

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Štěpánka Jansová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

Štěpánka Jansová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**REKONSTITUCE BUNĚČNÉ IMUNITY PO ALOGENNÍ
TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH KMENOVÝCH
BUNĚK**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D

PLZEŇ 2023

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Štěpánka JANSOVÁ**
Osobní číslo: **Z21B0185P**
Studijní program: **B0914P360004 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Rekonstituce buněčné imunity po alogenní transplantaci krvinek z kmenových buněk**
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

Zpracovat rešerši a uvést teoretická východiska kvalifikační práce
Stanovit výzkumný cíl kvalifikační práce
Zpracovat teoreticko-empirickou/ teoretickou rešeršní kvalifikační práci dle požadavků FZS
Popsat metodiku kvalifikační práce
Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
Dodržet citační normu (ISO) a jednotný citační styl v celé kvalifikační práci

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- Adams G. B., Scadden D. T. (20. března 2006). *Hematopoietic stem cell in its place*. Získáno 13. Ledna 2023, z Nature Immunology: <https://www.nature.com/articles/ni1331>
- Carreras E., Dufour C., Mohty M. Kroger N. (2019). *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing.
- Krejčí M., Mayer J., Adam Z., Vorlíček J. (1. Zář 2009). *Transplantation of haematopoietic cells*. Získáno 17. Ledna 2023, z Časopisu vnitřní lékařství: http://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-200909-0008_transplantation-of-haematopoietic-cells.php
- Ogonek J., Kralj Juric M., Ghimire S., Varanasi P. R., Holler E., Greinix H., Weissinger E. (2016). *Immune Reconstitution after Allogenic Hematopoietic Steam Cell Transplantation*. *Frontiers in immunology*: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00507>.
- Petr Cetkovský J. M. (2016). *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. Galén.

Vedoucí bakalářské práce: **Doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **15. června 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2024**



Ing. Jan Beránek, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Štěpánka Jansová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Rekonstituce buněčné imunity po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk

Vedoucí práce: doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D

Počet stran – číslované: 50

Počet stran – nečíslované: 35

Počet příloh: 6

Počet titulů použité literatury: 20

Klíčová slova: kmenové buňky, transplantace, imunita, rekonstituce

Souhrn:

Tato práce se zabývá problematikou transplantací hematopoetických kmenových buněk a potransplantační rekonstituci buněčné imunity. Teoretické část práce obsahuje základní údaje o hematopoetických kmenových buňkách, buněčné imunitě, dárcovství a samotných transplantacích. Je zde popsán popis a postup použitých metod. Při porovnání pacientů dle použitého štěpu jsme došli k závěru, že imunita se ve sledovaném období rekonstituuje u pacientů se štěpem od nepříbuzného dárce než od haploidického dárce. Dále jsme zjistili, že imunita je lépe rekonstituována u pacientů, kterým jsou podávány menší dávky kortikoidů.

Abstract

Surname and name: Štěpánka Jansová

Department: Department of rescue, diagnostic and public health

Title of thesis: Reconstitution of cellular immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Consultant: doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Number of pages – numbered: 50

Number of pages – unnumbered: 35

Number of appendices: 6

Number of literature items used: 20

Keyword: stem cells, transplantation, immunity, reconstitution

Summary:

This paper deals with the issue of hematopoietic stem cell transplantation and post-transplant reconstitution of cellular immunity. The theoretical part of the thesis contains basic information about hematopoietic stem cells, cellular immunity, donation and transplantation itself. The description and procedure of the methods used is described. When comparing patients according to the donor used, we concluded that immunity was earlier reconstituted in patients transplanted with an unrelated donor than from a haploidentical donor during the follow-up period. Furthermore, we found that immunity is better reconstituted in patients receiving lower doses of corticosteroids.

Předmluva

Účelem této bakalářské práce bylo osvětlit průběh rekonstituce buněčné imunity po alogenní transplantaci u pacientů se štěpem od haploidentické a nepříbuzného dárce. Cílem této práce je porovnání rekonstituce vybraných subpopulací lymfocytů u pacientů s haploidentickým štěpem a pacientů se štěpem od nepříbuzného dárce, dále pak zhodnotit vliv dávky podávaných kortikoidů na rekonstituci.

Poděkování

Ráda bych poděkuji doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad, materiálních podkladů a za velmi vstřícnou pomoc při konzultacích.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	15
ÚVOD.....	18
TEORETICKÁ ČÁST	19
1 HEMOPOETICKÁ KMENOVÁ BUŇKA	19
1.1 Základní charakteristiky	19
1.1.1 Schopnost sebeobnovy	19
1.1.2 Schopnost opakovaných buněčných dělení	19
1.1.3 Diferenciace.....	20
1.2 Druhy hematopoetických kmenových buněk	20
1.2.1 Embryonální buňky	20
1.2.2 Dospělé kmenové buňky	20
1.3 Výskyt hematopoetických kmenových buněk.....	21
1.3.1 Níky kmenových buněk.....	22
2 IMUNITA	24
2.1 Nespecifická imunita	24
2.1.1 Bariéry	24
2.1.2 Buněčná složka	25
2.1.3 Humorální složka.....	26
2.2 Specifická imunita	28
2.2.1 Buněčná složky.....	28
2.2.2 Humorální složka.....	29
3 TRANSPLANTACE A DÁRCOVSTVÍ.....	31
3.1 Alogenní transplantace	31
3.2 HSC z periferní krve.....	32
3.2.1 Kvalita transplantátu.....	32
3.2.2 Odběr	32
3.3 HSC z kostní dřeně.....	33
3.3.1 Kvalita transplantátu.....	33
3.3.2 Odběr	33
3.4 Vyhledávání vhodného dárce	34
3.4.1 HLA faktor	34
3.4.2 Typ dárce	35

3.4.3	Vyhledávání dárce	35
3.5	HLA kompatibilita.....	36
3.5.1	HLA systém – význam a rozdělení.....	36
3.5.2	Dědičnost, rekombinace a crossing - over.....	39
3.5.3	Vazebná nerovnováha.....	39
3.6	Nejčastější diagnózy u transplantovaných pacientů	40
3.6.1	Akutní myeloidní leukemie (AML).....	40
3.6.2	Akutní promyelocytární leukemie (APL).....	40
3.6.3	Akutní lymfoblastické leukemie (ALL)	40
3.6.4	Myelodysplastický syndrom (MDS)	41
4	PŘED TRANSPLANTAČNÍ PROCESY	42
4.1	Cíle předtransplantačních přípravných režimů.....	42
4.2	Základní typy přípravných režimů	42
4.2.1	Myeloablativní příprava	43
4.2.2	Režimy s redukovanou intenzitou RIC.....	43
4.3	Chemoterapie a ozařování	44
4.4	Imunosuprese.....	44
5	REKONSTITUCE IMUNITY	45
5.1	NK buňky	45
5.2	B-lymfocyty.....	45
5.3	T-lymfocyty	46
6	KOMPLIKACE	48
6.1	Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)	48
6.1.1	Akutní reakce štěpu proti hostiteli (aGvHD).....	48
6.1.2	Chronická reakce štěpu proti hostiteli (cGvHD).....	49
6.2	Selhání štěpu.....	49
	PRAKTICKÁ ČÁST	50
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	50
7.1	Hlavní cíl	50
7.2	Dílčí cíle	50
8	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	51
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	52
10	METODIKA PRÁCE	53
10.1	Stanovení lymfocytárních populací.....	53
10.2	Princip stanovení	53
10.2.1	Princip průtokového cytometru	53
10.3	Panel protilátek.....	54

10.4	Příprava vzorku	55
10.5	Statistické metody	55
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	56
11.1	Porovnání souborů dle použité imunosuprese	56
11.2	Porovnání souborů dle množství podávaných kortikoidů	64
	DISKUZE	65
	ZÁVĚR	67
	SEZNAM LITERATURY	68
	SEZNAM PŘÍLOH	71
	PŘÍLOHY	72
	Příloha A – Zdrojová data MUD	72
	Příloha B – Zdrojová data HAPLO	73
	Příloha C – Porovnávací grafy mezi MUD a HAPLO pro jednotlivé populace v časových bodech.....	74
	Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body	77
	Příloha E – Porovnávací grafy vlivu kortikoidů.....	82
	Příloha F – Povolení o sběru dat ve Fakultní nemocnici Plzeň.....	85

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Porovnání lymfocytů ve 4. týdnu	58
Graf 2. Porovnání lymfocytů v 8. týdnu	58
Graf 3. Porovnání lymfocytů ve 12. týdnu	59
Graf 4. Porovnání vývoje lymfocytů	61
Graf 5. Porovnání vývoje Th-lymfocytů	61
Graf 6. Porovnání vývoje Tc-lymfocytů	62
Graf 7. Porovnání vývoje B-lymfocytů	62
Graf 8. Porovnání vývoje NK-buněk.....	63
Graf 9. Porovnání vlivu kortikoidů na lymfocyty	64
Graf 10. Celkové porovnání lymfocytů.....	74
Graf 11. Celkové porovnání Th-lymfocytů	74
Graf 12. Celkové porovnání Tc-lymfocytů	75
Graf 13. Celkové porovnání B-lymfocytů.....	75
Graf 14. Celkové porovnání NK-buněk	76
Graf 15. Porovnání lymfocytů v čase	77
Graf 16. Porovnání Th-lymfocytů v čase	78
Graf 17. Porovnání Tc-lymfocytů v čase.....	79
Graf 18. Porovnání B-lymfocytů v čase	80
Graf 19. Porovnání NK-buněk v čase.....	81
Graf 20. Porovnání vlivu kortikoidů na lymfocyty	82
Graf 21. Porovnání vlivu kortikoidů na Th-lymfocyty	82
Graf 22. Porovnání vlivu kortikoidů na Tc-lymfocyty	83
Graf 23. Porovnání vlivu kortikoidů na B-lymfocyty	83
Graf 24. Porovnání vlivu kortikoidů na NK-buňky.....	84

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Asymetrické dělení	19
Obrázek 2. Proliferace a diferenciacce HSC	20
Obrázek 3. Průběh hematopoézy	21
Obrázek 4. Nika HSC	22
Obrázek 5. HLA antigen I. a II. typu.....	38
Obrázek 6. Průtokový cytometr.....	53
Obrázek 7. Analýza dat z průtokového cytometru	54
Obrázek 8. Povolení o sběr dat.....	85

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Přehled buněk nespecifické imunity.....	25
Tabulka 2. Přehled protilátek v Kombitestu.....	54
Tabulka 3. Seznam pacientů – Nepříbuzní dárce.....	57
Tabulka 4. Seznam pacientů – Příbuzní dárce.....	57
Tabulka 5. Zdrojová data pro MUD transplantované pacienty.....	72
Tabulka 6. Zdrojová data pro HAPLO transplantované pacienty.....	73

SEZNAM ZKRATEK

ALL.....	Akutní lymfoblastická leukémie
AML.....	Akutní myeloidní leukémie
APC.....	Antigen prezentující buňka
APL.....	Akutní promyelocytární leukémie
ATG.....	Antithymocytární globulin
BCR.....	B – buněčný receptor
CAR b.	CXCL12 – abundanční retikulární buňka
CsA.....	Cyklosporin
DAMP's.....	Damage-associated molecular patterns
EFS.....	Rozšířená rodina
G - CSF.....	Růstový faktor pro granulocyty
GvHD.....	Reakce štěpu proti hostiteli
GvL.....	Reakce štěpu proti leukemii
HAPLO.....	Haploidentičtí pacienti
HCT.....	Transplantace hematopoetických kmenových buněk
HLA.....	Lidský leukocytární antigen
HOO.....	Hemato-onkologie
HSC.....	Hematopoetická kmenová buňka
ICHS.....	Ischemická choroba srdeční
INF.....	Interferon
KD.....	Kostní dřev
LT – HSC.....	Dlouhodobě repopulační hematopoetická kmenová buňka

MA..... Myeloablativní příprava

MDS..... Myelodysplastický syndrom

MHC Hlavní histokompatibilní komplex

MMF Mykofenolát mofetil

MTX..... Metotrexát

MUD Nepříbuzní pacienti

PAMP's..... Pathogen-associated molecular patterns

PB..... Periferní krev

PTCy Cyklofosfamid

RIC..... Redukovaná příprava

ST – HSC..... Krátkodobě repopulační hematopoetická kmenová buňka

Tacro Tacrolimus

TBI..... Celotělové ozáření

Tc-lymfocyt Cytotoxický T-lymfocyt

TCM..... Centrální paměť T-lymfocytů

TCR..... T – buněčný receptor

TEFF Efektorové T-lymfocyty

TEM..... Efektorová paměť T-lymfocytů

Th-lymfocyt Pomocný T-lymfocyt

TNC Celkový počet jaderných buněk

TNF..... Tumor nekrotizující faktor

Treg-lymfocyty Regulační T-lymfocyty

TRM..... Tkáňově rezidentní paměťové T-lymfocyty

Tsup-lymfocyt..... Supresorový T-lymfocyt

ÚKBH Ústav klinické biochemie a hematologie

WMDA Světová asociace dárců dřeně

ÚVOD

Cílem této bakalářské práce je osvětlit rozdíly rekonstituce buněčné imunity po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk u dvou skupin pacientů – pacientů se štěpem od příbuzného dárce a pacientů se štěpem od nepříbuzného dárce. Zkoumané hodnoty jsou získávané průtokovou cytometrií z periferní krve pacientů. Cílové hodnoty jsou složkami buněčné imunity – lymfocyty celkové, pomocné T-lymfocyty, cytotoxické T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky. Hlavními rozdělovacími faktory pro naši práci byly druh podávané imunoprese před transplantací a podávání kortikoidů v průběhu rekonstituce.

Tato bakalářská práce je členěna do dvou oddílů, kde je rozebráno výše uvedené téma. Teoretická část této práce je rozdělena do 6 kapitol, ve kterých jsou rozebrána témata důležitá pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk. V prvních dvou kapitolách se zabýváme samotnými kmenovými buňkami a buňkami imunity. V třetí až šesté kapitole se zabýváme problematikou dárcovství, transplantací, potransplantačními komplikacemi a samotnou rekonstitucí buněk imunity. V praktické části se pak zabýváme postupy zpracování vzorků, analýze a interpretaci dat.

Vzhledem k tomu, že transplantace kmenových buněk je v dnešní době rutinně prováděným zákrokem, dává si za cíl tato bakalářská práce zanalyzovat stávající postupy a na základě jejich výsledků upozornit na rizika spojená s defektem imunity po transplantaci a důležitost potransplantačního sledování.

TEORETICKÁ ČÁST

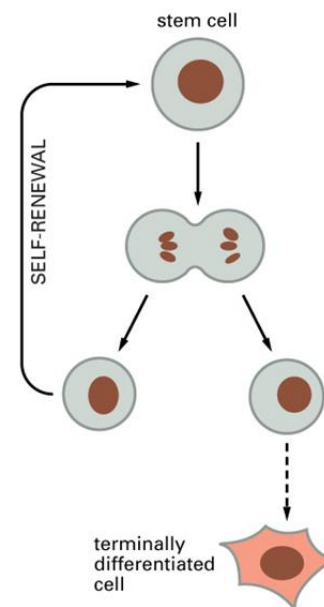
1 HEMOPOETICKÁ KMENOVÁ BUŇKA

Jedná se o kmenové buňky specifické tkáně dospělého organismu, které jsou aktivní po celý život. Základní charakteristickou kmenové buňky je schopnost sebeobnovy (může být teoreticky nevyčerpatelným zdrojem buněk), dále pak schopnost velkého množství buněčných dělení se zachováním její funkce, které je vyšší než u diferenciovaných buněk. Současně mají schopnost aktivovat diferenciací programy, díky nimž mohou dát vzniknout funkčně specializovaným buňkám. Neudávají funkci tkáně, ale mohou dát vzniku buněk s danou funkcí. Nezralé krvetvorné (hematopoetické) kmenové buňky (HSC) nesou znak CD34, který je jejich základní charakteristikou. (Hematopoietic stem cell in its place, 2006) (Carreras et al., 2009)

1.1 Základní charakteristiky

1.1.1 Schopnost sebeobnovy

Jedná se o obecnou vlastnost HSC a zároveň se jedná o charakteristickou schopnost, kterou jiné buňky diferencované nemají. To umožňuje udržení dostatečného poolu kmenových buněk po celou dobu života organismu. Tento proces se zakládá na buněčném dělení, jehož výsledkem je vznik dvou zcela identických dceřiných buněk buňky mateřské, jedná se o tzv. asymetrické dělení. Základním předpokladem je, že jedna z nově vytvořených dceřiných buněk si ponechá biologické vlastnosti buňky mateřské. Tato schopnost zabraňuje vyčerpání HSC a druhá buňka se může dále diferencovat. Geny kódující tuto schopnost produkují specifické transkripční faktory, které mohou udržovat kmenovou buňku v nezměněném stavu i po jejím rozdělení. (Carreras et al., 2009) (Cetkovský et al., 2016)



Obrázek 1. Asymetrické dělení

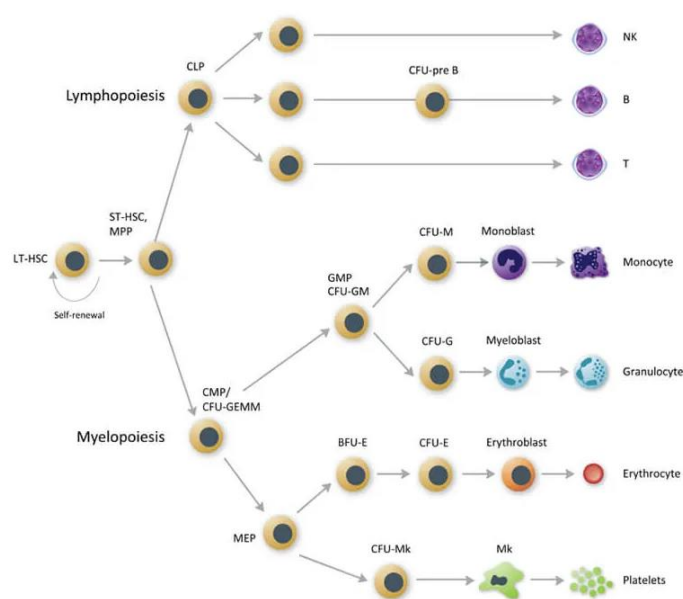
1.1.2 Schopnost opakovaných buněčných dělení

Jedná se také o obecnou a charakteristickou schopnost HSC, kterou se odlišují od ostatních buněk. Tato schopnost je založena na schopnosti HSC udržovat délku nekódujícího zakončení DNA na konci chromozomů, tuto část nazýváme telomery. Během každého

buněčného dělení se telomery zkrátí. HSC mají schopnost tento proces opravit, prodloužit telomery na původní délku nebo jen z části, a je založen na telomerázové aktivitě specifického enzymového komplexu. Pokud dojde k většímu zkrácení, buňka ireverzibilně ztrácí schopnost buněčného dělení, což vede k proliferačnímu stárnutí buňky nebo k jejímu zničení, apoptóze. U lidí dochází s přibývajícím věkem ke zkracování telomer, což ovšem nezpůsobuje selhání krvev tvorby. (Cetkovský et al., 2016)

1.1.3 Diferenciace

Jedná se o proces, při němž v hematopoetické tkáni vznikají z kmenových buněk myeloidní a lymfoidní progenitory a z nich se poté diferencují linie prekurzorů. Tento proces zajišťuje stálou náhradu krevních elementů v daném množství, ve kterém zanikají staré krevní elementy. (Cetkovský et al., 2016)



Obrázek 2. Proliferace a diferenciace HSC

1.2 Druhy hematopoetických kmenových buněk

1.2.1 Embryonální buňky

Jedná se o buňky, přítomné v embryu. Tato kmenová buňka je zdrojem všech tkání embrya a také všech tkání dospělého jedince. Jedná se o buňky pluripotentní. Z těchto embryonálních kmenových buněk vznikají následně kmenové buňky dospělého typu (Cetkovský et al., 2016)

1.2.2 Dospělé kmenové buňky

Dospělé kmenové buňky, jinak nazývané somatické kmenové buňky, jsou buňky nacházející se v každé tkáni našeho organismu. V těle mají za úkol zajišťovat obnovu

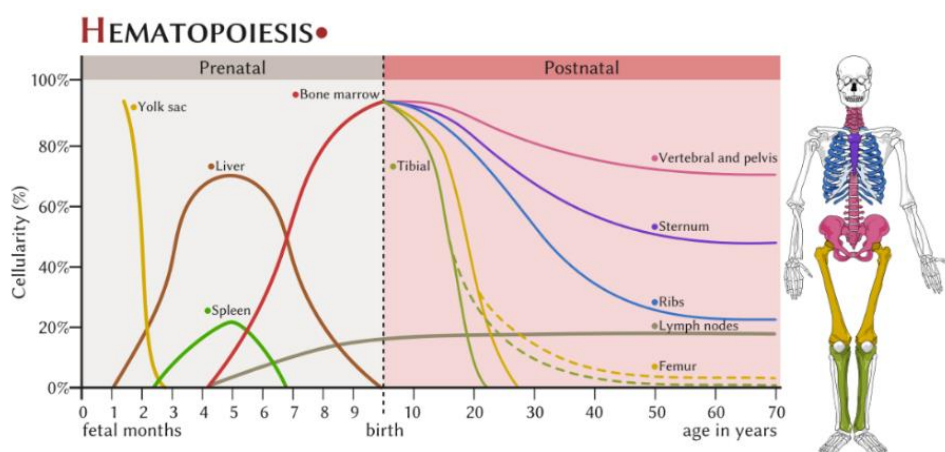
jednotlivých tkání, které v případě krve označujeme jako krvetvorbu neboli hematopoézu. Jedná se o multipotentní kmenové buňky což znamená, že se mohou diferencovat ve více funkčních typů buněk. (Professor Paul Knoepfler, 2018) (Gurusamy et al., Teplow, 2018) (Cetkovský et al., 2016)

Hematopoetické kmenové buňky se dělí na dva základní typy – dlouhodobě repopulační kmenové buňky a krátkodobě repopulační kmenové buňky. Dlouhodobě repopulační kmenové buňky (LT – HSC) zajišťují vysoce komplexní hematopoetickou diferenciaci. Jsou schopné udržet si sebeobnovu a zároveň mají více liniový diferenciační potenciál po celou dobu života. Z těchto buněk se diferencují krátkodobě repopulační kmenové buňky (ST – HSC). Na rozdíl od LT – HSC mají omezenou schopnost sebeobnovy, ale zachovávají si multipotenci. (Kerenyi, 2016) (Mosaad, Sa, 2014)

