mezi 15-24 aminokyselinovými zbytky. [6]

2.2.2. Funkce molekul HLA II. třídy

Podobně jako molekuly I. třídy, mohou vázat různé peptidy. Hlavní funkcí molekul HLA II. třídy je prezentovat zpracované antigeny, které jsou odvozeny primárně z exogenních zdrojů, na CD4⁺ T-lymfocytech. Antigeny tedy stimulují množení T-pomocných buněk, které zase stimulují B-buňky produkující protilátku, aby produkovaly protilátky proti tomuto specifickému antigenu. Vlastní antigeny jsou potlačeny regulačními T-buňkami. [7]

Při stanovení trojrozměrné struktury molekuly HLA-DR1 se zjistilo, že jeho rozštěp vázající peptid je otevřen na obou koncích. Tato vlastnost umožňuje molekulě II. třídy vázat delší peptidy. [7]

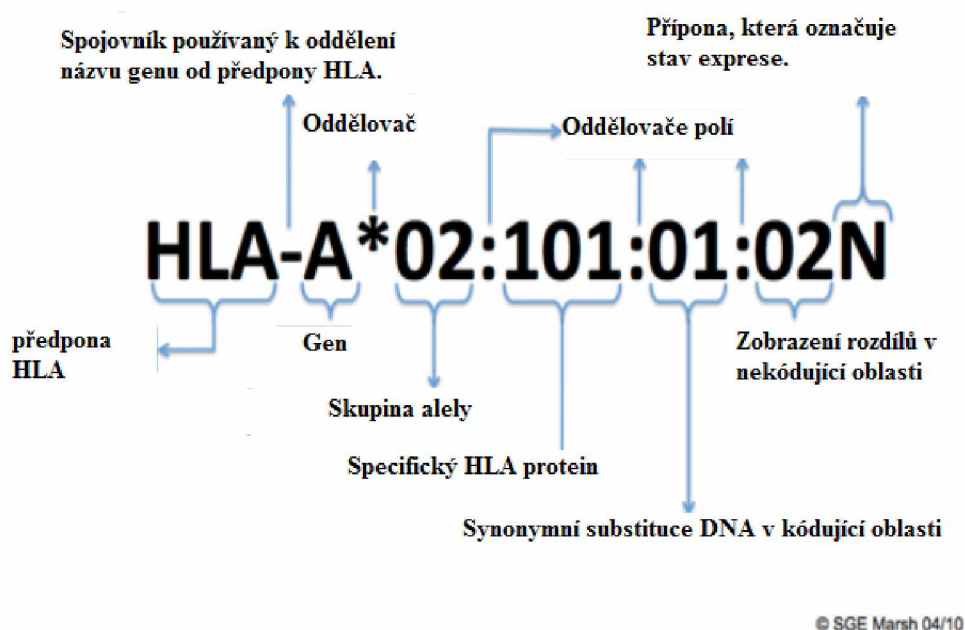
2.3. Molekuly HLA III. třídy

Na rozdíl od molekul I. a II. třídy se nejedná o molekuly s membránovými proteiny. Dosud není známo, proč jsou geny III. třídy umístěny v komplexu MHC. HLA III. třídy kódují komponenty komplementového systému. Celkem se jedná o téměř 50 genů. [7, 8]

3. NOMENKLATURA

Světová zdravotnická organizace (WHO) založila v roce 1968 Nomenklaturní výbor. Ten měl na starost vytvořit pojmenování alel. V roce 2010 došlo k jejímu zlepšení. [4]

Každá alela je vedena pod svým označením, které je složeno z maximálně 4 sad čísel. Sady mají daný význam a pořadí. Číslice se oddělují dvojtečkami. Délka alely je závislá na její posloupnosti. Alely obdrží minimálně čtyřmístné jméno. Podrobnější vysvětlení poukazuje obrázek 2. [4]



Obrázek 2: Schéma názvosloví HLA molekul

Alely, u nichž bylo prokázáno, že nejsou vyjádřeny – „Null“ - dostali příponu „N“. Alely, u kterých bylo prokázáno, že jsou alternativně vyjádřeny, mohou mít příponu „L“, „S“, „C“, „A“ nebo „Q“. Přípona „L“ je odvozená od „Low“ (nízký). Takové označení slouží u alel, u níž bylo prokázáno, že má ve srovnání s normálními hladinami exprese povrchu buněk nízkou hladinu exprese. Dále „S“ je odvozena od „Secreted“ (tajný). Používá se k označení alely určující protein, který není přítomen na povrchu buňky. Přípona „C“, odvozená od „Cytoplasm“ (cytoplazma) je přiřazena alelám, které jsou přítomny v cytoplasmě, nikoli na buněčném povrchu. Přípona „A“, odvozená od slova „Aberrant“ (bloudící), kde existují pochybnosti o tom, zda je protein skutečně exprimován. Přípona „Q“, odvozená od „Questionable“ (sporný) vzhledem k tomu, že se ukázalo, že mutace pozorovaná v alele ovlivňuje normální úroveň exprese v jiných alelách. [4]

4. POLYMORFISMUS HLA MOLEKUL

Schopnost imunitního systému reagovat na četné cizí imunogeny a vázat řadu peptidů, lze připsat schopnosti molekulám HLA. [8]

Mezi charakteristické rysy HLA systému patří jeho komplexnost a polymorfnost. U jednotlivých členů populace se mohou vyskytovat různé varianty genů, které se nazývají alely. O polymorfním lokusu se mluví, když se střídají více než 2 alely. Výjimku tvoří řetězec α u molekul HLA-DR. Jedná se totiž o jednotvárný řetězec. Produkty bílkovin alel systému HLA se od sebe liší, až ve 20 aminokyselinových zbytcích. [9]

Geny v MHC kódují polymorfní molekuly HLA I. třídy a molekuly II. třídy. Ty pomáhají T-lymfocytům reagovat na cizí antigeny a rozpoznávat je. Molekuly HLA I. a II. třídy, které nemají žádný nebo zanedbatelný polymorfismus přispívají k imunitní odpovědi řadou funkcí. [10]

Polymorfismus molekul II. třídy je umístěn v rýze, kterou tvoří část skládaného listu β . Výsledkem jsou různá vazebná místa pro antigen na každé molekule. Daná molekula II. třídy může vázat jen omezený počet antigenních peptidových fragmentů. Na konkrétní počet alel poukazuje tabulka 2. [6]

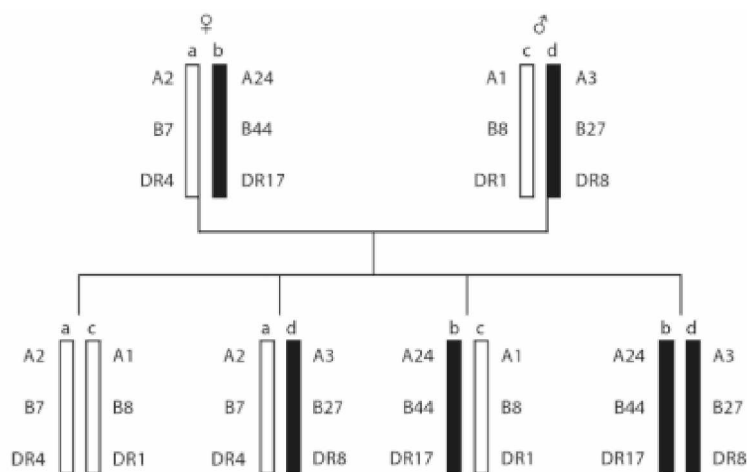
Tabulka 2: Polymorfismus genů HLA I. a II. třídy [6]

HLA I. třídy		HLA II. třídy	
Lokus	počet alel	Lokus	počet alel
HLA-A	893	HLA-DRB	814
HLA-B	1431	HLA-DRA	3
HLA-C	569	HLA-DPB	136
HLA-E	9	HLA-DPA	28
HLA-F	21	HLA-DQB	106
HLA-G	45	HLA-DQA	35

Odhad polymorfismu, který je momentálně aktuální v lidském i myším MHC, je navržený sérologickou a funkční analýzou. Jedná se řádově o 100 alel pro každý lokus. U lidí je rozmanitost větší než u myši, jelikož mají více genů I. a II. třídy. Polymorfní AMK I. třídy se mohou vyskytovat v membránově distální doméně α_1/α_2 . [7]

5. DĚDIČNOST HLA SYSTÉMU

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2., HLA systém se nachází na raménku 6. chromozomu. Jelikož se chromozomy nacházejí v páru, každý jedinec nese sestavu alel, kterou zdědil od otce i matky. Sestava HLA alel se definuje jako soubor vázaných genů a dědí se od otce a matky jako haplotyp. Tím pádem jedinec má dva haplotypy a tomu se říká genotyp jedince. Schéma haplotypů je znázorněno na obrázku 3. [9]



Obrázek 3: Schéma haplotypů [9]

Protože tyto geny jsou polymorfní, většina jedinců pravděpodobně bude v těchto lokusech heterozygotní. MHC alely jsou kodominantní. Produkty obou alel představují antigeny T-buňkám. Se třemi sadami genů HLA I. třídy a třemi sadami genů II. třídy, které se nachází na každé alele, jednotlivec může obvykle přemístit šest molekul I. třídy a II. třídy na svých buňkách. [8]

Uplatňuje se zde Mendelův zákon, podle kterého jsou haplotypy děleny na:

- První možnost je, že jedinec zdědí stejný haplotyp od matky a stejný haplotyp od otce. Tato možnost se vyskytuje u 25 % jedinců.
- Druhá možnost je, že jedinec zdědí pouze jeden stejný haplotyp. Ať už je to od matky nebo od otce. Od druhého rodiče zdědí jiný. Tato možnost je nejčastější, dědí ji 50 % jedinců.
- Třetí a poslední možnost je, že jedinec zdědí rozdílný haplotyp od obou rodičů. Tato možnost se vyskytuje u 25 % jedinců. [9]

6. HLA SYSTÉM A CHOROBY

Jak už bylo zmíněno, HLA antigeny jsou vysoce polymorfní. Přítomnost shluků genů se souvisejícími funkcemi, obrovský polymorfismus a silná vazebná nerovnováha mezi alelami způsobují, že je obtížné odhalit komplexní HLA funkce. V posledních několika desetiletích bylo zjištěno, že u jedinců, kteří nesou určité alely HLA, převládají různé stavy, jako jsou infekční onemocnění, rakovina nebo autoimunitní onemocnění. [11]

Většina onemocnění asociovaných s HLA může být klasifikována jako autoimunitní nebo imunitně zprostředkované onemocnění a byla pozorována pouze u alel HLA I. třídy, např. ankylozující spondylitida (AS) nebo pouze alel II. třídy. Navíc u některých autoimunitních onemocnění bylo zjištěno, že jsou ovlivněny geny HLA I. třídy i II. třídy, např. diabetes mellitus typu I (TD1M). Kromě HLA alel, které jsou náchylné k onemocnění, existuje také řada alel HLA, které chrání před onemocněním. [11]

Několik příkladů HLA alel je spojeno s více než jedním onemocněním se zcela odlišnými cílovými tkáněmi a patogenezi, což vzdoruje představě, že prezentace antigenu by měla být specifická jak pro antigen, tak pro prezentující HLA molekulu. Příklady takových HLA alel jsou HLA-DRB1*04:01, která je spojena jak s revmatoidní artritidou, tak s diabetem 1. typu a HLA-DQB1*03:02, která je spojena s diabetem 1. typu a celiakií (CD). [11]

6.1. Celiakie

Jedná se o genetické onemocnění. Nejdůležitějším určujícím faktorem genetické vnímavosti na celiakii je přítomnost heterodimerů lidského leukocytového antigenu HLA-DQ, HLA-DQ2 (kódovaných alely DQA1*05:01 a DQB1*02:01) a HLA-DQ8 (kódovaných alely DQA1*03:01 a DQB1*03:02). HLA-DQ2 je přítomen u více než 90 % a HLA-DQ8 přibližně u 5 % pacientů s CD. [12-14]

Homozygotnost HLA-DQB1*02 je obvykle spojena se zvýšenými riziky a agresivnějšími formami celiakie. Téměř všechny osoby s negativním HLA-DQ2, což se jedná o 5-10 % pacientů, nesou HLA-DQ8 heterodimery kódované alely HLA-DQB1*03:02. Pacienti s CD nesou velmi zřídka různé molekuly HLA-DQ. [15]

Celiakie postihuje odhadem 1 % populace na celém světě. Závažnost částečně závisí na rozsahu poškození sliznice tenkého střeva. CD může způsobit řadu příznaků, včetně průjmu, bolesti břicha a nadýmání. Klinické projevy zahrnují zejména příznaky a symptomy typické pro

malabsorpci, atypické nebo jemné klinické projevy však nejsou vzácné. Je způsobena nepříznivou reakcí na lepek. Jedná se o bílkovinu ve stravě, která se nachází v obilovinách. CD může být stanovena sérologickou biopsií a biopsií tenkého střeva, zatímco nepřítomnost haplotypu HLA-DQ2-HLA-DQ8 nemoc vylučuje. [14, 16]

