

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Eliška Zbořilová**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**SLEDOVÁNÍ POPULACÍ T, B A NK BUNĚK U PACIENTŮ  
S HEMATO-ONKOLOGICKÝM ONEMOCNĚNÍM**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Mgr. Monika Holubová, Ph.D

PLZEŇ 2017





Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2017

.....

vlastnoruční podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Monice Holubové Ph.D za cenné rady, vstřícný přístup, odbornou pomoc a trpělivost při tvorbě mé bakalářské práce.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Zbořilová Eliška

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Sledování populací T, B a NK buněk u pacientů s hemato-onkologickým onemocněním

Vedoucí práce: Mgr. Monika Holubová Ph.D

Počet stran - číslované: 30

Počet stran - nečíslované: 20

Počet příloh: 13

Počet titulů použité literatury: 25

Klíčová slova: lymfocyty, hemato-onkologická onemocnění, hematopoetické buňky, stanovení lymfocytárních subpopulací

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním vývoje jednotlivých subpopulací u pacientů po transplantaci hematopoetických buněk. Práce je složená z teoretické a praktické části. Teoretická část se zabývá leukocyty a popisem jednotlivých lymfocytů. Dále tato část je zaměřena na nejčastější hemato-onkologické onemocnění a druhy transplantací. Praktická část znázorňuje zpracování vzorku, grafické a statistické vyhodnocení dat, které jsou znázorněny v tabulkách v příloze.

## **Annotation**

Surname and name: Zbořilová Eliška

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: Monitoring of the population of T,B and NK cells in patients with blood-cancer

Consultant: Mgr. Monika Holubová Ph.D

Number of pages - numbered: 30

Number of pages - unnumbered: 20

Number of appendices: 13

Number of literature items used: 25

Key words: lymphocytes, blood-cancer, hematopoietic cells, the determination of lymphocytic subpopulations

### **Summary:**

This bachelor thesis deals with the monitoring of the development of individual leukocytes subpopulations in patients after allogeneic transplantation of hematopoietic cells. The work is composed of a theoretical and a practical part. The theoretical part deals with description of development and function of leukocytes focusing on lymphocyte subsets. Additionally, this section describes also the most common blood-cancer and types of grafts. The practical part shows the sample processing and results and their evaluation in tables and graphs.

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 LEUKOCYTY</b> .....	<b>11</b>
1.1 Lymfocyty .....	12
1.1.1 T - lymfocyty .....	12
1.1.1.1 Kvalifikace T-lymfocytů .....	13
1.1.2 B-lymfocyty .....	14
1.1.2.1 Imunoglobuliny .....	15
1.1.2.2 Protilátková odpověď .....	16
1.2 NK buňky .....	16
<b>2 HEMATO-ONKOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ</b> .....	<b>18</b>
2.1 Leukémie .....	18
2.1.1 Akutní myeloidní leukémie.....	18
2.1.2 Akutní lymfoblastická leukémie .....	18
2.1.3 Chronická myeloidní leukémie .....	18
2.1.4 Chronická lymfatická leukémie .....	19
2.2 Myelodysplastický syndrom .....	19
2.3 Mnohočetný myelom .....	19
<b>3 TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK</b> .....	<b>21</b>
3.1 Typy transplantací .....	21
3.2 Odběr a typy transplantovaného materiálu .....	21
3.3 Alogenní transplantace a post-transplantační komplikace .....	22
3.4 Obnova krvetvorby .....	23
<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
<b>4 CÍL</b> .....	<b>24</b>
<b>5 HYPOTÉZA</b> .....	<b>24</b>
<b>6 METODIKA VÝZKUMU</b> .....	<b>24</b>
6.1 STANOVENÍ LYMFOCYTÁRNÍCH SUBPOPULACÍ.....	25
6.1.1 Princip .....	25
6.1.2 Reagencie a materiál .....	25
6.1.3 Postup.....	25
6.2 Gatovací strategie .....	26
6.3 Statistické hodnocení .....	30



<b>7 VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>
7.1 Lymfocyty .....	32
7.2 T-lymfocyty .....	33
7.3 Th-lymfocyty .....	34
7.4 Tc-lymfocyty .....	35
7.5 B-lymfocyty.....	36
7.6 NK buňky .....	37
<b>8 DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>39</b>
<b>POUŽITÉ ZDROJE .....</b>	<b>40</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>43</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>44</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>45</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>46</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>47</b>

## ÚVOD

Hematologické malignity jsou velice vážná onemocnění krvetvorby. Lymfomy, jako nádorová onemocnění vyskytující se obvykle v lymfatických uzlinách, mohou infiltrovat i kostní dřeň. Leukémie, oproti lymfomům, postihují převážně přímo kostní dřeň. Vzniká maligní klon leukocytů a normální krvetvorba je potlačena. Můžou vznikat i anémie z nedostatečného množství erytrocytů a infekční stavy z důvodu snížení imunitního systému. Počet nemocných s hematologickou malignitou diagnózou přibývá a hledají se nové poznatky, které by pomohly při pochopení této skupiny onemocnění. V současné době existuje spousta moderních léků, které pomáhají problematiku zvládat. Pro mnohé pacienty (hlavně s akutní formou leukemie) však i nadále zůstává jedinou šancí transplantace hematopoetických buněk.

Transplantace hematopoetických buněk je náhrada patologické krvetvorby za zdravou hematopoézu. Při transplantaci se aplikují buď hematopoetické buňky pacienta (autologní transplantace) anebo zdravého dárce (alogenní transplantace). Důležitým aspektem úspěšnosti transplantace je regenerace hematopoézy, která je před transplantací zničena chemoterapií. Posupně se vyvíjejí všechny leukocytární subpopulace až do úplné obnovy všech složek imunitního systému. V rámci své práce jsme se zaměřili na sledování regenerace jednotlivých lymfocytárních subpopulací.

Nejprve jsme se věnovali charakteristice jednotlivých lymfocytárních subpopulací, přesněji T-lymfocytům, B-lymfocytům a NK buňkám. V další kapitole jsou uvedeny hlavní druhy hemato-onkologických chorob, jejich projevy a diagnostika. Ke konci teoretické části jsme se zabývali typy odběru kostní dřeně, transplantací a potransplantační stavy pacienta.

V rámci praktické části jsme se věnovali popisu metodiky, kterou jsme v této práci používali včetně popisu získávání výsledků. Na konci uvádíme získané výsledky, které jsou popsány slovně i graficky. V rámci diskuze jsou prezentovány získané výsledky a jejich následné srovnání s dostupnou literaturou

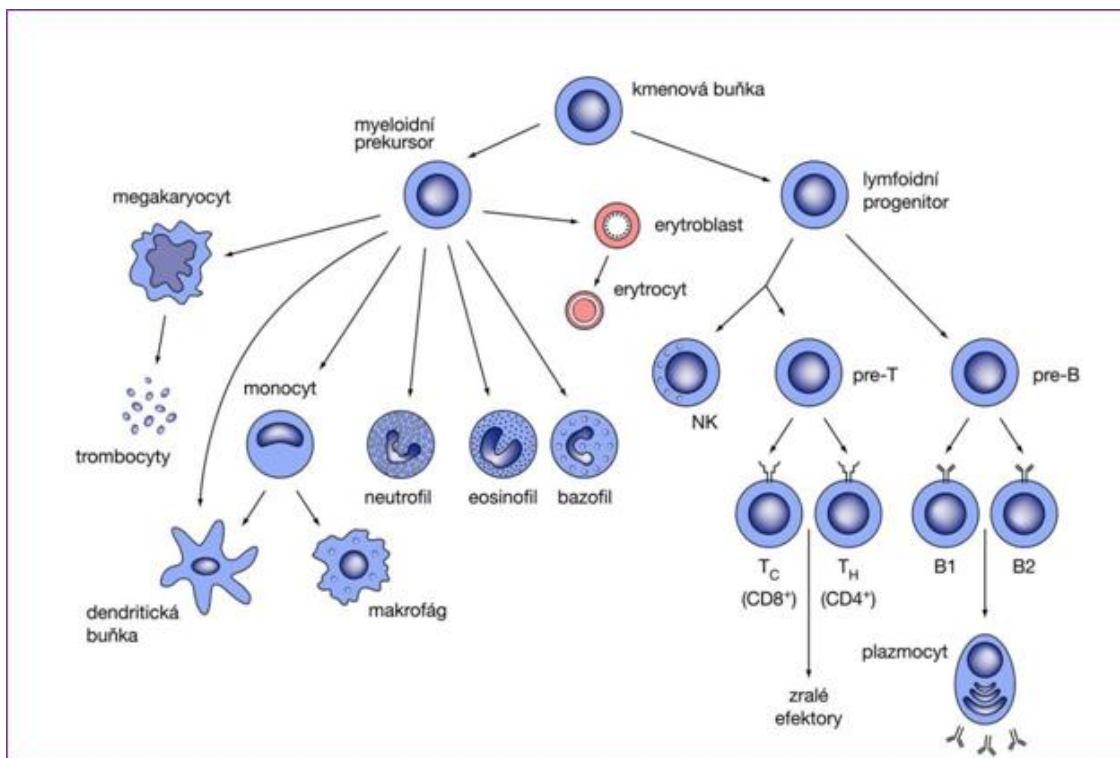
# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 LEUKOCYTY

Leukocyty, neboli bílé krvinky jsou buňky imunitního systému, které obsahují jádro. Diferencují se z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni (dále jen DK), ze které se vývoj přemísťuje do sekundárních lymfatických orgánů a cílových tkání. V našem těle dokáží žít několik hodin (granulocyty) až řadu let (paměťové lymfocyty). Jejich množství cirkulující v krvi se pohybuje mezi  $4 - 10 \cdot 10^9/l$ .

Z pluripotentní kmenové buňky vznikají 2 linie leukocytů: myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní se vyvíjejí monocyty, granulocyty, žírné buňky, dendritické buňky (dále jen DC). B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK (z angličtiny „natural killer“) buňky zastupují lymfoidní řadu (Penka, Tesařová a kol., 2011). Znázornění vývoje jednotlivých linií je ukázáno na obr. 1.

**Obr. 1 Diferenciace leukocytů**



Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/1903558/>

## 1.1 Lymfocyty

Patří mezi základní buňky lymfatické tkáně, lymfy, krve. V periferní krvi zabírají 15 - 40% z celkového počtu leukocytů. S kulatým tvarem, nesegmentovaným jádrem a lemem kolem cytoplazmy, dosahují průměru 7 - 12  $\mu\text{m}$ . Ty se následně dělí na 3 základní populace: T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky. Které se dělí na další subpopulace. (Ferenčík, Rovenský, Mařha, 2002).

### 1.1.1 T-lymfocyty

Mezi základní buňky získané imunity patří T-lymfocyty. Jejich vývoj je regulován cytokiny, transkripčními faktory i nitrobuněčnými signálními molekulami. Lymfocyty prodělávají řadu změn membránové výbavy a přeskupování genových segmentů vedoucích k vytvoření funkčního receptoru T-lymfocytů - TCR. Přeskupováním genů vzniká vysoká variabilita vazebných míst těchto receptorů, čímž je zajištěna specifická imunitní odpověď na široké spektrum antigenů. Existují dva typy receptorů lišící se složením svých řetězců, ze kterých je TCR složen –  $\text{TCR}\alpha\beta$  a  $\text{TCR}\gamma\delta$ . První z nich je na převážné části T-lymfocytů, proto se budu podrobněji věnovat vývoji této skupiny (Hořejší, Bartůňková, Brdička, et al. 2013).