1.3 Výskyt hematopoetických kmenových buněk

Krvetvorba se v různých časových obdobích nachází v různých tkáních našeho těla. Během prenatalního vývoji probíhá hematopoéza nejprve ve žloutkovém vaku a následně činnost přebírají játra a slezina (Obrázek 3). Od 4 měsíce vývoje plodu se začíná krvetvorba přesouvat do kostní dřeně plodu. Po narození se krvetvorba zůstává zachována pouze v kostní dřeni dlouhých a plochých kostí. V prvních letech života probíhá krvetvorba v dlouhých kostech – stehenních a holeních kostech – dále pak žebrech, sternu, pánvi a páteři. Krvetvorba ve stehenních a holeních kostech ustává úplně mezi dvacátým a třicátým rokem, v žebrech je krvetvorba utlumena, ale není zcela zastavena. (Penka, Tesařová, 2011)

Je také známo, že malé množství HSC je přítomna v periferní krvi. Je možné toto malé množství zvýšit mobilizací kostní dřeně, ze které se vyplaví do periferní krve. (Mosaad, Sa, 2014)

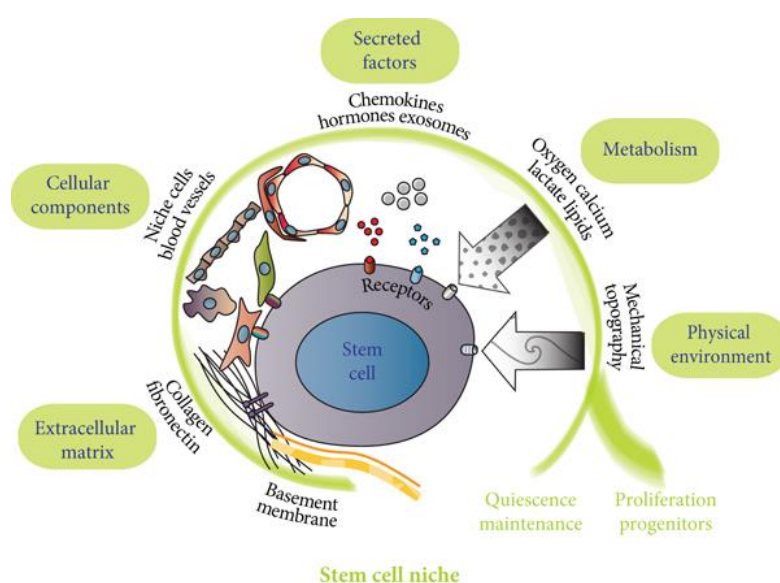


Obrázek 3. Průběh hematopoézy

1.3.1 Niky kmenových buněk

Nika je specifické místo ve stromatu hematopoetické tkáně, které tvoří fyziologické mikroprostředí, ve kterém se HSC usídlují a obnovují se. Niky kmenové buňky chrání před fyziologickým stresem a jinými nežádoucími účinky, zároveň také zabraňuje diferenciaci, aby nedošlo k vyčerpání kmenových buněk, a také nadprodukcii, což by mohlo vést ke tvorbě nádorů. Spojení niky a hematopoetické buňky představuje funkční jednotku, která je základem krvetvorby. Niky pro kmenové buňky je udržují většinou ve stavu proliferačního klidu a aktivují je v případě nutnosti tvorby nových buněk. Existují i niky pro progenitorové buňky, které podporují buňky v proliferaci, aby byla zajištěna stálá hematopoéza. V kostní dřeni se nacházejí dva druhy nik, endostová a vaskulární. (Cetkovský et al., 2016) (Mosaad, Sa, 2014)

Endostová nika je umístěna na vnitřním povrchu dřeňové dutiny, který je tvořený jak kortikálními, tak trabekulárními kostními typy. Tento prostor je lemován kostními buňkami, jako jsou osteoblasty a osteoklasty. Specializované osteoblasty interagující s dalšími specializovanými buňkami a vytváří tak niky pro kmenové buňky. Takto vytvořené niky poté na konci fetálního období k sobě přitáhnou kmenové buňky z fetálních jater. Osteoblasty v kostní dřeni jsou schopné produkovat CXCL12 chemokin, díky němuž jsou schopné k sobě vázat kmenové a progenitorové buňky. Tyto osteoblasty tak byly pojmenovány CXCL12-abundantní retikulární (CAR) buňky. Takto spojené buňky jsou udržovány převážně v klidovém stavu, což jim dodává schopnost dlouhodobě přispívat k hematopoéze dlouhodobě. (Mosaad, Sa, 2014) (Cetkovský et al., 2016)



Obrázek 4. Nika HSC

Vaskulární niky se nacházejí v sinusoidách kostní dřevě, jedná se o tenkostěnné cévy. Slouží jako pojitko v komunikaci mezi dřevnou dutinou a krevním oběhem. Tyto cévy obsahují buňky, které mají vysokou koncentraci chemokinu CXCL12, CAR buňky. Široká škála buněk – adventiciální retikulární buňky, perivaskulární stromální buňky, mezenchymální kmenové buňky a neurony – se zde sdružují a vytvářejí niku, která je schopná udržovat a regulovat HSC. (Mosaad, Sa, 2014) (Cetkovský et al., 2016)

Niky pro kmenové buňky jsou hypoxické, nejnižší hladina O₂ se nachází v endostální nuce a nejvyšší ve vaskulárních nikách. Nízká hladina kyslíku v endostálních nikách je důležitá pro udržení LT-HSC v lidové proliferační fázi. Studie uvádí, že ve vaskulárních nikách se nacházejí převážně ST-HSC, které se cyklicky obnovují a doplňují hematopoetické typy buněk, toto umístění je nejspíše dané hladinou kyslíku v nikách. (Mosaad, Sa, 2014)

HSC exprimují na svém povrchu receptory reagující na vápník. Díky přítomnosti tohoto receptoru mohou endostové niky díky vysoké koncentraci vápníku, udržet HSC na svém místě. (Mosaad, Sa, 2014)

2 IMUNITA

„Imunitní systém lze definovat jako soubor buněk, substancí a mechanismů, které brání vzniku onemocnění u vyššího organismu. Dokáže rozeznat struktury vlastní od cizích, zabránit rozvoji infekce a účinně degradovat vlastní staré či poškozené buňky, a tím udržovat homeostázu.“ Imunitu rozdělujeme na vrozenou, nespecifickou, a získanou, specifickou. Nespecifická imunita je vývojově starší a rychleji reaguje, ale nemá schopnost adaptace ani možnost vytvoření imunologické paměti. Specifická imunita je oproti ní vývojově mladší, odpověď je pomalejší a může si vytvořit imunologickou paměť. Díky této vlastnosti je silnější a lépe zacílená. Specifická a nespecifická imunita spolu tak úzce souvisí a doplňují se. Imunitu dále dělíme na buněčnou a humorální imunitu. Buněčnou složku imunity zastávají fagocyty (neutrofil, dendritické buňky a monocyty, respektive jejich tkáňová forma makrofágy), žírné buňky (mastocyty), bazofily, NK-buňky, ale také trombocyty a některé druhy lymfocytů. Humorální složku imunity zastávají protilátky tvořené B-lymfocyty, komplement a cytokiny. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.1 Nespecifická imunita

Mechanismy nespecifické imunity chrání organismus proti škodlivým látkám proti škodlivým látkám bez ohledu na identifikaci. S nespecifickou imunitou se již rodíme a je stále činná. Imunitní odpověď je rychlá, a nemění se v závislosti na předchozím setkání s patogeny. Nespecifická imunita spolupracuje spolu s nespecifickou imunitou, kterou informuje o hroící nákaze (například čistí nebo hojí rány). Působí proti strukturám mikrobů, které jsou společné pro mnoho typů mikroorganismů a nezbytné pro jejich přežití, zároveň jsou ale typické pouze pro patogeny. Mezi tyto struktury patří bakteriální stěny nebo DNA, která je odlišná od lidské. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.1.1 Bariéry

Mezi bariéry těla patří kůže a sliznice. Jejich neporušený povrch tvoří mechanickou a chemickou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím organismu. Bariéry mají na svém povrchu přirozenou mikroflóru, která tvoří nepříznivé prostředí pro patogenní mikroby a brání jejich vstupu do těla. Mechanické poškození těchto bariér a zároveň přirozené mikroflóry, které vede k usnadnění vstupu cizorodých látek do organismu, jako jsou infekční agens. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Na kůži se pak vyskytují bakterie, kožní maz (tvořený nenasycenými mastnými kyselinami), pot (tvořený kyselinou mléčnou, ionty a organické látky) tvořící kyselé prostředí (pH<5) jenž působí baktericidně. Ve slinách, slzách a dalších sekrety se vyskytuje lysozym, který působí antibakteriálně, dostatečně narušuje plazmatickou membránu bakterií. Žaludek obsahuje kyselinu chlorovodíkovou, která působí antimikrobiálně a zabraňuje tak množení kvasinek a plísni. Jedinou výjimkou je virus hepatitidy A, která je rezistentní na velmi nízké pH kyseliny chlorovodíkové. Pochva fyziologicky obsahuje laktobacily, které tvoří kyselé pH nepříznivé pro jiné mikroorganismy. Povrch dýchacího systému je pokryt řasinkovým epitelem pokrytý hlenem, který obsahuje glykolipidy. V tomto hlenu se zachycují mikroorganismy a jiné cizorodé částice a pomocí pohybu řasinek se vypuzují ven z dýchacích cest. Močové cesty jsou fyziologicky sterilní a normální odtok moči brání tvorbě patogenních agens. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.1.2 Buněčná složka

Buněčnou složku nespecifické imunity obstarávají fagocyty, kam řadíme mikrofágy (neutrofilů), eozinofilů, monocytů a makrofágy, což jsou monocytů vycestované do tkání, antigen prezentující buňky jako dendritické buňky. Dále sem řadíme NK buňky, v menší míře bazofily a žírné buňky. (Přehled všech buněk s jejich funkcí je zpracován v Tab. 1) (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Přehled buněk nespecifické imunity		
Buňka	Výskyt	Funkce
Neutrofilů	Krev, tkáň	Rozpoznávání exogenní antigenů
Monocyty, Makrofágy	Krev, slezina, tkáň	Rozpoznávání exogenní antigenů, Rozpoznávání endogenní antigenů, Diapedéza, Fagocytóza
Dendritické buňky	Různé tkáň, lymfatické uzliny	Rozpoznávání exogenní antigenů, Fagocytóza, Prezentace antigenu
NK buňky	Krev slezina	Detekce virových a nádorových buněk, Indukce apoptózy
Eozinofilů	Krev, sliznice	Toxické parazity, Tkáňová toxicita, Účast na alergických reakcích
Bazofily	Krev, sliznice	Zánětlivá alergická reakce (hypersenzitivita)
Mastocyty (Žírné buňky)	Sliznice, tkáň	Zánětlivá alergická reakce (hypersenzitivita)

Tabulka 1. Přehled buněk nespecifické imunity

Jedním z mechanismů, které využívá nespecifická imunita je fagocytóza. Jedná se o druh buněčného transportu směrem do buňky. Profesionální fagocyty pohlcují částice (bakterie, viry, bílkoviny) z okolního prostředí, které jsou příliš velké, aby prošli cytoplazmatickou membránou. Mezi tyto profesionální fagocyty patří mikrofágy, monocyty a makrofágy, které zajišťují obranyschopnost organismu pomocí fagocytózy. Funkce mikrofágů je antiinfekční obraně především proti extracelulárním bakteriím, makrofágy naopak fagocytují vlastní buňky zaniklé procesem apoptózy a intracelulární bakterie. Mikrofágy v infikované tkáni pohlcují cizorodé a zanikají, zatímco makrofágy mohou opakovaně fagocytovat. Fagocytující buňky se aktivním pohybem dostanou k určené částici a přilnou k jejímu povrchu. Tenká cytoplazmatická membrána fagocytujících buněk obalí tuto částici svými výběžky – panožkami – a tak vznikne membránový váček. Tento váček je pak vtažen dovnitř buňky a tam je enzymaticky rozložen a zlikvidován nebo je jejich antigenní determinanta předložena na povrchu APC (antigen prezentujících buněk). K APC patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky, folikulární dendritické buňky a B-lymfocyty. Tyto APC buňky vystavují na svém povrchu pomocí MHC II. část zpracovaného antigenu. APC spolupracují s T-lymfocyty, které jsou schopny rozpoznat tento antigenní peptid pouze, pokud je vystaven v kontextu MHC molekuly. Nezralé T-lymfocyty se po kontaktu s takovýmto antigenem diferencují buď do zralých efektorových cytotoxických buněk exprimují receptor CD8, nebo se vyvíjí do pomocných T-lymfocytů, které exprimují koreceptor CD4. Cytotoxické T-lymfocyty přímo napadá buňky, které nesou cizí nebo abnormální molekuly. Pomocné T-lymfocyty organizují imunitní odpověď pomocí cytokinů. Degradované částice mohou být předkládány B-lymfocytům, což přispívá k rozvoji specifické imunity. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Některé buňky působí přirozeně cytotoxicky, jedná se o cytotoxické T-lymfocyty a NK-buňky. Tyto buňky produkují perforiny, které narušují a perforují cytoplazmatickou membránu cílových buněk. Tyto buňky tedy tvoří přirozenou obranu proti virovému agens a nádorovým agens, dokáží tedy rozpoznat patologické agens na povrchu buněk. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.1.3 Humorální složka

Humorální složka nespecifické imunity je tvořena složkami komplementu, proteiny akutní fáze, koagulačním a fibrinolytickým systémem a cytokiny. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Komplement je soubor asi 30 sérových a membránových glykoproteinů, které jsou syntetizované v játrech, makrofázích a fibroblastech. V plasmě jsou obsaženy v neaktivní formě. Když se aktivují, jsou schopny lyzovat některé buňky. Jednotlivé složky jsou kaskádovitě aktivované klasickou alternativní nebo lektinovou cestou, což nastartuje imunitní reakci. Hlavními složkami komplementu jsou sérové proteiny C1 – C9. Ústřední složkou je protein C3, jejíž fragment C3b projevuje silné opsonizační účinky. Fragmenty C3a a C5a působí chemotakticky na profesionální fagocyty a přitahují je tak do místa kde je jejich potřeba. Terminální produkt, komplex C5b – C9, který označujeme jako MAC, se zanoří do cytoplasmatické membrány některých mikroorganismů a naruší jejich strukturu. Díky tomuto narušení vniká do mikroorganismu voda a unikají z něj organely, dochází k bobtnání a smrti mikroba. Imunokomplexy s fragmenty komplementu stimulují aktivaci B-lymfocytů, regulují transport do sleziny a některé komplementové receptory slouží jako adhezivní molekuly. Hlavní funkcí komplementu je opsonizace, chemotaxe, zprostředkování zánětu, osmotická lýza a další funkce jako je aktivace lymfocytů, regulace přenosu antigenů do uzlin a sleziny. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Jílek, 2014)

Proteiny akutní fáze se zvyšují po zahájení imunitní reakce, Jednotlivé složky pak reagují dle typu zánětu (bakteriální, virový apod.) a dle fáze zánětu. Do místa vzniku zánětu začnou pronikat fagocytující buňky, kde dochází ke zvýšení sedimentace erytrocytů. Přítomností bílých krvinek vzniká hnis – hnisavý zánět. Z leukocytů se uvolňují látky, pyrogeny, které zvyšují teplotu těla. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Cytokiny, skupiny signálních peptidů (některé z nich mají hormonální funkci), které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami specifické a nespecifické imunity. Mezi cytokiny řadíme interleukiny, chemokiny, interferony a další látky. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Interleukiny jsou produkovány pomocnými T-lymfocyty, makrofágy a buňkami prezentujícími antigen. Podle typu mají různé funkce, především regulaci leukocytů, např. zahájení zánětlivé odpovědi, podpora proliferace bílých krvinek, chemotaktické účinky... (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Chemokiny jsou důležité pro svojí chemotaktickou aktivitou. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Interferony působí v protivirové obraně na buňky ve svém okolí. Navázáním na buňky tkání zvýší jejich odolnost k virové infekci. Interferony rozdělujeme na interferon α , β a γ . Interferony α a β jsou tvořeny buňkami obsahující viry a navazují se na interferonové receptory zdravých i infikovaných buněk, a tam navodí antivirový stav. Interferon α je vylučován makrofágy a β fibroblasty. Interferon γ je vylučován pomocnými Th1 lymfocyty, indikuje syntézu enzymů, které potlačují replikaci virů, reguluje imunitní reakci. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Další jako např. transformující růstové faktory, protizánětlivé cytokiny, faktory nekrotizující nádory apod. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.2 Specifická imunita

Specifická imunita je vysoce adaptivní. Pokud je v organismu přítomný nějaký antigen, reaguje na něj tvorbou specifických protilátek nebo množením specifických T-lymfocytů. Pro správné fungování specifické imunity je nutné, aby spolupracovala s nescifickou imunitou. Konkrétně s antigen prezentujícími buňkami, které předkládají buňkám specifické imunity zpracované antigenní fragmenty. Plný rozvoj imunitní reakce nastává několik dní po vstupu antigenu do organismu. Toto zpoždění je způsobeno kvůli aktivaci specifických T a B lymfocytů a jejich zrání v efektorové buňky. Specifická imunita je sice pomalejší, ale je lépe zacílená a je schopna vytvářet imunologickou paměť, díky které je při opětovném průniku antigenu reakce rychlejší a silnější. Specifickou imunitu může rozdělit na buněčnou a humorální složku. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.2.1 Buněčná složky

Buněčná složka je zprostředkována T-lymfocyty. Jejich základní funkcí je především regulace buněčné variability, fagocytózy a zvýšení syntézy protilátek. Vzhledem k tomu, že T-lymfocyty nejsou schopné rozpoznat nativní antigeny je zapotřebí, aby byl antigen prezentován na povrchu APC buněk, kde jsou asociované s HLA molekulami. T lymfocyty se na takto upravený antigen naváží pomocí TCR receptorového komplexu na svém povrchu. Imunokompetentní buňka je aktivována a diferencuje se v efektorovou buňku. Existuje více typů efektorových buněk, mezi které patří pomocné Th-lymfocyty (typ 1 a 2), cytotoxické Tc-lymfocyty a regulační Treg-lymfocyty (synonymum supresorové lymfocyty Tsup-lymfocyty). (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Když je antigen navázán na HLA II. třídy, je rozpoznáván pomocnými T-lymfocyty, protože obsahuje povrchový antigen CD4. Th1-lymfocyty pomáhají aktivovat makrofágy a cytotoxické T-lymfocyty. Pokud jsou antigeny navázané na HLA I. třídy jsou rozpoznávány cytotoxickými T-lymfocyty, protože obsahují povrchový antigen CD8. Th2-lymfocyty tvoří velké množství cytokinů, a pomocí těchto cytokinů umožňují diferenciaci B-lymfocytů v plazmatické buňky produkující množství protilátek, stimulují také eozinofily, bazofily a mastocyty. Oba tyto typy T-lymfocytů obsahují i povrchový znak CD28, který se afinuje k povrchovým znakům CD80 nebo CD86, jenž se vyskytují na antigen prezentujících buňkách. Vazba těchto kostimulačních antigenů způsobí proliferaci a diferenciaci potřebných T-lymfocytů. Treg-lymfocyty mají za úkol tlumit účinek ostatních buněk, především T-lymfocytů a napomáhají tak toleranci vlastních antigenů. Tc-lymfocyty dokáží ničit nádorové buňky a buňky napadené intracelulárními patogeny jako jsou viry. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

2.2.2 Humorální složka

Humorální složku specifické imunity obstarávají imunoglobuliny, jedná se většinou o glykoproteiny. Imunoglobuliny jsou syntetizované lymfocyty typu B (které mají na svém povrchu BCR komplex). (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Imunoglobulin je tvořen dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci, které jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky. Jak lehké, tak těžké řetězce se skládají z variabilních a konstantních domén. Imunoglobuliny se mohou vyskytovat jako monomerní, dimerní nebo pentamerní. Rozlišujeme několik typů imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

Při expozici antigenem vykazuje tvorba protilátek charakteristický průběh. První fází je tzv. lag fází. V této fázi probíhají aktivační děje imunokompetentních buněk. V další fázi dochází k exponenciálnímu nárůstu titru protilátek. Později se jejich hladina stabilizuje, a nakonec začíná pozvolna klesat. Hlavní úlohu v protilátkové imunitní odpovědi sehrává receptorový komplex BCR (B-cell receptor, B-buněčný receptor) na povrchu B-lymfocytů. Tento komplex na rozdíl od TCR dokáže rozpoznat i nativní antigenní struktury. Při silné stimulaci, antigenem polysacharidového nebo lipopolysacharidového charakteru, BCR komplexu se může zvýšit mitogenní aktivita B-lymfocytů, tak že se diferencují v plazmatické buňky, a to i bez účasti pomocných T-lymfocytů. Takovouto imunitní reakci

dokáží vyvolat pouze antigeny nezávislé na T-lymfocytech. Výsledně syntetizované imunoglobuliny jsou zpravidla typu IgM a nedochází u nich k izotypovému přesmyku. Mnohem častěji vznikají imunoglobuliny typu IgM za působení antigenů závislých na T-lymfocytech, u kterých po určité době nastává izotypový přesmyk. (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

„Izotypový přesmyk je proces, při kterém vznikají z původního pentamerního IgM ostatní druhy imunoglobulinů, především IgA a IgG. Mění se tedy izotyp protilátky, ale její specifita zůstává stále stejná. Dochází k němu tehdy, když je plasmocyt stimulován antigenem ve spolupráci s Th-lymfocyty, které produkují řadu cytokinů podporujících přesmyk.“ (MUDr. Jana Amlerová Ph.D., 2020) (Chottová Dvořáková, Mistrová, 2018)

3 TRANSPLANTACE A DÁRCOVSTVÍ

Transplantací krvetvorných buněk rozumíme převod štěpu krvetvorných buněk formou nitrožilní infuze do oběhu pacienta, kterému předchází zavedení přípravného režimu. (Krejčí et al., 2009)

K úspěšnému provedení transplantace musí buňky implantované do oběhu pacienta uskutečnit několik kroků – rozpoznat hematopoetickou tkáň a uchytit se k endotelu jejích sinusoid, překonat endotel a nalézt niky a jako poslední se uchytit a zahájit krvetvorbu. Pro zvýšení účinnosti transplantace je nutné provést ablaci kostní dřeně pacienta. (Cetkovský et al., 2016)

Máme mnoho typů transplantací, dělíme je dle původu transplantátu – autologní, alogenní, a syngenní; dle zdroje – transplantace kostní dřeně, transplantace periferních kmenových buněk. (Prof. MUDr. Michael Doubek, 2017)

Autologní transplantace – jako transplantát je použit materiál od samotného pacienta, krvetvorné buňky odebrané ve fázi remise nebo v období minimální aktivity primárního onemocnění

Alogenní transplantace – jako transplantát se použijí krvetvorné buňky jiného člověka

Syngenní transplantace – transplantát pochází od jednovaječného dvojčete

V mé bakalářské práci se budu zabývat pouze alogenními transplantacemi, které budou podrobněji popsány v následujících odstavcích.