V současné době je jedinou účinnou léčbou striktní, celoživotní bezlepková strava. Pacienti však vnímají stažení lepku jako neudržitelnou zátěž v životě a někteří z nich mohou vykazovat přetrvávající příznaky i přes přísnou stravu. [16]

6.2. Diabetes mellitus I. typu

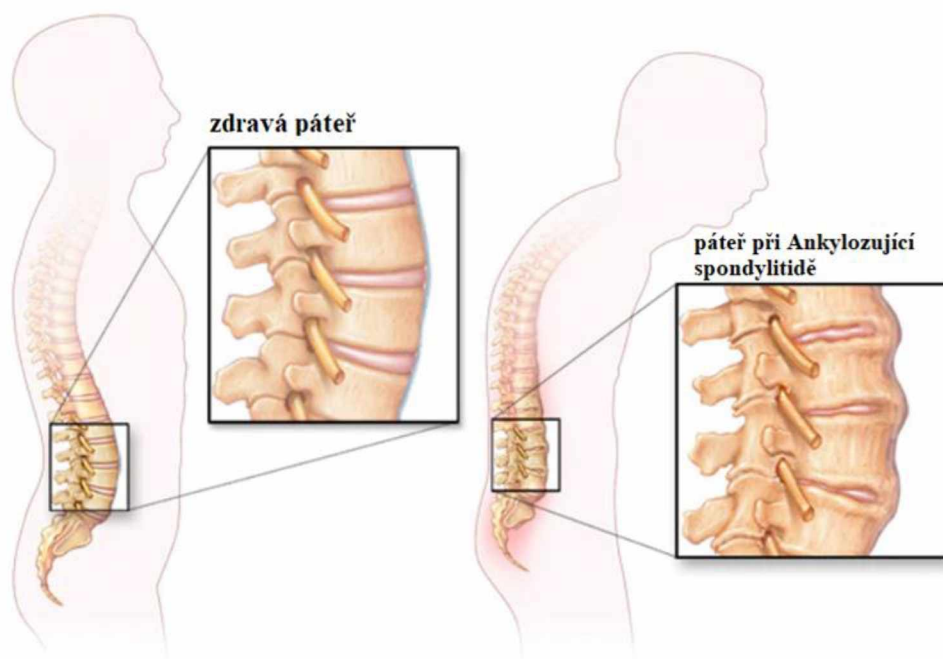
Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní porucha, kdy dochází k destrukci β buněk slinivky břišní, která vytváří stav nedostatku inzulínu, což vede k hyperglykémii, polyurii, polydipsií, ketoacidóze a dalším metabolickým poruchám, zejména u dětí. Chronickou hyperglykémii může doprovázet také zhoršení růstu a náchylnost k určitým infekcím. Dlouhodobé komplikace diabetu zahrnují retinopatii s možnou ztrátou zraku. [17, 18]

U pacientů s diabetem je zvýšený výskyt aterosklerotických kardiovaskulárních chorob. Patofyziologie onemocnění zahrnuje různé genetické aspekty a faktory prostředí. S tímto onemocněním je spojeno asi 20 genů, u nichž je nejčastější odlišná kombinace haplotypu HLA-DRB1-HLA-DQA1-HLA-DQB1. [17,18]

HLA je jedním z nejvíce polymorfních genetických systémů v lidském genomu. Molekuly II. třídy hrají zásadní roli v náchylnosti k T1DM nebo při jeho ochraně. Mohou totiž ve své drážce vázající se na antigen přijmout širokou škálu antigenů a prezentovat je různým T-lymfocytovým antigenovým receptorům, čímž se spustí rozpoznávání antigenu. [19]

6.3. Ankylozující spondylitida

Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění, které postihuje hlavně axiální kostru a sakroiliakální kloub (přechod mezi kostí křížovou a kostí kyčelní). Hlavními klinickými znaky ankylozující spondylitidy jsou zánětlivé bolesti zad. V průběhu času může způsobit roztavení některých malých kostí v páteři (obratle), viz obrázek 4. Toto tavení způsobuje, že páteř je méně flexibilní a může mít za následek špatné držení těla. Pokud jsou postižena žebra, může být obtížné zhluboka dýchat. [20, 21]



Obrázek 4: Roztavení obratlů [20]

Nemoc postihuje častěji muže než ženy. Příznaky a symptomy obvykle začínají v rané dospělosti. Zánět může také nastat v jiných částech těla – nejčastěji v očích. Za patogenezi je zodpovědných několik patogenních faktorů, jako jsou bakteriální infekce, environmentální podněty, prevalence HLA-B27 a HLA-E. Osoby s variantou HLA-B27 jsou vystaveny vyššímu riziku než u běžné populace při vývoji poruchy. Více než 90 % lidí, u kterých byla diagnostikována AS, je HLA-B27 pozitivních, ačkoli se tento poměr liší od populace k populaci. HLA-B27 je věnována kapitola 10. [21]

V současné době se studie zaměřují na imunologické a oxidační stresové faktory pro AS. T-buňky mají klíčovou roli v patogenezi kvůli jejich roli v regulaci imunitního systému. Mnoho výzkumů vyhodnotilo převahu regulačních T-buněk u autoimunitních poruch, jako je AS. Bylo potvrzeno, že k únavě došlo u více než poloviny pacientů s AS, což má vážný dopad na práci, rodinu, každodenní aktivity a výrazně snižuje kvalitu života pacientů. Bolest je jako hlavní faktor spojená s únavou. V současné době jsou faktory předpovídající únavu u pacientů s AS stále kontroverzní. [21, 22]

6.4. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je zánětlivé demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému, tedy mozku a míchy. Imunitní systém útočí na ochranný obal tzv. myelin, který pokrývá nervová vlákna a způsobuje problémy s komunikací mezi mozkiem a zbytkem

těla. Toto onemocnění může nakonec způsobit trvalé poškození nebo zhoršení nervů. Většina lidí s RS je diagnostikována ve věku mezi 20ti a 50ti lety, s touto chorobou jsou diagnostikovány nejméně dvakrát až třikrát více ženy než muži. Počáteční příznaky se zřídka objevují před 10. rokem nebo po 60. roku. Pravděpodobnost, že se u jednotlivce rozvine RS, je silně ovlivněna jeho etnickým původem a rodinnou anamnézou nemoci, což naznačuje, že genetická vnímavost je klíčovým určujícím faktorem rizika. [23-25]

Někteří lidé s těžkou RS mohou ztratit schopnost chodit, zatímco jiní mohou mít dlouhodobé remise bez jakýchkoli nových příznaků. Neexistuje žádný lék na roztroušenou sklerózu. Léčba však může pomoci urychlit zotavení, změnit průběh nemoci a zvládnout příznaky. Znaky a příznaky roztroušené sklerózy se mohou u jednotlivých osob a v průběhu nemoci velmi lišit v závislosti na umístění postižených nervových vláken. [24]

Nemoc RS není výhradně geneticky podmíněná choroba, ale je polygenní. To znamená, že neexistuje pouze jeden gen, který je zodpovědný za vznik onemocnění. Primární signál mapuje gen HLA-DRB1 nebo konkrétněji alelu HLA-DRB1*15:01. Pacienti s RS, kteří nesou haplotyp HLA-DRB1*15:01, jsou s větší pravděpodobností ženy a mají starší věk nástupu onemocnění, většinou nad 50. let. Tento haplotyp je dále spojen s přítomností oligoklonálních páسů, což jsou pásy imunoglobulinů (IgG), které je možné vidět při analýze pacientova krevního séra, získaného z krevní plazmy nebo mozkomíšního moku. HLA-DRB1*15:01 byl spojen s RS téměř ve všech testovaných populacích. To ukazuje na specifickou prezentaci antigenu jako na patogenní mechanismus, i když to plně nevysvětluje asociaci onemocnění. Nejčastěji se, ale vyskytuje v evropských populacích jako součást rozšířeného haplotypu, včetně HLA-DQA1*01:02-DQB1*06:02, a proto je obtížné rozlišit primární predispoziční lokus nebo alelu. [25, 26]

6.5. Narkolepsie

Narkolepsie je chronická porucha spánku charakterizovaná ohromující denní ospalostí a náhlými záchvaty spánku. Postihuje 0,02–0,05 % celkové bělošské populace. U lidí s narkolepsií je často obtížné zůstat vzhůru po dlouhou dobu, bez ohledu na okolnosti. Narkolepsie může způsobit vážné narušení každodenní činnosti. [27, 28]

Někdy může být narkolepsie doprovázena náhlou ztrátou svalového tonu, nazývanou kataplexie, která může být vyvolána silnou emocí. Narkolepsie, ke které dochází při kataplexii, se nazývá narkolepsie 1. typu (NT1). Kataplexie je příznak, který se vyskytuje, když se svalové napětí v různých částech těla nedobrovolně náhle sníží a trvá od několika sekund do několika

minut. Obecně je indukována smíchem, zlostí a dalšími emočními změnami. Narkolepsie, která se vyskytuje bez kataplexie, se nazývá narkolepsie typu 2 (NT2). Oba typy vykazují nadměrnou spavost během dne. Narkolepsie je chronický stav, na který neexistuje lék. Léky a změna životního stylu však mohou pomoci zvládnout příznaky. [27-29]

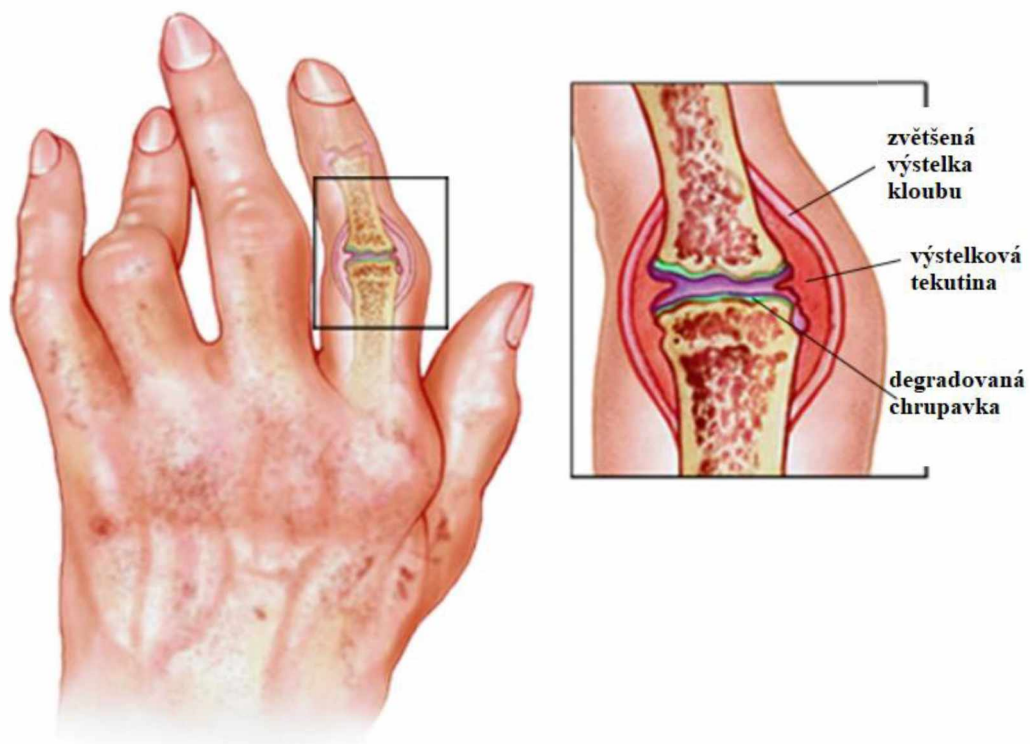
V patogenezi narkolepsie hrají klíčovou roli jak genetické, tak environmentální faktory. Téměř všichni pacienti s NT1 nesou haplotyp HLA-DQB1*06:02 a vazbu na polymorfismy v jiných genech, které nejsou HLA, což může ovlivnit imunitní regulační funkci a několik infekčních spouštěčů, což podporuje autoimunitní patogenezi. Porucha chování v REM spánku (fáze spánku charakteristická rychlými pohyby očí, z angl. Rapid Eye Movement) do značné míry přispívá k nočnímu narušení spánku a narkolepsie je nejčastější příčinou sekundární poruchy chování v REM spánku. Údajně postihuje 30–60 % pacientů s NT1, ale může být vidět také u NT2. [29]