Prekurzory T-lymfocytů vstupují do thymu jako tzv. pro-thymocyty. Genové přeskupování začíná nejprve pro  $\text{TRC}\beta$ , proběhne-li úspěšně, na povrchu lymfocytu se objeví pre-TCR. Poté se děj přesune na geny pro  $\text{TCR}\alpha$  a vznikne definitivní TCR. V této fázi, kdy thymocyty kromě TCR mají na svém povrchu i koreceptory CD4 a CD8, dochází k negativní nebo pozitivní selekci. Při negativní selekci se eliminují buňky, které nejsou schopny rozeznat MHC proteiny, tedy buňky s nefunkčním TCR. Pozitivně selektovány jsou pouze ty lymfocyty, které rozpoznají MHC proteiny. Později si zachovávají expresi CD4 nebo CD8 a jako zralé T-buňky opouštějí thymus. (Bartůňková, Hořejší, Špírek, et al. 2013)

### 1.1.1.1 Kvalifikace T-lymfocytů

Podle různých funkcí rozlišujeme různé subpopulace T-lymfocytů (tab. 1).

**Tab. 1 Podskupiny Th-lymfocytů**

Populace	Subpopulace	Diferenciační antigen
Th-lymfocyty	Th1	CD4+
	Th2	CD4+
	Th17	CD4+
Tc-lymfocyty		CD8+
Treg-lymfocyty	nTreg	CD4+, CD25+
	iTreg	CD4+, CD25-

Zdroj: Bartůňková, Paulík, 2011

#### CD4+ T-lymfocyty

Subpopulace Th-lymfocytů se dělí na dvě další subpopulace. Pomáhají B-lymfocytům (Th2) neboli makrofágům (Th1). Pomocné T-lymfocyty rozeznávají antigeny pomocí MHC II. třídy (Bartůňková, Brdička, Špíšek et al. 2013).

Th1 buňky chrání organismus před intracelulárními parazity, produkují cytokin interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Ten aktivuje makrofágy, které mohou zničit parazity uvnitř buňky. Th2 jsou zaměřeny proti extracelulárním mikroorganismům. Pomocí IL-4, IL-5, IL-6 (interleukin), které vytvářejí, stimulují B-lymfocyty k tvorbě protilátek. Th1 a Th2 se produkcí cytokinů navzájem ovlivňují. Interleukin 12 a INF- $\gamma$  podporují tvorbu Th1, ale inhibují Th2. Naopak díky tvorbě IL-4, IL-10 dochází k stimulaci Th2.

Th17 pomáhají u zánětlivých procesů, hlavně díky expresi IL-17 podporující zánětlivé reakce imunitního systému.

Do této skupiny patří také lymfocyty supresorové, známé jako T-regs. Vyznačují se expresí CD4+, CD25+, FoxP-3. V udržování imunitní tolerance hrají důležitou roli pomocí exprese IL-10, TGF- $\beta$  (Parham, 2015).

#### CD8+ T-lymfocyty

Cytotoxické T-lymfocyty ničí buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními parazity popřípadě maligně transformované buňky.

Ve zralé cytotoxické buňky se diferencují po rozpoznání komplexu antigenu s MHC I. na povrchu buněk prezentující antigen. Avšak jejich diferenciace je závislá na Th1-lymfocytech produkující IL-2 (Bartůňková, Hořejší, Špišek et al. 2013).

Efektorové buňky eliminují různé typy buněk pomocí granulí obsahující perforiny a grazymy. Perforiny jsou proteiny vytvářející do cílové buňky díry, kterými se dostávají grazymy dovnitř. Ty pomocí své proteolytické aktivity spouštějí apoptózu a cílová buňka hyne. Buněčnou smrt mohou navodit i pomocí FAS ligandu na svém povrchu, který se naváže na molekulou FAS na cílové buňce (Ferenčík, Rovenský, Shoenfeld, et al. 2005).

### **1.1.2 B-lymfocyty**

Za protilátkovou imunitní odpověď zodpovídají B-lymfocyty s typickými znaky CD 19, 20. Vznikají v KD, ale dozrávání pokračuje v sekundárních orgánech po setkání s antigenem. Pro finální diferenciaci je zapotřebí vazba antigenu na B cell receptor (dále jen BCR). Ten je tvořen povrchovým imunoglobulinem a signalizačními molekulami. Povrchový imunoglobulin rozeznávající antigeny, se skládá z lehkých a těžkých řetězců. Jelikož se vyskytují různé struktury antigenů, je zapotřebí i různorodost BCR. Tomu je docíleno pomocí tzv. přeskupovaných V, D, J, C segmentů (Hořejší, Bartůňková, Brdička et al. 2013).

Během rekombinace B-lymfocyt projde vývojovou etapou: pro B-lymfocyt, pre-B-lymfocyt, B-lymfocyt. Vývoj začíná na těžkém řetězci přeskupením D, J a později mezi DJ a V segmenty v pro B-lymfocytu. Produktivní VDJ spojení vede k expresi těžkého řetězce, který je charakteristickým znakem dalšího stádia vývoje pre-B buňky (Janeway Murphy, Travers et al. 2012). Přeskupování dále pokračuje na lehkém řetězci. Nejdříve dochází k přeskupování řetězce kappa, není-li úspěšné, začnou se přeskupovat geny na řetězci lambda. Po úspěšném přeskupení lehkých řetězců se buňka stává nezralým B-lymfocyt, který na svém povrchu produkuje IgM. K dalšímu vývoji dochází až po setkání s antigenem. Jako první dochází k somatickým mutacím, vytváří se BCR s velikou afinitou a poté k izotypovému přesmyku, díky kterému dochází ke změně třídy imunoglobulinu (viz níže) (Bartůňková, Hořejší, Brdička et al. 2013).

### 1.1.2.1 Imunoglobuliny

Protilátky jsou základní molekuly imunitního systému zodpovídající za specifickou imunitní odpověď. Imunoglobuliny tvoří dva lehké řetězce ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) a těžké řetězce ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ). Jsou spojené disulfidickými můstky, které udávají konečný tvar imunoglobulinu do písmene Y. Konec jedné části se označuje jako variabilní doména a slouží k uchycení antigenu. Druhý konstantní konec přichycuje protilátku k povrchu buňky.

Podle těžkého řetězce a uspořádání molekuly se imunoglobulinu rozdělují do pěti tříd - IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Jejich úlohou je antimikrobiální obrana pomocí tří mechanismů: neutralizace, opsonizace, aktivace komplementu (tab. 2) (Jílek, 2005).

Neutralizací blokuje toxiny, které se uvolňují z mikroorganismů nebo brání jejich přilnutí na hostitelskou buňku. Pomocí opsonizační funkce je označený mikrob pro fagocyty či Tc-buňky lépe viditelný, tudíž ho rychleji zlikvidují. Pro aktivaci se protilátka naváže na povrch buňky, změní svou konformaci a zaktivuje klasickou cestu komplementu (Ferenčík, Rovenský, Shoenfeld et al. 2005).

**Tab. 2 Základní charakteristika imunoglobulinů**

<b>Třída</b>	<b>Lokalizace</b>	<b>Funkce</b>
IgG	sérum, intersticiální tekutina	přestup přes placentu, sekundární odpověď
IgM	sérum povrch B - lymfocytů	aktivace komplementu, primární odpověď
IgA	sérum, sliny, slzy, mléko	ochrana sliznic, opsonizace
IgE	sérum, povrch sliznic	ochrana proti parazitům
IgD	sérum, povrch B - lymfocytů	receptor pro antigen

Zdroj: Bartůňková, Brdička, Špíšek, Hořejší 2013

### 1.1.2.2 Protilátková odpověď

Imunitní reakce založené na protilátkách rozdělujeme na nezávislou, závislou na T-lymfocytech. Další dělení je na primární a sekundární odpověď.

Nezávislé mohou být pouze zralé B-lymfocyty s funkčním BCR. Podnětem pro diferenciaci B-lymfocytu na plazmatickou buňku jsou lipopolysacharidy a polymerní bílkoviny. Slouží jako antigeny vážící se na povrch BCR. Avšak nezávislost není úplná. B-lymfocyty potřebují cytokiny, které produkují T - lymfocyty.

U závislé reakce B-lymfocyt nemůže dozrát bez interakce s Th2-lymfocyt. B-lymfocyt rozpozná antigen, který po zpracování vystaví na svém povrchu pomocí MHC II. Pokud Th2-lymfocyt rozezná stejný antigen a produkuje potřebné cytokiny, po setkání B-lymfocyt vyvíjí v plazmatickou buňku produkující protilátky. V případě setkání s Th2-lymfocyt, který zaznamenal jiný antigen, je potřeba cytokinové stimulace a vazby kostimulační molekuly CD40L na receptor CD40 (Šterzl, 2007).

V případě, že se buňka setkala s antigenem poprvé, spustí se primární protilátková odpověď. Aktivují se B-lymfocyty s nejprve se tvořící IgM a později IgG protilátkou. Po skončení reakce protilátky zůstávají v plazmě a tvoří se paměťové buňky, které mohou být z obou lymfocytů. Přetrvávají v lymfatických orgánech, a pokud se opět setkají se stejným antigenem, vzniká sekundární reakce, která je mnohem rychlejší (Hořejší, Bartůňková, Brdička et al 2013).

## 1.2 NK buňky

Jedná se o granulární lymfocyty patřící mezi mechanismy nespecifické imunity. Z celkového počtu lymfocytů zastupují NK buňky v PK 5 - 20%. Na povrchu všech NK buněk je charakteristická exprese hlavní molekuly CD56. U většiny těchto buněk nacházíme i CD16 neboli Fc receptor rozpoznávající buňky opsonizované protilátkou. Mezi aktivátory řadíme  $INF\alpha$  a  $\beta$ , které produkují buňky infikované virem (Krejsek, Kopecký, 2004).

Na povrchu NK buněk je řada aktivačních a inhibičních receptorů, která zajišťují správnou funkci. Inhibiční receptory rozpoznávají na povrchu buněk molekuly MHC I., které exprimují všechny zdravé buňky. Virem infikované a nádorové buňky mají tuto expresi sniženou a tudíž se stávají terčem NK buněk. Hlavní mechanismus účinku je stejný jako v případě Tc-lymfocytů popsané v kapitole 1.1.1. Dalším mechanismem je cytotoxická reakce závislá na protilátkách. Kdy dochází k aktivaci NK buněk



prostřednictvím vazby opsonizační protilátky na aktivační Fc receptor. (Bartůňková, 2013, Šterzl, 2007).

Zvláštním typem jsou NKT buňky, které mají antigenní receptory NK buněk i T-lymfocytů. Rozeznávají glykoproteiny v komplexu s CD1 nikoliv s MHC I. třídy (Ferenčík, Rovenský, Mařha, 2002).

## **2 HEMATO-ONKOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ**

### **2.1 Leukémie**

Podle rychlosti průběhu a typu buněk rozdělujeme onemocnění na:

- Akutní (leukémie s rychlým průběhem, která bez časné diagnózy vede k fatálním následkům)
  - akutní myeloidní leukémie (AML)
  - akutní lymfatická leukémie (ALL)
- Chronické (pomalu rozvíjející se onemocnění, s kterým může pacient žít řadu let i bez léčby)
  - chronická myeloidní leukémie (CML)
  - chronická lymfatická leukémie (CLL)

#### **2.1.1 Akutní myeloidní leukémie**

Rozvoj AML je charakterizován bujením myeloblastů utlačující normální krvetvorbu. Vyskytuje se převážně u starších lidí nad 60 let.