3.1 Alogenní transplantace

Jak již bylo zmíněno výše alogenní transplantace je převod HSC pocházejících z těla zdravého dárce. Může se jednat o buňky pocházející z kostní dřeně nebo z periferní krve. Transplantovat můžeme od příbuzných či nepříbuzných dárců, které hledáme v registrech dárců. Takto prováděná transplantace má ovšem jistá pravidla jako je HLA kompatibilita, v ideálním případě ještě shoda v AB0 systému (Krejčí et al., 2009) (Prof. MUDr. Michael Doubek, 2017)

3.2 HSC z periferní krve

Hematopoetické buňky odebírané z periferní krve mohou být různého stádia vyzrání, ať už se jedná o primitivní pluripotentní buňky nebo, částečně diferenciované. Tyto buňky se periferní krvi nacházejí i za fyziologických podmínek ovšem jen malém množství, které neumožňují provedení efektivního odběru pro účely transplantace. (Cetkovský et al., 2016)

Za určitých okolností může dojít k vyplavení kmenové buňky do periferní krve, takovéto buňky pak nazýváme periferní kmenové buňky. (Carreras et al., 2009)

Pro efektivní a úspěšný odběr kmenových buněk z periferní krve je nutno provést proces tzv. mobilizace. Během tohoto procesu se z do periferní vyplaví velké množství hematopoetických buněk z kostní dřeně. Mobilizace se provádí podáním růstového faktoru pro granulocyty (G – CSF, jedná se o cytokin). Část pacientů případně dárců jsou tzv. „poor mobilizers“ – osob s nedostatečnou mobilizací. U nich je možné inhibicí vazby ligandu SDF – 1 s jeho receptorem CXCR4, který je přítomný na povrchu hematopoetických buněk, možné podpořit vyplavování HSC do periferní krve. Tato inhibice zajistí mobilizaci, která je nezávislá na efektu G – CSF. (Cetkovský et al., 2016)

3.2.1 Kvalita transplantátu

Pro zaručení kvalitního transplantátu je třeba, aby přípravek obsahoval dostatečné množství kmenových buněk. Tento parametr zjišťujeme stanovením počtu CD 34+ buněk pomocí flowcytometrického vyšetření. Za kvalitní a tím i bohatý považujeme takový transplantát, který obsahuje alespoň $2,5 * 10^6$ CD 34+ buněk na kg hmotnosti příjemce. Optimální je transplantát s obsahem $3 - 7 * 10^6$ CD 34+ buněk na kg hmotnosti příjemce. Při alogenních transplantacích se preparáty s obsahem vyšším než $7 * 10^6$ CD 34+ buněk na kg hmotnosti příjemce nepovažují za žádoucí, kvůli zvýšenému riziku vzniku nemoci z reakce štěpu proti hostiteli. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

3.2.2 Odběr

Samotný odběr se provádí pomocí separátorů krevních elementů s kontinuálním průtokem krve. U takovýchto separátorů se u pacienta musí zajistit dvojitý žilní přístup a to přes povrchové žíly na předloktí nebo pomocí dvojcestného centrálního žilního katetru pro dialyzační léčbu. Krev přitékající do separátoru je smíchána s citrátovým antikoagulačním činidlem. V separátoru pak krev vtéká do centrifugy, ve které dochází k rozdělení jednotlivých složek krve dle jejich hustoty. Při zevním okraji separačního prstence se oddělí

erytrocyty následované vrstvou granulocytů, další vrstvou jsou mononukleární buňky, které nás zajímají, vrstva trombocytů zakončená plazmou. Vrstva mononukleárních buněk je odváděna do sběrného vaku a obsahuje vedle kmenových buněk také monocyty, lymfocyty i některé další krevní buňky, ovšem jen v malém množství. Výsledný objem transplantátu se pohybuje mezi 200 až 300 ml. Abychom dostali toto množství, proteče separátorem přibližně 3 – 4 krát celý objem krve dárce. Takovýto odběr trvá přibližně 5 hodin. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

Aby byl odběr co nejefektivnější, musí být správně načasovaný. Po zahájení mobilizace začne kostní dřeň dárce vyplavovat kmenové buňky do krve. Doba pro uskutečnění odběru se označuje jako odběrové okno. Během této doby u většiny dárců dochází ke kontinuálnímu vyplavování kmenových buněk. Toto okno je většinou 4. – 5. den po zahájení mobilizace. Abychom ovšem odběrové okno správně zachytili, sledujeme koncentraci CD 34+ buněk v krvi, jak již bylo uvedeno v přechodí podkapitole. (Cetkovský et al., 2016)

3.3 HSC z kostní dřeně

K odběru HSC z kostní dřeně přistupujeme v případě, kdy odběr z periferní krve není zcela vhodný, zbytečně nákladný, neúčelný nebo zatížený vysokou pravděpodobností neúspěchu. Odběr HSC z periferní krve se upřednostňuje před odběrem kostní dřeně hlavně kvůli nutnosti používání anestezie a invazivnosti samotného odběru. Odběr kostní dřeně u dospělých zdravých dárců se preferuje u pacientů, u kterých chceme snížit riziko vzniku GvHD. K odběru kostní dřeně přistupujeme také v případě, že odběr HSC z periferní krve není možný – dárce je poor mobilizer. (Cetkovský et al., 2016)

3.3.1 Kvalita transplantátu

Zásadním kritériem pro posouzení kvality transplantátu z kostní dřeně je celková buněčnost vyjádřená v absolutním počtu odebraných buněk na celkovou hmotnost příjemce (TNC/kg příjemce, total nucleated cells). Kvalitní transplantát musí obsahovat alespoň $3 \cdot 10^8$ TNC/kg příjemce u alogenní transplantace. Mezi další kritéria posuzující kvalitu transplantátu patří obsah mononukleárních buněk, CD34+ buněk nebo kultivačně vyšetřených kolonie tvořících progenitorů. (Cetkovský et al., 2016)

3.3.2 Odběr

Odběr kostní dřeně provádíme v celkové nebo částečné (epidurální) anestezii. Odběr provádějí dva lékaři, kterým asistuje instrumentářka a je zde přítomná také zaškolená sestra.

Samotný odběr je prováděn na břiše, kostní dřev je odebírána ze zadní části pánevní kosti pomocí opakovaných vpichů. Z jednoho vpichu může být aspirováno 3 – 5 ml dřevové krve, z jednoho kožního vpichu je možné provést více vpichů do kosti a z jednoho vpichu do kosti můžeme provést maximálně 4 – 5 aspirací, kdy se po každé aspiraci jehla mírně posune na jiné místo. Maximálně dárci odebereme 15 ml dřevové krve na kg dárce. Celkový počet vpichů do kůže by neměl převýšit 3 – 4 vpichy na každé straně pánve. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

Takto odebraná dřevová krev (obvykle kolem 1000 ml) obsahuje velké množství tuku, drobné úlomky kostí. Pro zajištění kvality transplantátu se odebírá vzorek na krevní obraz a zjištění zastoupení CD34+ buněk. Následně se transplantát připravuje k aplikaci. Pokud je nutné odstranit erytrocyty z důvodu AB0 inkompatibility mezi dárcem a příjemcem lze toho docílit využitím centrifugační nebo sedimentační metody (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

3.4 Vyhledávání vhodného dárce

Tento krok je zásadním a nejvíce kritickým bodem celého procesu alogenní transplantace. Volba vhodného dárce částečně určuje riziko a úspěch následné léčby. Tento krok je závislý na mnoha faktorech ze strany dárce i pacienta, na druhu onemocnění i samotného transplantačního centra. Jednotlivé faktory jsou rozebrány v následujících kapitolách. (Cetkovský et al., 2016)

3.4.1 HLA faktor

Hlavním faktorem ovlivňujícím výběr dárce je HLA kompatibilita. Vzhledem ke skutečnosti, že možnost nalezení genotypicky identického sourozence je pouze 20 – 30 %, přistupujeme ke hledání dárce k tzv. alternativním dárům, kam patří: nepřibuzní dárci, haploidentičtí příbuzní dárci a použití pupečnickové krve. (Penka, Tesařová, 2012) (Cetkovský et al., 2016)

Neshoda v HLA systému mezi dárcem a příjemcem spouští T- a NK- buněčnou aloreaktivitu, která zapříčiňuje vznik reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) a GvL efektu – tedy reakce štěpu proti nádoru/leukémii. Transplantace může být stejně úspěšná s jednou alelickou nebo antigenní neshodou jako s plně kompatibilním dárcem. Preferujeme využívání plně shodných dárů, nicméně v některých případech částečnou neshodu musíme akceptovat, to závisí na naléhavosti transplantace, rizikovosti onemocnění a potřebě GvL

efektu či dostupnosti alternativní léčby. HLA kompatibilita je podrobněji popsána v následující kapitole. (Penka, Tesařová, 2012) (Cetkovský et al., 2016)

3.4.2 Typ dárce

Štěpy vhodné pro transplantaci může získat od dvou různých typů dárců, kterými jsou příbuzní a nepříbuzní dárce. (Cetkovský et al., 2016)

V případě příbuzných dárců je optimálním dárce sourozenec, který zdědil stejné haplotypy a je tudíž genotypově identický v HLA-A, -B, -C, -DR, tedy shoda 8/8, nebo i v HLA-DQ a pak jde o shodu 10/10. Takováto shoda pak dává menší riziko vzniku závažné reakce štěpu proti hostiteli a mortality. U takto plně kompatibilních pacientů se vyskytuje klinická GvHD v 60 % případů. (Cetkovský et al., 2016)

U nepříbuzných dárců vyšetřujeme všechny alely HLA I. třídy a HLA-DR a HLA-DQ z II. třídy molekulárně genetickými metodami s vysokým rozlišením. Míra HLA shody mezi dárce a pacientem udává, jaký výsledek bude transplantace mít. Každá neshoda v tomto systému pak zvyšuje riziko transplantačních komplikací jako je mortalita spojená s transplantací a GvHD, a také může mít nepříznivý dopad na přežití. Pro nepříbuzenské transplantace se proto preferují plně kompatibilní dárce se shodou 10/10 případně 12/12. Nejpříjemnější je neshoda na lokusu HLA-DQ, pokud je shoda ve všech ostatních lokusech, protože nezhoršuje výsledek transplantace. Z toho vyplývá, že zásadní vliv na transplantace má vliv neshody na lokusech HLA-A, -B, -C a -DR, vliv neshody na těchto jednotlivých lokusech je srovnatelný. Použití částečně neshodného štěpu je nutné zvážit u každého pacienta individuálně v závislosti na typu malignity, proti riziku netransplantační léčby nebo použití alternativní léčby. Velkou roli také hraje vyšší riziko GvHD, které ovšem může vyvážit GvL efekt, který snižuje riziko relapsu. Důležitý je také časový faktor, kdy použití částečně neshodného dárce zkrátí dobu vyhledávání dárce a umožní včasné provedení transplantace. (Cetkovský et al., 2016)

3.4.3 Vyhledávání dárce

Hledání vhodného dárce zahajujeme vždy mezi sourozenci nemocného. Pokud ho nenajdeme, přistupujeme ke kontaktování registrů dárců a hledáme HLA kompatibilní nepříbuzné dárce. V případě, že není k dispozici plně kompatibilní příbuzný nebo nepříbuzný dárce, nebo není k dispozici dostatečný čas na jeho vyhledání, můžeme přistoupit k tzv. haploidentické transplantaci. Takovým dárce může být například rodič nebo potomek, kteří mají s pacientem shodný jeden haplotyp (tedy polovinu

transplantačních znaků). Haploidentická transplantace vyžaduje ovšem specifickou imunosupresi z důvodu zvýšeného rizika GvHD a je prováděna opožděnou imunitní rekonstitucí se zvýšeným rizikem infekčních komplikací. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

3.4.3.1 Příbuzní

Jak už bylo řečeno, zahajujeme hledání vhodného dárce u sourozenců. V případě neshody u sourozence se přistupuje ke hledání nepříbuzného dárce. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

3.4.3.2 Nepříbuzní

Nepříbuzné dárce vyhledáváme v registrech nepříbuzných dárců, spolu s požadavkem pro pacienta s konkrétním HLA fenotypem. Všechny registry dárců jsou spolu vzájemně propojeny v rámci organizace WMDA a je k dispozici jedna společná celosvětová databáze dárců. Aktuálně je v této databázi registrováno 41 020 757 (stav k 29.2.2024). Šance na nalezení kompletní schody u nepříbuzného dárce závisí na frekvenci daného HLA fenotypu v daném registru a na etniku pacienta. Nalezení vhodného dárce je výsledkem spolupráce mezi transplantačním centrem, koordinačním centrem registru dárců a HLA laboratoří. Doba hledání vhodného dárce je závislá na frekvenci hledané kombinace transplantačních znaků u dárců v registru, proto je nutné začít hledat ihned, jakmile je pacient indikován k alogenní transplantaci. Při výběru vhodného dárce je nutné respektovat maximální snahu registrů chránit zdraví dárců a zvážit riziko odběru proti přínosu transplantace pro pacienta v situacích, kdy je indikace hraniční. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

3.5 HLA kompatibilita

3.5.1 HLA systém – význam a rozdělení

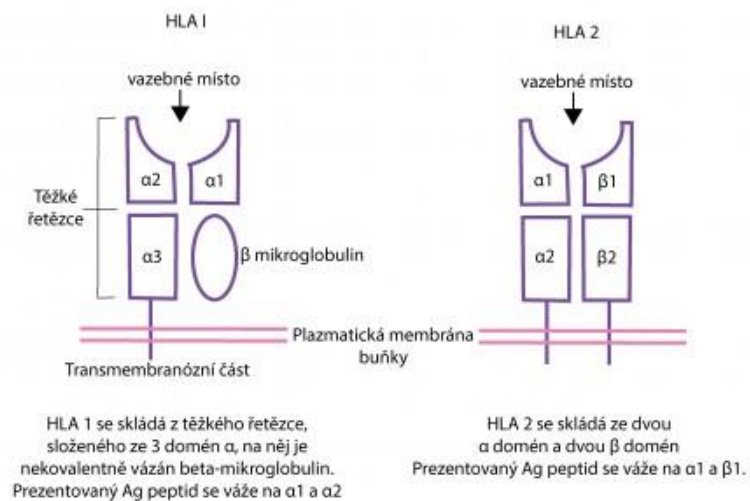
Jedná se o systém, jehož antigeny se vyskytují na povrchu buněk všech orgánů těla. Tento systém hraje zásadní roli u buněk imunitního systému, kde tyto membránové glykoproteiny podmiňují vzájemnou tkáňovou neslučitelnost u nepříbuzných jedinců. Tyto antigeny byly označeny jako histokompatibilní. Charakter těchto histokompatibilních antigenů je dán genetickým systémem označeným MHC (major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex), což je obecný termín pro histokompatibilní systémy všech živých druhů. U lidí tento systém označujeme jako HLA (human leukocyte antigen) systém. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)

HLA antigeny můžeme rozdělit do dvou základních skupin.

- První skupinou jsou HLA molekuly I. třídy. Do této skupiny patří HLA-A, HLA-B, HLA-C. Jedná se transmembránový glykoproteinový heterodimer nacházející se na povrchu všech jaderných buněk, který je složený ze dvou nekovalentně asociovaných podjednotek:
 - Polymorfního, membránově vázaného těžkého α -řetězce, který je kódován na 6. chromozomu. Skládá se ze tří extracelulárních částic α_1 - α_3 (aminoskupinový konec, $-\text{NH}_2$), dále jedné transmembránové domény a intracelulární kotvy (karboxylový konec, $-\text{COOH}$). Nejvíce variabilní je α_1 doména, která jako jediná nese oligosacharidový postranní řetězec ($-\text{CHO}$). Méně variabilní je pak α_2 doména a α_3 doména je označována za konzervativní. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)
 - Nepolymorfní β_2 -mikroglobulin, který je kódovaný na 15. chromozomu. Tato podjednotka je stejná pro všechny HLA antigeny I. třídy. Svou strukturou je velice podobný molekulám imunoglobulinů. Navazuje se na α_3 doménu a zodpovídá za správnou orientaci cele molekuly. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)

Interakcí mezi α_1 a α_2 doménou vzniká funkčně významný žlábek. Vzhledem k tomu, že vazebné místo pro peptidy na této molekule je z obou stran uzavřeno, váží se na toto vazebné místo výhradně peptidy o délce 8-10 aminokyselin. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)

- Druhou podskupinou jsou HLA antigeny II. třídy. Mezi ně řadíme HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP. Díky své struktuře je řazen, jako HLA I. třídy, k imunoglobulinům. Stejně jako HLA I. třídy se jedná o transmembránový glykoproteinový heterodimer, který se skládá z těžkého řetězce α a lehkého řetězce β . Oba řetězce mají dvě extracelulární domény, transmembránový region a intracelulární kotvu. Řetězec α má dva postranní oligosacharidové řetězce (-CHO). Řetězec β má pouze jeden oligosacharidový řetězec na doméně β_1 . Spojením extracelulárních domén α_1 - β_1 vzniká žlábek pro vazbu antigenních fragmentů, které jsou stejně jako HLA I. třídy schopny prezentovat ho imunokompetentním buňkám. Rozdílem je že žlábek je otevřený a mohou se tak na něj vázat antigenní fragmenty o délce 15-35 aminokyselin i delší. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)



Obrázek 5. HLA antigen I. a II. typu

Molekuly HLA systému jsou kódovány na 6. chromozomu, kde spolu s přibližně 220 geny tvoří tzv. HLA komplex, které jsou koncentrované na poměrně malém kousku DNA. Tato oblast obsahuje 128 funkčních genů a 96 pseudogenů. Tento systém je vysoce polymorfní, což znamená, že se v populaci vyskytuje mnoho variant těchto genů. Aktuální počet detekovatelných variant HLA genů, tzv. alel, je více než 35 tisíc. Protože pro každý HLA antigen máme dvě alely, je HLA systém extrémně polymorfní s velkým množstvím kombinací. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012) (Marsh, BSc PhD, 2023)

3.5.2 Dědičnost, rekombinace a crossing - over

Vzhledem k tomu, že HLA systém je systémem genetickým, je přenášen na potomstvo. Protože chromozomy se vyskytují v páru, dědí potomek 2 haplotypy, jeden haplotyp od otce a jeden haplotyp od matky. Tak vzniká HLA genotyp jedince. V rámci jednoho lokusu je možné nést maximálně 2 alely. Tyto geny, které kódují HLA alely jsou kodominantní a řídí se mendelovským typem dědičnosti. Pokud jedinec zdědí stejné alely od rodičů, je výsledný lokus homozygotní. Pokud však zdědí alely rozdílné, je výsledný lokus heterozygotní. Dle mendelovských zákonů jsou haplotypy děděny následovně:

- 25 % potomků je HLA identických. To znamená, že zdědili stejný HLA haplotyp od matky i od otce.
- 50 % potomků se shoduje pouze v jednom haplotypu (haploidentičtí). To znamená, že zdědili stejný haplotyp od otce a jiný od matky anebo naopak.
- 25 % potomků zdědily jiný haplotyp od otce a od matky.