Toto onemocnění je silně spojeno s bělochy a Japonci s haplotypem HLA-DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02. U Afroameričanů je nemoc spojena s haplotypy HLA-DQB1*06:02 nesoucími různé alely HLA-DRB1(*11:01 a *15:03), což naznačuje, že HLA-DQA1 a HLA-DQB1 hrají primární roli v citlivosti. [28]

6.6. Revmatoidní artritida

Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění, které postihuje klouby. U některých lidí může tento stav poškodit celou řadu tělesných systémů, včetně kůže, očí, plic, srdce a krevních cév. Ovlivňuje asi 1 % populace a je častější u žen než u mužů. Ačkoli etiologie revmatoidní artritidy (RA) zůstává nejasná, předpokládá se, že souhra genetiky, prostředí a imunitního systému hraje při jejím vývoji zásadní roli. Autoimunitní porucha nastane, když imunitní systém omylem napadne tkáň vlastního těla. Na rozdíl od poškození způsobeného opotřebením (osteoartrózy). RA ovlivňuje výstelku kloubů a způsobuje bolestivé otoky, které mohou nakonec vést k erozi kostí a deformitě kloubů, viz obrázek 5. Zánět spojený s RA je to, co může poškodit i další části těla. Zatímco nové typy léků dramaticky zlepšily možnosti léčby, těžká RA může stále způsobovat tělesné postižení. [30, 31]

Výsledný zánět zesiluje výstelku membrán, která může nakonec zničit chrupavku a kost v kloubu. Šlachy a vazy, které drží kloub pohromadě, se oslabují a protahují se. Kloub postupně ztrácí svůj tvar a zarovnění. Historicky pozorovací epidemiologické studie zkoumaly kouření jako důležitý modifikovatelný rizikový faktor RA. [30]



Obrázek 5: Otok kloubu [30]

Studie například naznačují, že kouření cigaret může zvyšovat oxidační stres v těle díky obsahu oxidačních plynů např. volných radikálů a dalších toxických látek např. nikotinu, které mohou zvyšovat riziko RA prostřednictvím narušených antioxidačních systémů. Kromě toho může chronické kouření nepříznivě ovlivnit vrozenou a adaptivní imunitní odpověď a vyvolat různé morfologické, fyziologické, biochemické a enzymatické změny, které vedou k narušené antibakteriální obraně, buněčné regulační aktivitě a zánětlivým reakcím, které mohou přispět k rozvoji RA. [31]

Dále se předpokládalo, že kouření by mohlo interagovat s HLA-DR sdílenými epitopovými geny a vyvolat imunitní reakce omezené HLA-DR na autoantigeny modifikované citrulinací. Ačkoli jsou tato vysvětlení biologicky věrohodná, je třeba provést další studie, aby se objasnily základní mechanismy kouření ve vývoji RA. [31]

Nemoc RA je silně spojena s antigenem HLA-DR4, který je hlavní implikovaný genetický faktor. Většina pacientů s RA exprimuje i HLA-DR1 nebo HLA-DR10. Nyní je známo, že ve většině případů je tato zvýšená citlivost spojena s lokusem HLA-DRB1

a konkrétně s přítomností alotypů HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:04 nebo HLA-DRB1*04:05. [32]

6.7. Systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) neboli lupus je systémové autoimunitní onemocnění, ke kterému dochází, když imunitní systém těla útočí na vlastní tkáně a orgány. Zánět způsobený lupusem může ovlivnit mnoho různých tělesných systémů, včetně kloubů, kůže, ledvin, krvinek, mozku, srdce a také i plic. SLE může být také charakterizován tvorbou protilátek proti nukleárním molekulám. Toto onemocnění postihuje především mladé ženy a vyskytuje se s různou frekvencí u rasových a etnických skupin. Ačkoli má SLE silnou genetickou složku, jeho výskyt je v rodinách ojedinělý a shoda je neúplná, a to i mezi dvojčaty. Tato pozorování společně naznačují, že etiologie SLE má genetické a environmentální složky, přičemž ženské pohlaví silně ovlivňuje patogenezi. [33, 34]

Lupus může být obtížně diagnostikovatelný. Nejvýraznější známka lupusu je vyrážka na obličeji, která připomíná křídla motýla, viz obrázek 6. Vyskytuje se v mnoha, ale ne ve všech případech lupusu. Někteří lidé se rodí se sklonem k rozvoji lupusu, který může být vyvolán infekcemi, určitými drogami nebo dokonce slunečním zářením. Na lupus neexistuje žádný lék. Během léčby se pouze kontrolují příznaky. [33]



Obrázek 6: Lupus [33]

Geny HLA dostaly značnou pozornost mezi kandidátními geny, které mohou být odpovědné za náchylnost k SLE. Některé alely jsou považovány za ochranné, zatímco jiné zvyšují riziko rozvoje určité podmínky. U jednoho člověka může mít alela kladný vliv na jeho zdravotní stav, ale ta samá alela u druhého člověka může negativně ovlivňovat jeho zdravotní stav. HLA I. třídy a II. třídy přispívají ke zvýšení rizika SLE. Lidé s alelou HLA-DR4, HLA-DR11 a HLA-DR14 jsou chráněni před touto nemocí. [35, 36]

6.8. AIDS

Jedná se o chronický, potenciálně život ohrožující stav způsobený virem lidské imunodeficiencie (HIV). Poškozením imunitního systému HIV narušuje schopnost těla bojovat s infekcemi a nemocemi. AIDS (syndrom získané imunodeficiencie) je pohlavně přenosná nemoc, ale může se také šířit kontaktem s infikovanou krví nebo z matky na dítě během těhotenství, porodu nebo kojení. Infekce HIV je obvykle spojena s akutním virovým syndromem, s následným zmizením příznaků a poté s 8 až 10 let asymptomatickým obdobím do vzniku AIDS, které je u dospělých definováno poklesem počtu $CD4^+$ T-buněk na méně než 200 buněk/ mm^3 nebo přítomnost určitých nemocí definujících AIDS, které odraží základní imunitní deficit. [37, 38]

Lék na HIV/AIDS neexistuje, ale léky mohou dramaticky zpomalit progresi onemocnění a mají schopnost snížit úmrtí v mnoha rozvinutých zemích. Příznaky HIV a AIDS se liší v závislosti na fázi infekce. U některých lidí nakažených virem HIV se během dvou až čtyř týdnů po vstupu viru do těla objeví chřipková nemoc. Toto onemocnění, známé jako primární neboli akutní infekce HIV, ta může trvat i několik týdnů. [38]

Molekuly HLA I. třídy jsou přímo zapojeny do schopnosti $CD8^+$ T-buněk rozpoznávat a zabíjet buňky infikované virem. Infekční choroby vedou k polymorfismu HLA I. třídy. HLA-B27 a HLA-B57 mají největší dopad na zpomalení nemoci. [37]

6.9. Sjögrenův syndrom

Jedná se o poruchu imunitního systému, která je identifikována svými dvěma nejčastějšími příznaky – suchýma očima a suchými ústy, protože imunitní buňky napadají a ničí exokrinní žlázy, které produkují slzy a sliny. Tento stav často doprovází další poruchy imunitního systému, jako je revmatoidní artritida a lupus. Spadá do skupiny zánětlivých revmatických poruch klasifikovaných jako onemocnění pojivové tkáně. U Sjögrenova syndromu (SS) bývají postiženy nejprve sliznice a žlázy vylučující vlhkost očí a úst – což má

za následek sníženou produkci slz a slin. Přestože se SS může vyvinout v kterémkoli věku, většina lidí je v době diagnózy starší 40 let. Tento stav je mnohem častější u žen. Léčba se zaměřuje na zmírnění příznaků. Spouštěcí mechanismus může být například infekce konkrétním virem nebo kmenem bakterií. [39, 40]

Pokud jde o SS, nejvýznamnější geny jsou HLA II. třídy, konkrétně alely HLA-DR a HLA-DQ. Haplotyp HLA může patrně ovlivnit závažnost autoimunitního onemocnění. Tvrdilo se, že pacienti SS s alelou HLA-DQ1 nebo HLA-DQ2 mají závažnější autoimunitní onemocnění než pacienti s jakoukoli jinou alelickou kombinací na HLA-DQ a haplotyp HLA-DR3-DQ2 byl označen jako možný marker pro aktivnější imunitní odpověď. [40]

6.10. Autoimunitní hepatitida

Jedná se o zánět jater, ke kterému dochází, když se imunitní systém těla otočí proti jaterním buňkám. Přesná příčina autoimunitní hepatitidy (AIH) je nejasná, ale zdá se, že genetické a environmentální faktory interagují v průběhu času při spouštění nemoci. AIH je relativně vzácné onemocnění, i když její výskyt v posledních letech vzrostl. Ovlivňuje děti i dospělé a je charakterizována hypergamaglobulinemií, cirkulujícími autoprotiilátky a hepatitidou na rozhraní. Ženy jsou častěji postiženy než muži. [41, 42]

Nemoc AIH je velmi heterogenní onemocnění s řadou klinických projevů, od asymptomatických biochemických abnormalit jater po akutní závažnou hepatitidu nebo dokonce akutní selhání jater. Rozdíl mezi zdravými a poškozenými játry lze vidět na obrázku 7. Neléčená autoimunitní hepatitida může vést k cirhóze, a nakonec k selhání jater. Když je však diagnostikována a léčena brzy, může být AIH často kontrolována léky, které potlačují imunitní systém. Transplantace jater může být alternativou, pokud AIH nereaguje na léčbu léky nebo v případě pokročilého onemocnění jater. [41, 42]



Obrázek 7: Srovnání zdravých jater a jater při AIH. [43]

Autoimunitní hepatitida typu 1 (AIHT1) je nejčastější typ onemocnění. Může se vyskytnout v každém věku. Přibližně polovina lidí s AIHT1 má jiné autoimunitní poruchy, jako je celiakie, revmatoidní artritida nebo ulcerózní kolitida. Autoimunitní hepatitida typu 2 (AIHT2) se nejčastěji vyskytuje u dětí a mladých lidí, ačkoli se může vyskytnout i u dospělých. Tento typ autoimunitní hepatitidy může doprovázet jiná autoimunitní onemocnění. [41]

Genetická citlivost na AIH je silně spojena s alelou HLA-DRB1. HLA-DRB1*13 může být alelou vnímavosti na výskyt autoimunitní hepatitidy. HLA-DRB1*07 a HLA-DRB1*15 mohou být alely vnímavosti na výskyt AIHT1. [44]

7. TYPYZACE HLA SYSTÉMU

Jedná se o genetické testy, které se využívají k identifikaci určitých individuálních variací imunitního systému člověka. Tento proces je rozhodující pro určení, kteří lidé mohou bezpečně darovat kostní dřeň, pupečnickovou krev nebo orgán člověku, který potřebuje transplantaci. Existuje mnoho různých zdravotních stavů, které mohou vyžadovat léčbu transplantací. Například různé typy rakoviny krve a genetické poruchy krve. Vzorky jsou odebírány buď z kostní dřeně, nebo z periferní krve. Jedná se například o léčbu srpkovitých chorob. [45, 46]

Pevná transplantace orgánů může být nezbytná pro všechny zásadní orgány, které jsou jakýmkoliv způsobem poškozeny. K tomu může dojít traumatem, infekcí, autoimunitním onemocněním, genetickým onemocněním, toxiny nebo mnoha dalšími chorobnými procesy. Stanovení HLA molekul se tedy využívá v transplantační imunologii, ale můžeme ji také použít v kriminalistice. [45, 46]

HLA antigeny u člověka lze zjistit dvěma postupy:

- sérologickou metodou – k identifikaci dané HLA molekuly
- molekulárně genetickou metodou – k určení HLA alely na úrovni nukleové kyseliny [45]

7.1. Sérologické metody

V rutinní typizaci HLA pro transplantaci orgánů se stále používá sérologická metoda jako standard, i když stále častěji se používají molekulární techniky. Tyhle metody mají za úkol rozlišit molekuly HLA I. třídy a II. třídy, a to na základě antigenních rozdílů, které jsou podmíněny aminokyselinovým složením polymorfních částí molekul HLA. Jsou využívány typizační séra, která se získávají z krve matky po porodu, která má minimálně dvě děti. Podmínkou je, že dítě zdědí HLA molekuly po svém otci. Imunitní systém matky, začne vytvářet protilátky, což vykazuje, že zareaguje na odlišné HLA molekuly. U 20 % žen se po opakovaných těhotenstvích vyskytují HLA protilátky trvale, jedná se o protilátky IgG. Další možnost získání protilátek je transfuze, jak už bylo zmíněno. [45, 47]

Typizace je prováděna lymfocytotoxickým testem. Určují se HLA antigeny, které jsou přítomné na vyšetřovaných lymfocytech. Metody se provádí na tzv. Terasakiho destičkách, na kterých jsou nakapány typizační séra, která tvoří testovací panel, ve kterém jsou protilátky proti

HLA antigenům. K séru v destičkách se přidají lymfocyty testovaného jedince. Pokud odpovídá specifická protilátka HLA antigenu, který je na povrchu buňky, dojde při inkubaci ke spojení. Pokud ne, k vazbě nedojde. K reakci se přidává komplement, aby šla vazba lépe vidět. [9, 45].