Genetické vyšetření nám pomáhá zařadit pacienty do tří rizikových podskupin. Nepříznivá AML, kdy přežití pacienta je pod 15%. Standardní AML se 45% pravděpodobností a příznivá AML vyznačující se 60% úspěšností. Podle těchto podskupin a dostupnosti dárce krvetvorných buněk se odvíjí volba léčebného postupu. V prvním kroku je vždy cílem dosáhnout ústupu nemoci pomocí chemoterapie. Podle stavu a prognózy pacienta může následovat transplantace hematopoetických buněk (Vokurka, 2008).

#### **2.1.2 Akutní lymfoblastická leukémie**

Oproti AML potlačuje krvetvorbu nárůst lymfoblastů, ale příznaky se zvláště neliší. Průběh onemocnění se odvíjí od věku pacienta, kdy u dětí je lymfoblastická leukémie dobře léčitelná až vyléčitelná. Komplikace se objevují u věku nad 60 let. Nízká citlivost a genetické změny dávají šanci na dlouhodobé přežití u 10% pacientů (Vokurka, 2008).

#### **2.1.3 Chronická myeloidní leukémie**

Geneticky podmíněná CML vycházející z pluripotentní kmenové buňky, patří do skupiny myeloproliferativních onemocnění. Vzniká translokací mezi chromozomy č. 9, 22 (Philadelphia chromosom) (Kačírková, Vít, 2007).

Představuje 15 - 20% všech leukémií. Možnost výskytu roste s věkem pacienta. Postižení bývají především muži nad 50 let. Ročně onemocní přibližně 1 dospělí z 100 000 (Faber, 2010). Většina případů je zjištěna náhodně při rutinním odběru krve. Únava, bolesti břicha, snížený výkon patří mezi nejčastější symptomy (Adam, Krejčí, Vorlíček a kolektiv, 2008). Léčba v podobě podání inhibitorů thyrosinkináz je velice účinná. Avšak u některých pacientů je nutné stálé užívání (Štefánek, 2011).

#### **2.1.4 Chronická lymfatická leukémie**

Je nejčastější onemocnění krvetvorby s výskytem u pacientů kolem 65 let. Patří mezi heterogenní skupinu onemocnění s nekontrolovatelným množением lymfocytů. Může probíhat buď pozvolným způsobem i bez zahájení léčby nebo s výraznou klinickou aktivitou vyžadující terapii (Faber, 2010).

Rizikovost CLL se odvíjí od proběhlé nebo neproběhlé mutace IgVH genů. Podskupina obsahující mutaci IgVH genů se vyznačuje dobrou léčbou a prognózou, která umožňuje dobu přežívání 25 let. Naproti CLL bez mutace a přítomnost dalších rizikových faktorů, umožňuje dobu přežití 8 let. Tento fakt je důležitý při výběru vhodné terapie, kterou obvykle bývá chemoterapie. V ojedinělých případech se přistupuje k transplantaci KD (Vokurka, 2008).

## **2.2 Myelodysplastický syndrom**

MDS nemá poruchu jen v bílé řadě, ale i v červené a destičkové. V tomto případě je typická anémie, leukopenie i trombocytopenie. Dalším projevem nemoci je deformace tvaru a poškození funkčnosti buněk neboli dysplazie. Jelikož neexistuje typický klinický obraz pro diagnózu, může probíhat u každého pacienta jinak. Postiženy jsou převážně opět muži kolem 65 let.

Závažnou roli hraje také vysoká rizikovost nemoci, při které může MDS přejít do AML. Proto je důležitá včasná diagnostika a léčba pomocí transfuzí, antibiotik nebo alogenních transplantací. Přesto však pacienti častěji umírají na selhání KD než na AML (Adam, Krejčí, Vorlíček a kolektiv, 2008).

## **2.3 Mnohočetný myelom**

Mnohočetný myelom je nemoc, která se může vyvíjet velice pomalu. Rozvoj může trvat týdny až měsíce. Genetická porucha plazmatických buněk způsobuje jejich hromadění v kostech. Mohou tak vznikat poruchy v kostech (zlomeniny)

a je potlačována ostatní krevtvorba. Plazmatické buňky produkují paraprotein, který se ukládá v ledvinách a tím dochází k jejich poškození (Vokurka, 2008).

Věkový medián se opět pohybuje kolem 66 let. Výjimečně se mohou objevit případy, u nichž jsou osoby v době stanovení diagnózy mladší 40 let. I přes zavedení nových léků je délka života pacienta krátká. Myelom se dá léčit chemoterapií a autologní transplantací, ovšem úplně vyléčit ho lze jen v omezených případech (Adam, Krejčí, Vorlíček a kolektiv, 2008).

### **3 TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK**

Transplantace hematopoetických buněk je léčebná procedura, nahrazující poškozenou krvetvorbu pacienta za zdravou tkáň od dárce. Ti jsou nejprve hledáni v příbuzenském okruhu nemocného.

#### **3.1 Typy transplantací**

Podle původu buněk dělíme transplantace na dva typy:

- 1 Autologní transplantace používá vlastní krvetvorné buňky odebrané ve stádiu remise nebo před zahájením chemoterapie. Během léčby chemoterapií je nenávratně poškozena kostní dřeň. Proto se po ukončení podává odebraný štěp, který obnoví tvorbu buněk. Jelikož jde o buňky pacienta, není nutné po transplantaci užívat imunosupresiva potlačující imunitu.
- 2 U alogenní transplantace se využívají buňky získané od zdravého dárce. Tyto transplantace rozdělujeme na:
  - a) Příbuzenské - sourozenci, rodiče. Největší pravděpodobnost, že znaky MHC I. a II. třídy budou totožné, je u identických sourozenců. Vzácně se syngenní transplantace provádí u jednovaječných dvojčat.
  - b) Nepříbuzenské - dárce nalezený prostřednictvím mezinárodního registru. U jiných příbuzných a nepříbuzných s jednou neshodou.

Vzhledem k tomu, že transplantujeme buňky imunitního systému, je nutné aby byly buňky příjemce co nejvíce totožné s buňkami dárcovskými. Nejdůležitější je shoda v MHC znacích leukocytů, kdy ideální dárce má všechny antigeny stejné s pacientem. Čím je větší neshoda v MHC znacích, tím se zvyšuje pravděpodobnost, že buňky dárce zareagují na tělo příjemce a projeví se závažná komplikace transplantace hematopoetických buněk – reakce štěpu proti hostiteli.

Alogenní transplantace probíhají nejčastěji s dárci, které mají MHC shodu 10/10 popř. 9/10 (tj. 10 resp. 9 MHC znaků je shodných). V ojedinělých případech se přistupuje k tzv. haploidentické transplantaci, kdy je shoda 5/10. V těchto případech jde nejčastěji o transplantace mezi dětmi a rodiči (Krejčí, Mayer, 2016).

#### **3.2 Odběr a typy transplantovaného materiálu**

V dnešní době jsou nejčastějším zdrojem hematopoetických buněk periferní kmenové buňky, v menší míře kostní dřeň a pupečnicková krev.

Odběr periferních kmenových buněk probíhá po stimulaci růstovým faktorem pro granulocyty a makrofágy (GM-CSF). Vyplavené hematopoetické buňky jsou sbírány leukocytaferézou. Tato metoda je dnes zcela standardní a prováděna bez dlouhodobé hospitalizace a narkózy. Krev je odebírána v rozmezí 200 - 300ml do citrátové antikoagulace, kdy produktem je leukocytární koncentrát obsahující hematopoetické buňky. Tento typ odběru se využívá u autologních i alogenních transplantací. Jelikož množství erytrocytů je v konečném produktu minimální. Zmíněný postup se dá použít i v případě neshody krevních skupin.

Kostní dřev patří mezi historicky starší zdroje hematopoetických buněk. Celkový objem darované dřevě je obvykle 1000 - 1500ml. Doba hospitalizace trvá 3 dny, je spojována s bolestmi v místě v pichu a 8 týdenní regenerací KD dárce. Odběr se provádí pod narkózou, kdy je pomocí jehly odebrán vzorek z lopatky kosti kyčelní. Posledním zdrojem je pupečnicková krev. Ta se však využívá v ojedinělých situacích. Z pravidla tehdy, nepodařilo-li se najít vhodného alogenního dárce u pediatrických pacientů (Cetkovský, Mayer, Starý et al. 2016).

### **3.3 Alogenní transplantace a post-transplantační komplikace**

Ošetřující lékař před transplantací zhodnotí rizika a faktory ovlivňující úspěšnost transplantace. Mezi hlavní kritéria patří věk, celkový zdravotní stav pacienta a prognóza. Čím vyšší kalendářní věk, tím stoupá riziko potransplantačních komplikací. Věková hranice pro transplantace je obvykle 65 let, ale je možné provádět až do věku 70, pokud je celkový klinický stav dobrý (Závadová et al. 2015).

Před vlastní transplantací nejprve nemocný podstoupí předtransplantační režim. V této fázi je pacient vystaven vysokému riziku infekcí. Protože neefektní krvetvorba pomocí cytostatik nebo chemoterapie se zničí, aby se uvolnilo místo pro novou krvetvorbu. Ta však musí obsahovat nejvíce shodné znaky na leukocytech, jinak by mohlo dojít k závažné reakci štěpu proti hostiteli.

Ke snaze zabránit těmto komplikacím, jsou podávány imunosupresiva, které tlumí imunitní systém. Samotný proces pak probíhá podobně jako transfúze. Po žilním podání si krvetvorné buňky samy najdou místo v KD, usídlí se a postupná obnova přichází do 2 - 3 týdnů (Krejčí, Mayer, 2016).

I přes sebelepší výběr dárce se jedná o dlouhotrvající léčbu s větší pravděpodobností uzdravení u dětí. Je zde i riziko návratu choroby, které záleží

na druhu onemocnění a typu zákroku. U autologních transplantací je riziko dvakrát větší než u alogenních.

Komplikace spojené s transplantací se nemusí týkat pouze relapsu choroby. Mohou se objevit následky po proběhlé chemoterapii - neplodnost, porucha funkce štítné žlázy, infekce (Mlčoch, 2009).

### **3.4 Obnova krve tvorby**

Pomalý nárůst krvinek poukazuje na přihojení štěpu a úspěšnost transplantace. Vyšetření krevního obrazu (dále jen KO) umožní pozorovat tento děj, trvající i měsíce až roky. Rychlejší rekonstrukce krve tvorby se vyskytuje u autologních transplantací (Iarocci, 2017).

Jelikož po transplantaci nastupuje krvetvorný útlum, pacient podle potřeby dostává transfúze erytrocytů, trombokonzentrátů. Podáním růstových faktorů se dá urychlit množení buněk. Erythropoetin podporuje růst červených krvinek, G-CSF zase růst granulocytů. Den kdy se objeví neutrofilní granulocyty, se označuje jako přihojení. Tvorba krevních destiček je oproti lymfocytům opožděna. I přes objevení neutrofilních granulocytů je tu stále možnost infekcí nebo krvácení a to do té doby, než vznikne dostatečné množství krvinek (Švojkrová, Koza, Hamplová, 2006).