Z prováděných studií bylo zjištěno, že asi 2 % potomků nese rekombinantní genotyp, který je odlišný od původního rodičovského genotypu. Takovýto rekombinantní genotyp vzniká díky tzv. crossing – overu. Crossing – over je způsobený výměnou genetického materiálu mezi dvěma homologními chromozomy v průběhu mitotického dělení. „Frekvence rekombinace mezi dvěma lokusy závisí na vzájemné vzdálenosti těchto lokusů, čím větší je vzdálenost, tím větší je pravděpodobnost rekombinace.“ (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)

3.5.3 Vazebná nerovnováha

Vazebnou nerovnováhou chápeme nenáhodnou asociaci alel dvou nebo více lokusů. Typicky jí můžeme pozorovat mezi specifickými alelami HLA-B a HLA-C, nebo HLA-DR a HLA-DQ. Tyto alely se pak v populaci vyskytují mnohem častěji, než by se dalo předpokládat. Díky genetickým studiím se zjistilo, vazebná nerovnováha je jedním z charakteristických rysů tohoto systému. Tato vlastnost HLA systému je zásadní při vyhledávání vhodného nepříbuzného dárce. (Cetkovský et al., 2016) (Penka, Tesařová, 2012)

3.6 Nejčastější diagnózy u transplantovaných pacientů

3.6.1 Akutní myeloidní leukemie (AML)

AML rozumíme: „Nádorové onemocnění vznikající na základě klonální expanze myeloidních blastů v periferní krvi, kostní dřeni nebo jiné tkáni. Jde o heterogenní onemocnění, a to jak klinicky, tak morfoloicky i geneticky a tato heterogenita se odráží i na prognóze nemocného. Nádorové buňky mohou pocházet z jedné, více nebo všech myeloidních linií. K určení myeloidního původu leukemie je nezbytný průkaz nejméně 5 % blastů pozitivních na myeloperoxidázu (cytochemie, průtoková cytometrie), případně zjištění, že jde o megakaryoblasty, monoblasty, promonocyty či atypické promyelocyty, tedy buňky, které jsou ekvivalentem blastů a jsou myeloidního původu.“ (Penka, Tesařová, 2011)

Vznik AML ovšem není objasněn. Jsou však známy vlivy, které zvyšují pravděpodobnost vzniku – genetické vlivy. (Penka, Tesařová, 2011)

Klinické příznaky AML mohou být různé a nespecifické a souvisí se změnami v krevním obraze (anémie, trombocytopenie, neutropenie, atd.). Typickými příznaky pro AML jsou únava, krvácení nebo infekce s horečkami. Běžně se objevuje bledost, únava, závratě a dušnost při námaze. Tyto příznaky jsou obvykle vyvolány chyběním normální funkce elementů periferní krve. (Penka, Tesařová, 2011)

3.6.2 Akutní promyelocytární leukemie (APL)

„APL je akutní leukemie, u níž je nádorová populace představovaná abnormálními promyelocyty. Představuje 5–8 % nemocných s AML.“ (Penka, Tesařová, 2011)

APL se může teoreticky kdykoli. Nejčastěji se objevují krvácivé projevy. (Penka, Tesařová, 2011)

3.6.3 Akutní lymfoblastické leukemie (ALL)

Jedná se o: „Klonální nádory z nezralých T či B lymfoidních buněk, které označujeme jako T či B lymfoblastické leukemie.“ (Penka, Tesařová, 2011)

Pokud se budeme bavit o B lymfoblastické leukemii, definujeme ji jako: „Neoplazii z prekurzorových buněk (lymfoblastů) zadaných pro B buněčnou vývojovou linii, které nejsou provázeny rekurentní cytogenetikou abnormalitou. Je postižena primárně kostní dřev a periferní krev.“ (Penka, Tesařová, 2011)

U B-ALL se může objevit postižení centrální nervové soustavy, uzlin, jater, sleziny a u chlapců varlat. (Penka, Tesařová, 2011)

T lymfoblastické leukemie definujeme jako: „Klonální nádorové vycházející z prekurzorových buněk T buněčné lymfoidní linie. Diagnóza leukemie by neměla být stanovena, jestliže počet lymfoblastů v periferní krvi a/nebo kostní dřeni nedosahuje 20 % všech jaderných buněk. Nicméně léčebné protokoly většinou vyžadují zastoupení více než 25 %.“ (Penka, Tesařová, 2011)

T-ALL někdy provází dechová tíseň a někdy se objeví i pleurální výpotek. Může též postihnout uzliny, infiltrovat kůži, tonsily, játra, slezinu, varlata a centrální nervovou soustavu. (Penka, Tesařová, 2011)

3.6.4 Myelodysplastický syndrom (MDS)

„MDS je skupina klonálních onemocnění krvetvorby, které jsou charakterizovány cytopenií, dysplazií jedné nebo více hlavních myeloidních buněčných linií, neefektivní krvetvorbou a zvýšeným rizikem vývoje v akutní myeloidní leukemii.“ (Penka, Tesařová, 2011)

Příznaky MDS obvykle odpovídají cytopenií. Projevuje se únava, ztráta energie, dechové potíže a vyskytuje se i anémie. V některých případech se objevuje neutropenie a trombocytopenie, u těchto pacientů se pak objevují časté infekce a krvácivé projevy. (Penka, Tesařová, 2011)

4 PŘED TRANSPLANTAČNÍ PROCESY

Přípravné předtransplantační mají za úkol připravit podmínky pro přijetí nového krvetvorného štěpu, odstraněním původní nemocné krvetvorné tkáně. V případě nádorového onemocnění má tento proces potenciál zajistit dlouhodobý a úspěšný výsledek léčby, ale může také klíčovým způsobem ovlivnit časnou mortalitu. Chyby v použití přípravného režimu mohou mít ohromné důsledky, které mohou být pro nemocného i fatální. Volba správného režimu a kontrola kvality při jeho podání je proto zásadní. (Cetkovský et al., 2016) (Tomíška, CSc, 2012)

4.1 Cíle předtransplantačních přípravných režimů

Předtransplantační přípravné režimy mají 3 hlavní cíle:

1. Vytvoření prostoru v kostní dřeni – tento krok provádíme, aby se buňky ze štěpu měli v kostní dřeni kam přichytit. Za normálních okolností si nezralé progenitorové buňky hledají místo vhodné pro svou proliferaci a diferenciaci. Proto, aby se tyto dárcovské buňky mohly přichytit, musíme eradikovat stávající osídlení. Tímto krokem se urychlí přihojení štěpu i u přípravných režimů s redukovanou přípravou. (Cetkovský et al., 2016) (Tomíška, CSc, 2012)
2. Imunosuprese s cílem snížit riziko odmítnutí štěpu – u alogenního typu transplantace je použití imunosuprese nutný, aby nedošlo k odmítnutí hostitelským imunitním systémem. Potřeba imunosuprese s vyšší mírou neshody v HLA systému. Stejně se zvyšuje potřeba při senzibilizaci proti malým histokompatibilním antigenům při opakovaných transfuzích krevních elementů před HCT. (Cetkovský et al., 2016) (Tomíška, CSc, 2012)
3. Potlačení nádoru – dalším důležitým cílem je významně přispět k zajištění dlouhodobé kontroly nádorového onemocnění. K zajištění tohoto cíle přispívá co možná největší eliminace nádorových buněk z postižených tkání. (Cetkovský et al., 2016) (Tomíška, CSc, 2012)

4.2 Základní typy přípravných režimů

Jak již bylo zmíněno, je nutné zajistit splnění cílů přípravy před HCT. Tyto cíle mohou být splněny buď radikálním odstraněním kostní dřene – myeloablativní příprava –

nebo méně intenzivním potlačením krvetvorby pacienta za současného spoléhání na popsany imunitní efekt – nemyeloablativní příprava. (Cetkovský et al., 2016) (Tomáška, CSc, 2012)

4.2.1 Myeloablativní příprava

Myeloablativní přípravný (MA) režim má za výsledek kompletní eradikaci nádorových buněk a zároveň dociluje ablace kostní dřeně s vytvořením prostoru pro uchycení dárcovského štěpu a použitím silné imunoprese dosažení dobrých podmínek nutných k přihojení štěpu. (Krejčí et al., 2009) (Tomáška, CSc, 2012)

4.2.2 Režimy s redukovanou intenzitou RIC

Pro mou bakalářskou práci je nejpodstatnější RIC režim (reduced intensity conditioning). Jedná se o režim přípravy, který byl použitý na pacientech v souboru pacientů.

RIC je režim, který má sice méně cytotoxický účinek na nádorové buňky, ale nádorové buňky, které uniknou tomuto účinku, mohou být eliminovány následnou imunitní reakcí typu GvL. Hlavní výhodou tohoto přípravného režimu je menší toxicita, což umožňuje provádění HCT u starších pacientů nebo pacientů s přidruženými onemocněními, u kterých by použití MA bylo provázeno velkým rizikem komplikací až s fatálními následky. Toto je jeden z důležitých cílů RIC režimu. Dalším důležitým cílem je zajistit imunomodulační efekt na dárcovské T-lymfocyty, aby byla zajištěna eradikace reziduálních nádorových buněk. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009) (Tomáška, CSc, 2012)

Studiemi bylo zjištěno, že v případě nespustění imunitního efektu GvL je zvýšené riziko relapsu, zatímco v případech spuštění imunitního efektu je toto riziko významně menší. Imunitní efekt na potlačující nádor je také patrný ze snížení výskytu relapsů při chronické GvHD a při aktivním použití infuze dárcovských lymfocytů po alogenní HCT. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009) (Tomáška, CSc, 2012)

Tyto režimy vycházejí z preklinických studií, které definují minimální požadavky na přihojení štěpu. RIC režim tak umožňuje dočasnou koexistenci HSC pacienta a dárce, tzv. smíšený chimérismus, díky kterému by v případě selhání štěpu mohlo dojít k obnovení původní krvetvorby. Smíšený chimérismus pak může být převeden na plný dárcovský chimérismus imunomanipulací, jako např. podáním dárcovských lymfocytů. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009) (Tomáška, CSc, 2012)

4.3 Chemoterapie a ozařování

Před samotnými přípravnými režimy provádíme jisté kroky, mezi něž zařazujeme vysokodávkovanou chemoterapii a ozařování. (Cetkovský et al., 2016)

Vysokodávkovaná chemoterapie je založená na podávání vyšší dávky cytotoxických léků, než je dávka standardní. S nárůstem této cytotoxicity narůstá i toxický účinek na nádorové buňky. Vysokodávkovanou chemoterapii můžeme definovat jako „dávku cytotoxických léků, která vede k ablaci kostní dřeně“. (Cetkovský et al., 2016)

Celotělové ozařování (TBI, total body irradiation) je součástí některých přípravných režimů před alogenní HCT. TBI je v těchto režimech kombinováno s podáváním cytotoxických léků (cytostatik), které jsou dávkovány na míru pacienta. U přípravy RIC se využívá TBI v nižších dávkách. Příprava se však vždy vybírá na míru pacientovy, s ohledem na jeho zdravotní stav a diagnózu. (Cetkovský et al., 2016) (Tomáška, CSc, 2012)

4.4 Imunosuprese

Imunosuprese je součástí přípravných režimů ale také se používá po transplantaci pro dobré přijetí štěpu a úspěšnou obnovu krvetvorby a imunity. Existuje mnoho druhů imunosuprese, jako jsou imunosupresiva zasahující do metabolismu DNA, látky vážící se na imunofiliny, monoklonální protilátky a mnoho dalších. Pro mou práci jsou však důležité zejména kortikosteroidy, které se používají jako první linie léčby u rozvinuté GvHD. Jejich účinek je komplexní. Kortikosteroid se naváže na plasmatický receptor, kde je translokován do jádra buňky. V jádře dochází k interakci s GREs – glucocortikoid response elements – následně dojde k tvorbě mRNA a syntéze proteinů. Lék použitý k imunosupresi u skupiny pacientů v této práci je komerčně vyráběný Medrol, celým názvem Methylprednisolon. (Cetkovský et al., 2016) (Tomáška, CSc, 2012)

Methylprednisolon je lék patřící do skupiny glukokortikoidů, který má mnoho vlastností, ale nejdůležitější pro HCT je narušení funkce T-lymfocytů čímž působí útlum imunity. Má ovšem i nežádoucí účinky, mezi které řadíme: bolest hlavy, nevolnost, zvracení, přibývání na váze, otoky kotníků nohou nebo rukou, vysoký krevní tlak, změny nálad a emocí atd. (Cetkovský et al., 2016) (Tomáška, CSc, 2012)

5 REKONSTITUCE IMUNITY

5.1 NK buňky

NK buňky jsou detekovatelné již v době engraftmentu a během prvních tří měsíců zastupují většinu lymfocytů. Po 1 až 2 měsících se hladina NK buněk dostává na normální hodnoty. Rekonstituci těchto buněk neovlivňuje významně zdroj štěpu, typ transplantace, věk a ani přítomnost GvHD. NK buňky nesou nezralý fenotyp CD3 negativní, CD56 pozitivní, s tím souvisí vysoká exprese CD94/NKG2-A a nízká exprese KIR receptoru. Tyto buňky jsou v omezené míře cytotoxické a produkují INF- γ , je zde popsána možná souvislost se vznikem GvHD. Zralé NK buňky, s vysokou expresí KIR receptoru, se objevují až později, jejich výskyt negativně koreluje s výskytem GvHD. U pacientů, kteří nemají GvHD, může dojít k normální KIR expresi již po 1 měsíci po transplantaci, ovšem častěji se exprese vyvíjí postupně až do 3 let. Zvýšená exprese je spojena s lepším přežíváním u alogenních transplantací. (Cetkovský et al., 2016)

5.2 B-lymfocyty

Rekonstituce B-lymfocytů probíhá rychleji než u T-lymfocytů a kopíruje vývoj v ontogenezi, pokud není přítomná GvHD. Přítomnost GvHD a podávání nízkých dávek cytostatik negativně ovlivňuje rekonstituci B-lymfocytů, ale není ovlivněna věkem ani typem štěpu. Po 3 měsících od transplantace se jejich celkové počty normalizují, pozorujeme ovšem převahu naivních B-lymfocytů (chybí populace, která je schopná izotypového přesmyku). Ještě rok od transplantace mají pacienti nedostatek zralých B-lymfocytů, což může být způsobeno nejen deficitem Th-lymfocytů ale i absencí germinálních center v uzlinách. (Tomáška, CSc, 2012)

„B-lymfocytární kompartment, který představuje humorální imunitu, se obnovuje nejpomaleji a může trvat až 5 let po alogenní HSCT. Přechodné B-lymfocyty CD19+CD21lowCD38high jsou první B-lymfocyty emigrující z kostní dřeně (KD) a v prvních měsících po HSCT jsou zvýšené v periferní krvi (PB), než se jejich podíl postupně sníží, zatímco podíl zralejších subpopulací B-lymfocytů se zvyšuje. Nedostatek CD19+CD27+ paměťových B-lymfocytů, snížené hladiny cirkulujících imunoglobulinů, porucha přepínání imunoglobulinových tříd a ztráta komplexnosti vzorců představby imunoglobulinových genů činí pacienty po alogenní HSCT zranitelnými vůči zapouzdřeným bakteriím, jako jsou *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.“ (Ogonek et al., 2016)

5.3 T-lymfocyty

Rekonstituce T-lymfocytů probíhá nejdéle, což je způsobeno mnoha faktory, a nekopíruje vývoj v ontogenezi, což je způsobeno rekonstitucí probíhající ve dvou fázích. Vyšší množství T-lymfocytů v časně potransplantační fázi dáno periferní expanzí paměťových buněk přenesených štěpem. Později se uplatňuje centrální fáze, která je závislá na thymu a již kopíruje ontogenezi, ta nastává nejdříve po 6 měsících od transplantace. Začíná tak vývoj širokého spektra naivních T-lymfocytů z progenitorové buňky. Při rekonstituci dochází nejprve ke zmnožení cytotoxických T-lymfocytů (CD8+), což způsobuje inverzní poměr CD4+/CD8+ buněk. Normalizace tohoto poměru je závislá na obnově pomocných T-lymfocytů (CD4+), která nenastává dříve než po roce od transplantace. (Cetkovský et al., 2016)

Centrální cesta rekonstituce T-lymfocytů je negativně ovlivněna přítomností GvHD, věkem, CD34+ selekcí nebo T-buněčnou deplecí, typem štěpu, HLA shodou a přítomností kompletního dárcovského chimérismu. (Cetkovský et al., 2016)

„Obnova T-lymfocytárního kompartmentu závisí na periferní expanzi paměťových T buněk, která je řízena cytokiny i alogenními antigeny, s nimiž se hostitel setkal, a je následována produkcí naivních T buněk v thymu. CD4+ T lymfocyt se rekonstituuje později než CD8+ T lymfocyty a po HSCT jsou více závislé na tvorbě CD4+CD45RA+ naivních T lymfocytů v thymu, což vysvětluje uváděnou inverzi poměru CD4/CD8. Jako náhradní parametry rekonstituce CD4+CD45RA+ naivních T buněk odvozených z thymu byly zkoumány kruhy přestavby DNA receptoru T buněk (TCR). Zvláštní podskupinou CD4+ buněk jsou regulační T-lymfocyty (Tregs), které mohou být důležité pro lepší výsledky po alogenní HSCT. Tregs potlačují aktivitu efektorových T buněk, čímž snižují zánět a podporují imunitní homeostázu po alogenní HSCT. Klinické, preklinické a experimentální modely ukázaly, že rekonstituce Treg hraje zásadní roli při zmírnění GvHD při zachování efektu štěpu proti leukemii. Zvyšující se věk je spojen s atrofií a ztrátou funkce thymu. Cyklování zralých lymfocytů udržuje počet zralých T lymfocytů homeostatickou periferní expanzí. Naivní CD4+ a CD8+ T-lymfocyty jsou závislé na interleukinu-7 (IL-7) a zapojení TCR pro přežití a expanzi. CD8+CD27+ paměťové T buňky mohou být udržovány a rozšiřovány pouze pomocí cytokinových signálů zahrnujících IL-7 a interleukin-15 (IL-15). U starších pacientů vede nedostatek CD4+CD45RA+ naivních T buněk s širokým repertoárem TCR ke zvýšenému riziku oportunních infekcí a pravděpodobně také ke

zvýšenému riziku relapsu leukemie. Nedostatek CD4⁺CD45RA⁺ naivních T buněk navíc zhoršuje GvHD.“ (Ogonek et al., 2016)

Jednou z podskupin T-lymfocytů ze skupiny CD4 jsou tzv. regulační T-lymfocyty. Jejich hlavní funkcí je potlačovat imunitní reakce a udržovat autotoleranci. Hlavním faktorem pro vývoj Treg-lymfocytů je faktor FoxP3. Pokud je Treg-lymfocyt odvozen z brzlíku jedná se o přirozený Treg-lymfocyt, který je charakteristický koexpresí CD4 a vysokou expresí znaků CD25 a FoxP3. Jedná se funkčně zralou subpopulaci T-lymfocytů, která může také být indukována z CD4⁺ CD45RA⁺ naivních T-lymfocytů v periferních lymfatických orgánech za přítomnosti růstového faktoru beta (TGF- β) a interleukinu-2 (IL-2). Pokud jsou Treg-lymfocyty takto vytvářeny, jedná se o tzv. indukované či adaptivní regulační T-lymfocyty (iTreg). Hladiny Treg-lymfocytů zůstávají nízké až do 3-6 měsíců po alogenní HSCT. (Ogonek et al., 2016)

„Paměťové T lymfocyty [centrální paměť (TCM) a efektorová paměť (TEM)], tkáňové rezidentní paměťové buňky (TRM) a efektorové buňky (TEFF) jsou nezbytné pro kontrolu virových reaktivací po alogenní HSCT. Při setkání s antigeny se paměťové buňky diferencují na TEFF a lyzují infikované buňky a vylučují prozánětlivé cytokiny [např. IFN- γ a tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α)]. Imunitní dohled nad TCM probíhá prostřednictvím sekundárních lymfoidních orgánů, TEM a TEFF, prostřednictvím nelymfoidních orgánů. Naopak buňky TRM se nacházejí na různých místech (např. v játrech, plicích, střevech a kůži) a poskytují okamžitou protivirovou odpověď (cytotoxicitu a sekreci IFN- γ), aniž by docházelo k jejich prezentování. Po alogenní HSCT je nezbytná rekonstituce CD4⁺CD45RA⁺ naivních T-lymfocytů, které poskytují široký repertoár TCR potřebný ke kontrole infekcí a k zamezení opětovného výskytu leukemických buněk. Rekonstituci CD4⁺CD45RA⁺ naivních T lymfocytů lze prokázat měřením TREC. Imunitní rekonstituce CD4⁺ a CD8⁺ T buněk je rovněž nezbytná pro udržení účinku GvL. Rekonstituce CD8⁺ T-lymfocytů je rychlejší než rekonstituce CD4⁺ T-lymfocytů, k níž obvykle dochází kolem dne +100 nebo později a která je indikována inverzí poměru CD4⁺/CD8⁺ T-lymfocytů brzy po HSCT. Doba do úplné rekonstituce CD4⁺ T buněk může trvat až 2 roky po alogenní HSCT.“ (Ogonek et al., 2016)

6 KOMPLIKACE

6.1 Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)

Reakce štěpu proti hostiteli je jednou z hlavních komplikací u alogenních HCT. GvHD je způsobena imunologickou reakcí dárcovského transplantátu proti organismu pacienta. Existují tři základní kritéria, které jsou nezbytná pro vznik GvHD:

- ve štěpu musí být obsaženy imunokompetentní buňky
- příjemcovy buňky musejí exprimovat antigeny, které dárcovské imunokompetentní buňky rozpoznají jako cizí
- příjemce musí být dostatečně imunokompromitován

GvHD je tedy stav, nežádoucí reakce, kdy T-lymfocyty od dárce poškozují buňky tkání a orgánů příjemce. Toto poškození pak může méně či více ovlivnit pacienta i stav štěpu. Riziko vzniku GvHD se zvyšuje s vyšší imunologickou inkompatibilitou a také s vyšším věkem pacienta i dárce. GvHD rozdělujeme do dvou forem akutní a chronické. (Cetkovský et al., 2016) (Krejčí et al., 2009)

6.1.1 Akutní reakce štěpu proti hostiteli (aGvHD)

Akutní GvHD je přímo či nepřímo hlavním důvodem brzké mortality u alogenní HCT. Akutní GvHD můžeme popsat jako třífázový proces:

1. Aferentní fáze – tato první fáze zahrnuje počáteční poškození tkání příjemce způsobené podáním přípravného předtransplantačního režimu, které vede k aktivaci hostitelské nemoci nebo vzniku dalších komplikací. Tato aktivace vede k aktivaci hostitelských antigen-prezentujících buněk pomocí PAMP's (pathogen-associated molecular patterns) a DAMP's (damage-associated molecular patterns).
2. Fáze indukce a expanze – Tato fáze je provázena aktivací T-lymfocytů, které jsou aktivovány pomocí APC's, jež byly aktivovány výše uvedeným způsobem. Aktivace T-lymfocytů vede k produkci IL-2, který kontroluje a zesiluje imunitní odpověď, a INF- γ
3. Efektorová fáze – Tato fáze je finální a je charakterizovaná cytotoxickým poškozením buněk a uvolňováním zánětlivých cytokinů, jako například

interleukin IL-1, tkáňové ionty a tumor nekrotizující faktor α (TNF α), který nakonec způsobí nekrózu tkáně (eferentní fáze).