Výsledek se pozoruje pod fluorescenčním mikroskopem. Pokud dojde k lýze buněk s navázanými protilátkami po přidání komplementu, reakce je pozitivní. Pokud se buňky s protilátkami nespojili, mluvíme o negativní reakci. Buňky zůstávají neporušené. [45]

Hlavní nevýhodou sérologických metod je vysoká pravděpodobnost nepřesnosti, protože některé antigeny určitého lokusu jsou schopny tvořit tzv. křížově reagující skupiny. To znamená, že například HLA-B7 reaguje na sérum anti-B27, ale i na anti-B22 a anti-B40. Sérologické testování je složité i u nádorových buněk, proto se využívají raději molekulárně genetické metody. [47]

7.2. Molekulárně genetické metody

7.2.1. Metoda PCR

Jedná se o metodu, která je široce používána v molekulární biologii. Umožňuje rychle vytvořit miliony až miliardy kopií specifického vzorku DNA, což vědcům umožňuje odebrat velmi malý vzorek DNA. PCR se obecně používá k diagnostice nemocí, identifikaci bakterií a virů, v kriminalistice u trestných činů. Identifikace alel probíhá vždy v místě HLA genu, které je nejvíce polymorfní, jedná se o oblast zodpovědnou za vazbu peptidového fragmentu. Většina metod PCR se spoléhá na termální cyklování. To vystavuje reaktanty opakovaným cyklům zahřívání a ochlazování, aby umožnily různé reakce závislé na teplotě. Konkrétně DNA tavení a replikaci DNA řízenou enzymy. [45, 48]

K reakci jsou potřeba především specifické primery, což jsou krátké kousky DNA, které jsou vyrobeny v laboratoři. Protože jsou vytvořeny pro danou reakci, mohou mít primery sekvenci nukleotidů, která je zrovna potřeba. Jsou také nezbytné, protože DNA polymeráza se nemůže připojit na žádné staré místo. Přidá se pouze na existující kousek DNA. [48]

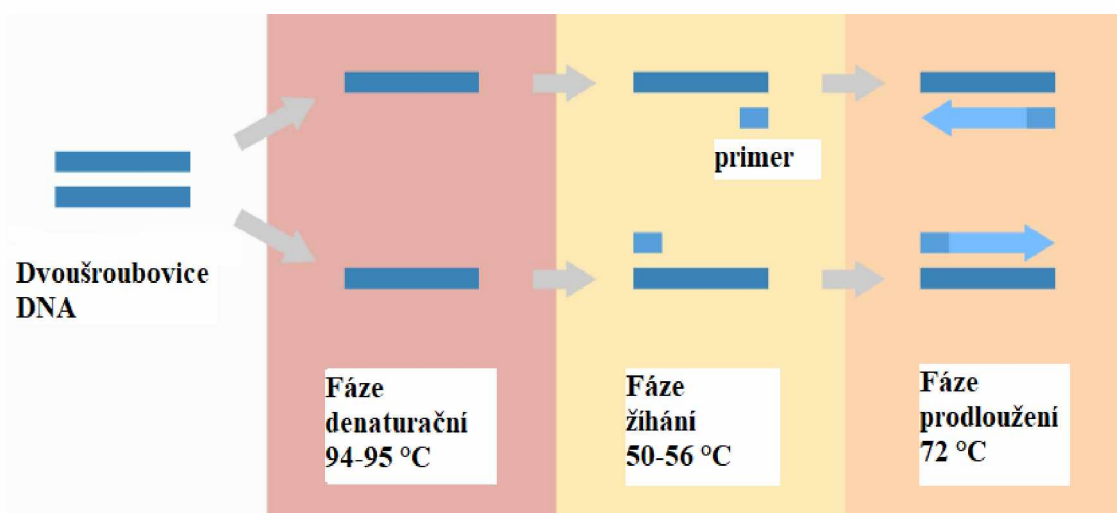
Dále je k reakci potřeba DNA polymeráza. Jedná se o přirozeně se vyskytující komplex proteinů, jejichž funkcí je kopírování DNA buněk před tím, než se rozdělí na dvě. Když molekula DNA polymerázy narazí do primeru, který je spárován s bází s delším kouskem DNA, připojí se ke konci primeru a začne přidávat nukleotidy. DNA polymeráza se v lidském těle rozkládá při teplotách pod 95 °C, což je teplota nezbytná k oddělení dvou komplementárních řetězců DNA ve zkumavce. [48]

Další důležitou složkou u metody PCR jsou deoxyribonukleotidy, které tvoří směs čtyř typů nukleotidů – deoxyadenozintrifosfát, deoxytymidintrifosfát, deoxyguanozintrifosfát a deoxycytozintrifosfát. Nukleotidy jsou stavební kameny, z nichž jsou molekuly DNA vyrobeny. DNA polymeráza zachycuje nukleotidy, které se vznášejí v kapalině kolem ní a připojují je na konec primeru. [48]

Existují tři hlavní fáze PCR:

- denaturace – výsledkem jsou dva jednotlivé řetězce DNA, které budou působit jako šablony pro výrobu nových řetězců DNA.
- žihání – během této fáze se reakce ochladí na 50 až 65 °C. To umožňuje primerům připojit se na konkrétní místo na jedno vláknové templátové DNA pomocí vodíkové vazby.
- prodloužení – během tohoto posledního kroku se teplo zvýší na 72 °C, aby se nová DNA mohla vyrobit speciálním enzymem polymerázy Taq DNA, který přidává báze DNA. Výsledkem je obrovské množství kopií specifického segmentu DNA vytvořených v relativně krátkém časovém období. [49]

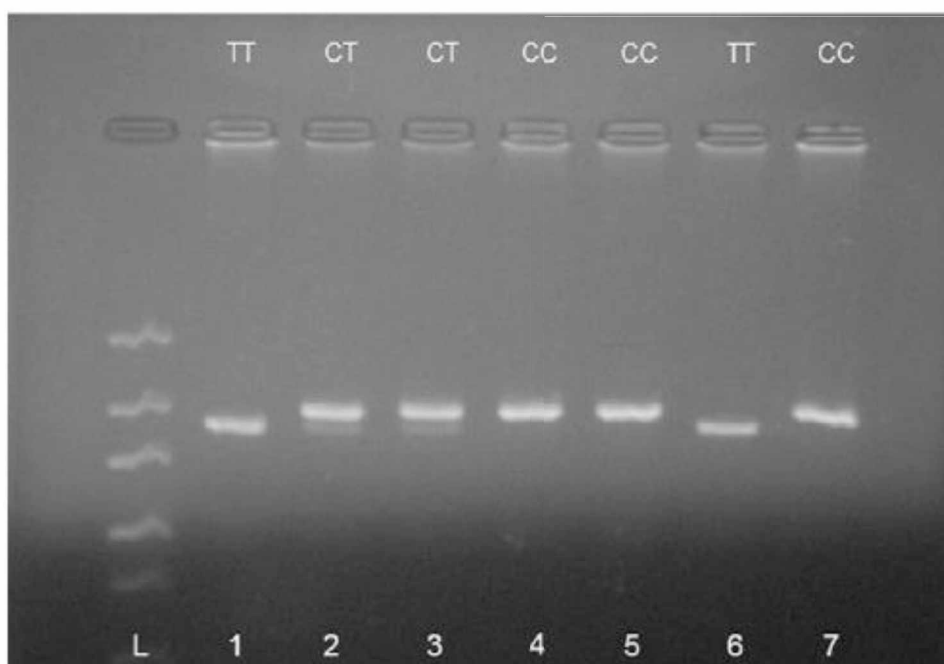
Tato tři stádia se opakují 20–40x. Pokaždé se zdvojnásobí počet kopií DNA. Fáze lze vidět na obrázku 8. U některých vysokorychlostních strojů může být úplná reakce PCR provedena za několik hodin nebo dokonce méně než za hodinu. Po dokončení PCR lze ke kontrole množství a velikosti produkovaných fragmentů DNA použít metodu zvanou elektroforéza. [49]



Obrázek 8: Ilustrace znázorňující hlavní kroky PCR. [49]

7.2.2. PCR se sekvenčně specifickými primery

Technika PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) se poprvé objevila na počátku 90. let. Metoda slouží ke zjištění konkrétní HLA oblasti – HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 a HLA-DQB1, viz obrázek 9. U této metody je používají párové primery. K PCR reakci dojde, pokud jsou primery zcela komplementární k dané DNA sekvenci. Použitím elektroforézy v agarózovém gelu, je způsobeno rozdělení DNA fragmentů. Poté se přidá se fluorescenční barvivo. Reakci je možné sledovat pod UV zářením. [47, 50]



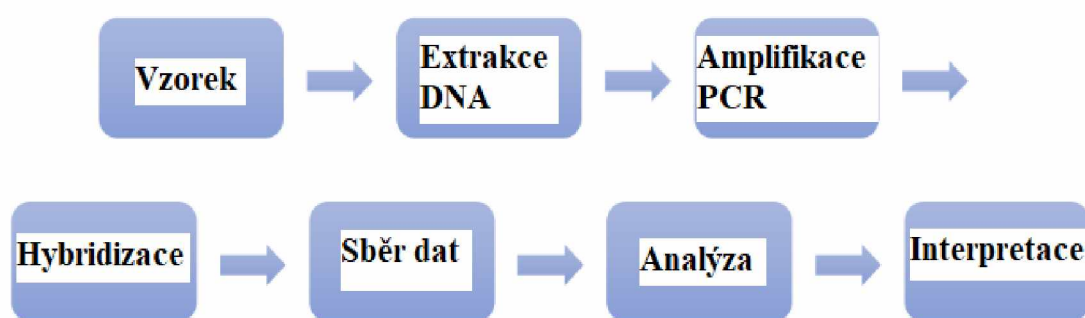
Obrázek 9: Pásový vzorek pozitivních vzorků pro HLA-DRB1*15:01 pomocí PCR-SSP v agarózovém gelu se standardizovanou směsí. [51]

Pozitivní reakci lze poznat podle svítícího proužku. Identifikovat alely můžeme z kombinace použitých primerů. Techniky PCR-SSP jsou široce využívány pro genotypizaci SNP (jedná se o měření genetických variací jednonukleotidových polymorfismů, a to mezi členy daného druhu). Navíc je typizace PCR-SSP vhodná pro haplotypování sousedních jednonukleotidových polymorfismů. Kromě toho lze přítomnost dvou alel na jednom chromozomu prokázat, když se dvě vhodné alely a specifické primery kombinují v jediné reakci PCR. [47, 50]

Výsledek genotypizace je vyhodnocen na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti produktu PCR specifického pro alelu. Tato metoda je mnohem méně finančně náročná než tradiční analytické metody, jako je průtoková cytometrie, což umožní získat experimentální výsledky v krátkodobém horizontu. [47, 50]

7.2.3. PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy

Jedná se o metodu, která má výhody vysoké specifity, citlivosti a nízké velikosti vzorku. Využívá izotopových nebo neradioaktivně značených sond k hybridizaci cílového fragmentu z amplifikace PCR, přičemž se rozhoduje o individuálním genotypu na základě pozitivních skvrn. Používá se jeden pár primerů, aby došlo k amplifikaci, tedy k zesílení a zvětšení dané části lokusu. Rozlišení alel probíhá reverzní hybridizací se sekvenčně specifickými DNA oligosondami. Pracovní postup této metody je znázorněn na obrázku 10. Sonda s vazbou produktu amplifikace je zvýrazněna fluorescencí, enzymatickou reakcí anebo radioizotopem. [52, 53]