# **PRAKTICKÁ ČÁST**

## **4 CÍL**

Cíl mé bakalářské práce je zjistit, jak probíhá regenerace lymfocytárních subpopulací po alogenní transplantaci kostní dřeně.

## **5 HYPOTÉZA**

Při sledování krevního obrazu lze zjistit, že se z populace leukocytů regenerují jako poslední lymfocyty. Předpokládá se, že v rámci lymfocytárních subpopulací se budou nejdříve regenerovat lymfocyty zodpovědné za imunitní odpověď zprostředkovanou buňkami a až následně buňky zodpovědné za produkci protilátek.

## **6 METODIKA VÝZKUMU**

K měření základní lymfocytární subpopulace v periferní krvi je využívána průtoková cytometrie. Tento postup je standardní metodou sledování regenerace hematopoézy na Hematoonkologickém oddělení FN Plzeň. Použití dat v této práci je se schválením FN Plzeň.



## 6.1 STANOVENÍ LYMFOCYTÁRNÍCH SUBPOPULACÍ

Stanovení zastoupení subpopulací lymfocytů v periferní krvi, slouží pro základní posouzení obnovy krvetvorby a stavu buněčné imunity. První hodnocení probíhá v okamžiku, kdy hodnota leukocytů přesáhne  $1 \times 10^9/l$ . Následné stanovení probíhá v intervalech 7 - 10dní.

### 6.1.1 Princip

Na průtokovém cytometru se stanovuje diferenciální rozpočet leukocytů a procentuální zastoupení lymfocytárních subpopulací. Výsledkem měření jsou procentuální zastoupení a absolutní počty subpopulací lymfocytů ( $bb. \times 10^9/l = bb./\mu l$ ).

### 6.1.2 Reagencie a materiál

- monoklonální protilátky:
  - CD45 Krome Orange, Beckman Coulter, Kat. č. B36294
  - CD19 PECy7, Beckman Coulter, Kat. č. IM3628
  - CD3 FITC+CD16/56PE – Exbio, Kat. č. ED7054
  - CD4 Pacific Blue – Beckman Coulter, Kat. č. B49197
  - CD8 PerCP – Exbio, Kat. č. PC-207-T100
- lyzační roztok – amonium chlorid
- zkumavky 12 x 75mm – BD Bioscience
- mikropipety – 1 - 10 $\mu$ l, 1 - 50 $\mu$ l, 100 - 1000 $\mu$ l; špičky

### 6.1.3 Postup

- 1 Připravíme si čistou zkumavku - do které přepipetujeme 50 $\mu$ l krve pacienta a přidáme 2 $\mu$ l monoklonálních protilátek (tab. 3).

**Tab. 3 Panel používaných monoklonálních protilátek**

Kombinace protilátek	Analýza
CD45 KO	gate z CD45/SS na lymfocyty
CD19 PECy7	analýza B-lymfocytů (CD19+)
CD3 FITC	T-lymfocytů (CD3+),
CD16 + CD56 PE	NK buněk (CD3negCD16+56poz)
CD4 PB	Th-lymfocytů (CD3+CD4)
CD8 PerCP	Tc-lymfocytů (CD3+CD8)

Zdroj: Hemato-onkologická laboratoř FN Plzeň

- 2 Inkubujeme 15 minut ve tmě. Protilátka značena fluorescencí se mezitím naváže na protein.
- 3 Po inkubaci přidáme 500 $\mu$ l lyzačního roztoku, pro hemolýzu erytrocytů. Inkubujeme 15 minut ve tmě a měříme pomocí průtokového cytometru Navios, analýzu provádíme v software Kaluza. Poté počítáme procentuální zastoupení jednotlivých subpopulací na kvantitativní hodnoty (k tomu použijeme hodnoty krevního obrazu z Ústavu klinické biochemie a hematologie FN Plzeň).

#### **Absolutní zastoupení lymfocytů:**

$$\text{lymfocyty (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD3}}{100} \times \text{hodnota WBC} \times 10^3/\mu\text{l}$$

#### **Absolutní počet jednotlivých subpopulací vypočítáme:**

$$\text{CD3 (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD3}}{100} \times \text{absolutní počet lymfocytů}$$

$$\text{CD19 (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD19}}{100} \times \text{absolutní počet lymfocytů}$$

$$\text{CD4 (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD3+CD4+}}{100} \times \text{absolutní počet lymfocytů}$$

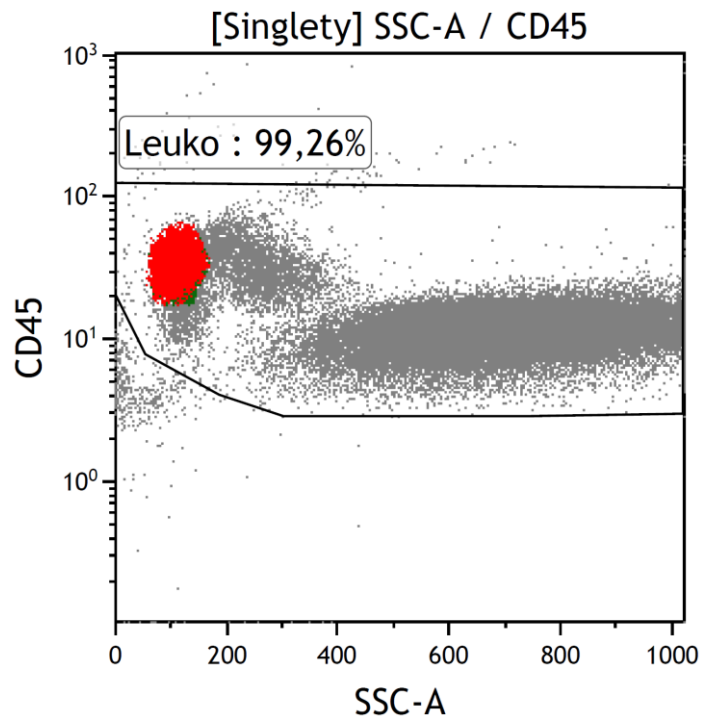
$$\text{CD8 (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD3+CD8+}}{100} \times \text{absolutní počet lymfocytů}$$

$$\text{CD16/56 (buněk}/\mu\text{l)} = \frac{\text{procento CD16/56+}}{100} \times \text{absolutní počet lymfocytů}$$

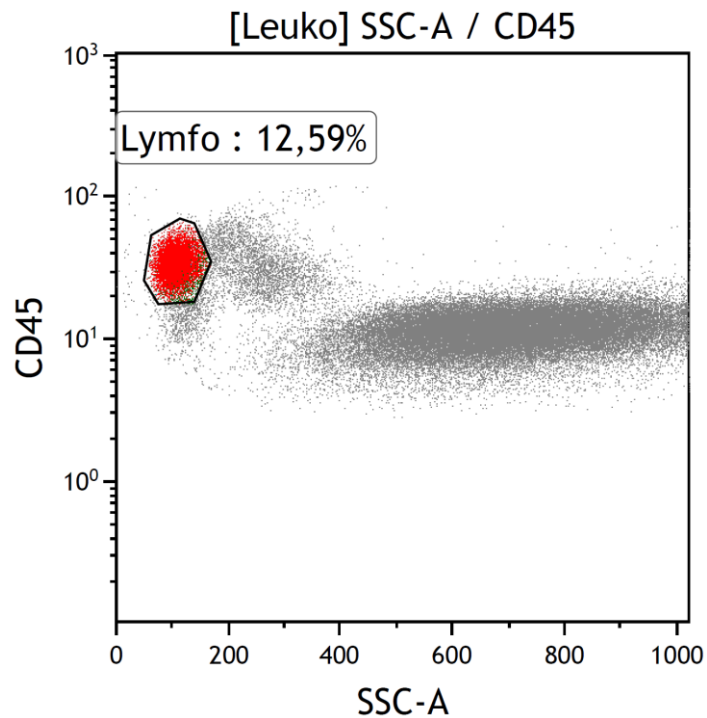
## **6.2 Gatovací strategie**

Softwarový program Kaluza umožňuje analyzovat snadno a rychle miliony buněk. Pomocí charakteristických znaků pro dané populace můžeme zagatovat v daném Dot Plotu sledované lymfocyty - postup je znázorněn v následujícím schématu (Obr. 2, 3, 4, 5, 6, 7 ).

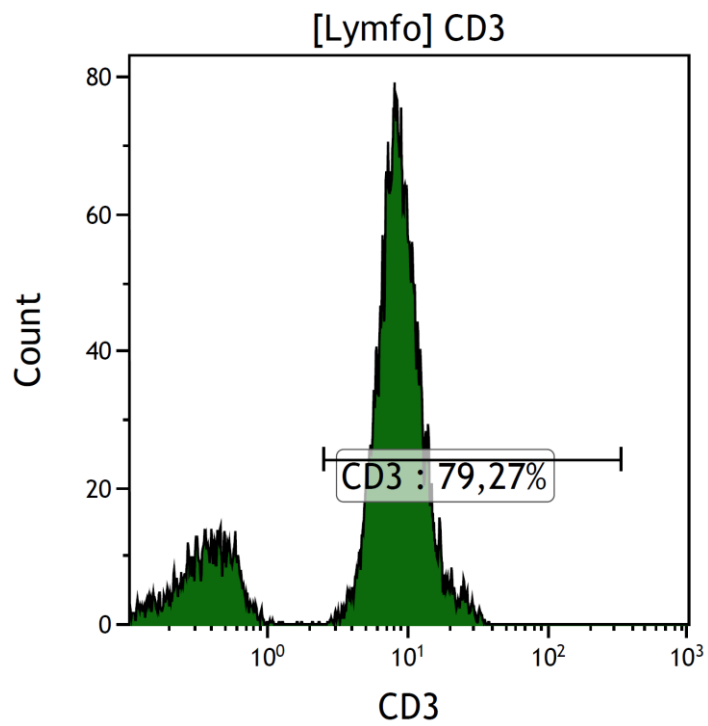
**Obr. 2 Rozdělení buněk podle exprese CD45 a granularity (SSC) na základní populace (monocyty, granulocyty, lymfocyty)**



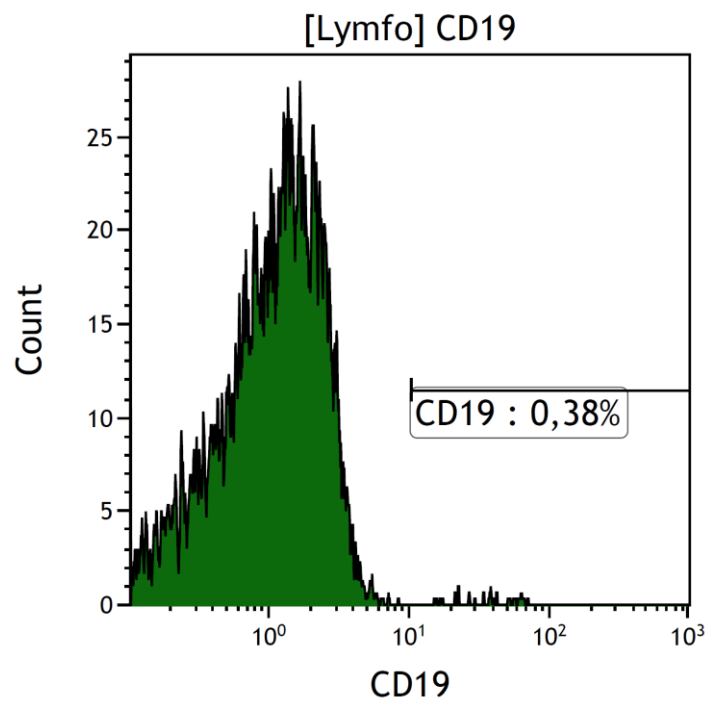
**Obr. 3 Výběr lymfocytů pomocí znaku CD45, který je pro ně typický.**