Proces patogenního procesu při indukci aGvHD může být ovlivněn přítomností buněk schopných inhibovat imunitní odpověď, jako jsou T-regulační buňky, regulační T-buňky typu 1, invariantní NKT buňky a myeloidní supresorové buňky. (Cetkovský et al., 2016) (Wolfl et al., 2021) (Carreras et al., 2009)

Akutní GvHD se klinicky projevuje na 3 orgánových systémech. Jedná se o kůži, játra a gastrointestinální trakt, může se také objevit postižení očí a sliznice dutiny ústní. (Cetkovský et al., 2016)

6.1.2 Chronická reakce štěpu proti hostiteli (cGvHD)

Chronická GvHD je nejzávažnější a zároveň nejčastější reakcí u alogenní HCT. Jedná se o nejvýznamnější příčinu morbidity. Vyskytuje se až v 50% případů. Chronická GvHD je charakteristická narušením imunitní tolerance, které ovlivňují specifickou i nespecifickou imunitu. (Cetkovský et al., 2016) (Carreras et al., 2009)

Charakteristické pro cGvHD jsou chronické zánětlivé změny, které zahrnují oční, orální jícnové, kožní, kloubně-fasciální a genitální tkáně. Může progredovat do fibróza zahrnující více orgánů v kožním, muskuloskeletálním, aero-digestivním, gastrointestinálním, kardiorepiračním, reprodukčním a periferním nervovém systému se vyskytuje u těžce postižených. (Cooke et al., 2016)

6.2 Selhání štěpu

Důležitým pojmem v této kapitole je přihojení, tzv. engraftment. „Engraftment je definován jako první ze 3 po sobě jdoucích dnů s absolutním počtem neutrofilů vyšším než $0,5 \cdot 10^9 / l$ (trvale $> 20 \cdot 10^9 / l$ trombocytů a hemoglobin $> 80 \text{ g/l}$, bez nutnosti transfuze).“ Selhání štěpu je většinou vzácná komplikace. (Cetkovský et al., 2016) (Carreras et al., 2009)

V případě přípravy RIC je nutné přizpůsobit. Proto je nutné se řídit vyšetřením chimérismu, což znamená do dne +28 po transplantaci je nutné dosáhnout stavu, kdy je alespoň 5% T-lymfocytů CD3 dárcovských (pokud je počet T-lymfocytů mezi 5-95% jde o smíšený chimérismus a pokud je počet nad 95% jde o kompletní chimérismus). Nepřihojení transplantátu se označuje jako primární selhání. Naopak odhojení transplantátu po jeho přechodné dobré funkci je označováno jako sekundární selhání. (Cetkovský et al., 2016)

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

7.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem bylo zjistit jaký je rozdíl v rekonstituci buněčné imunity u pacientů po alogenní transplantaci od příbuzných a nepříbuzných dárců.

7.2 Dílčí cíle

1. Zjistit, jestli existují faktory ovlivňující vývoj buněčné imunity

8 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Má vliv na vývoj buněčné imunity druh použitých imunosupresiv?

Má vliv na vývoj buněčné imunity podávání kortikoidů v potransplantačním období?

9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovaný soubor pro mou bakalářskou práci obsahoval 37 pacientů se štěpem od příbuzných a nepříbuzných dárců, data jsem získala z Hemato-onkologického oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. V souboru byly pacienti od 45 do 74 let s průměrným věkem 64 let. Všichni pacienti byli transplantováni PBSC, po identické přípravě a po imunosupresi (jedná se o tedy o homogenní soubor pacientů). Jedná se o retrospektivní analýzu pacientů z období 11.1.2017 do 22.8.2022. Vzorke pacientů byly měřeny po určitých časových intervalech na průtokovém cytometru od firmy Beckman Coulter, kde nás zajímaly absolutní hodnoty lymfocytů a NK buněk.

10 METODIKA PRÁCE

10.1 Stanovení lymfocytárních populací

Cílem je stanovit subpopulace lymfocytů z periferní krve, abychom mohly posoudit stav buněčné imunity. Populace jsme stanovovali ve 4, 8, 12 týdnů, 6 měsících, 9 měsících a po 1 roce od transplantace

10.2 Princip stanovení

Pro vyšetření využíváme tzv. „double platform“ metodu, která využívá stanovení koncentrace leukocytů na hematologickém analyzátoru a diferenciální rozpočet leukocytů spolu s procentuálním zastoupením lymfocytárních subpopulací na průtokovém cytometru. Stanovení na hematologickém analyzátoru se provádí v hematologické laboratoři ÚKBH. Stanovení na průtokovém cytometru provádí laboratoř průtokové cytometrie na HOO, kde sledujeme absolutní počty v bb/ μ l.

10.2.1 Princip průtokového cytometru

Průtoková cytometrie je analytická laboratorní metoda používaná k měření morfologie a antigenního profilu vyšetřovaných buněk.

Vzorek obsahující buňky je suspendován v tekutině a vstřikován do průtokového cytometru. Tenký proud tekutiny vhná vzorek (v ideálním případě po jednotlivých buňkách) do místa, kam je soustředěn paprsek laseru. Při interakci laseru s buňkami dochází k absorpci, fluorescenci a rozptylu světla. Parametry prošlého, vyzářeného a rozptýleného světla jsou charakteristické pro různé buňky a jejich součásti.



Obrázek 6. Průtokový cytometr

(Zdroj vlastní)

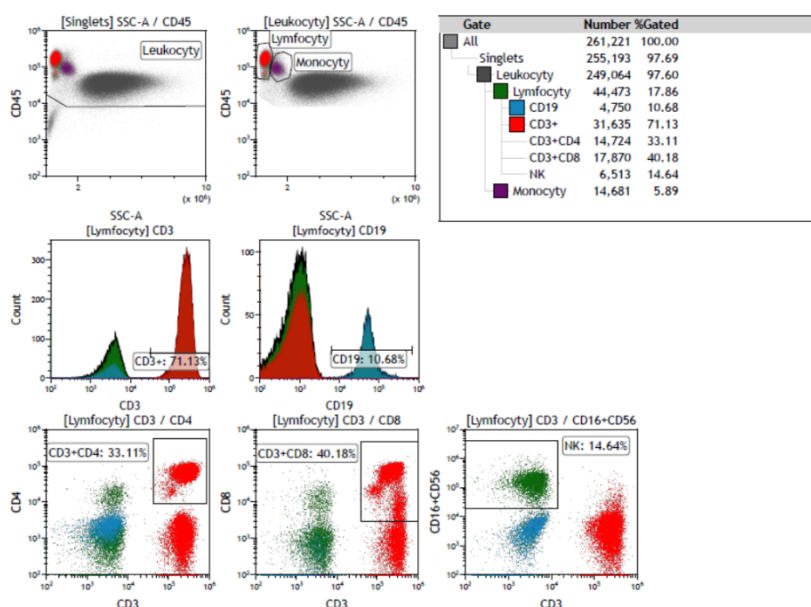
10.3 Panel protilátek

Pro stanovení jednotlivých populací se používá reagensie Kombitest. Jedná se o již namíchanou kombinaci protilátek, kde každá protilátka je označena fluorochromy pro vhodné identifikování v následné analýze. Protilátky jsou uvedené v následující tabulce.

Protilátka	Fluorochrom
CD 45	PerCP – Cy5.5
CD 3	FITC
CD 4	PE – Cy7
CD 8	APC – Cy7
CD 19	APC
CD 16 + CD 56	PE

Tabulka 2. Přehled protilátek v Kombitestu

V následujícím obrázku je na příkladu ukázaná analýza získaných hodnot z průtokového cytometru. Gate z CD45/SS označí lymfocyty, z nich provádíme analýzu B-lymfocytů (CD19+), T-lymfocytů (CD3+), NK buněk (CD3negCD16+56poz), Th-lymfocytů (CD3+CD4) a Tc-lymfocytů (CD3+CD8).



Obrázek 7. Analýza dat z průtokového cytometru

10.4 Příprava vzorku

1. Potřebné zkumavky označíme jménem/číslem pacienta.
2. Do zkumavky pipetujeme 50 μ l periferní krve odebrané do zkumavky s K₃EDTA.
3. Do zkumavky přidáme 10 μ l reagentie Kombitest a pořádně promícháme pomocí vortexu.
4. Směs inkubujeme po dobu 15 – 20 minut v temnu za laboratorní teploty.
5. Po inkubaci provádíme lyzaci erytrocytů pomocí 500 μ l naředěného lyzačního roztoku EXCELLYSE Easy, který ředíme 10x – 1 díl reagentie a 9 dílů deionizované vody.
6. Zkumavku pečlivě promícháme na vortexu a necháme inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
7. Ihned po odbarvení vzorek stanovujeme na průtokovém cytometru. Měříme 50000 lymfocytů (při nízké koncentraci bílých krvinek alespoň 5000 lymfocytů)

10.5 Statistické metody

Pro statistické zpracování statistických dat jsme používaly Mann-Whitney U test a Kruskal-Wallis test ANOVA, jedná se o neparametrické statistické testy. Výpočty a grafy jsme vytvářely v programu GraphPad Prism 10. Získané P-hodnoty vyznačené v grafech určují míru statistické významnosti – P-hodnota $\leq 0,05$, 0,01, 0,001 a 0,0001 což v grafickém provedení odpovídá (*), (**), (***) , (****).

11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

11.1 Porovnání souborů dle použité imunosuprese

V této analýze jsme se snažili zjistit, jaký vliv má druh imunosuprese, resp. předtransplantační přípravy na rekonstituci imunity. Pacienty jsme si rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvoří pacienti se štěpem od nepříbuzných dárců (MUD), u kterých byla jako imunosuprese použita kombinace Cyklosporin, Metotrexát, Antithymocytární globulin (CsA/MTX/ATG). Druhá skupina pak obsahuje pacienty s štěpem od haploidentického dárce (HAPLO), u kterého byla použita imunosuprese potransplantační Cyklofosfamid, Tacrolimus a Mykofenolát mofetil (PTCy/Tacro/MMF). V tabulkách 3 (Tabulka 3) a 4 (Tabulka 4) jsou základní data o pacientech, kteří jsou rozděleni dle použité imunosuprese.

Soubor dat obsahuje pět populací tvořící buněčnou imunitu – celkové lymfocyty (CD3), Th-lymfocyty (CD3+4), Tc-lymfocyty (CD3+8), B-lymfocyty (CD19), NK-buňky (CD 16+56). Tyto populace jsme sledovali v časových bodech 4. týdnů, 8. týdnů, 12. týdnů, 6. měsíců, 9. měsíců a 12. měsíců. Jednotlivé populace jsme v daný časový bod porovnávali mezi skupinou MUD a HAPLO. Veškeré grafy a statistické analýzy byly prováděny na zdrojových datech uvedených v přílohách (Příloha A – Zdrojová data MUD, Příloha B – Zdrojová data HAPLO).

Základní údaje								
Číslo pac.	Věk	Pohlaví	Dg.	Datum transplantace	Status	aGvHD	cGvHD	IS
ID 1	51	F	AML	11.01.2017	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 2	45	F	AML	31.01.2017	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 3	51	M	AML	16.08.2017	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 5	74	F	AML	25.04.2018	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 6	69	M	AML	09.05.2018	A	0	0	CsA/MTX/ATG
ID 7	62	M	AML	30.05.2018	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 8	72	M	AML	27.06.2018	D	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 9	63	F	AML	22.08.2018	A	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 10	67	M	AML	11.09.2018	A	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 11	66	M	AML	19.12.2018	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 13	65	F	AML	16.01.2019	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 14	71	F	AML	19.06.2019	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 15	56	M	MDS-MLD	19.06.2019	D	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 16	67	M	MDS-EB1	11.03.2020	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 17	70	F	AML	18.05.2020	D	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 18	48	M	MDS	16.10.2020	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 19	71	F	AML	13.01.2021	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 20	58	M	AML	27.01.2021	A	0	0	CsA/MTX/ATG
ID 21	58	M	AML	17.03.2021	A	1	1	CsA/MTX/ATG
ID 22	65	M	AML	21.05.2021	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 23	66	M	AML	21.07.2021	A	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 24	66	M	AML	04.08.2021	D	0	0	CsA/MTX/ATG
ID 25	71	F	AML	02.09.2021	D	1	0	CsA/MTX/ATG
ID 26	65	M	MDS-MLD	06.10.2021	A	0	0	CsA/MTX/ATG
ID 27	73	F	AML	22.12.2021	A	1	0	CsA/MTX/ATG

Tabulka 3. Seznam pacientů – Nepříbuzní dárce

(Zdroj vlastní)

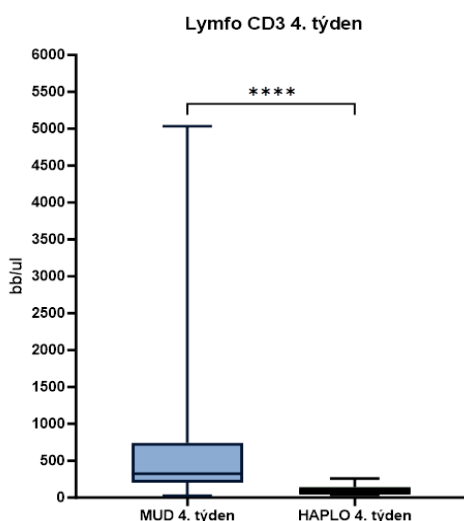
Základní údaje								
Číslo pac.	Věk	Pohlaví	Dg.	Datum transplantace	Status	aGvHD	cGvHD	IS
ID 28	73	F	AML	21.02.2018	D	1	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 29	66	M	APL	19.12.2018	A	0	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 30	57	F	AML	13.02.2019	D	1	0	PTCY/Tacro/MMF
ID 31	63	M	AML	24.04.2019	D	1	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 32	54	F	MDS	12.06.2019	D	0	0	PTCY/Tacro/MMF
ID 33	72	M	AML	17.10.2019	A	1	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 34	66	M	AML	18.12.2019	D	1	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 35	71	M	AML	10.06.2020	D	0	1	PTCY/Tacro/MMF
ID 36	70	F	ALL	12.08.2020	D	1	0	PTCY/Tacro/MMF
ID 38	68	F	MDS-EB2	27.10.2021	A	0	0	PTCY/Tacro/MMF
ID 39	71	F	AML	15.12.2021	D	1	0	PTCY/Tacro/MMF
ID 40	56	F	AML	29.12.2021	A	1	0	PTCY/Tacro/MMF

Tabulka 4. Seznam pacientů – Příbuzní dárce

(Zdroj vlastní)

U celkových CD3+ lymfocytů je statisticky významný rozdíl ve 4. týdnu, 8. týdnu a 12. týdnu, jak je vidět na grafech – Graf 1, Graf 2, Graf 3. Jak můžeme vidět, rozpětí hodnot v jednom časovém bodě je sice veliké, ale rozdíl je statisticky významný.

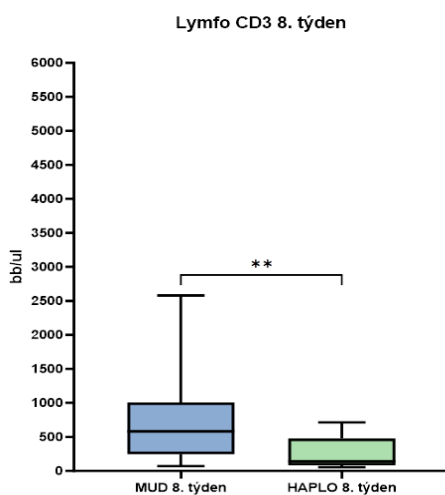
Zejména ve 4. týdnu můžeme pozorovat větší rozdíly v hodnotách mez MUD a HAPLO ($p \leq 0,001$). Tuto skutečnost můžeme připsat imunosupresi použité u HAPLO transplantovaných pacientů (cyklofosfamid).



Graf 1. Porovnání lymfocytů ve 4. týdnu

(Zdroj vlastní)

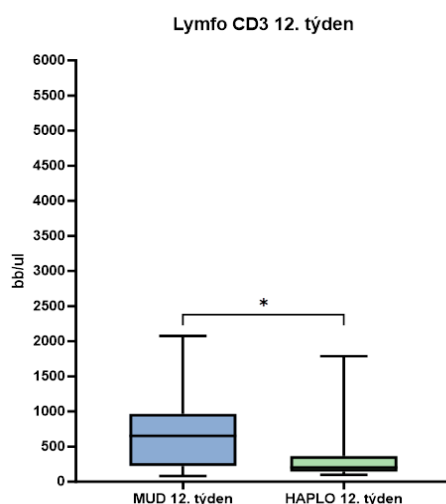
Na grafu 2. zobrazující 8. týden můžeme vidět mírné zvýšení hodnot u MUD transplantovaných pacientů oproti 4. týdnu, zatímco u HAPLO transplantovaných pacientů pozorujeme rychlejší nárůst počtu CD3+ lymfocytů ($p \leq 0,01$). Hodnoty u HAPLO jsou však stále nižší než u MUD transplantovaných pacientů, což nám potvrzuje pomalejší rekonstrukci lymfocytů.



Graf 2. Porovnání lymfocytů v 8. týdnu

(Zdroj vlastní)

Ve 12. týdnu (Graf 3) již pozorujeme větší rozpětí hodnot u HAPLO transplantovaných pacientů, ale stále je zde znatelný rozdíl hodnot mezi MUD a HAPLO pacienty ($p \leq 0,05$).



Graf 3. Porovnání lymfocytů ve 12. týdnu

(Zdroj vlastní)

Od 6. měsíce pozorujeme u HAPLO pacientů významný nárůst počtu CD3+ lymfocytů, což vede normalizaci jejich hladiny v periferní krvi. Od 6. měsíce již nejsou rozdíly mezi MUD a HAPLO statisticky významné.

Podobný trend vývoje můžeme pozorovat u Tc-lymfocytů, kde ve 4. týdnu 8. týdnu a 12. týdnu dosahují CD3+8 lymfocyty velmi nízkých hodnot u HAPLO pacientů. U MUD pacientů pozorujeme ve 4. týdnu poměrně vysoký rozptyl hodnot, v 8. a 12. týdnu pak takovýto rozptyl již není. Od 6. do 12. měsíce pak pozorujeme nárůst hodnot u HAPLO pacientů a tím i normalizaci hodnot, zatímco MUD pacienti si normální hodnoty drží od 8. týdne. (Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body)

V případě Th-lymfocytů nenalzáme žádný statisticky významný rozdíl. Z grafů můžeme vyčíst, že od 6. měsíce můžeme pozorovat větší množství Th-lymfocytů u MUD pacientů. Pouze ve 12. měsíci můžeme nalézt statisticky významný rozdíl, kde jsou hodnoty Th-lymfocytů vyšší u MUD pacientů. (Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body)

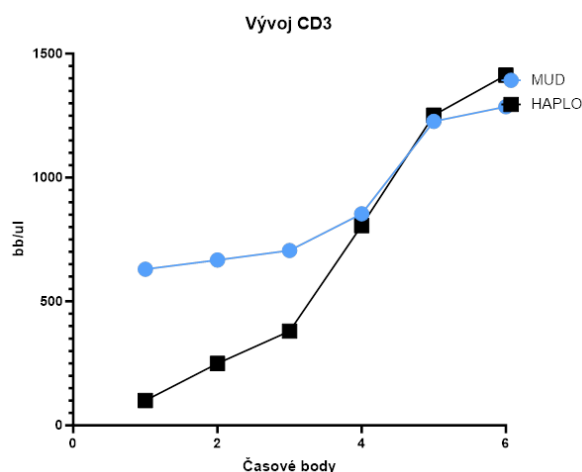
U B-lymfocytů pozorujeme pomalou rekonstituci, která nedosahuje normálních hodnot po dobu sledování našich pacientů. Můžeme však pozorovat rozdíly mezi MUD a HAPLO pacienty, kde je do 6. měsíce statisticky významný rozdíl. U MUD pacientů

dosahujeme vyšší hodnot což může významně ovlivnit humorální imunitu pacienta. (Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body)

Jedinou populací, která dosahuje normálních hodnot již ve 4. týdnu jsou NK-buňky. U této populace nenalézáme statisticky významný rozdíl mezi MUD a HAPLO. (Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body)

Na následujících grafech je vidět jaká byla kinetika vývoje jednotlivých populací v čase. Hodnoty použité v grafech jsme získali provedením deskriptivní analýzy zdrojových dat, ze které jsme použili průměry pro každý časový bod.

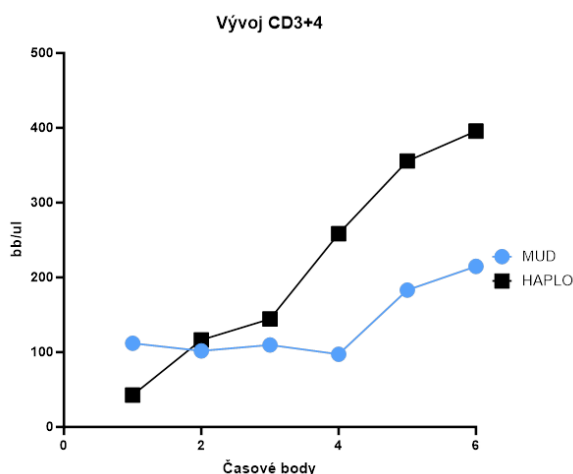
Na grafu celkových CD3+ lymfocytů si můžeme ověřit, že kinetika vývoje lymfocytů je podobná u obou skupin pacientů. Zde je názorně vidět, že se lymfocyty začínají časněji rekonstituovat u MUD pacientů. Na základě tohoto grafu můžeme usoudit, že použití imunoprese PTCy/Tacro/MMF oslabí buněčnou imunitu výrazněji než při použití CsA/MTX/ATG imunoprese



Graf 4. Porovnání vývoje lymfocytů

(Zdroj vlastní)

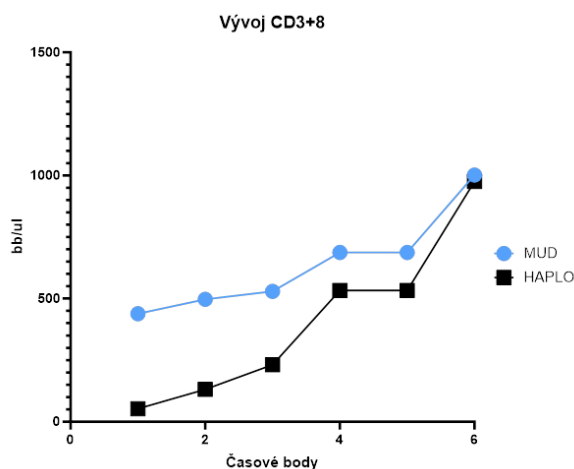
Na základě grafu pro vývoj Th-lymfocytů, můžeme usoudit, že zde kinetika rekonstituce je lepší u HAPLO pacientů. V souvislosti s vyhodnocením grafů porovnávající jednotlivé časové body je pozoruhodné že i přes podobné hodnoty Th-lymfocytů v periferní krvi je takovýto rozdíl v kinetice. (komentář viz dále)



Graf 5. Porovnání vývoje Th-lymfocytů

(Zdroj vlastní)

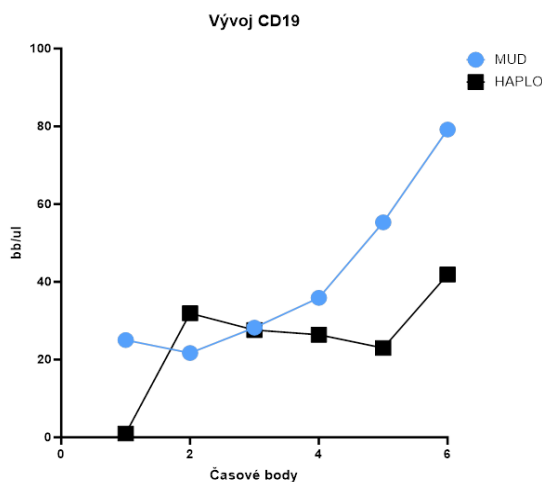
Z grafu Tc-lymfocytů, je opět zřetelné, že u MUD pacientů dochází k rychlejší rekonstituci těchto buněk a tím jsou MUD pacienti lépe chráněni před hrožícími infekcemi. Také můžeme říci, že kinetika rekonstituce této populace je podobná u obou sledovaných souborů pacientů.