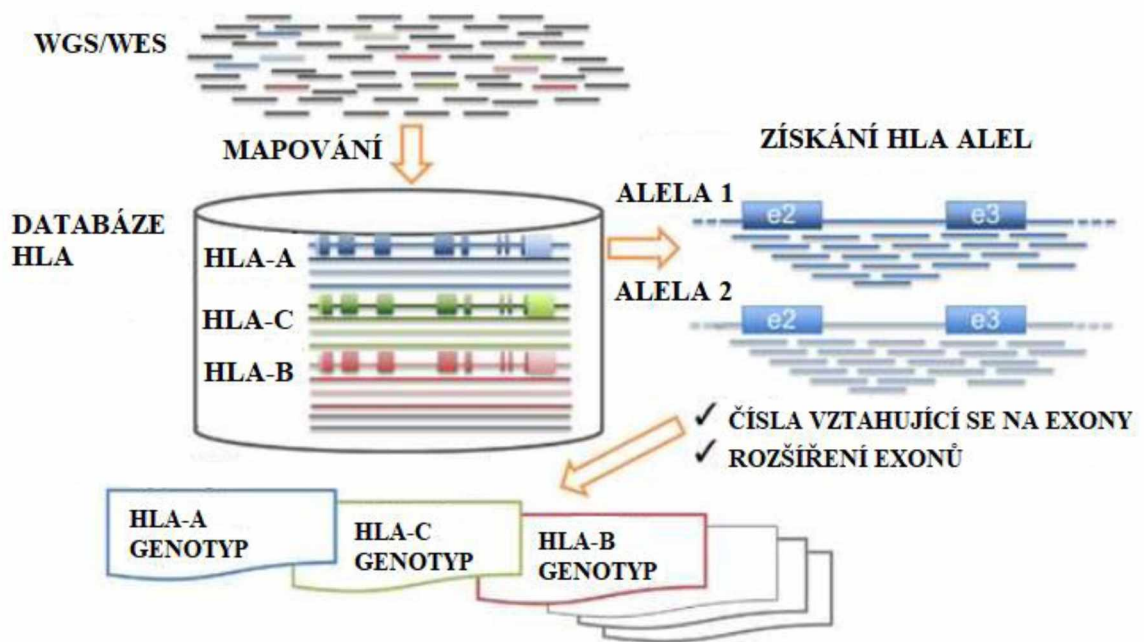


Obrázek 10: Pracovní postup PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy. [53]

První aplikace PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy, co se týče HLA molekul, byly zahájeny s HLA-DQA1, následovala I. třída a další specifické vlastnosti II. třídy. Typizace této metody kombinuje schopnost definovat HLA specifitu analýzou odpovídajících sekvencí DNA, s možností studovat velké populace normálních a postižených jedinců. Je potřebná k charakterizaci lokusů MHC spojených s náchylností k autoimunitním onemocněním, jako je revmatoidní artritida, diabetes mellitus typu I, celiakie. [52, 53]

7.2.4. Sekvenování HLA alel

Metoda slouží k identifikaci nových HLA alel a k určení pořadí nukleotidů. Využívají dideoxyribonukleotidy (ddNTP), které jsou značené fluorochromem. DdNTP zastaví další množení po navázání na daný úsek DNA. Vznikají fragmenty DNA, které jsou různě dlouhé a vždy jsou zakončeny ddNTP. Na gelové koloně se na základě své délky fragmenty rozdělí. Pomocí laseru lze sledovat fluorescenci. Schéma typizace HLA založené na sekvenování lze vidět na obrázku 11. [47]



Obrázek 11: Typizace HLA založené na sekvenování. [54]

Metoda byla původně vyvinuta jako metoda ručního sekvenování. Později byla aplikována na alely I. třídy. Její předností je zavedení barvivem značených primerů a fluorescenčního automatizovaného sekvenování. To výrazně zlepšilo přesnost. Sekvenování HLA alel je jediná technika, která přímo detekuje nukleotidovou sekvenci alely, takže ji lze přesně přiřadit. Vyžaduje velmi drahé vybavení a složité laboratorní metody, aby bylo dosaženo jasných výsledků typizace HLA s vysokým rozlišením. [54]

7.2.5. Metoda mikročipu

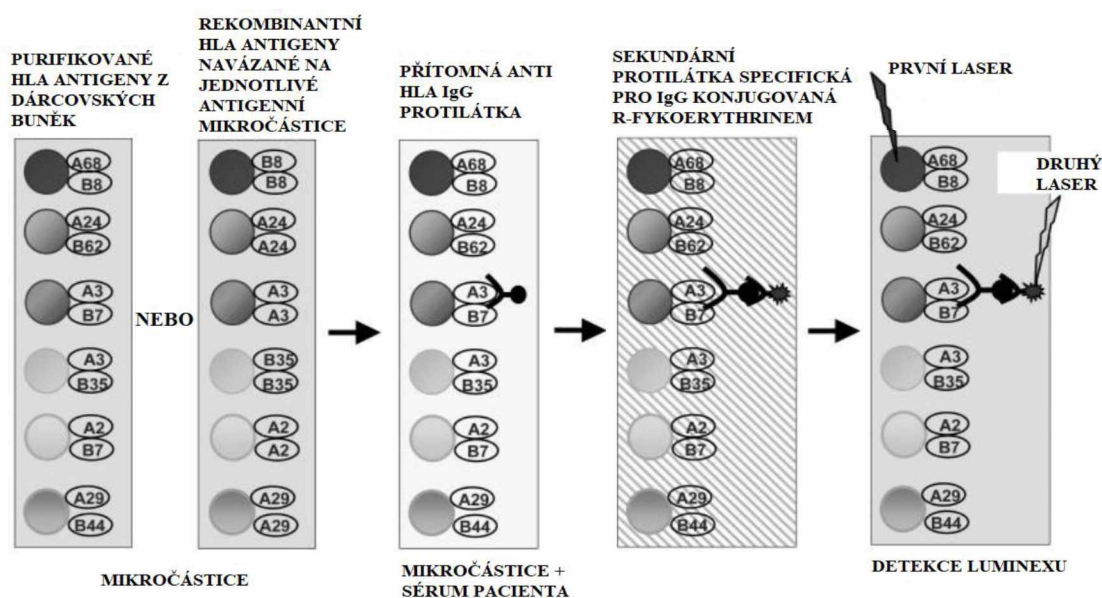
Jedná se o revoluční postup v genotypizaci HLA. Principem této metody je směřovat na ploše tzv. mikročipu o velikosti 1x1 cm oligonukleotidové sondy až v řádech tisíců. Mikročip se naváže k DNA a dojde k hybridizaci, která je hodnocena pomocí specifických analyzátorů. [9]

Zařízení PCR na bázi mikročipů byla realizována pomocí různých kombinací křemíku, skla anebo plastů. Silikonové a plastové povrchy mohou být pasivovány silanizací. S povrchovou pasivací může být PCR prováděna efektivně a ekonomicky v čipových mikro reaktorech. Snížená tepelná hmotnost mikročipů umožňuje extrémně rychlé zvyšování teploty. [55]

Technologie mikročipů může také hrát důležitou roli v detekci patogenů nebo infekčních chorob. V laboratořích tato metoda není moc využívána. [9, 56]

7.2.6. HLA typizace průtokovým analyzátořem (Luminex)

Základním principem technologie Luminex je schopnost měřit více analytů současně v jedné reakční jamce. Molekulární reakce probíhají na povrchu plastových mikrokuliček nazývané fluorochromy. Jsou barevně odlišné a pomáhají ke spojení s DNA sondou, která je určena k zachycení cílových molekul anebo k zachycení s protilátkou. Při použití této metody je možné vytvořit více než 100 různých sad mikročásteček. Nejdříve probíhá amplifikace DNA a poté hybridizace s DNA sondami, které jsou navázány na mikročástečky. Každá mikročástečka vykazuje fluorescenční signály, které se snímají v průtokovém analyzátořu na laserových papřscích. Jeden laser excituje barvy uvnitř mikročásteček, aby zjistil, která mikročástečka se právě čte. Druhý laser excituje barvu na povrchu mikročásteček. Nakonec jsou data zpracována a vyhodnocena. Schéma metody je znázorněno na obrázku 12. [9, 57]



Obrázek 12: Screening HLA protilátek pomocí technologie Luminex. [57]

Technologie screeningu protilátek HLA na Luminexu je široce rozšířena v laboratořích přidružených k transplantaci ledvin a umožňuje jak screening, tak identifikaci protilátek s vysokou citlivostí a specificitou. Technologie Luminex pro analýzy histokompatibility obecně poskytuje rychlé zpracování vzorků v 96 jamkovém formátu v kombinaci s omezenou technickou složitostí, což znamená vysokou efektivitu nákladů. Zejména doba trvání zkoušky a náklady na pořízení strojů jsou výrazně nižší ve srovnání se stanovením strategie typizace HLA. Společnosti poskytující testy na testování histokompatibility pro Luminex navíc nabízejí celou řadu testů pokrývajících různé HLA lokusy a úroveň rozlišení pro genotypizaci a rovněž pro diagnostiku protilátek. [57]

8. VÝZNAM HLA V TRANSPLANTAČNÍ MEDICÍNĚ

Jak už je v bakalářské práci uvedeno, molekuly HLA hrají důležitou roli v transplantační imunologii. Z typizace HLA je možné posoudit při transplantaci imunitní kompatibilitu mezi dárce a příjemcem. [58]

8.1. Transplantace

Jedná se terapeutický zákrok, při kterém dochází k nahrazení nefunkční tkáně příjemce, příslušnou zdravou tkání nebo orgánem dárce. Transplantace orgánů je jedním z největších terapeutických úspěchů 20. století. Primární funkcí imunitního systému je ochrana hostitele před infekčními mikroby v jeho prostředí. Tento systém se vyvíjel po miliony let v reakci na koexistenci s mikroorganismy. Systém lze v zásadě rozdělit na dvě složky, vrozenou a adaptivní imunitu. Při transplantaci orgánů je získaná neboli adaptivní imunita považována za hlavní reakci na transplantovanou tkáň, protože hlavním cílem imunitní odpovědi jsou molekuly MHC exprimované na povrchu dárcovských buněk. [58, 59]

Vrozená imunita nebo také nazývaná přirozená imunita, označuje nespecifickou odpověď, která zahrnuje nábor různých složek imunitního systému, jako jsou makrofágy, neutrofilové, cytokiny, několik buněčných receptorů, komplementové složky a antimikrobiální peptidy. Tato imunita je fylogeneticky starší ve srovnání s adaptivní imunitou. Hlavními efektorů adaptivní imunity jsou T-buňky a B-buňky. T-buňky rozpoznávají antigen ve formě peptidu navázaného na MHC. B-buňky mají imunoglobulinové receptory, které rozpoznávají antigenní části určených molekul. Vrozená a adaptivní imunita, jsou úzce propojeny a měly by být považovány za doplňkové a spolupracující. [59]

Když je prováděna transplantace, molekuly HLA od dárce jsou rozpoznávány imunitním systémem příjemce vyvolávající aloimunní odpověď. Ukázalo se, že shoda dárce a příjemce pro MHC antigeny má významný pozitivní účinek na přijetí štěpu. [59]

8.1.1. Autologní transplantace

Jedná se o tzv. přenos tkáně nebo orgánu v rámci jednoho pacienta. Autologní transplantace je nazývána i jako autotransplantace. Při této transplantaci se shromažďují vlastní kmenové buňky tvořící krev. Poté se člověk léčí vysokými dávkami chemoterapie. Léčba vysokými dávkami ničí rakovinné buňky, ale zbavuje se i buněk produkujících krev, které zůstávají v kostní dřeni. Poté se shromážděné kmenové buňky vloží zpět do krevního řečiště,

což umožňuje kostní dření produkovat nové krvinky. Lékaři obvykle přidávají shromážděné kmenové buňky do krevního řečiště pacienta stejným způsobem, jakým provádějí krevní transfúzi. V následujících dnech a týdnech se transplantované kmenové buňky přesunou do kostní dřeně v kostech. Tam postupně začnou produkovat nové krvinky. Lidé, kteří před transplantací podstoupili vysoké dávky chemoterapie nebo radioterapie, mohou mít krátkodobé nebo dlouhodobé komplikace, dokud se jejich produkce krvinek nevrátí k normálu. Tyto komplikace mohou zahrnovat infekci, krvácení, anémii atd. Dosud není známo, zda molekuly HLA mohou sloužit jako markery výsledku v autologních transplantacích. [9, 60, 61]

8.1.2. Alogenní transplantace

Při alogenní transplantaci jsou kmenové buňky odebírány od vhodného dárce a transplantovány do pacienta k potlačení onemocnění a obnovení imunitního systému pacienta. Hledání vhodného dárce je klíčem například k úspěšné transplantaci alogenních kmenových buněk. Dárce je často bratr, sestra nebo jiný příbuzný. V mnoha případech se registry dárců používají k nalezení vhodné shody pomocí typizace tkání. Tkáňová typizace používá HLA molekuly, které se nacházejí na bílých krvinkách a tkáních, aby určily, zda jsou kmenové buňky dárce správné shody. Porovnávají se pomocí HLA testu krev a tkáň pacienta s krevními vzorky dárce. HLA molekuly fungují jako transplantační antigeny a jako markery ve spojení s chorobami. Rozdíl v lokusech HLA-A, HLA-B a HLA-DR v alogenních transplantacích kmenových buněk má za následek zvýšený výskyt onemocnění štěpu proti hostiteli, odmítnutí štěpu a snížení přežití. [9, 61, 62]