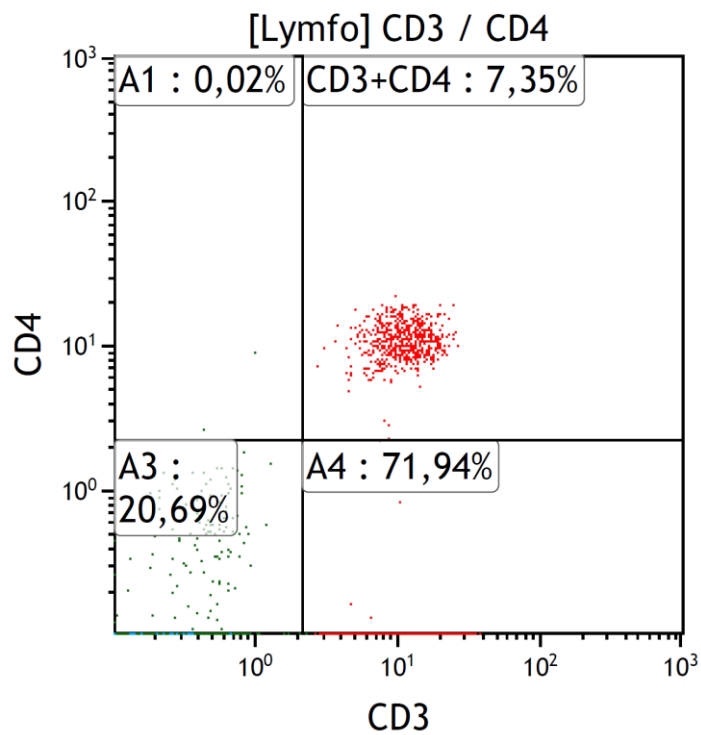
**Obr. 4 Stanovení procentuálního zastoupení T-lymfocytů pomocí znaku CD3.**



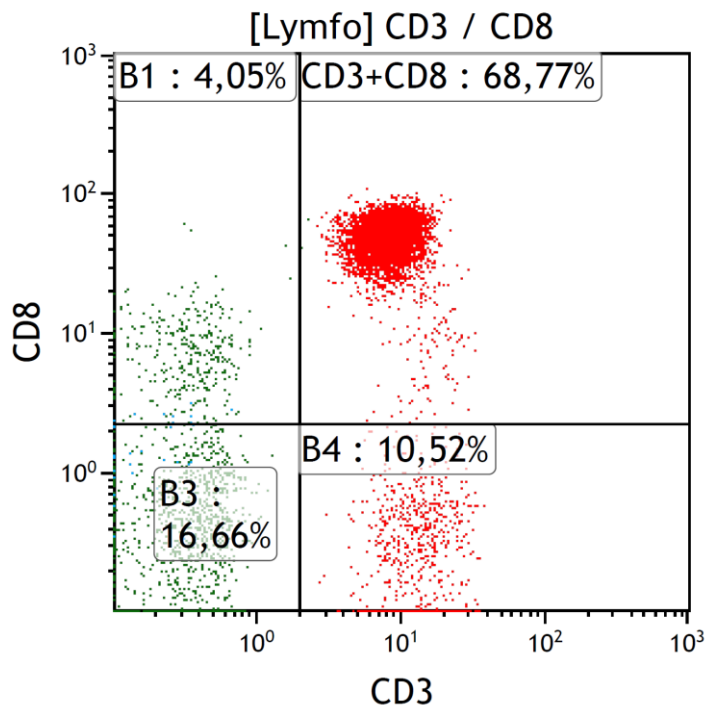
**Obr. 5 Procentuální zastoupení B-lymfocytů stanovených znakem CD19**



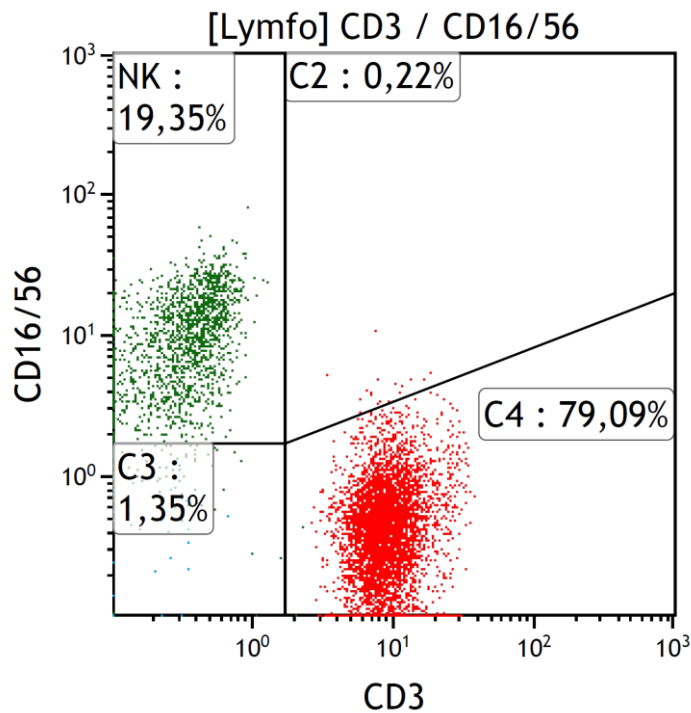
**Obr. 6** Gatování Th-lymfocytů pomocí znaků CD3 a CD4.



**Obr. 7** Gatování Tc-lymfocytů pomocí znaků CD3, CD8.



**Obr. 8** Gatování NK buněk pomocí znaků CD3, CD16 + 56.



### 6.3 Statistické hodnocení

Statistika byla provedena ve spolupráci s Bc. Martinem Lebou z Katedry kybernetiky ZČU. Pro vyhodnocení dat byl zvolen Mann-Whitneyův test (= Wilcoxon rank sum test), který porovnával rozdíly mezi mediány jednotlivých měření na hladině významnosti 5%. Zpracování dat probíhalo v programu MATLAB.

Nulová hypotéza ( $h$ ) = průměry jsou stejné

$h = 0$  = stejné mediány,

$h = 1$  = rozdílné mediány

## 7 VÝSLEDKY

Celkem bylo sledováno 17 pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. U všech pacientů bylo měřeno zastoupení lymfocytů a jednotlivých lymfocytárních subpopulací. Vývoj jednotlivých subpopulací byl sledován u čtyřech po sobě jdoucích vyšetřeních.

Jednotlivé procentuální zastoupení i kvantita buněk mezi pacienty byly již od prvního náběru s variabilním rozdílem. Došlo tudíž k velkému rozptylu sledovaných parametrů při statistickém hodnocení, způsobenou variabilitou jednotlivých pacientů. Proto jsme hodnotili procentuální změnu u jednotlivých pacientů, tj. první hodnotu jsme označili jako 100% a u následujících hodnot jsme spočítali, kolik procent tvoří z původní hodnoty. Viz. příloha č. 1 - 12. Z těchto hodnot pak bylo následně prováděno statistické vyhodnocení. Viz příloha č. 13.

V porovnáním s prvním měřením bylo zjištěno, že kromě CD3 + CD4 + (Th-lymfocytů) došlo u všech sledovaných populací k nárůstu koncentrace buněk. Tyto změny odpovídaly celkové regeneraci leukocytů. Při sledování procentuální zastoupení jednotlivých subpopulací jsme zachytili trend poukazující na zvýšení složek buněčné imunity (NK buňky, Tc-lymfocyty) a pokles složek protilátkové imunity (B-lymfocyty). Jednotlivé populace popisujeme v následujících kapitolách.

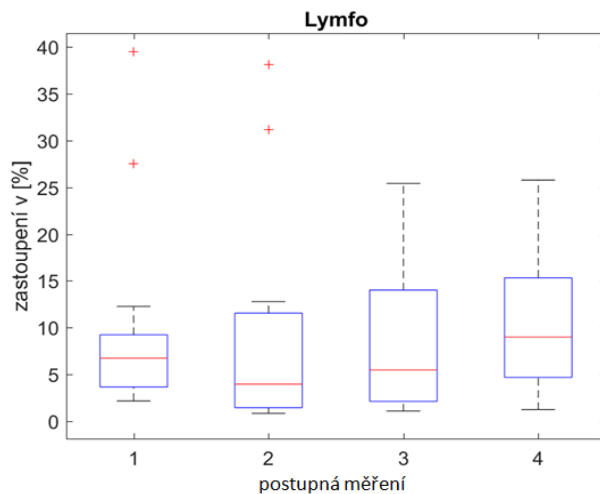
**Tab. 4 Procentuální zastoupení jednotlivých populací**

znak	% fyziologická	% Měření 1 (medián)	% Měření 2 (medián)	% Měření 1 (medián)	% Měření 1 (medián)
Lymfocyty	15 - 40	7	4	5	9
CD3	58 - 85	67	61	62	70
CD3+CD4	27 - 64	16	9	9	10
CD3+CD8	19 - 48	39	38	32	55
CD19	7 - 23	3	3	2	2
CD16+56	5 - 34	16	30	23	25

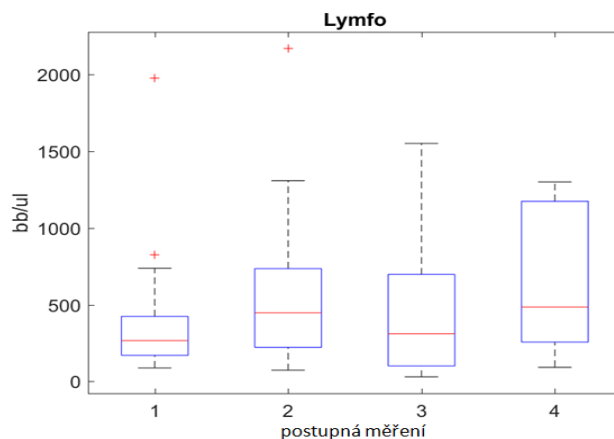
## 7.1 Lymfocyty

Při sledování procentuálního zastoupení vykazovaly hodnoty pokles oproti prvnímu měření ve druhém a třetím měření a to s mediánem 63% u druhého a 71% u třetího. V posledním stanovení již došlo k regeneraci lymfocytů a k jejich zvýšení na 115% původní hodnoty. Při kvantifikaci buněk na  $\mu\text{l}$  krve byl nejprve zachycen nárůst na 126% oproti prvnímu měření, poté následoval pokles na původní hodnotu následován opětovným nárůstem na 154% výchozí hodnoty. V následujících grafech jsou zobrazena procentuální (graf 1) a kvantitativní zastoupení lymfocytů (graf 2). Žádné rozdíly nebyly statisticky signifikantní.