Graf 6. Porovnání vývoje Tc-lymfocytů

(Zdroj vlastní)

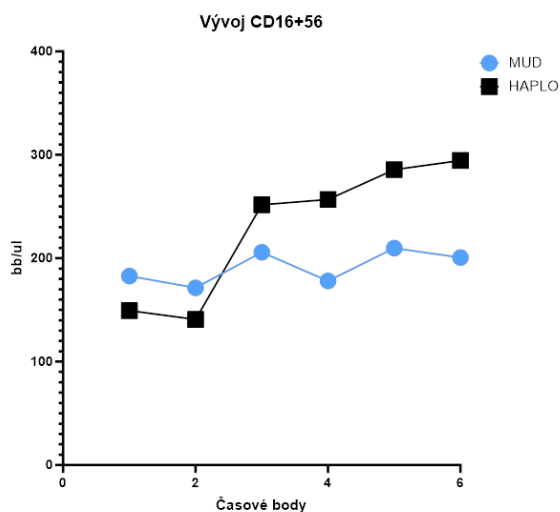
Na grafu pro vývoj B-lymfocytů si můžeme všimnout, že kinetika rekonstituce HAPLO transplantovaných pacientů je odlišná od kinetiky MUD transplantovaných pacientů. Jak je již známé z teoretické části doba rekonstituce B-lymfocytů je velice dlouhá a nám se podařilo zachytit pouze její část. I přes tuto skutečnost je možné říci, že použití CsA/MTX/ATG imunosuprese má lepší vliv na začátek rekonstituce.



Graf 7. Porovnání vývoje B-lymfocytů

(Zdroj vlastní)

Z grafu pro kinetiku NK-buněk je patrné, že na rekonstituci nemá vliv použitá imunoprese. Kinetika MUD a HAPLO je dosti podobná. NK-buňky u HAPLO pacientů dosahují vyšších hodnot již v šestém týdnu, od kterého si již drží relativně stabilní hodnotu. (komentář viz. dále)



Graf 8. Porovnání vývoje NK-buněk

(Zdroj vlastní)

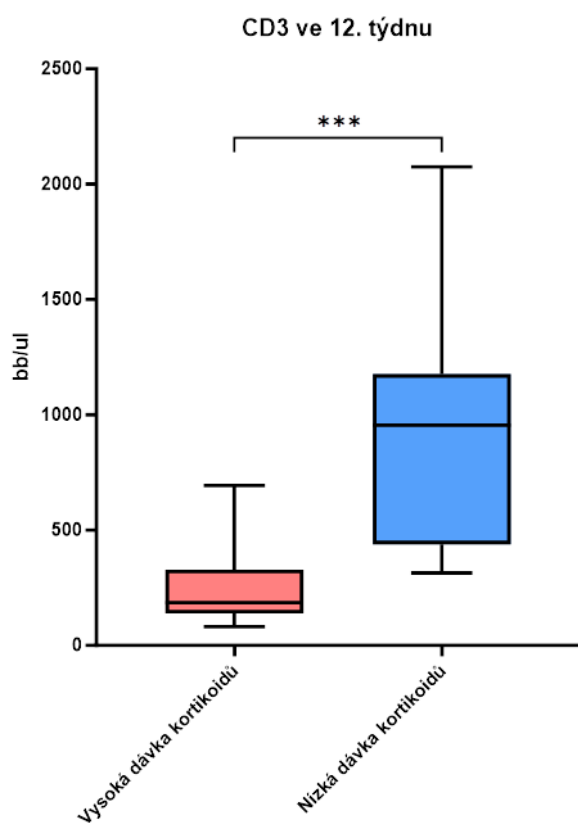
Pomocí Kruskal-Wallisova testu jsme poté určily statistickou významnost vývoje jednotlivých populací v čase. Z této analýzy jsme zjistili, že ve všech populacích je statisticky významný vývoj u obou populací, pouze u NK-buněk je statisticky významný vývoj pouze u HAPLO pacientů.

Jak můžeme pozorovat buněčná imunita se vyvíjí lépe u MUD pacientů než u HAPLO pacientů. Výjimka, kterou nacházíme u Th-lymfocytů a NK-buněk může být způsobená výrazně menším počtem pacientů ve skupině HAPLO pacientů a zároveň poměrným rozptylem hodnot v této skupině.

11.2 Porovnání souborů dle množství podávaných kortikoidů

Tuto analýzu jsme prováděli pouze u skupiny MUD transplantovaných pacientů. Dle získaných dat jsme provedli statistickou analýzu pomocí Mann-Whitneyho testu.

Pacienty jsme rozdělili na dvě skupiny: pacienty, kterým nebyly kortikoidy podávány vůbec, nebo jen v nízkém množství (do 0,2 mg/kg hmotnosti) a pacienty, kterým byly podávány vyšší dávky kortikoidů (nad 0,2 mg/kg hmotnosti). Pro tuto analýzu jsme zvolili data z 12. týdne, ale zohledňovali jsme hodnoty i z 8. týdne. Jedná se o tři pacienty, které jsme do skupiny přiřadili, protože množství kortikoidů byly v 8. týdnu vyšší než 0,2 mg/kg hmotnosti.



Graf 9. Porovnání vlivu kortikoidů na lymfocyty

Jak je vidět na následujícím grafu hodnoty CD3 leukocytů jsou u pacientů, kterým byly podávány nízké dávky kortikoidů, vyšší než u pacientů s vyššími dávkami kortikoidů ($p \leq 0,001$).

Stejný trend se vyskytuje i u ostatních populací lymfocytů, kromě NK-buněk. U NK-buněk jsme neprokázali vliv podávání kortikoidů na vývoj buněčné imunity. Naopak u populací Th-lymfocytů, Tc-lymfocytů a B-lymfocytů můžeme říci, že podávání kortikoidů má negativní vliv na rekonstituci imunity.

Grafy pro porovnání vlivu kortikoidů na Th-lymfocyty, Tc-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky jsou uvedeny v příloze.

DISKUZE

Cílem této bakalářské práce je porovnání rekonstituce imunity u souborů pacientů transplantovaných s nepříbuznými a haploidentickými dárci, a porovnání rekonstituce u pacientů s nižšími a vyššími dávkami kortikoidů.

Pacienti, kteří podstupují alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk, jsou vystavení imunoablativní předtransplantační přípravě, která umožňuje přihojení transplantátu a zároveň užívají imunosupresivní léky snižující riziko vzniku GvHD. Jejich imunita, buněčná i humorální, je v časném potransplantačním období výrazně suprimovaná a postupně se v průběhu měsíců rekonstruuje. Rychlost její obnovy je výrazně ovlivněna různými peritransplantačními parametry (typ dárce, transplantátu, imunosuprese atd.) a také případným rozvojem GvHD a jeho léčbou.

Kinetika jednotlivých buněčných subpopulací je rozdílná, kdy jako první se zpravidla normalizují NK-buňky, zatímco hladina T- a zejména B-lymfocytů zůstává delší dobu snižena a normalizuje se až v řádu měsíců.

V našem souboru jsme se soustředili na analýzu kinetiky rekonstituce lymfocytárních subpopulací po transplantaci ode dne +14 do 12 měsíce po transplantaci. Zároveň jsme porovnávali rozdíly v této kinetice mezi nepříbuzenskými a haploidentickými dárci respektive mezi různými typy použité imunosuprese (ATG vs. potransplantační cyklofosfamid). Hladiny lymfocytárních subpopulací se mezi jednotlivými timepointy postupně zlepšovaly. Absolutní hodnoty subpopulací dosahovaly vyšších hodnot a rychleji se obnovovaly u MUD dárců, naopak potransplantačním cyklofosfamid u HAPLO dárců se projevil výraznějším imunosupresivním efektem opoždujícím imunitní rekonstituci (pro populaci Th-lymfocytů a NK-buněk byla kinetika opačná, ale toto zjištění může být ovlivněno relativně malým počtem měřeným hodnot u HAPLO dárců v pozdějších timepointech). Celkově se potransplantačním cyklofosfamid potvrdil jako významný faktor zpozdující imunitní rekonstituci. Díky tomu jsou pacienti transplantovaní s haploidentickým dárcem ve větším riziku infekčních komplikací v potransplantačním období.

Dalším významným faktorem, který může ovlivnit rychlost imunitní rekonstituce po alogenní transplantaci, je kortikoterapie používaná pro léčbu GvHD. Porovnání hladin lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s vyšší a nižší dávkou kortikoidů (nad a pod 0,2

mg/kg tělesné hmotnosti ve 12. týdnu s ohledem na 8. týden) prokázalo pomalejší rekonstituci u nemocných na vyšších dávkách kortikoidů. Tito pacienti jsou taktéž ohroženi vyšším rizikem vzniku infekčních komplikací včetně oportunních infekcí, reaktivace CMV atd. a proto je dávka kortikoidů redukována tak rychle, jak to klinické projevy GvHD umožňují.

Prokázali jsme tedy, že kinetika imunitní rekonstituce po alogenní transplantaci je výrazně variabilní a je ovlivněna mimo jiné typem dárce, resp. použitou imunosupresivní přípravou a také výskytem GvHD a s ní související kortikoterapií. Vzhledem k tomu, že dostatečně rychlá imunitní rekonstituce a obnovení plně funkčního imunitního systému má zásadní význam pro protiinfekční i protinádorovou imunitu, tedy prevenci infekčních komplikací a relapsů, je důležité parametry buněčné imunity v pravidelných intervalech monitorovat. Nedostatečné hodnoty lymfoidních subpopulací se pak zohledňují v nastavení kratších intervalů ambulantních kontrol, podávání profylaktické antiinfekční terapie, proaktivním managementu teplot/infekcí atd. To znamená, že imunitní monitorace je důležitým aspektem potransplantační péče, který má vliv na snižování mortality a dosažení co nejlepšího výsledku transplantace.

ZÁVĚR

První část této bakalářské práce byla věnována teoretickým znalostem o hematopoetických kmenových buňkách, buněčné imunitě a transplantacím, které jsou zásadní pro rekonstituci imunity. Byly popsány zdroje kmenových buněk používaných pro transplantace a jejich získávání. Jedním z důležitých témat bylo také vyhledávání vhodného dárce a HLA kompatibility. Hlavním cílem teoretické části bylo popsat samotnou rekonstituci buněčné imunity.

V praktické části jsme pak analyzovali soubor pacientů po alogenní transplantaci HSC, u kterých jsme zjišťovali průběh rekonstituce buněčné imunity a její rozdíly u nepříbuzenských a haploidentických transplantací. Popsali jsme také přípravu vzorků a postup práce při získávání hodnot na průtokovém cytometru a také statistické metody použité pro analýzu dat. Pozorovali jsme vybrané subpopulace lymfocytů – celkové CD3+ lymfocyty, Th-lymfocyty, Tc-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky, v časových bodech 4. týdnů, 8. týdnů, 12. týdnů, 6. měsíců, 9. měsíců a 12. měsíců. Dále jsme pak hodnotili vliv podávaného množství kortikoidů na rekonstituci buněčné imunity v souboru pacientů transplantovaných od nepříbuzného dárce.

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk je kurativní metodou pro řadu nádorových i nemaligních onemocnění. Její provedení je spojené s výrazným defektem imunity, která se postupně rekonstruuje v potransplantačním období a hraje zásadní roli v proti-infekční a protinádorové imunitě. Sledování buněčné imunity a její obnovy po transplantaci má zásadní význam pro prevenci a řešení potransplantačních komplikací a snižování mortality spojené s transplantací

SEZNAM LITERATURY

CARRERAS, Enric; DUFOUR, Carlo; MOHTY, Mohamad a KRÖGER, Nicolaus, 2009. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. online. In: KREJČÍ, M.; MAYER, J. a VORLÍČEK, J. *Transplantace krvetvorných buněk*. 55. Publisher: Vnitřní lékařství, s. 689. ISBN 978-3-030-02277-8 978-3-030-02278-5. ISSN 0042-773X, 1801-7592. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5>. [cit. 2023-08-02].

CETKOVSKÝ, Petr; MAYER, Jiří; STARÝ, Jan a HRIČINOVÁ, Mariana, 2016. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. online. První vydání. Galén. ISBN 978-80-7492-267-1. [cit. 2023-09-04].

COOKE, Kenneth; LUZNIK, Leo; SARANTOPOULOS, Stefanie; HAKIM, Frances; JAGASIA, Madan et al., 2016. *Biologie chronického onemocnění štěpu proti hostiteli*. online. In: PubMed Central (PMC). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020045/>. [cit. 2024-02-23].

GURUSAMY, Narasimman; ALSAYARI, Abdulrhman; RAJASINGH, Sheeja a RAJASINGH, Johnson; TEFLOW, David B. (ed.), 2018. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. online. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1. Academic Press, s. 1-22. ISBN 9780128162361. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117318301121>. [cit. 2023-09-10].

Hematopoietic stem cell in its place, 2006. online. Nature. ISSN 333-337 (2006). Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/ni1331>. [cit. 2023-08-04].

CHOTTOVÁ DVOŘÁKOVÁ, Magdaléna a MISTROVÁ, Eliška, 2018. *Fyziologie krve a základy imunity*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3833-1.

JÍLEK, Petr, 2014. *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. online. In: Bookport. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/imunologie-2290/>. [cit. 2024-02-20].

KERENYI, M. A., 2016. LT-HSC Methylcellulose Assay. online. In: *Nenalezený vydavatel*. Dostupné z: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1067>. [cit. 2023-09-10].

KREJČÍ, M.; MAYER, J.; ADAM, Z. a VORLÍČEK, J., 2009. *Transplantation of haematopoietic cells*. In: Časopis vnitřní lékařství. Dostupné z:

http://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-200909-0008_transplantation-of-haematopoietic-cells.php. [cit. 2023].

KREJČÍ, M.; MAYER, J. a VORLÍČEK, J., 2009. *Transplantace krvetvorných buněk*. online. Publisher: Vnitřní lékařství. ISBN 978-3-030-02277-8 978-3-030-02278-5. ISSN 0042-773X, 1801-7592. Dostupné z: <https://doi.org/DOI: 10.1007/978-3-030-02278-5>. [cit. 2023-08-02].

MARSH, BSC PHD, Steven GE, 2023. *Nomenklatura HLA @ hla.alleles.org*. online. In: Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>. [cit. 2024-03-13].

MOSAAD, Youssef a SA, Sasha, 2014. Hematopoietic stem cells: An overview. online. In: *ScienceDirect*. 3. Elsevier Inc. ISSN 1473-0502). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.10.016>. [cit. 2023-09-07].

MUDR. JANA AMLEROVÁ PH.D., , 2020. *Imunologie*. online. In: Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/187/page00.html>. [cit. 2024-02-20].

OGONEK, Justyna; KRALJ JURIC, Mateja; GHIMIRE, Sakhila; VARANASI, Pavankumar; HOLLER, Ernst et al., 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. online. *Frontiers in Immunology*. roč. 7, č. 7. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00507>. [cit. 2024-03-17].

PENKA, Miroslav a TESAŘOVÁ, Eva, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

PENKA, Miroslav a TESAŘOVÁ, Eva, 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. online. In: On-line knihovna pro každého | Bookport - Hematologie a transfuzní lékařství II. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/hematologie-a-transfuzni-lekarstvi-ii-1612731/#>. [cit. 2024-02-20].

PETR CETKOVSKÝ, Jiří, 2016. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. Galén.

PROF. MUDR. MICHAEL DOUBEK, Ph.D., 2017. *Linkos - pacient a rodina*. Linkos. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/transplantace-krvetvornych-bunek/typy-darci-a-indikace-k-transplantacim/>. [cit. 2023].

PROFESSOR PAUL KNOEPFLER, Ph.D., 2018. *Kmenové buňky se neztratily v překladovém projektu: Nyní až 33 jazyků s češtinou.* online. In: The Niche. Dostupné z: <https://ipscell.com/2018/08/stem-cells-not-lost-in-translation-project-now-up-to-33-languages-with-czech/>. [cit. 2023-09-10].

TOMÍŠKA, CSC, doc. MUDr. Miroslav, 2012. *Vysokodávková léčba a přípravné režimy před transplantací krvetvorných buněk.* online. In: Vnitřní lékařství. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2012/07/29.pdf>. [cit. 2024-02-20].

WOLFL, Matthias; QAYED, Muna; BENITEZ CARABANTE, Maria; SÝKORA, Tomas; BONIG, Halvard et al., 2021. *Současné profylaxe a léčebné přístupy u akutního onemocnění štěpu proti hostiteli při transplantaci krvetvorných kmenových buněk u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií.* online. In: PubMed Central (PMC). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8771910/>. [cit. 2024-02-23].

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Zdrojová data MUD
- Příloha B – Zdrojová data HAPLO
- Příloha C – Porovnávací grafy mezi MUD a HAPLO pro jednotlivé populace v časových bodech
- Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body
- Příloha E – Porovnávací grafy vlivu kortikoidů
- Příloha F – Povolení o sběru dat ve Fakultní nemocnici Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha A – Zdrojová data MUD

Číslo pacienta	Datum	leuko	lymfoc	3q	4. týden					korticoidy /mg/kg/hmotnosti	Datum	leuko	lymfoc	3q	8. týden					korticoidy /mg/kg/hmotnosti	Datum	leuko	lymfoc	3q	12. týden					korticoidy /mg/kg/hmotnosti
					3+4q	3-8q	19q	16/56q	3+4q						3-8q	19q	16/56q	3+4q	3-8q						19q	16/56q	3+4q	3-8q	19q	
ID 1	11.02.2017	236	1178	715	62	566	34	405	Ano	0,282	11.03.2017	7,3	240	145	114	114	12	77	Ano	0,113	11.04.2017	7,4	1199	964	37	882	19	142	Ano	0,113
ID 2	28.02.2017	5,3	245	188	32	148	1	55	Ano	0,671	28.03.2017	7,5	755	654	118	510	3	99	Ano	0,213	28.04.2017	3,6	454	363	92	256	1	82	Ano	0,148
ID 3	16.09.2017	0,8	1375	798	88	671	46	487	Ano	0,186	16.10.2017	1,9	415	282	25	243	12	112	Ano	0,072	16.11.2017	5,4	822	438	51	361	20	333	Ano	0,093
ID 5	25.05.2018	19,4	935	650	59	530	26	248	Ano	0,295	25.06.2018	8,8	494	289	23	231	19	171	Ano	0,172	25.07.2018	7,3	848	653	51	554	24	132	Ano	0,011
ID 6	09.06.2018	2,8	413	153	63	63	1	148	Ne	0,189	09.07.2018	2,5	761	637	35	566	5	65	Ne	0,172	09.08.2018	3,3	1233	955	100	809	54	189	Ne	0
ID 7	30.06.2018	31,6	657	220	35	146	85	302	Ano	0,182	30.07.2018	2,6	945	582	104	444	16	28	Ano	0,061	30.08.2018	11,9	1376	902	155	688	28	418	Ano	0,044
ID 8	27.07.2018	19,4	1787	1146	222	768	49	516	Ano	0,182	27.08.2018	9,8	1887	1436	100	1211	16	403	Ano	0,091	27.09.2018	11,6	2801	2075	207	1686	28	662	Ano	0,049
ID 9	22.09.2018	8,2	1302	1119	129	951	18	111	Ne	0,157	22.10.2018	6,8	1595	1257	256	909	95	233	Ne	0,114	22.11.2018	6	1170	1343	318	917	123	201	Ne	0
ID 10	11.10.2018	5,8	274	218	45	170	5	45	Ano	0,157	11.11.2018	6,6	1684	1502	174	1290	10	163	Ano	0,13	11.12.2018	6,9	1104	960	159	828	11	99	Ano	0,089
ID 11	19.01.2019	9,2	449	326	85	133	11	106	Ano	0,472	19.02.2019	5,6	1407	1289	118	875	5	90	Ano	0,097	19.03.2019	2,6	1012	891	153	568	7	94	Ne	0
ID 13	16.02.2019	10,4	229	65	11	37	69	82	Ano	0,491	16.03.2019	2,6	166	72	17	46	38	54	Ano	0,251	16.04.2019	7,1	582	176	25	123	37	346	Ano	0,156
ID 14	19.07.2019	8,8	143	26	2	18	27	90	Ano	0,192	19.08.2019	4,7	464	256	68	160	28	173	Ano	0,114	19.09.2019	1,3	436	407	78	278	1	29	Ano	0,005
ID 15	19.07.2019	3,6	401	365	23	311	2	31	Ano	0,18	19.08.2019	2,4	321	261	23	220	1	54	Ano	0,164	19.09.2019	1,3	436	407	78	278	1	29	Ano	0,005
ID 16	11.04.2020	8,1	947	769	230	323	22	111	Ano	0,19	11.05.2020	6,2	1110	870	206	535	19	214	Ano	0,172	11.06.2020	4,74	1692	1091	215	677	20	496	Ano	0,132
ID 17	18.06.2020	16,6	397	224	48	164	10	157	Ano	0,49	18.07.2020	3,31	248	101	24	72	16	129	Ano	0,179	18.08.2020	4,3	230	180	15	160	4	40	Ano	0,238
ID 18	16.11.2020	9,55	168	68	11	57	13	83	Ne	0,531	16.12.2020	6,72	452	237	21	210	38	196	Ano	0,407	16.01.2021	11,25	417	225	26	196	10	161	Ano	0,415
ID 19	13.02.2021	4,54	999	544	187	313	6	259	Ne	0,192	13.03.2021	4,4	1082	735	173	500	38	234	Ne	0,114	13.04.2021	3,71	691	426	100	236	18	195	Ne	0
ID 20	27.02.2021	6,86	1139	697	90	488	10	163	Ne	0,32	27.03.2021	9,55	1601	1144	75	848	10	234	Ne	0,114	27.04.2021	3,71	691	426	100	236	18	195	Ne	0
ID 21	17.04.2021	2,76	591	371	150	115	2	188	Ano	0,32	17.05.2021	3,47	434	276	80	90	2	153	Ano	0,476	17.06.2021	1,36	273	191	63	70	1	77	Ano	0,346
ID 22	21.06.2021	10,93	1202	1059	59	785	12	126	Ano	0,356	21.07.2021	3,47	434	276	80	90	2	153	Ano	0,19	21.08.2021	7,31	1333	1177	48	958	7	232	Ano	0,091
ID 23	21.08.2021	40,21	578	312	27	257	90	160	Ano	0,316	21.09.2021	3,75	805	636	140	488	8	167	Ano	0,18	21.10.2021	3,96	941	693	184	491	7	232	Ano	0,203
ID 24	04.09.2021	1004	5339	5032	958	3591	27	225	Ne	0,34	04.10.2021	7,81	2884	2578	636	1765	108	122	Ne	0,286	04.11.2021	8,25	2001	1606	424	1084	212	123	Ne	0
ID 25	02.10.2021	22,09	433	274	62	102	10	147	Ano	0,34	02.11.2021	9,93	788	293	32	172	11	478	Ano	0,286	02.12.2021	4,42	369	126	16	72	3	273	Ano	0,19
ID 26	06.11.2021	7,76	512	280	85	187	21	177	Ano	0,312	06.12.2021	9,56	439	221	23	191	15	185	Ano	0,158	06.01.2022	7,22	556	314	62	237	7	209	Ano	0,102
ID 27	22.01.2022	8,69	329	139	58	72	28	147	Ano	0,653	22.02.2022	7,87	187	102	26	61	22	73	Ano	0,444	22.03.2022	2,82	172	81	23	53	11	76	Ano	0,312