Kromě použití kmenových buněk z cirkulující krve dárce, mohou být použity také kmenové buňky z pupečnickové krve (transplantace pupečnickové krve). Kmenové buňky v pupečnickové krvi jsou méně zralé, což znamená, že mají potenciál diferencovat se na různé typy buněk. A protože buňky jsou při narození zmrazené, vyhýbají se poškození životního prostředí a stárnutí. Transplantace pupečnickové krve, proto obvykle nevyžadují extrémně kompatibilní typ tkáně a mohou pomoci snížit riziko komplikací. [62]

Transplantace obnovuje dodávku normálních buněk, které byly zničeny intenzivními terapiemi. V některých případech lze použít minitransplantaci. Jedná se o alogenní transplantaci, která před transplantací používá nižší, méně toxické dávky chemoterapie anebo celkové ozařování těla. To potlačuje imunitní systém pacienta, aby se zabránilo odmítnutí transplantátu. [62, 63]

Alogenní transplantace kmenových buněk také nese riziko komplikace známé jako onemocnění štěpu proti hostiteli, což je stav, kdy darované buňky napadají tkáň. Čím menší je shoda typu tkáňe mezi pacientem a dárcem, tím větší je riziko. [62]

8.1.3. Další typy transplantací

Jedná se o transplantace, které jsou méně používané. Například o syngenní transplantaci, což je definována jako přenos tkáňe nebo orgánu mezi jednovaječnými dvojčaty. Dále se může využít xenogenní transplantace neboli xenotransplantace. Zde se jedná o přenos tkáňe nebo orgánu mezi dvěma jedinci různého živočišného druhu. Takle transplantace je velmi vzácná. Mezi méně používané můžeme zařadit i implantaci, což je transplantace umělé tkáňe. [9]

8.2. Transplantace kostní dřeně

Transplantace kostní dřeně je proces, kdy se do těla vnáší zdravé kmenové buňky tvořící krev a nahrazují poškozenou nebo nemocnou kostní dřeň. Transplantaci kostní dřeně tedy můžeme nazvat i jako transplantaci kmenových buněk. Transplantace se provádí, když kostní dřeň přestane fungovat a neprodukuje dostatek zdravých krvinek. Transplantace může být provedena autologně nebo alogenně. [64]

Transplantace kostní dřeně může pomoci lidem s řadou jak rakovinných (maligních), tak nerakovinných (benigních) nemocí, včetně akutní leukémie, aplastické anémie, poruše plazmatických buněk atd. Transplantace kostní dřeně představuje četná rizika. Někteří lidé mají minimální problémy, zatímco jiní mohou mít vážné komplikace, které vyžadují léčbu nebo hospitalizaci. Komplikace někdy ohrožují i život. Konkrétní rizika závisí na mnoha faktorech – včetně nemoci nebo stavu, který způsobil, že potřebuje člověk transplantaci, dále typu transplantace a věku a celkovém zdraví. Možné komplikace zahrnují například onemocnění štěpu proti hostiteli (pouze u alogenní transplantace), poškození orgánů, infekci, neplodnost. [64]

V posledním desetiletí došlo k významnému vývoji v technologiích typizace HLA a v dostupnosti výsledných údajů z velkých multicentrických studií hodnotících rostoucí počet zdrojů kmenových buněk. Společně tyto pokroky poskytují vodítko pro zvažování při vývoji protokolů klinického hodnocení, aby se zajistila zobecnění výsledků na úroveň standardní péče. Jak už bylo zmíněno, aby se dosáhlo nejvíce identickým HLA molekulám, je nejvhodnější dárcem sourozenec. Pokud je to možné, měly by být přiřazeny familiární haplotypy, aby se stanovila předpokládaná shoda s vysokým rozlišením mezi dárcem a příjemcem. [65]

Výběr dárců pro transplantaci kmenové buňky, zahrnuje pečlivé posouzení dostupnosti a stavu lidských dárců leukocytového antigenu. Větší zapojování HLA molekul do transplantace je neustále v pohybu, protože se mění technologie a rozdíly ve výsledcích klinických transplantací. Důležitost HLA-A, -B, -C a -DR byla dobře popsána v různých studiích. Méně než 20 % transplantací odpovídajících HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1 je také kompatibilních s HLA-DPB1 kvůli velmi slabé nerovnováze vazeb mezi lokusy DR/DQ a lokusem DP. Kromě toho nízká frekvence náhodného párování HLA-DP brání přesné analýze skutečných nezávislých účinků nesouladu HLA-DP s výjimkou případů velmi velkého počtu transplantací. [66]

8.3. Rejekce

Rejekce neboli odmítnutí transplantátu je proces, při kterém imunitní systém příjemce útočí na transplantovaný orgán nebo tkáň. Imunitní systém obvykle člověka chrání před látkami, které mohou být škodlivé. Řadíme mezi ně bakterie, jedy a někdy rakovinné buňky. Tyto škodlivé látky mají proteiny zvané antigeny, které potahují jejich povrch. Když osoba během transplantační operace obdrží orgán nebo tkáň od někoho jiného, imunitní systém může rozpoznat, že je orgán nebo tkáň cizí. Čím více jsou antigeny mezi dárcem a příjemcem shodné, tím menší je pravděpodobnost, že orgán nebo tkáň bude odmítnuta. Tkáňová typizace zajišťuje, že orgán nebo tkáň je co nejvíce podobná tkáni příjemce. Žádní dva lidé, kromě identických dvojčat, nemají identické tkáňové antigeny. [67, 68]

Cílem je zabránit imunitnímu systému v „útok“ na nově transplantovaný orgán. Existují však některé výjimky. Transplantace rohovky jsou zřídka imunitním systémem odmítnuty, protože rohovka nemá krevní zásobení. Taktéž transplantace z jednoho identického dvojčete na druhé imunitní systém téměř nikdy neodmítne. [67, 68]

Existují tři typy odmítnutí:

- hyperakutní rejekce – objevuje se několik minut po transplantaci, když jsou antigeny zcela bezkonkurenční. Tkáň musí být okamžitě odstraněna, aby příjemce nezemřel. Tento typ odmítnutí je patrný, když je příjemci podán nesprávný typ krve. Například když je člověku dána krev typu A, když je typ B.
- akutní rejekce – k odmítnutí může dojít kdykoli od prvního týdne po transplantaci do 3 měsíců. Všichni příjemci mají určité množství akutního odmítnutí.

- chronická rejekce – odmítnutí může nastat po mnoho let od transplantace. Neustálá imunitní reakce těla na nový orgán pomalu poškozuje transplantované tkáně nebo orgány. [67]

9. HLA PROTILÁTKY

HLA protilátky jsou proteiny, které mohou být přítomny v krvi pacienta, například po úspěšné transplantaci. Někteří lidé si nevyvíjejí HLA protilátky vůbec, zatímco jiní ano. Není jasné, proč tomu tak je, ale lidé s největší pravděpodobností vyvinou HLA protilátky z předchozí transfúze krve nebo z krevních destiček, z transplantace orgánů anebo ženy při těhotenství. Protilátky se mohou vyšetřovat lymfocytotoxickým testem (LCT), který je uveden již v podkapitole 7.1. Sérologické metody. Dále metodou ELISA a průtokovou cytometrií. [47, 69]

9.1. Metoda ELISA

Enzymově vázaný imunosorbentový test (ELISA) je metoda zachycení cílového antigenu (nebo protilátky) ve vzorcích pomocí specifické protilátky (nebo antigenu) a detekce cílové molekuly pomocí enzymatické reakce s jeho substrátem. V metodě ELISA se používají různé kombinace antigen-protilátka, vždy obsahující antigen nebo protilátku značenou enzymem a enzymatická aktivita se měří kolorimetricky. Enzymatická aktivita je měřena pomocí substrátu, který mění barvu, když je modifikován enzymem. Měření absorpce světla vytvořeného po přidání substrátu se měří a převádí na numerické hodnoty. [47, 70]

V závislosti na kombinaci antigen-protilátka se test nazývá:

- přímá ELISA – cílový protein (nebo cílová protilátka) je imobilizován na povrchu mikrotitračních jamek a inkubován s enzymem značenou protilátkou k cílovému proteinu (nebo specifickému antigenu k cílové protilátce). Po promytí se měří aktivita dobře vázaného enzymu na mikrotitrační destičce.
- nepřímá ELISA – cílový protein je imobilizován na povrchu mikrotitračních jamek a inkubován s protilátkou proti cílovému proteinu (primární protilátka), následovanou sekundární protilátkou proti primární protilátce. Po promytí se měří aktivita dobře vázaného enzymu na mikrotitrační destičce. Přestože nepřímá ELISA vyžaduje více kroků než přímá ELISA, značené sekundární protilátky jsou komerčně dostupné, což eliminuje potřebu označení primární protilátky.
- sendvičová ELISA – protilátka proti cílovému proteinu je imobilizována na povrchu mikrotitračních jamek a inkubována nejprve s cílovým proteinem a poté

s jinou protilátkou specifickou pro cílový protein, která je značena enzymem. Po promytí se měří aktivita dobře vázaného enzymu na mikrotitrační destičce. Imobilizovaná protilátka a enzymem značená protilátka musí rozpoznávat různé epitopy cílového proteinu.

- konkurenční ELISA – protilátka specifická pro cílový protein je imobilizována na povrchu mikrotitračních jamek a inkubována se vzorky obsahujícími cílový protein a známé množství enzymem značeného cílového proteinu. Po reakci se měří aktivita dobře vázaného enzymu na mikrotitrační destičce. Když je hladina antigenu ve vzorku vysoká, hladina antigenu značeného enzymu vázaného na protilátku je nižší a barva je světlejší. Naopak, když je nízká, hladina antigenu značeného enzymu vázaného na protilátku je vyšší a barva tmavší. [70]

9.2. Průtoková cytometrie

Jedná se o technologii, která rychle analyzuje jednotlivé buňky nebo částice, když protékají jednotlivými nebo více lasery, zatímco jsou suspendovány v pufrovaném solném roztoku. Každá částice je analyzována na rozptyl viditelného světla a jeden nebo více parametrů fluorescence. Viditelný rozptyl světla je měřen ve dvou různých směrech. Rozptyl světla je nezávislý na fluorescenci. Vzorky jsou připraveny pro měření fluorescence pomocí transfekce a exprese fluorescenčních barvení fluorescenčními barvivy (např. propidium jodid) nebo barvením fluorescenčně konjugovanými protilátkami. [47, 71]

Přístroje používané pro průtokovou cytometrii se vyvíjely v posledních několika desetiletích. Více laserových systémů je běžných, stejně jako přístroje, které jsou navrženy pro specifické účely, jako jsou systémy s 96 jamkovými zavaděči určené pro analýzu kuliček, systémy kombinující mikroskopii a průtokovou cytometrii a systémy, které kombinují hmotnostní spektrometrii a průtokovou cytometrii. [71]

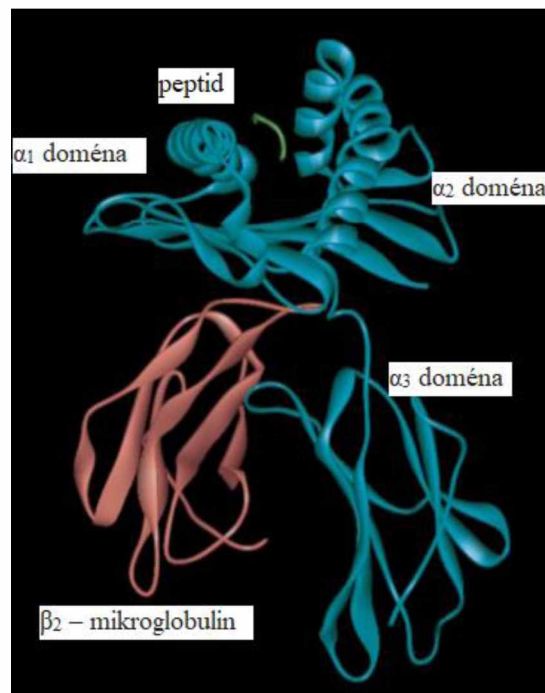
Tradiční průtokové cytometry se skládají ze tří systémů: fluidika, optika a elektronika. Fluidní systém se skládá z tekutého pláště (obvykle pufrovaného solného roztoku), který je pod tlakem, aby dodával a zaostřoval vzorek na laserové zachycovací nebo vyšetřovací místo, kde je vzorek analyzován. Optický systém se skládá z excitační optiky (lasery) a sběrné optiky (fotonásobičové trubice nebo fotodiody), které generují viditelné a fluorescenční světelné signály používané k analýze vzorku. Průtoková cytometrie má řadu technik a aplikací, které jsou vhodné pro více oborů studia. [71]