**Graf 1 Procentuální zastoupení lymfocytů**



**Graf 2 Kvantitativní zastoupení lymfocytů**

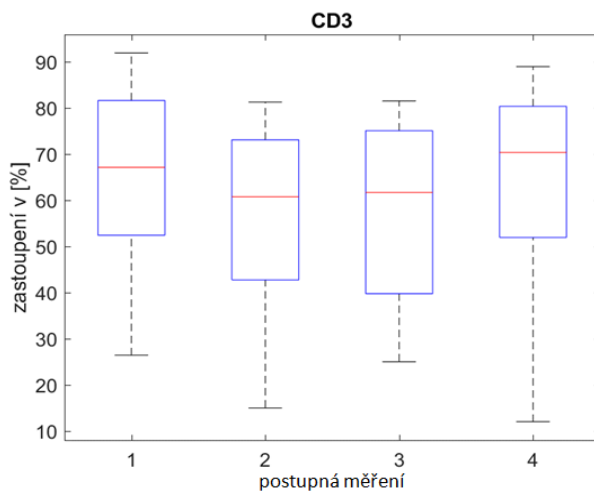




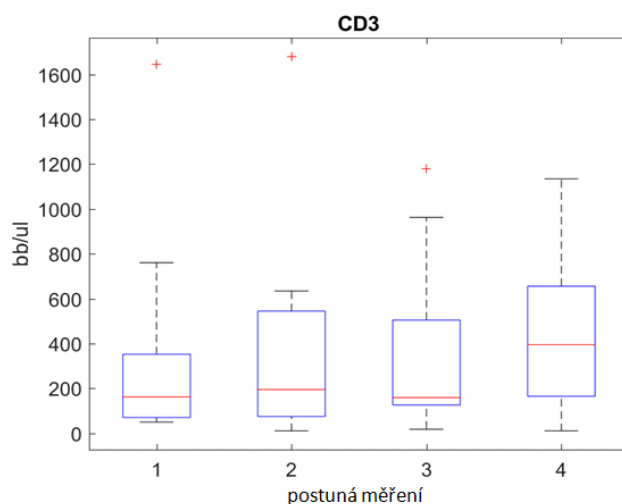
## 7.2 T-lymfocyty

Trend u T-lymfocytů se podobal trendu u celkových lymfocytů, i když v rámci procentuálního zastoupení nedošlo k dosažení resp. převýšení první hodnoty měření. Hodnoty tvořily 86% (druhé měření), 88% (třetí měření) a 97% (třetí měření) z původní hodnoty (graf 3). Při kvantitativním měření docházelo postupně k zvyšování zastoupení T-lymfocytů a to konkrétně na 111% (druhé měření), 124% (druhé měření) a 143% (třetí měření) z původní hodnoty (graf 4). Žádné rozdíly nebyly statisticky signifikantní.

**Graf 3 Procentuální zastoupení T- lymfocytů**



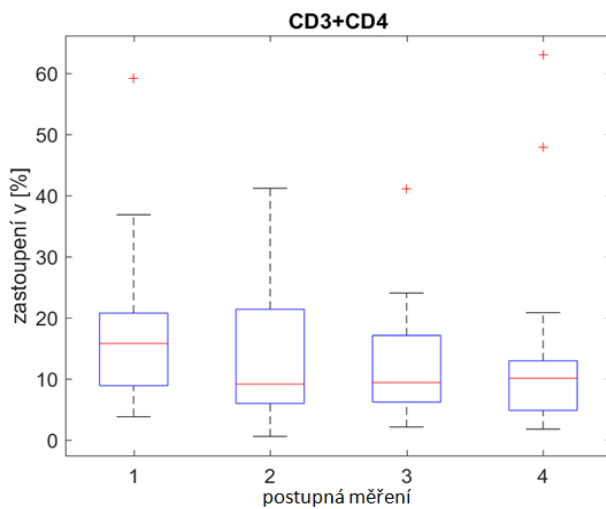
**Graf 4 Kvantitativní zastoupení T-lymfocytů**



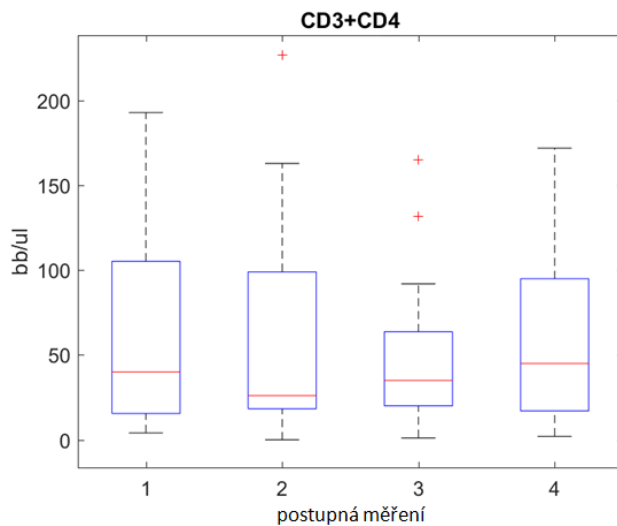
### 7.3 Th-lymfocyty

U procentuálního zastoupení Th-lymfocytů docházelo k postupnému poklesu hodnot na 82%, 65% až 56% z původní hodnoty (graf 5). Pokles byl také zaznamenán u kvantitativního zastoupení, kde však hodnoty začaly klesat až od třetího měření na 91% a u čtvrtého dosahovaly 89% z původní hodnoty. Mezi prvním a druhých měřeními byl rozdíl pouze 2% (graf 6). Žádné rozdíly nebyly statisticky signifikantní.

**Graf 5 Procentuální zastoupení Th - lymfocytů**



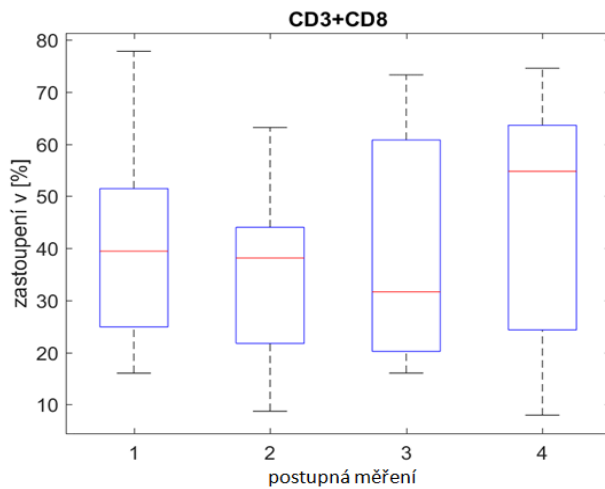
**Graf 6 Kvantitativní zastoupení Th - lymfocytů**



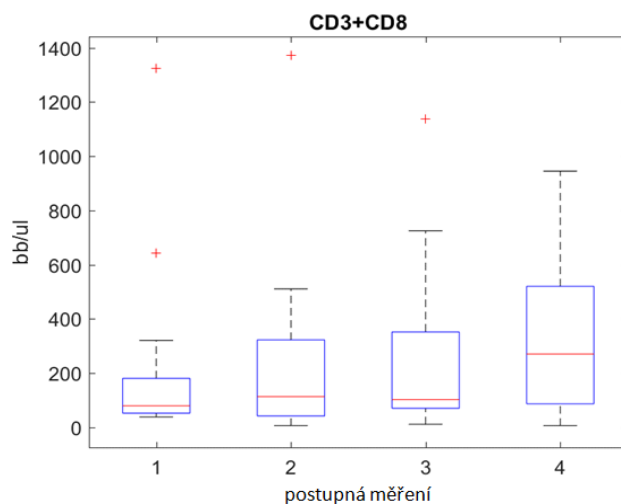
## 7.4 Tc-lymfocyty

CD8+ T-lymfocyty kopírovaly trend zachycený u lymfocytů. U procentuálního zastoupení nejprve došlo u druhé a třetího měření k poklesu hodnot na 91% resp. 96%, u čtvrtého měření již hodnoty dosahovaly 132% z výchozího prvního měření (graf 7). Kvantita buněk postupně rostla a to na 110% (druhé měření), 127% (třetí měření) a 171% (čtvrté měření) z původní koncentrace (graf 8.) Žádné rozdíly nebyly statisticky signifikantní.

**Graf 7 Procentuální zastoupení Tc - lymfocytů**



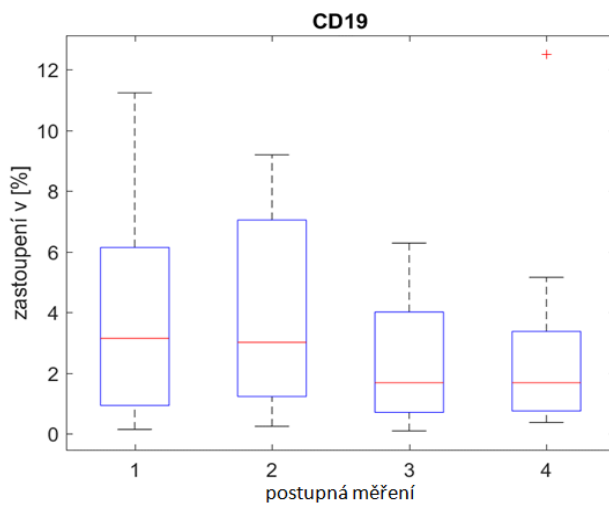
**Graf 8 Kvantitativní zastoupení Tc - lymfocytů**



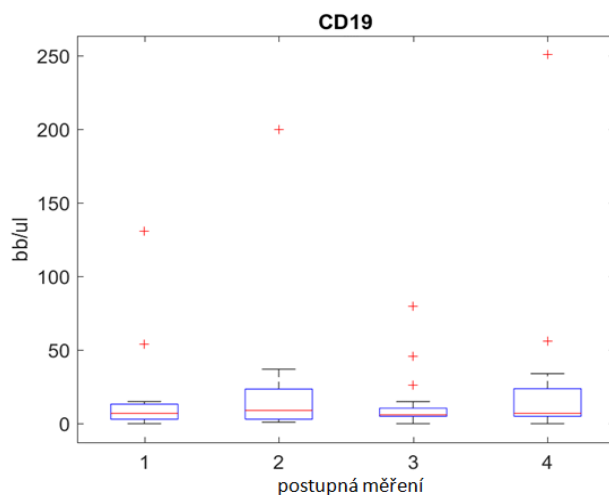
## 7.5 B-lymfocyty

U B-lymfocytů byl zachycen opačný trend jako u T-lymfocytů. V druhém měření došlo v rámci procentuálního zastoupení k mírnému nárůstu na 114%, následoval pokles na 67% (třetí měření) až 61% (čtvrté měření). Oproti tomu v kvantitativním stanovení tento trend nebyl zachycen a u všech měření došlo k nárůstu proti prvnímu stanovení a to na 153% (druhé měření), 114% (třetí měření) a 200% (čtvrté měření). Zastoupení B-lymfocytů však bylo velmi nízké a tak tyto trendy mohou být zkresleny chybou malých čísel. Žádné rozdíly nebyly statisticky významné.