Tabulka 5. Zdrojová data pro MUD transplantované pacienty

Příloha B – Zdrojová data HAPLO

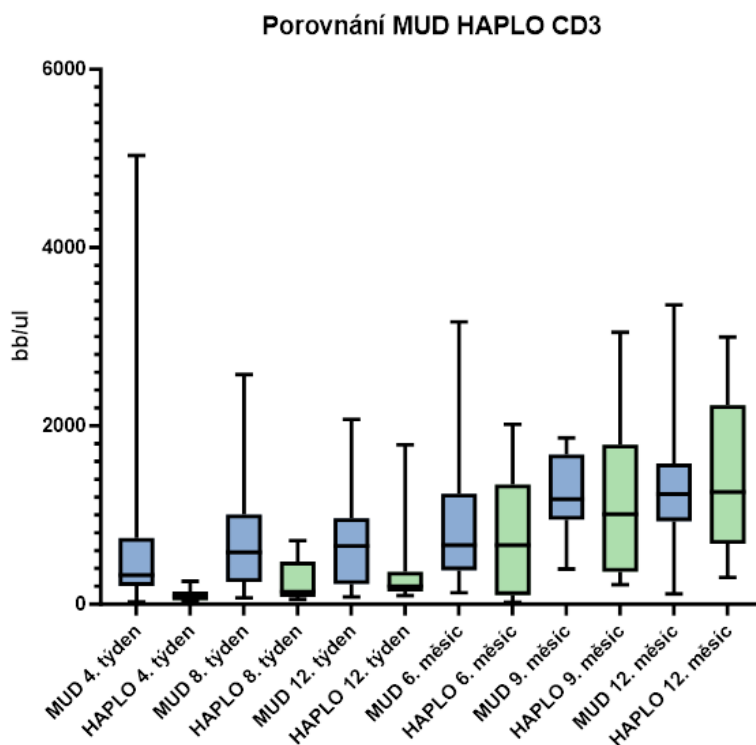
Číslo pacienta	4. týden										8. týden									
	Datum	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti	Datum	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti
ID 28	21.03.2018	6,2	4,7	38	20	19	0	8	Ano	0,992	21.04.2018	7	86,7	71,3	133	580	1	148	Ano	0,281
ID 29	19.01.2019	11	1,73	79	58	20	3	80	Ano	0,195	19.02.2019	0,9	186	82	28	54	2	102	Ano	0,165
ID 30	13.03.2019	0,3	66	51	29	23	0	14	Ano	0,471	13.04.2019	6,6	640	531	76	449	2	90	Ano	0,437
ID 31	24.05.2019	10	244	159	17	142	2	68	Ano	0,197	24.06.2019	4,2	109	63	22	42	1	43	Ano	0,129
ID 32	12.07.2019	0	102	38	22	13	0	55	Ano	0,046	12.08.2019	6,6	277	138	69	69	1	81	Ano	0,061
ID 33	17.11.2019	8,9	60	39	13	27	1	17	Ano	0,46	17.12.2019	6,5	227	84	24	60	1	138	Ano	0,526
ID 34	18.01.2020	1,76	61,2	100	81	16	0	494	Ano	0,35	18.02.2020	1,9	280	55	37	19	0	190	Ano	0,274
ID 35	10.07.2020	2,55	410	151	51	101	2	159	Ne		10.08.2020	7,37	1105	605	493	113	360	Ano	0,131	
ID 36	12.09.2020	13,73	369	100	46	47	0	245	Ano	0,345	12.10.2020	7,32	506	115	62	47	2	370	Ano	0,187
ID 38	27.11.2021	3,51	148	74	51	22	0	61	Ne		27.12.2021	6,61	514	311	279	32	5	169	Ne	
ID 39	15.01.2022	2,15	389	115	12	83	0	237	Ne		15.02.2022	10,74	206	144	128	15	8	53	Ano	0,416
ID 40	29.01.2022	8,71	631	258	112	117	4	354	Ano	0,381	28.02.2022	4,01	383	153	45	95	0	193	Ano	0,263

Datum	12. týdnů										6. měsíce									
	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti	Datum	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti	
21.05.2018	8	2162	1787	349	1431	1	356	Ano	0,283	21.08.2018	4,8	202	21	5	16	0	180	Ano	0,108	
19.03.2019										19.06.2019	4,6	1380	1183	259	910	4	167	Ano	0,038	
13.05.2019	1,9	451	354	60	295	2	93	Ano	0,245	13.08.2019	3,5	792	424	145	278	1	330	Ano	0,085	
24.07.2019										24.10.2019	6,1	1017	899	152	677	10	105	Ano	0,054	
12.09.2019	1,9	301	97	51	41	5	116	Ano	0,023	12.12.2019										
17.01.2020	4,5	557	116	34	83	1	433	Ne		17.04.2020	2,8	313	95	35	59	0	193	Ne		
18.03.2020	10,5	444	200	112	85	3	216	Ano	0,278	18.06.2020	4,95	304	103	66	35	0	186	Ano	0,103	
10.09.2020	5,34	765	314	220	92	250	166	Ano	0,174	10.12.2020	5,7	2438	2016	454	1500	191	227	Ano	0,085	
12.11.2020	7,63	607	201	88	105	0	394	Ano	0,112	12.02.2021										
27.01.2022	3,32	594	392	296	94	9	155	Ne		27.04.2022	5,36	1546	1129	431	672	52	353	Ne		
15.03.2022	1,86	280	152	139	11	2	125	Ano	0,248	15.06.2022	8,68	2273	1817	902	974	4	439	Ano	0,045	
28.03.2022	2,19	668	191	95	79	3	462	Ano	0,116	28.06.2022	4,09	784	377	136	212	2	388	Ano	0,106	

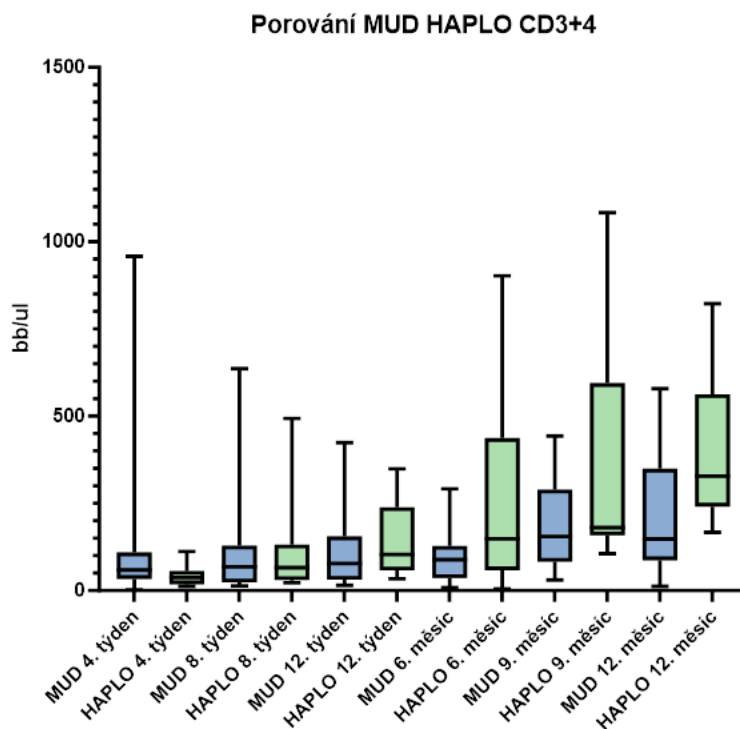
Datum	9. měsíc										12. měsíc									
	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti	Datum	leuko	lymfoc	3q	3+4q	3+8q	19q	16/56q	kortikoidy	mg/kg hmotnosti	
21.11.2018	8,2	2213	1790	168	1320	2	399	Ano	0,058	21.02.2019	7,7	3145	2457	607	1845	15	626	Ano	0,14	
19.09.2019	4,1	866	723	158	556	42	142	Ano	0,022	19.12.2019	7	1117	870	266	590	135	99	Ano	0,104	
13.11.2019										13.02.2020										
24.01.2020	5,5	1170	1008	199	705	6	143	Ano	0,031	24.04.2020	5,7	1237	1079	239	725	5	136	Ano	0,026	
12.03.2020										12.06.2020										
17.07.2020	5,36	490	218	106	103	21	238	Ne		17.10.2020	6,22	559	300	167	113	43	193	Ne		
18.09.2020										18.12.2020										
10.03.2021										10.06.2021	5,04	1721	1558	390	1106	34	116	Ano	0,018	
12.05.2021										12.08.2021										
27.07.2022	6,76	1933	1617	595	962	50	263	Ne		27.10.2022	5,4	1747	1437	430	912	48	240	Ne		
15.09.2022	6,62	3763	3049	1083	1949	34	656	Ano	0,129	15.12.2022	6,11	3679	2997	822	2181	33	644	Ano	0,072	
28.09.2022	5,54	530	362	180	164	6	158	Ano	0,07	28.12.2022	5,49	939	611	244	336	22	302	Ano	0,095	

Tabulka 6. Zdrojová data pro HAPLO transplantované pacienty

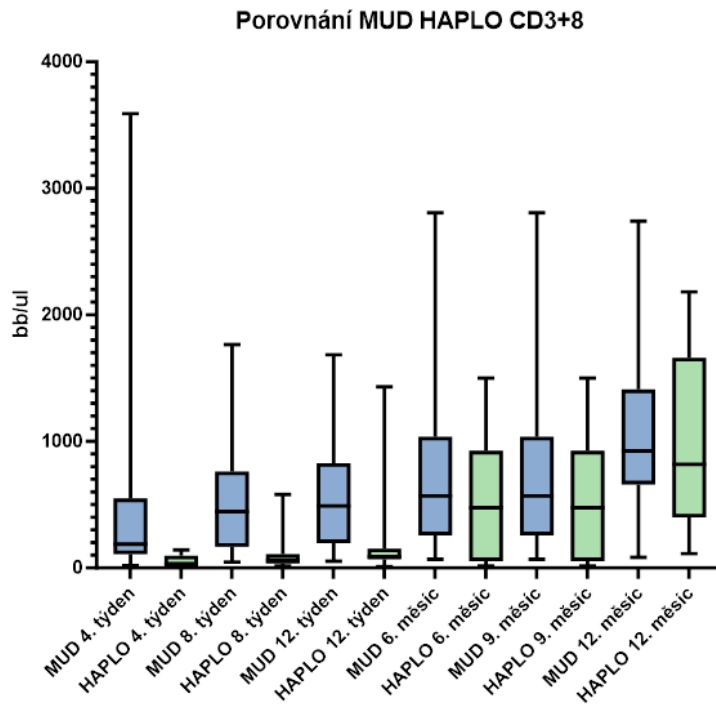
Příloha C – Porovnávací grafy mezi MUD a HAPLO pro jednotlivé populace v časových bodech