10. ANTIGEN HLA-B27

Lidský leukocytární antigen HLA-B27 je silně spojen s vývojem skupiny zánětlivých artritid. Je historicky studován jako faktor náchylnosti u spondyloartropatií a především u AS. V posledních letech se však objevil jako ochranný faktor před některými závažnými virovými infekcemi. To je způsobeno vysokou kapacitou virově specifických, HLA-B27 omezených $CD8^+$ T-buněk jak pro vnitřní, tak pro vnější faktory. Některé teorie naznačují, že patogenní role HLA-B27 je nezávislá na imunitní funkci, například že HLA-B27 působí jako receptor pro mikroorganismy způsobující onemocnění nebo je dokonce pouze genetickým markerem. Alternativně je možné, že HLA-B27 sám působí jako zdroj antigenu, čímž se získají peptidy, které mohou být prezentovány jinými HLA molekulami. Krysy a myši nesoucí HLA-B27 jako transgen poskytují silný důkaz, že HLA-B27 je přímo zapojen do patogeneze onemocnění. U těchto zvířat se mohou vyvinout nemoci podobné spondyloartropatiím. [71, 72]

10.1. Struktura a funkce

Antigen spadá do I. třídy HLA molekul a je kódovaný lokusem B. Jedná se o heterodimer, který obsahuje HLA-B tzv. těžký α řetězec membránového glykoproteinu. Ten je nekovalentně vázaný na lehký řetězec, který je nazýván β 2-mikroglobulin. Strukturu lze vidět na obrázku 13. [71]



Obrázek 13: Struktura HLA-B27. [73]

10.2. Podtypy HLA-B27

Aminokyselinové sekvenování HLA-B27 je známé od roku 1985. Studie podtypů HLA-B27 se za poslední roky velice zrychlila, díky vylepšeným metodám genotypizace založených na DNA. HLA-B27 má vysoký stupeň genetického polymorfismu, se 105 známými podtypy, jmenovanými HLA-B*27:01 až HLA-B*27:106. Pro většinu podtypů bylo identifikováno příliš málo nosičů k určení, zda jsou spojeny s onemocněním AS. U některých podtypů však existují důkazy o rozdílné síle spojení s AS. [74-76]

Nejběžnějšími podtypy spojenými s AS jsou HLA-B*27:05, HLA-B*27:04 a HLA-B*27:02. Například se ukázalo, že podtyp HLA-B*27:06 je méně spojen s AS než HLA-B*27:04. Například u čínských populací je HLA-B*27:04 spojen s větším rizikem AS než HLA-B*27:05. Zdá se, že dva podtypy, HLA-B*27:06 a HLA-B*27:09, nemají žádnou asociaci s nemocí. Antigen je přítomen pouze v 1,4 - 8 % obecné populace (vyšší přítomnost může být v určitých skupinách domorodých Američanů a Skandinávců). Tato míra dopadu ovlivňuje rasové pozadí i národní původ. Frekvence HLA-B27 je nejnižší u černochů, střední u Asiatů a nejvyšší u bílé rasy. [74-76]

HLA-B27 není jedinou alelou HLA-B asociovanou s AS. Asociace s HLA-B60 byla hlášena v různých případech související s tímto onemocněním. [74]

10.3. Výskyt antigenu

Antigen HLA-B27 je protein umístěný na povrchu bílých krvinek. Jak už bylo v práci zmíněno, přítomnost HLA-B27 může být spojen i s reaktivní artritidou, která způsobuje zánět kloubů, močové trubice, očí a někdy i léze na kůži. Dále může být přítomen u juvenilní revmatoidní artritidy a přední uveitidy, která způsobuje otok a podráždění ve střední vrstvě oka. [77]

10.3.1. HLA-B27 test

Test HLA-B27 se používá k identifikaci specifického proteinu na bílých krvinkách, který může být příznakem autoimunitního onemocnění. Tento test je jedním krokem v procesu diagnostiky potenciální autoimunitní poruchy. [71, 77]

U lidí se specifickými příznaky lze test HLA-B27 použít spolu s jinými krevními, močovými nebo zobrazovacími testy k potvrzení diagnózy autoimunitního onemocnění. Mezi příznaky, které by mohly přimět lékaře k objednání testu, patří bolest kloubů, ztuhlost nebo

otok páteře, krku nebo hrudníku, zánět kloubů nebo močové trubice doprovázený kožními nálezy nebo i opakující se zánět v oku. Lékař může provést testy HLA antigenu, včetně testů na HLA-B27, když pacient podstoupí transplantaci ledvin nebo kostní dřeně. Tyto testy lze použít k zajištění vhodné shody mezi pacientem a dárce. [77]

Negativní test ukazuje nepřítomnost HLA-B27 v krvi. Pokud je však test negativní, neznamená to, že člověk netrpí autoimunitní poruchou. Při konečné diagnóze zváží lékař všechny výsledky testu spolu s příznaky. Někdy lidé s autoimunitními poruchami nemají HLA-B27 na svých bílých krvinkách. Pokud je test pozitivní, znamená to, že HLA-B27 je přítomen v krvi. Ačkoli pozitivní výsledek může být důvodem k obavám, přítomnost antigenu, neznamená vždy, že se vyvine autoimunitní porucha. Diagnóza autoimunitní poruchy musí být provedena na základě příznaků a výsledků všech krevních testů a diagnostických vyšetření. [78]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo představit HLA systém. Téma jsem si vybrala, protože hodně lidí nemá tušení o tom, že HLA antigeny existují a mají velký vliv na lidský organismus. V první části je popsána stručně historie tohoto systému. Od vzniku z 30. let až do 90. let. Dále jsou přiblíženy jednotlivé molekuly patřící do tohoto systému. Je zde uvedeno rozdělení do skupin I., II. a III. třídy a možná pravidla, podle kterých se vytváří názvosloví. HLA kódované geny v hlavním histokompatibilním komplexu vykazují působivý stupeň polymorfismu. Je známo, že se jedná o nejpolymorfnější genetický systém u lidí. Biologickou úlohou molekul HLA I. třídy a II. třídy je prezentovat zpracované peptidové antigeny. Velký počet alel v lokusech I. a II. třídy představuje významný problém pro molekulární diagnostiku. Znalosti skupin alel a specifických alel přítomných u jednotlivců, mají důležité důsledky při transplantacích orgánů a kmenových buněk ve studiích asociačních chorob.

Druhá část bakalářské práce je zaměřena na dědičnost a celkově možné choroby, které s HLA systémem souvisí, ale jeho základní mechanismy dosud nejsou zcela vysvětleny. HLA geny jsou úzce spojeny a celý MHC je zděděn jako HLA haplotyp v Mendelově módě od každého rodiče. Možné náhodné kombinace antigenů z různých HLA lokusů na HLA haplotypech jsou obrovské. Určitá onemocnění, zejména autoimunitní povahy, jsou spojena s konkrétními typy HLA. Úroveň asociace se u jednotlivých onemocnění liší a obecně neexistuje silný soulad mezi typem HLA a nemocí. Mohou zde hrát roli i jiné genetické faktory a faktory prostředí. Bakalářská práce je zaměřena na celiakii, diabetes mellitus I. typu, ankylozující spondylitidu, roztroušenou sklerózu, narkolepsii, revmatoidní artritidu, systém lupus erythematoses, AIDS, sjögrenův syndrom a v neposlední řadě je zde zmíněna i autoimunitní hepatitida.

Ve třetí části je popsána typizace HLA systému, sérologické a molekulárně genetické metody, význam antigenů v transplantační medicíně, HLA protilátky. Na závěr je práce zaměřena na antigen HLA-B27, jeho výskyt, obecnou charakteristiku a jeho podtypy. Typizace HLA je důležitá v protokolech transplantace orgánů, protože určuje pravděpodobnost odmítnutí. Používá se k porovnávání pacientů a dárců při transplantacích kostní dřeně nebo pupečnickové krve. HLA protilátky jsou proteiny, které mohou být přítomny v krvi pacienta, což by mohlo interferovat s úspěchem transplantace. Vyšetřují se pomocí metody ELISA a průtokové cytometrie. U některých lidí se nevyvinou vůbec. HLA-B27 je povrchový antigen I. třídy kódovaný lokusem B představuje antigenní peptidy na T-buňky. HLA-B27 se kromě

svého spojení s ankylozující spondylitidou podílí i na jiných typech séronegativní spondyloartropatie, jako je reaktivní artritida.

Myslím si, že cíl práce jsem splnila. Domnívám se, že obsah bakalářské práce může být přínosem i pro další studenty, kteří se o tohle téma zajímají.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JÍLEK, P. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019, s. 35. ISBN 978-80-271-0595-3.
- [2] THORSBY, E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* [online]. 2009, **74**(2), s. 101-116 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x. ISSN 00012815. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>
- [3] NIKOLICH-ZUGICH, J., D. H. FREMONT, M. J. MILEY and I. MESSAOUDI. The role of MHC polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes and Infection* [online]. 2004, **6**(5), s. 501-512 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.01.006. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457904000553?via%3Dihub>
- [4] Nomenclature for Factors of the HLA System. *HLA Nomenclature* [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>
- [5] APTSIAURI, N., A. M. GARCIA-LORA and T. CABRERA. *MHC class I antigens in malignant cells: immune escape and response to immunotherapy*. New York: Springer, [2013], s. 1. Springer Briefs in cancer research. ISBN 978-1-4614-6543-0.
- [6] STITES, D. P. and A. I. TERR. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994, s. 50-52. ISBN 80-85605-37-6.
- [7] KUBY, J. *Immunology*. 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1994, s. 215-222. ISBN 0-7167-2400-6.
- [8] PATHAK, S. and U. PALAN. *Immunology: essential & fundamental*. 3rd ed. Tunbridge Wells: Anshan, 2012, s. 73, 161. ISBN 978-1-848290-33-4.
- [9] PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012, s. 74-76, 184-187, 364-367. ISBN 978-80-247-3460-6.
- [10] LITTLE A. and P. PARHAM. *Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules*. *Rev Immunogenet.* 1999; **1**(1), s. 105-123.
- [11] VAN DRONGELEN, V. and J. HOLOSHITZ. Human Leukocyte Antigen–Disease Associations in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* [online].

- 2017, **43**(3), s. 363-376 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.rdc.2017.04.003. ISSN 0889857X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889857X17300182>
- [12] Coeliac Disease; *New Coeliac Disease Findings from University Rovira i Virgili Reported* (Medium-High Resolution Electrochemical Genotyping of HLA-DQ2/DQ8 for Detection of Predisposition to Coeliac Disease). Atlanta: May 22, 2015 ProQuest Central. ISSN 15316459.
- [13] VAN HEEL, D. A. Recent advances in coeliac disease. *Gut* [online]. 2006, **55**(7), s. 1037-1046 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1136/gut.2005.075119. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2005.075119>
- [14] AYESH, B. M., E. K. ZAQOUT and M. M. YASSIN. HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes frequency and diagnostic utility in celiac disease patients of Gaza strip, *Palestine. Autoimmunity Highlights* [online]. 2017, **8**(1), s. 1-6 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1007/s13317-017-0099-0. ISSN 2038-0305. Dostupné z: <https://autoimmunhighlights.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13317-017-0099-0>
- [15] MEGIORNI, F. and A. PIZZUTI. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2012, **19**(1), s. 88 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1186/1423-0127-19-88. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/88>
- [16] CAIO, G., R. CICCOCIOPPO, G. ZOLI, et al. Therapeutic options for coeliac disease: What else beyond gluten-free diet? *Digestive and Liver Disease*. 2020, **52**(2), s. 130-137 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.dld.2019.11.010. ISSN 15908658.
- [17] SINGH, G. C., M. AHMED, M. ZAID and S. HASNAIN. Biochemical, serological, and genetic aspects related to gene HLA-DQB1 and its association with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. 2020 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1002/mgg3.1147. ISSN 2324-9269. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mgg3.1147>
- [18] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [online]. 2012, 36(Supplement_1), s. 67-74 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.2337/dc13-S067. ISSN 0149-5992. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc13-S067>
- [19] RAHA, O., B. SARKAR, B. VKS LAKKAKULA, et al. HLA class II SNP interactions and the association with type 1 diabetes mellitus in Bengali speaking patients of Eastern India.