**Graf 9 Procentuální zastoupení B - lymfocytů**



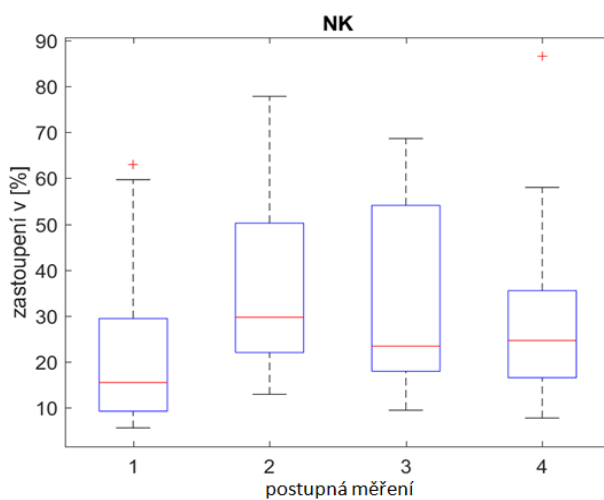
**Graf 10 Kvantitativní zastoupení B - lymfocytů**



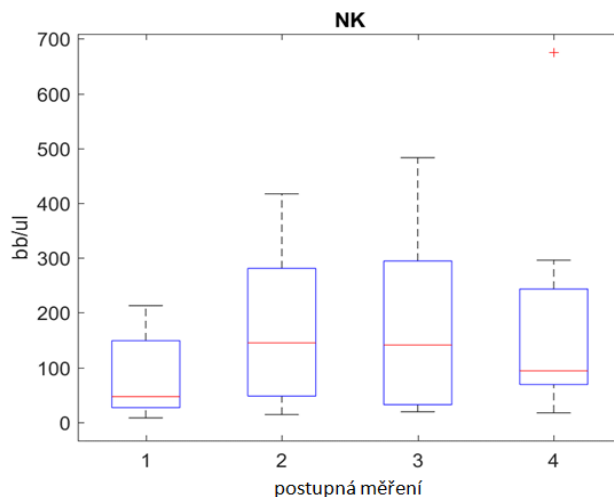
## 7.6 NK buňky

V populaci NK buněk byly zachyceny největší změny. U procentuálního zastoupení došlo k výraznému zvýšení na 181% (druhé měření) a až na 200% (třetí měření) z původní hodnoty. Následně hodnoty mírně poklesly, ale stále byly vyšší než hodnoty z prvního stanovení, ve kterém byl medián 145%. U kvantitativního zastoupení dosáhly hodnoty během druhého měření na 262% původní hodnoty a poté mírně klesaly na 214% resp. 211% (třetí resp. čtvrté měření). Ani zde nebyly rozdíly statisticky signifikantní.

**Graf 11 Procentuální zastoupení NK buněk**



**Graf 12 Kvantitativní zastoupení NK buněk**



## 8 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jak probíhá regenerace lymfocytárních subpopulací po alogenní transplantaci kostní dřeně. Zabývali jsme se domněnkou, která předpokládá nejdříve regeneraci u lymfocytů zodpovědných za buněčnou imunitu (cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky) a až později za protilátkovou (B-lymfocyty). Pro toto sledování jsme použili průtokovou cytometrii, pomocí které jsme stanovili lymfocyty a jejich subpopulace ve čtyřech po sobě jdoucích náběrech.

Je známo, že po transplantaci hematopoetických buněk jako první regenerují granulocyty a až jako poslední lymfocyty a jejich jednotlivé subpopulace (Ogonek, Kralj Juric, Ghimire et al. 2016). V naší studii jsme zaznamenali ve všech měřeních snížené zastoupení lymfocytů oproti standardním fyziologickým hodnotám. Nejnižší zastoupení vykazovaly B-lymfocyty, které byly po celou dobu značně pod fyziologickým rozmezím a jejichž standardní dobou regenerace je zhruba 1- 2 roky (Park, Park, Jang et al. 2015, (Marie-Cardine et al. 2008). Nejrychleji po transplantaci z lymfocytů regenerují NK buňky, jejichž hodnoty jsou po transplantaci v prvních měsících vyšší. (Williams, Gress, 2008). V našem souboru se pohybovaly na horní hranici fyziologických rozmezí, stejně jako cytotoxické T-lymfocyty. Oproti tomu pomocné Th-lymfocyty byly po celou dobu monitorace pod fyziologickým rozmezím, což odpovídá výsledkům jiných zahraničních studií (Seggewiss, Einsele, 2010). B-lymfocyty se objevují nejpomaleji (Marie-Cardine et al. 2008).

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem "Sledování populací T, B, NK buněk u pacientů s hemato-onkologickým onemocněním" se člení na teoretickou a praktickou část.

Měli jsem za cíl zjistit jak probíhá regenerace lymfocytů a lymfocytárních subpopulací po transplantaci hematopoetických buněk.

Výsledkem je potvrzení naší hypotézy, že nejdříve se regenerují elementy buňkami zprostředkované imunity NK buňky a Tc-lymfocyty a B-lymfocyty, které zodpovídají za protilátkovou odpověď se regenerovali až jako poslední. Jelikož jsme sledovali jen 17 pacientů a mezi jednotlivými pacienty je značná variabilita, výsledky naší práce nebyly statisticky průkazné a je nutné další monitorování u většího souboru pacientů.

## POUŽITÉ ZDROJE

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2. dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008, 404 s., ISBN 978-80-247-2502-4.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 172 s., ISBN 978-80-247-3533-7.

CETKOVSKÝ, Petr, Jiří MAYER, Jan STARÝ a Mariana HRIČINOVÁ. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. Praha: Galén, 2016, 460 s., ISBN 978-80-7492-267-1.

FERENČÍK, Miroslav, Josef ROVENSKÝ, Yehuda SHOENFELD a Vladimír MAŤHA. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005, 236 s., ISBN 80-247-1196-6.

FERENČÍK, M., J. ROVENSKÝ a V. MAŤHA. *Ilustrovaný imunologický slovník*. Praha: Galén, c2004, 288 s., ISBN 80-7262-243-9.

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA, Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. 330s., ISBN 978-80-7387-713-2.

IAROCCI, Tom. *Treatment Advances for Leukemia and Lymphoma*. Werywell. [online] [cit. 10. 1. 2017]

Dostupné z: <https://www.verywell.com/treatment-advances-for-leukemia-and-lymphoma-4117268>

JÍLEK, Petr. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. 79 s., ISBN 978-80-254-2422-3.

KAČÍRKOVÁ, Petra a Vít CAMPR. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada, 2007. 304 s., ISBN 9788024718538.



KREJČÍ, Marta, Jiří MAYER, Zdeněk ADAM a Jiří VORLÍČEK. *Transplantace krvetvorných buněk*. Vnitřní lékařství, Brno: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2009, roč. 55, č. 9, s., 738-745. ISSN 0042-773X.

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. 941 s., ISBN 80-86225-50-x.

MARIE-CARDINE A, F. DIVAY, I. DUTOT, A. GREEN, A. PERDRIX, O. BOYER et al. *Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Immunol, 2008, 127(1) doi:10.1016/j.clim.2007.11.013

MLČOCH, Zbyněk. *Transplantace kostní dřeně - provedení, princip, informace, vysvětlení*. Na našem webu najdete všechno a ještě něco navíc. [online]. [cit. 10. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/medicina/nemocilecba/transplantace-kostni-drene-cena-provedeni-princip-informace-vysvetleni>

JANEWAY, Ch., K. MURPHY, P. TRAVERS, M. WALPORT. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science, c2012. 888 s., ISBN 0815342438.

OGONEK J., KRALJ JURIC M., GHIMIRE S., VARANASI PR., HOLLER E., GREINIX H., WEISSINGER E. *Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol. 2016 Nov 17;7:507.

PARHAM, Peter. *The immune systém*. Garland Science. 2015. 532 s., ISBN 978-0-8153-4466-7

PARK BG., PARK CJ., JANG S., CHI HS., KIM DY., LEE JH., LEE KH. *Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients*. Leuk Res, 2015, 39(12) s.1334

PENKA, Miroslav a Eva Tesařová. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1 vyd. Praha: Grada, 2011. 488s., ISBN: 978-80-247-3459-0

SEGGEWISS R, EINSELE H. *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update.* Blood, 2010, 13;115(19):3861-3868

ŠTEFÁNEK, Jiří. *Chronická myeloidní leukémie.* Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK [online], 2011. [cit. 6. 3. 2017].

Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=chronicka-myeloidni-leukemie>

ŠTERZL, Ivan. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře.* Praha: Karolinum, 2005. 208 s., ISBN 80-246-0972-X.

ŠVOJGROVÁ, Mája, Vladimír KOZA a Alice HAMPLOVÁ. *Transplantace kostní dřeně: průvodce Vaší léčbou.* Plzeň: F.S. Publishing nákladem Nadace pro transplantace kostní dřeně, 2006. 127 s., ISBN 80-903560-2-8.

VOKURKA, Samuel. *Základní hemato-onkologická onemocnění a jejich charakteristiky. 1. vyd.* Praha: Galén, c2008. 89 s., ISBN 978-80-7262-553-6.

VODVÁŘKA, Pavel. *Podpůrná léčba v onkologii 2003: podpora výživy, léčba komplikací chemoterapie, bolest, kvalita života, genetika.* Praha: Galén, c2004. 224 s., ISBN 80-7262-264-1.

WILLIAMS, K.M, R.E, GRESS. *Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation.* Best Pract. Res. Clin. Haematol., 2008, 21.

ZÁVADOVÁ, Eva, ed. *Onkologická imunologie.* Praha: Mladá fronta, 2015. Aeskulap. 320 s. ISBN 978-80-204-3756-3.

## **SEZNAM ZKRATEK**

- AML - akutní myeloidní leukémie (acute myelogenous leukemia)
- ALL - akutní lymfatická leukémie (acute lymphocytic leukemia)
- BCR - B-buněčný receptor (B-cell receptor)
- CML - chronická myeloidní leukémie (chronic myelogenous leukemia)
- CLL - chronická lymfatická leukémie (chronic lymphocytic leukemia)
- CD - diferenciační antigen (cluster of differentiation)
- DC - dendritické buňky (dendritic cells)
- G-csf - růstový hormon pro granulocytární řadu leukocytů
- Ig - imunoglobulin
- IL - interleukin
- INF - interferon
- KD - kostní dřeň
- KO - krevní obraz
- MHC - hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
- MDS - myelodysplastický syndrom
- NK - přirození zabíječi (natural killer)
- NKT - NK T-lymfocyt (natural killer T-cell)
- PK - periferní krev
- Tc-lymfocyt - cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-cell)
- TCR - T-buněčný receptor pro antigen (T-cell receptor)
- Th-lymfocyt - pomocný T-lymfocyt (helper T-cell)
- T-reg - regulační T-lymfocyt

## **SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Podskupiny Th – lymfocytů .....	13
Tab. 2 Základní charakteristika imunoglobulinů .....	15
Tab. 3 Panel používaných monoklonálních protilátek.....	25
Tab. 4 Procentuální zastoupení jednotlivých populací .....	31

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Procentuální zastoupení lymfocytů .....	32
Graf 2 Kvantitativní zastoupení lymfocytů .....	32
Graf 3 Procentuální zastoupení T- lymfocytů.....	33
Graf 4 Kvantitativní zastoupení T-lymfocytů.....	33
Graf 5 Procentuální zastoupení Th - lymfocytů.....	34
Graf 6 Kvantitativní zastoupení Th - lymfocytů.....	34
Graf 7 Procentuální zastoupení Tc - lymfocytů.....	35
Graf 8 Kvantitativní zastoupení Tc - lymfocytů.....	35
Graf 9 Procentuální zastoupení B - lymfocytů .....	36
Graf 10 Kvantitativní zastoupení B - lymfocytů .....	36
Graf 11 Procentuální zastoupení NK buněk .....	37
Graf 12 Kvantitativní zastoupení NK buněk .....	37

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Diferenciace leukocytů .....	11
Obr. 2 Rozdělení buněk podle exprese CD45 a granularity (SSC) na základní populace (monocyty, granulocyty, lymfocyty) .....	27
Obr. 3 Výběr lymfocytů pomocí znaku CD45, který je pro ně typický. ....	27
Obr. 4 Stanovení procentuálního zastoupení T-lymfocytů pomocí znaku CD3.....	28
Obr. 5 Procentuální zastoupení B-lymfocytů stanovených znakem CD19 .....	28
Obr. 6 Gatování Th-lymfocytů pomocí znaků CD3 a CD4.....	29
Obr. 7 Gatování Tc-lymfocytů pomocí znaků CD3, CD8.....	29
Obr. 8 Gatování NK buněk pomocí znaků CD3, CD16 + 56. ....	30

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1 Procentuální zastoupení lymfocytů

Příloha 2 Zastoupení lymfocytů v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 3 Procentuální zastoupení T - lymfocytů

Příloha 4 Zastoupení T - lymfocytů v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 5 Procentuální zastoupení Th - lymfocytů

Příloha 6 Zastoupení Th - lymfocytů v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 7 Procentuální zastoupení Tc - lymfocytů

Příloha 8 Zastoupení Tc - lymfocytů v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 9 Procentuální zastoupení B - lymfocytů

Příloha 10 Zastoupení B - lymfocytů v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 11 Procentuální zastoupení NK buněk

Příloha 12 Zastoupení NK buněk v  $\text{bb}/\mu\text{l}$

Příloha 13 Statistické zpracování

# PŘÍLOHY

## Příloha 1 Procentuální zastoupení lymfocytů

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	10,1	7,77	7,99	7,41	4,09	8,92	27,6	12,3	5,62	3,24	6,61	3,45	39,5	6,72	2,14	3,7	2,21	6,72
2	4,58	11,5	31,2	3,94	9,31	12,8	6,78	11,6	3,51	3,73	1,22	2,13	38,1	0,81	1,48	1,25	1,16	3,94
3	7,22	4,1	25,4	5,46	12,8	11,9	9,84	18,3	3,14	17,5	1,75	2,18	24,9	1,34	4,04	1,06	1,84	5,46
4	12,7	8,97	15,4	7,66	14,7	15,3	20,9	25,8	4,1	1,7	1,22	6,1	25,8	4,85	12,6	1,4	6,49	8,97

## Příloha 2 Zastoupení lymfocytů v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	566	163	738	326	172	339	827	245	309	266	119	252	1976	376	225	89	88	266
2	560	276	1309	552	633	447	1044	1101	260	287	73	543	2171	84	292	109	103	447
3	181	30	1499	322	1180	537	433	1552	311	1396	65	440	68	149	60	112	144	311
4	557	170	1167	360	908	1301	1276	1262	283	177	92	458	902	485	1196	160	441	485

## Příloha 3 Procentuální zastoupení T - lymfocytů

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	82,6	30,9	58,5	81,2	67,1	30,1	91,9	26,4	41	63,1	56,2	64,4	83,3	86,5	77,5	78,9	80,2	67,09
2	81,2	15,2	45,5	65,3	72,6	29,2	60,7	54	43	62,1	14,9	41,8	77,4	74,5	66,7	58,4	77	60,71
3	72,4	40,9	55,1	63,6	81,5	25	81,4	75,9	51	48,1	28,4	36	30	74,7	74,6	76,8	61,6	61,64
4	77,4	53,7	46,5	70,3	80	45,5	88,9	71,1	64,5	55,9	12	38,2	70,1	81,4	79,2	84,1	84,5	70,31

## Příloha 4 Zastoupení T - lymfocytů v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	467	50	431	265	115	102	760	65	127	168	67	162	1646	326	174	70	71	162
2	528	42	596	360	459	131	634	594	112	178	11	227	1679	63	195	63	79	195
3	131	139	827	205	962	134	353	1178	158	671	18	159	197	111	449	86	88	159
4	431	92	542	253	726	592	1134	897	182	99	11	175	632	395	948	134	373	395

## Příloha 5 Procentuální zastoupení Th - lymfocytů

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	19,7	5,26	13,9	59,1	9,42	17	7,71	5,7	16,6	13,4	3,76	15,8	9,21	36,8	21,8	20,4	22	15,75
2	17,6	5,82	7,36	41,2	3,25	29	10,3	5,98	15,2	7,97	0,53	4,28	7,52	22,7	20,9	9,09	22,7	9,09
3	19,6	8,9	11	41,1	4,82	24	9,04	2,21	16,2	6,6	2,07	4,58	9,35	20	12	7,05	14,3	9,35
4	10,1	4,89	11,1	47,9	4,54	63	7,32	2,15	16	11,4	1,73	5,41	11,9	20,8	7,35	4,52	10,8	10,06

## Příloha 6 Zastoupení Th - lymfocytů v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	112	9	103	193	16	5,01	64	14	51	36	4	40	182	139	49	18	19	40
2	114	16	96	227	21	6,4	108	66	39	26	0	23	163	19	61	10	23	26
3	35	30	165	132	57	4,54	39	34	50	92	1	20	61	30	72	8	20	35
4	56	8	129	172	41	4,83	93	27	45	20	2	25	107	101	88	7	48	45



### Příloha 7 Procentuální zastoupení Tc - lymfocytů

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	56,7	25,3	31,2	21,2	39,5	23,9	77,8	16	18,9	36,6	46,6	32	67	43,7	51	52,9	46	39,45
2	55,4	8,73	24	21,6	43,3	21,8	33,5	46,4	22,5	39,9	9,11	19,6	63,2	46,3	43,1	40,9	38,1	38,14
3	45,9	31,6	30,1	20,6	61,4	19,2	61,8	73,3	30,6	25	18,9	16,1	17,8	51,1	60,6	63,3	35,9	31,64
4	59,4	48,8	22,6	22	62,5	38,8	74,1	67,1	45,5	24,9	7,98	19,5	54,8	58,1	68,7	74,6	61,4	54,78

### Příloha 8 Zastoupení Tc - lymfocytů v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	321	41	230	69	68	81	643	39	59	97	55	80	1323	165	115	47	41	80
2	360	24	314	119	268	97	350	511	58	114	7	107	1372	39	126	44	39	114
3	83	108	541	66	725	103	276	1137	95	348	12	71	115	86	365	71	51	103
4	331	83	264	79	567	505	945	846	129	44	7	89	494	282	821	119	271	271

### Příloha 9 Procentuální zastoupení B - lymfocytů

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	4,92	0,26	7,28	2,75	7,66	1,42	0,39	1,12	0,15	3,7	0,21	5,98	6,64	3,71	3,15	11,2	2,9	3,15
2	2,8	0,25	2,13	3,02	3,94	1,22	2,18	0,28	1,24	7,83	0,79	6,79	9,2	4,63	4,84	8,06	8,47	3,02
3	5,77	1,61	1,73	2,08	3,91	0,95	1,69	0,4	0,77	5,7	0,54	3,37	0,25	0,1	1,37	4,35	6,29	1,69
4	5,16	1,43	1,51	1,69	3,79	0,76	0,53	4,47	0,75	12,5	0,41	3,03	3,24	1,44	0,38	2,86	3,15	1,69

### Příloha 10 Zastoupení B - lymfocytů v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	4,92	1	54	9	13	5	3	3	1	10	1	15	131	14	7	10	3	7
2	2,8	1	28	17	25	5	23	3	3	22	1	37	200	4	14	9	9	9
3	5,77	5	26	7	46	5	7	6	2	80	0	15	2	5	8	5	9	6
4	5,16	2	251	6	34	10	7	56	2	22	0	14	29	7	5	5	14	7

### Příloha 11 Procentuální zastoupení NK buněk

%	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	9,6	25,7	21,4	15,5	24,9	62,9	5,63	59,7	58,5	6,27	39,9	26	9,3	8,06	13,6	9,13	11,4	15,51
2	14,1	52,7	31,6	29,6	22,9	65,1	26,9	37,9	52,1	29,7	77,8	49,6	12,9	19,4	24,7	32,6	13,4	29,72
3	19,3	53,2	32,2	33,9	14,5	68,5	15,9	17,4	9,48	28	68,6	56,6	60,2	20,5	23,4	18,1	23,3	23,44
4	17,3	43,5	24,7	26,2	16,2	51,9	7,76	23,5	32,9	26,2	86,6	58	26,1	16,7	19,8	13,2	12,2	24,65

### Příloha 12 Zastoupení NK buněk v bb/μl

bb/ul	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	median
1	9,6	42	158	51	43	213	47	146	181	17	47	65	184	30	31	8	10	47
2	14,1	146	414	163	145	291	281	417	52,1	85	57	269	281	16	72	35	14	145
3	19,3	181	483	109	171	368	69	270	29	382	44	249	390	30	141	20	33	141
4	17,3	74	288	94	147	675	99	296	93	46	79	265	236	81	236	21	54	94

## Příloha 13 Statistické zpracování

porovnávaná měření:		Lymfo			CD3			CD3+CD4		
		1vs2	1vs3	1vs4	1vs2	1vs3	1vs4	1vs2	1vs3	1vs4
% zastoupení	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	p-value	0,352384	0,654322	0,408438	0,121151	0,168283	1	0,408438	0,168283	0,098272
	median 1.měření	6,72	6,72	6,72	67,09	67,09	67,09	15,75	15,75	15,75
	median porovnávaného měření	3,94	5,46	8,97	60,71	61,64	70,31	9,09	9,35	10,06
bb/ul	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	p-value	0,389189	0,782895	0,062892	0,654297	0,428243	0,065348	0,972517	0,83625	0,94508
	median 1.měření	266	266	266	162	162	162	40	40	40
	median porovnávaného měření	447	311	485	195	159	395	26	35	45

## Příloha 13 (pokračování) Statistické zpracování

CD3+CD8			CD19			NK		
1vs2	1vs3	1vs4	1vs2	1vs3	1vs4	1vs2	1vs3	1vs4
0	0	0	0	0	0	1	0	0
0,352384	0,704778	0,228001	0,67937	0,317861	0,546637	0,038771	0,085038	0,190584
39,45	39,45	39,45	3,15	3,15	3,15	15,51	15,51	15,51
38,14	31,64	54,78	3,02	1,69	1,69	29,72	23,44	24,65
0	0	1	0	0	0	0	0	1
0,717484	0,22132	0,038756	0,36933	0,876431	0,360232	0,051594	0,073217	0,017456
80	80	80	7	7	7	47	47	47
114	103	271	9	6	7	145	141	94

legenda: h ... 0 = stejné mediány, 1 = rozdílné mediány (na hladině významnosti 5%)

**\*\* Wilcoxon rank sum test \*\*** oba soubory dat jsou z rozdělení se stejným mediánem  
 nulová hypotéza = průměry jsou stejné  
 pokud "1" ? nulová hypotéza se zamítá (nejsou stejné)  
 pokud "0" ? nulová hypotéza se nezamítá (mediány jsou stejné) na hladině významnosti  $\leq 5\%$  ...