Journal of Biomedical Science [online]. 2013, **20**(1), s. 1-6 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1186/1423-0127-20-12. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/20/1/12>

[20] Ankylosing spondylitis. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/ankylosing-spondylitis/symptoms-causes/syc-20354808>

[21] DANAIL, S., R. ABOLHASANI, M. S. SOLTANI-ZANGBAR, et al. Oxidative stress and immunological biomarkers in Ankylosing spondylitis patients. *Gene Reports* [online]. 2020, s. 18 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.genrep.2019.100574. ISSN 24520144. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S245201441930216X>

[22] ZHOU, W., J. GUO, M. HE, et al. Fatigue and contributing factors in Chinese patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology* [online]. [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1007/s10067-020-04976-x. ISSN 0770-3198. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10067-020-04976-x>

[23] MARTINEZ, B. and P. V. PELOW. Protective effects of pharmacological therapies in animal models of multiple sclerosis: a review of studies 2014–2019. *Neural Regeneration Research* [online]. 2020, **15**(7), s. 1220-1234 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.4103/1673-5374.272572. ISSN 1673-5374. Dostupné z: <http://www.nrronline.org/text.asp?2020/15/7/1220/272572>

[24] Multiple sclerosis. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/multiple-sclerosis/symptoms-causes/syc-20350269>

[25] HOLLENBACH, J. A. and J. R. OKSENBERG. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* [online]. 2015, s. 13-25 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.06.010. ISSN 08968411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841115300019>

[26] ALCINA, A., M. M. ABAD-GRAU, M. FEDETZ, et al. Multiple Sclerosis Risk Variant HLA-DRB1*1501 Associates with High Expression of DRB1 Gene in Different Human Populations. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(1), s. 3-9 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1371/journal.pone.0029819. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029819>

- [27] Narcolepsy. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/narcolepsy/symptoms-causes/syc-20375497>
- [28] ALAEZ, C., L. LIN, H. FLORES-A, et al. Association of narcolepsy-cataplexy with HLA-DRB1 and DQB1 in Mexican patients: A relationship between HLA and gender is suggested. *BMC Medical Genetics* [online]. 2008, **9**(1), s. 1-9 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1186/1471-2350-9-79. ISSN 1471-2350. Dostupné z: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-9-79>
- [29] ANTELM, E., F. PIZZA, Ch. FRANCESCHINI, et al. REM sleep behavior disorder in narcolepsy: A secondary form or an intrinsic feature? *Sleep Medicine Reviews* [online]. 2020, **50**(3), s. 839-844 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.smr.2019.101254. ISSN 10870792. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087079219302229>
- [30] Rheumatoid arthritis. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>
- [31] QIAN, Y., L. ZHANG, D. J. H. WU, et al. Genetic predisposition to smoking is associated with risk of rheumatoid arthritis: a Mendelian randomization study. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2020, **22**(1), s. 1-5 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1186/s13075-020-2134-1. ISSN 1478-6362. Dostupné z: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-020-2134-1>
- [32] SAKURAI, Y., D. D. BRAND, B. TANG, et al. Analog peptides of type II collagen can suppress arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice. *Arthritis Research & Therapy* [online]. **8**(5), s. 1-7 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1186/ar2043. ISSN 14786354. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2043>
- [33] Lupus. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lupus/symptoms-causes/syc-20365789>
- [34] ARDOIN, S. P. and D. S. PISETSKY. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2008, **10**(5), s. 218 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/ar2488. ISSN 1478-6354. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2488>

- [35] MARTENS, H. A., I. M. NOLTE, G. VAN DER STEEGE, et al. An extensive screen of the HLA region reveals an independent association of HLA class I and class II with susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology* [online]. 2009, **38**(4), s. 256-262 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1080/03009740802552469. ISSN 0300-9742. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03009740802552469>
- [36] NIU, Z., P. ZHANG and Y. TONG. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *International Journal of Rheumatic Diseases* [online]. 2015, **18**(1), s. 17-28 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1111/1756-185X.12528. ISSN 17561841. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1756-185X.12528>
- [37] GOULDER, P. J. R. and B. D. WALKER. HIV and HLA Class I: An Evolving Relationship. *Immunity* [online]. 2012, **37**(3), s. 426-440 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.005. ISSN 10747613. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131200386X>
- [38] HIV/AIDS. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hiv-aids/symptoms-causes/syc-20373524>
- [39] Sjögren's syndrome. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/sjogrens-syndrome/symptoms-causes/syc-20353216>
- [40] BOLSTAD, A. and R. JONSSON. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. *Arthritis Research* [online]. **4**(6), s. 353-359 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/ar599. ISSN 14659905. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar599>
- [41] Autoimmune hepatitis. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/autoimmune-hepatitis/symptoms-causes/syc-20352153>
- [42] LIBERAL, R., Y. S. DE BOER and R. J. ANDRADE, et al. Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2017, **45**(5), s. 723-732 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1111/apt.13907. ISSN 02692813. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.13907>

- [43] Autoimunitní hepatitida (AIH) - příčiny, příznaky a léčba – Záněť Jater. In: *Medicineh* [online]. 2020 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://cs.medicineh.com/26-autoimmune-hepatitis-74587>
- [44] ELFARAMAWY, A., R. M. ELHOSSINY, A. ABBAS and H. AZIZ. HLA-DRB1 as a risk factor in children with autoimmune hepatitis and its relation to hepatitis A infection. *Italian Journal of Pediatrics* [online]. 2010, **36**(1), s. 1-6 [cit. 2020-03-29]. DOI: 10.1186/1824-7288-36-73. ISSN 1824-7288. Dostupné z: <http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-36-73>
- [45] KREJSEK, J. a O. KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-x.
- [46] JESSEN HICKMAN, R. HLA Typing: Purpose, Genetics, Procedure, Interpretation. In: *Very well health* [online]. 2020, [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/hla-typing-overview-4588231>
- [47] ŘEHÁČEK, V. a J. MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013, s. 180-190. ISBN 978-80-247-4534-3.
- [48] PCR. *Genetics Learn* [online]. Salt Lake City: Genetic science learning center, University of Utah Health Sciences, 2008 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>
- [49] What is PCR (polymerase chain reaction)? In: *Your Genome* [online]. Public Engagement, 2016 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>
- [50] MÜLLER-STEINHARDT, M., F. SCHULTE, H. KLÜTER and P. BUGERT. Optimized PCR with sequence specific primers (PCR-SSP) for fast and efficient determination of Interleukin-6 Promoter -597/-572/-174 Haplotypes. *BMC Research Notes* [online]. 2009, **2**(1), s. 1-4 [cit. 2020-04-19]. DOI: 10.1186/1756-0500-2-245. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-2-245>
- [51] JAVOR, J., Z. PÁRNICKÁ, J. MICHALIK, a kol. The +190 G/A (rs1799864) polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 (CCR2) gene is associated with susceptibility to multiple sclerosis in HLA-DRB1*15:01-negative individuals. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. 2015, **349**(1-2), s. 138-142 [cit. 2020-04-19]. DOI:

10.1016/j.jns.2015.01.002. ISSN 0022510X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X15000039>

[52] Sequence-specific Oligonucleotide (PCR-SSO) Technology. In: *Creative biolabs* [online]. 2020 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/sequence-specific-oligonucleotide-pcr-sso-technology.html>

[53] WORDSWORTH, P. PCR-SSO typing in HLA-disease association studies. *European Journal of Immunogenetics* [online]. 1991, **18**(1-2), s. 139-146 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1111/j.1744-313X.1991.tb00013.x. ISSN 0960-7420. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-313X.1991.tb00013.x>

[54] Sequencing-based Typing (PCR-SBT) Technology. In: *Creative biolabs* [online]. 2020 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/sequencing-based-typing-pcr-sbt-technology.html>

[55] CARLES, M. C. and N. J. SUCHER. Polymerase Chain Reaction on Microchips. SHELLEY, Minter D. *Microfluidic Techniques* [online]. New Jersey: Humana Press, 2005, s. 131-140 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1385/1-59259-997-4:131. ISBN 1-59259-997-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-997-4:131>

[56] ZHUANG, B., W. GAN, P. LIU. Integrated microfluidic systems for genetic analysis. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications* [online]. Elsevier, 2013, s. 465-494 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1533/9780857097040.4.465. ISBN 9780857096975. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709697550013X>

[57] HEINEMANN, F. M. HLA Genotyping and Antibody Characterization using the LuminexsupTM/sup Multiplex Technology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2009, **36**(4), s. 273-278 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1159/000228834. ISSN 1660-3818. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/228834>

[58] TRIVEDI, V.B., A.P. DAVE, J.M. DAVE and B.C. PATEL. Human Leukocyte Antigen and Its Role in Transplantation Biology. *Transplantation Proceedings* [online]. 2007, **39**(3), s. 688-693 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.01.066. ISSN 00411345. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134507001157>

[59] AYALA GARCÍA, M. A., B. GONZÁLEZ YEBRA, A. L. LÓPEZ FLORES and E. GUANÍ GUERRA. The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. *Journal of*

Transplantation [online] 2012, s. 1-7 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1155/2012/842141. ISSN 2090-0007. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jtrans/2012/842141/>

[60] Autologous Transplantation. In: *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* [online]. 2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://www.mskcc.org/cancer-care/diagnosis-treatment/cancer-treatments/blood-stem-cell-transplantation/autologous>

[61] SKERRETT, D., O. ROSINA and C. BODIAN. Human Leukocyte Antigens (HLA)-Cw as Prognostic Indicators in Autologous Transplantation for Lymphoma. *Cancer Investigation* [online]. 2001, **19**(5), s. 487-494 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1081/CNV-100103847. ISSN 0735-7907. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/CNV-100103847>

[62] Allogeneic stem cell transplant. In: *Cancer Treatment Centers of America* [online]. 2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://www.cancercenter.com/treatment-options/hematologic-oncology/allogeneic-stem-cell-transplant>

[63] PETERSDORF, E. W., HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Current Opinion in Hematology* [online]. 2004, **11**(6), s. 386-391 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1097/01.moh.0000143701.88042.d9. ISSN 1065-6251. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00062752-200411000-00003>

[64] Bone marrow transplant. In: *Mayo Foundation for Medical Education and Research: Mayo Clinic* [online]. 2020 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/bone-marrow-transplant/about/pac-20384854>

[65] HOWARD, C. A., M. A. FERNANDEZ-VINA, F. R. APPELBAUM, et al. Recommendations for Donor Human Leukocyte Antigen Assessment and Matching for Allogeneic Stem Cell Transplantation: Consensus Opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2015, **21**(1), s. 4-7 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.09.017. ISSN 10838791. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879114005989>

[66] PARK, M. and J. J. SEO. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Research* [online]. 2012, s. 1-7 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1155/2012/680841. ISSN 2090-2999. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/680841/>

[67] Transplant rejection. In: *Medline Plus* [online]. US National Library of Medicine, 2020, [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/000815.htm>

- [68] INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric Nephrology* [online]. 2010, **25**(1), s. 61-74 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1007/s00467-008-1020-x. ISSN 0931-041X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-008-1020-x>
- [69] Description of HLA: What Are HLA Antibodies? In: *Seattle Cancer Care Alliance* [online]. Seattle: Equal Opportunity and VEVRAA Employer, 2004 [cit. 2020-05-09]. Dostupné z: <https://www.seattlecca.org/healthcare-professionals/clinical-labs/clinical-immunogenetics-laboratory/description-hla>
- [70] The principle and method of ELISA. In: *Medical and biological laboratories co., ltd* [online]. 2017 [cit. 2020-05-09]. Dostupné z: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>
- [71] MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2018, **120**(1), s. 1-11 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1002/cpim.40. ISSN 1934-3671. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpim.40>
- [72] MCMICHAEL, A. and P. BOWNESS. HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Research* [online]. 2002, s. 4 (Suppl 3) [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1186/ar571. ISSN 14659905. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar571>
- [73] SORRENTINO, R., R. A. BÖCKMANN and M. T. FIORILLO. HLA-B27 and antigen presentation: At the crossroads between immune defense and autoimmunity. *Molecular Immunology* [online]. 2014, **57**(1), s. 22-27 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.06.017. ISSN 01615890. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589013004379>
- [74] LÓPEZ-LARREA, C., S. GONZÁLEZ and J. MARTÍNEZ-BORRA. The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Molecular Medicine Today* [online]. 1998, **4**(12), s. 540-549 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/S1357-4310(98)01375-6. ISSN 13574310. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357431098013756>
- [75] BROWN, M. A. Progress in spondylarthritis. Progress in studies of the genetics of ankylosing spondylitis. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2009, **11**(5) [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1186/ar2692. ISSN 1478-6354. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2692>

[76] KHAN, M. A. Polymorphism of HLA-B27: 105 Subtypes Currently Known. *Current Rheumatology Reports* [online]. 2013, **15**(10) [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s11926-013-0362-y. ISSN 1523-3774. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-013-0362-y>

[77] DILORENZO, A. L., K. S. LAW, Simon. How many subtypes of human leukocyte antigen (HLA) B27 have been identified? In: *Medscape* [online]. 1998 [cit. 2020-05-09]. Dostupné z: <https://www.medscape.com/answers/1201027-31109/how-many-subtypes-of-human-leukocyte-antigen-hla-b27-have-been-identified>

[78] DAVE, M. Some basic information about HLA B27 lab test. In: *Symbion VIP Diagnostics Pathology Lab* [online]. Om Net Solution, 2020 [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: <https://www.viplab.in/blog-details/some-basic-information-about-hla-b27-lab-test/>