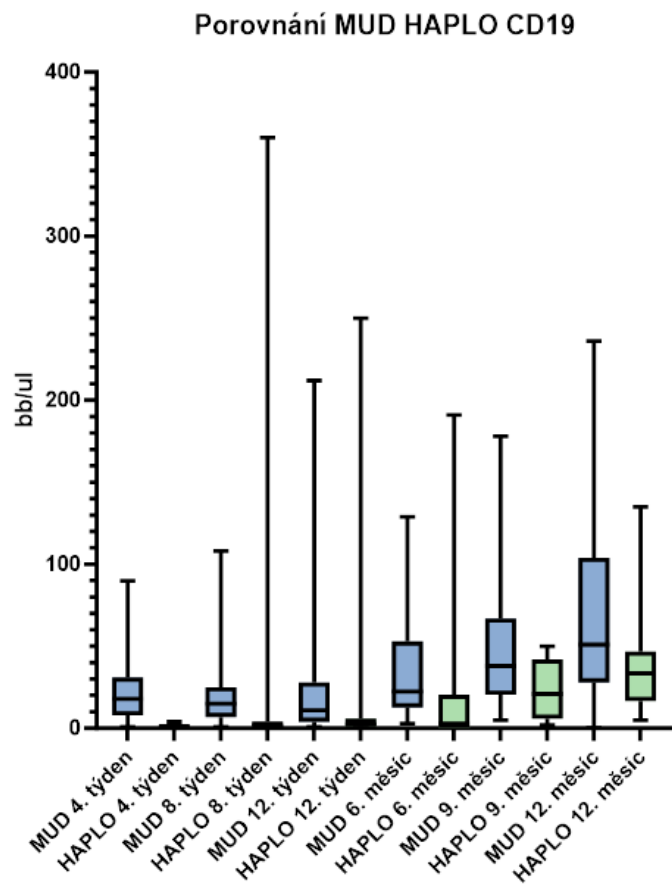
Graf 10. Celkové porovnání lymfocytů



Graf 11. Celkové porovnání Th-lymfocytů

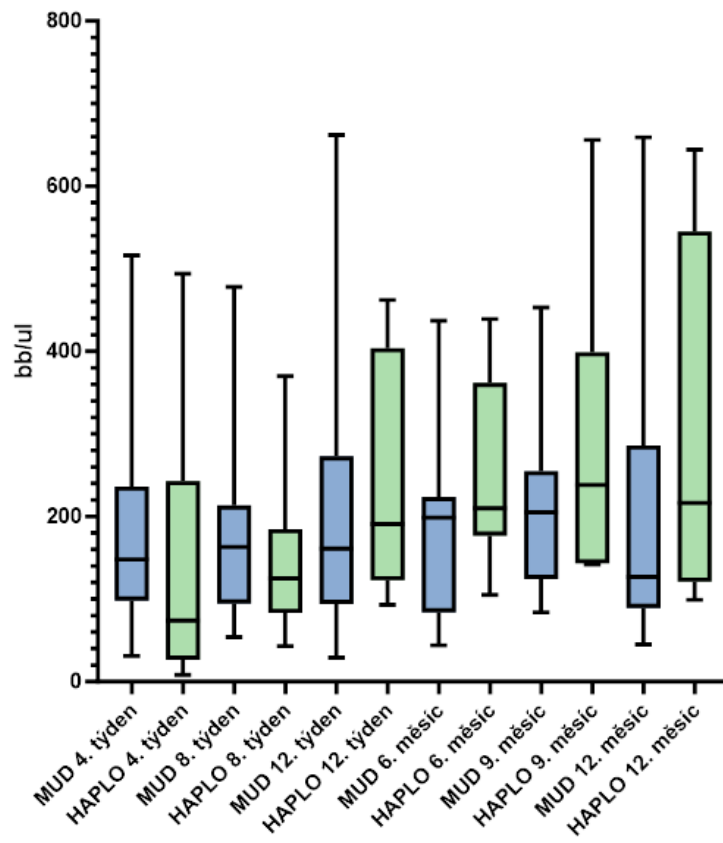


Graf 12. Celkové porovnání Tc-lymfocytů



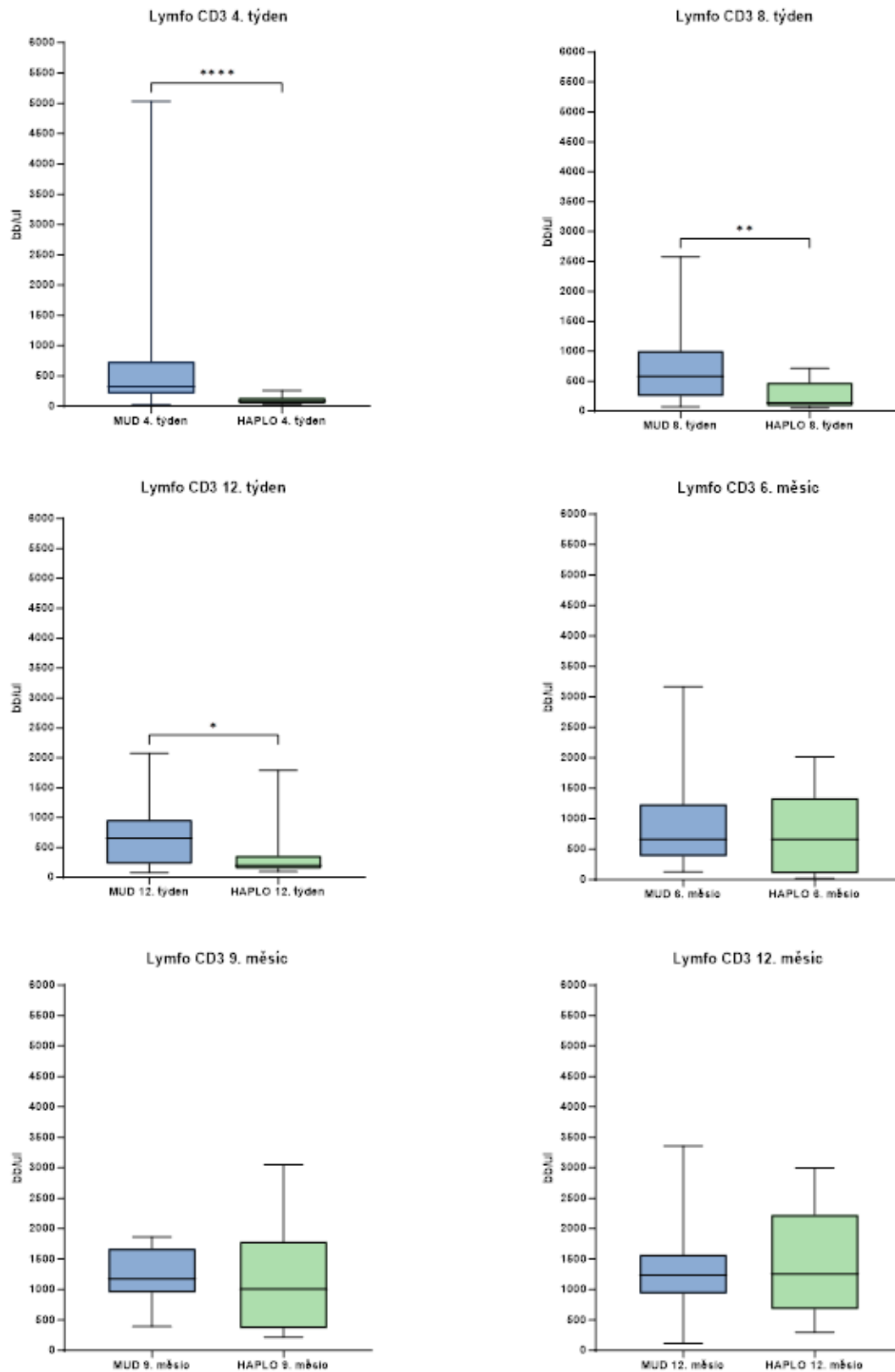
Graf 13. Celkové porovnání B-lymfocytů

Porovnání MUD HAPLO CD16+56

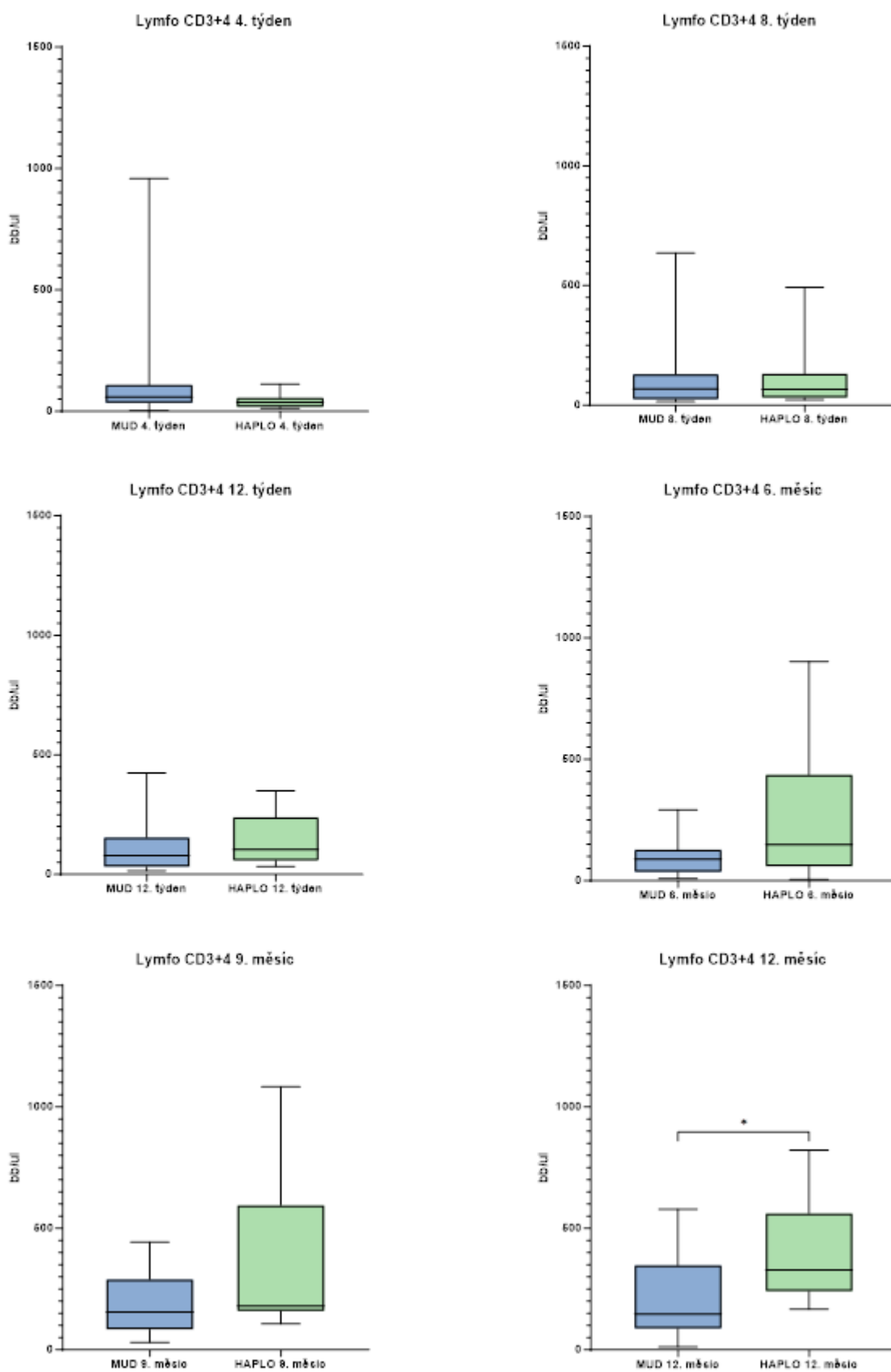


Graf 14. Celkové porovnání NK-buněk

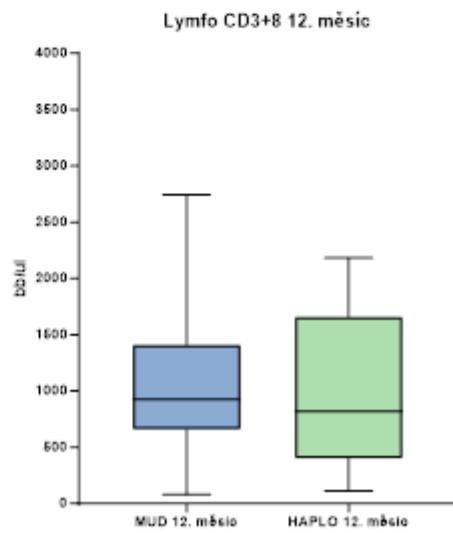
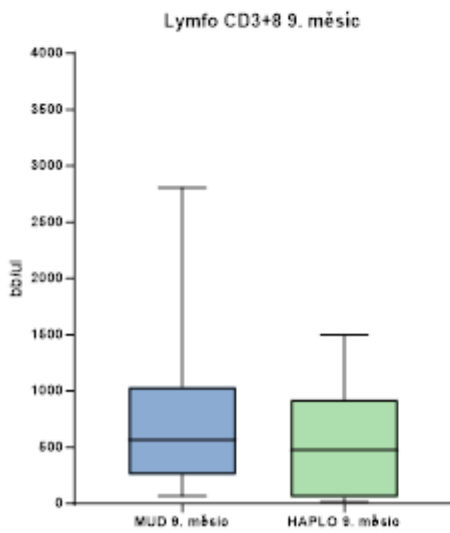
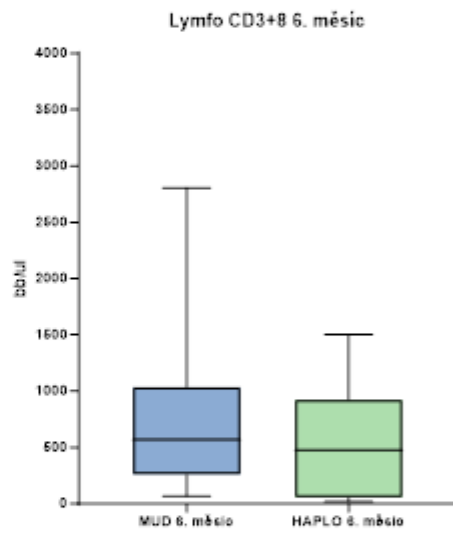
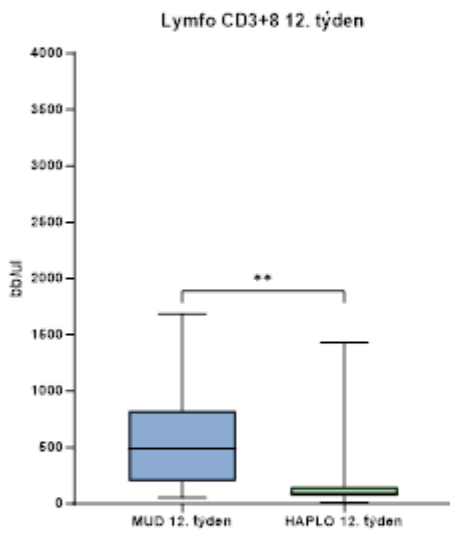
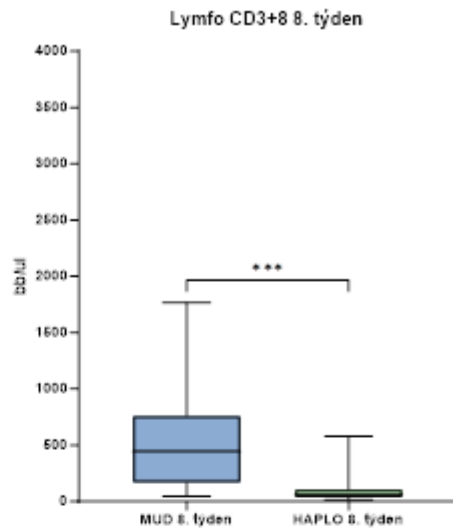
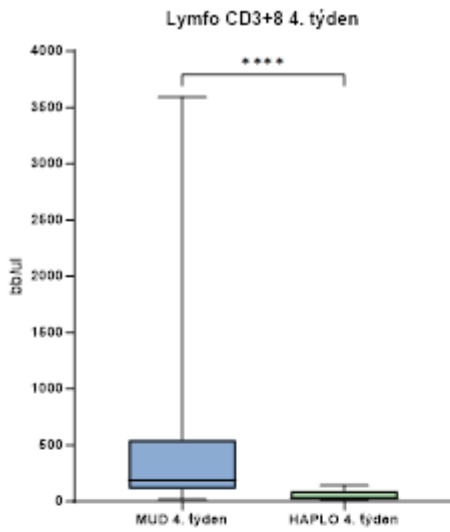
Příloha D – Porovnávací grafy pro jednotlivé časové body



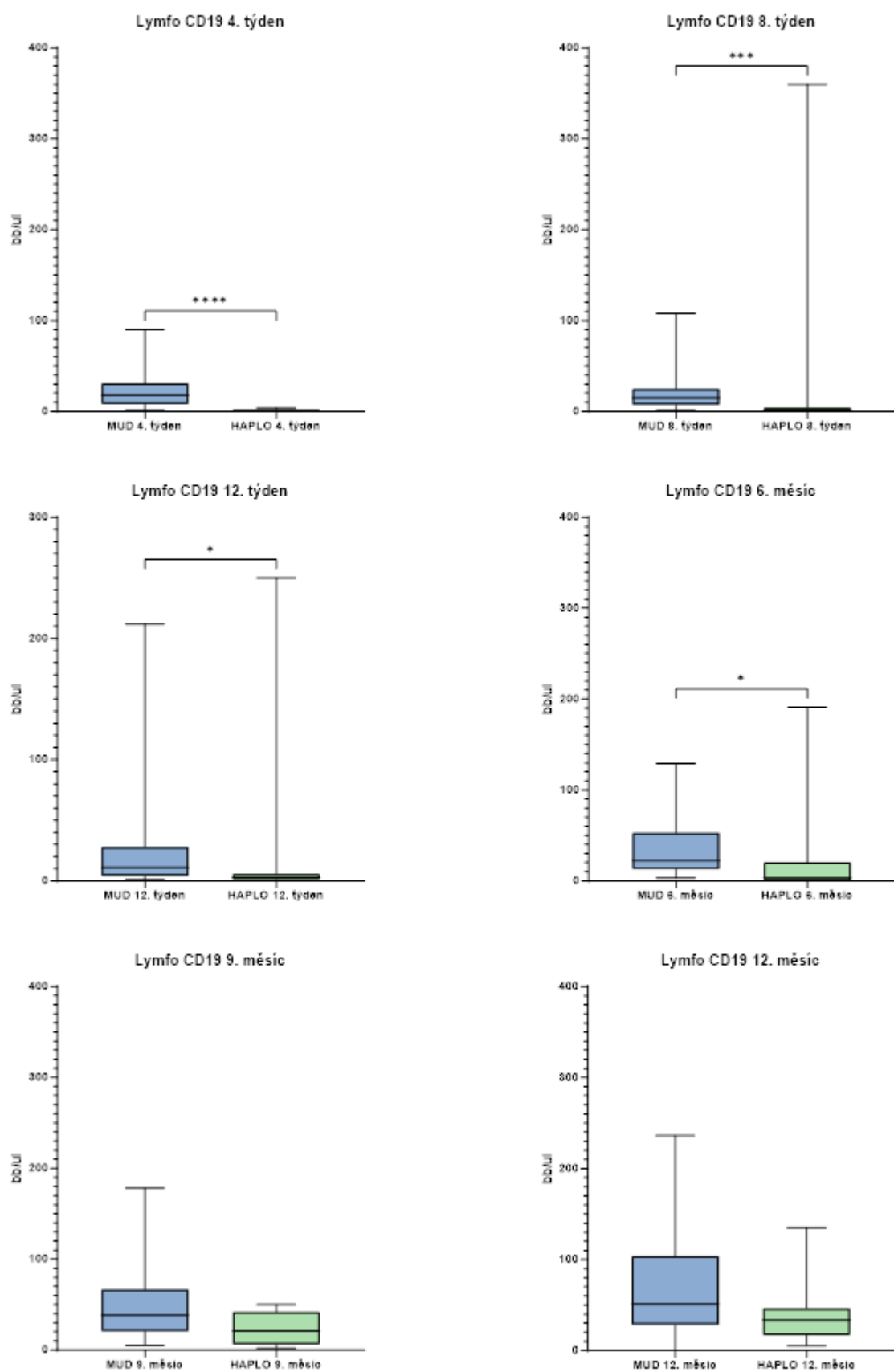
Graf 15. Porovnání lymfocytů v čase



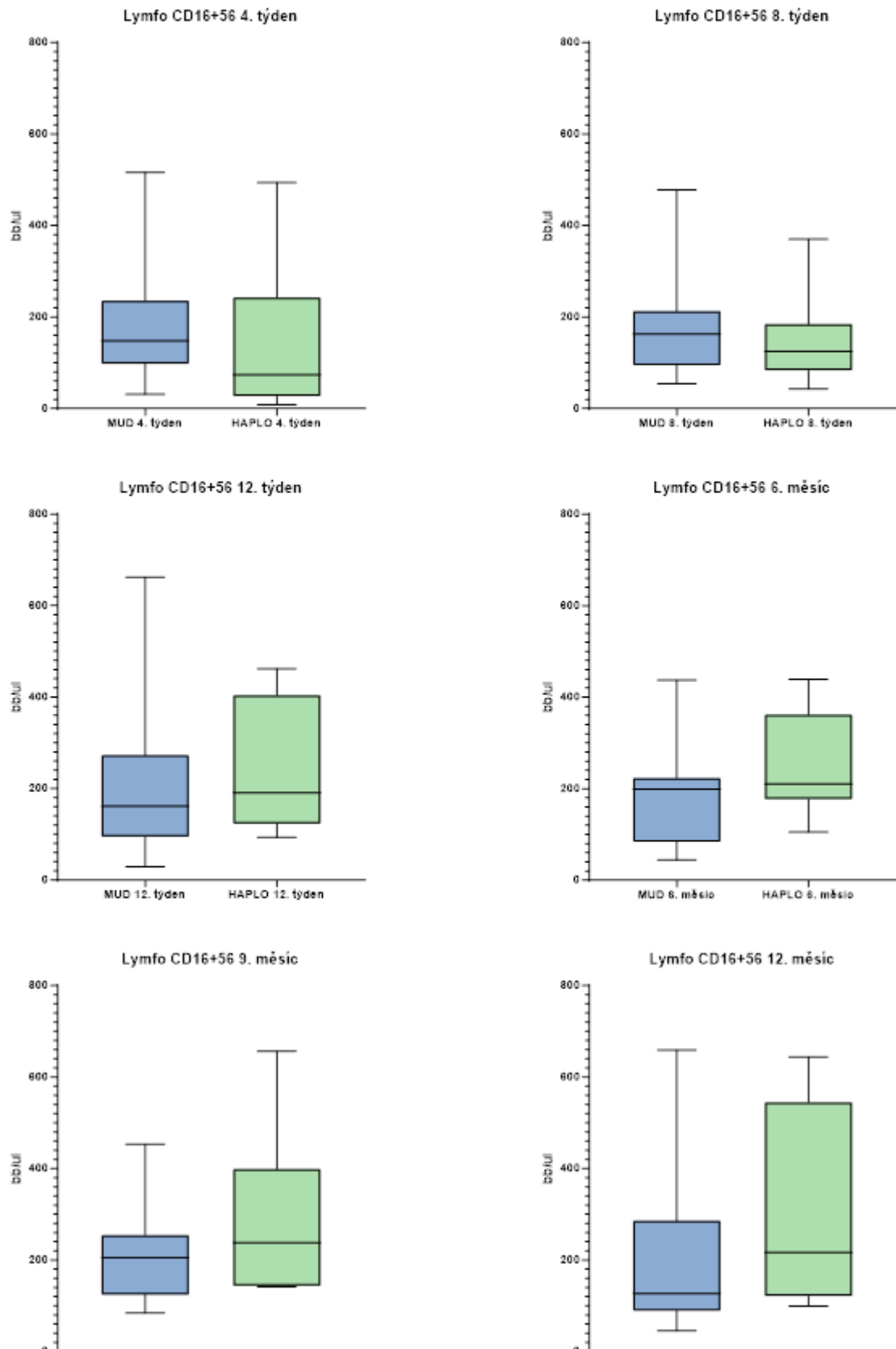
Graf 16. Porovnání Th-lymfocytů v čase



Graf 17. Porovnání Tc-lymfocytů v čase

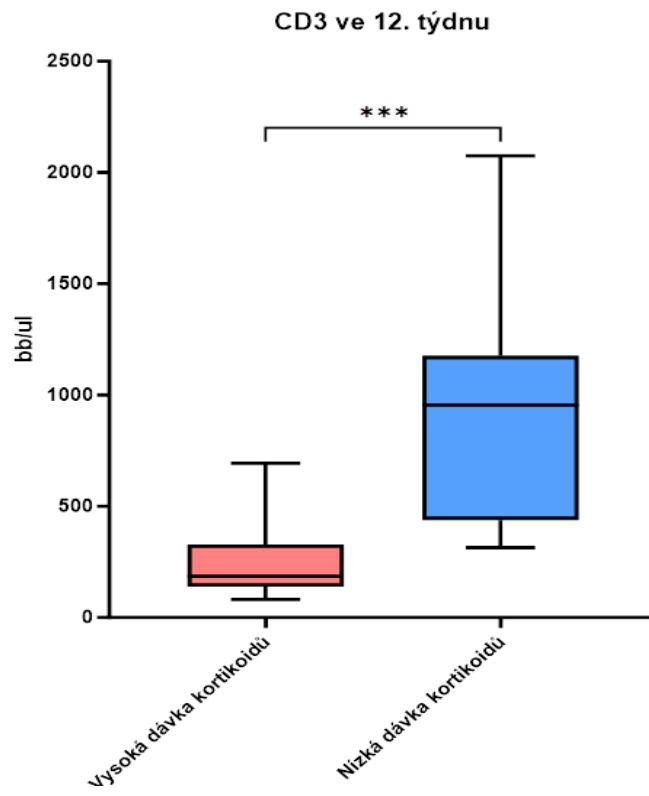


Graf 18. Porovnání B-lymfocytů v čase

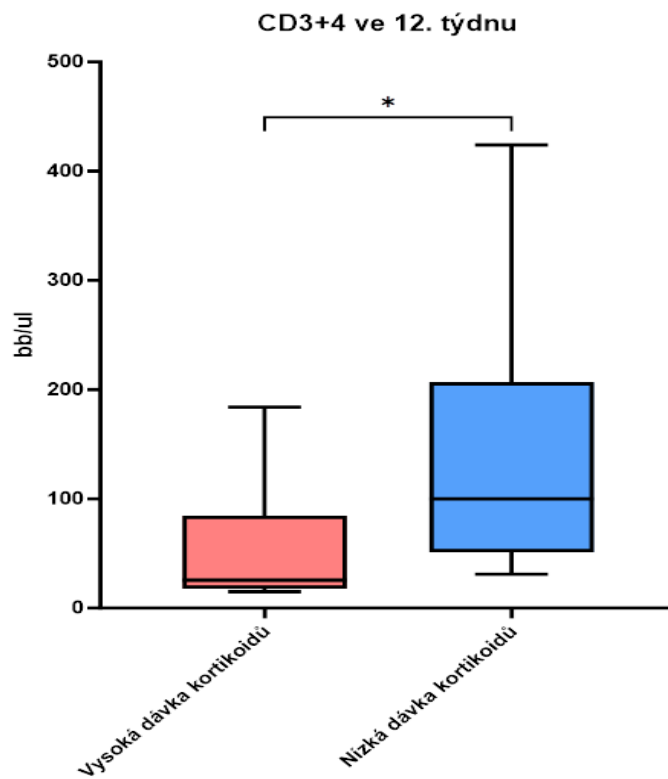


Graf 19. Porovnání NK-buněk v čase

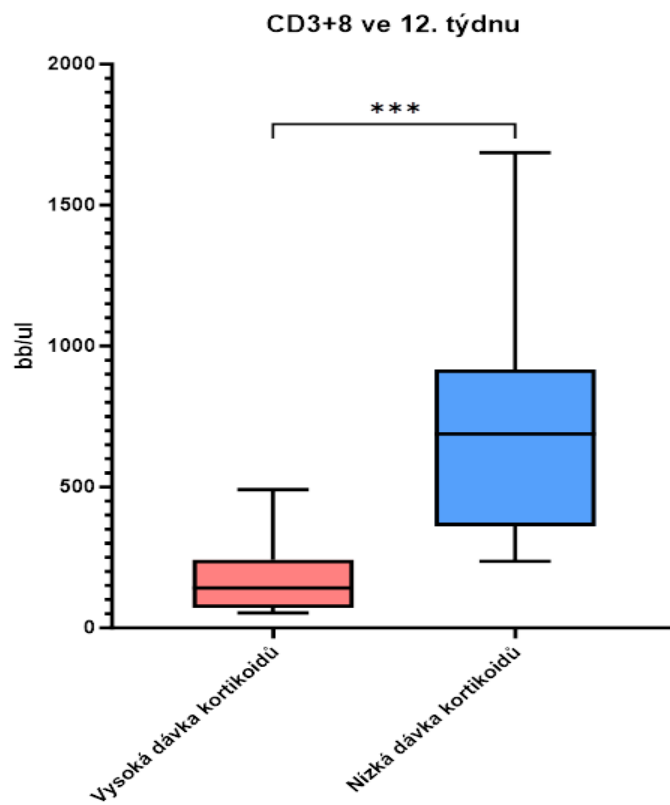
Příloha E – Porovnávací grafy vlivu kortikoidů



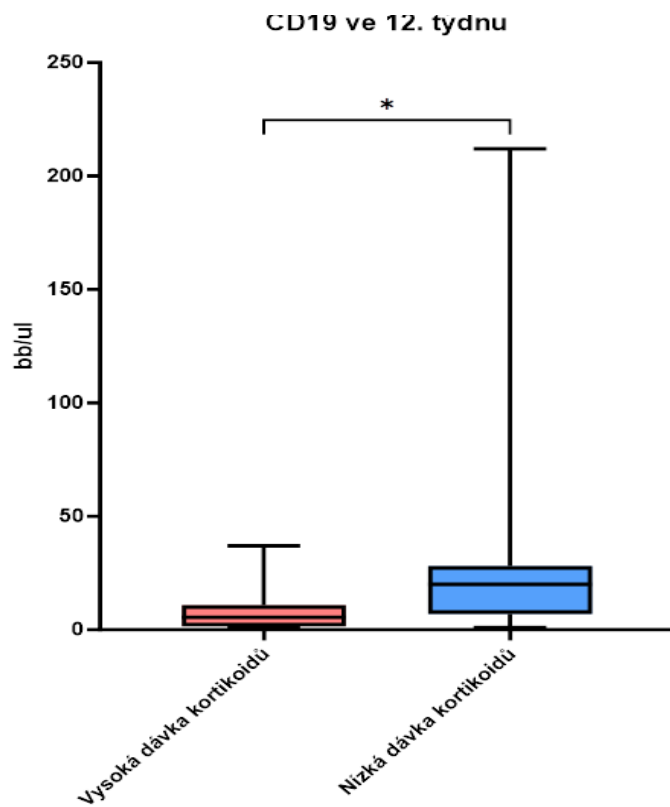
Graf 20. Porovnání vlivu kortikoidů na lymfocyty



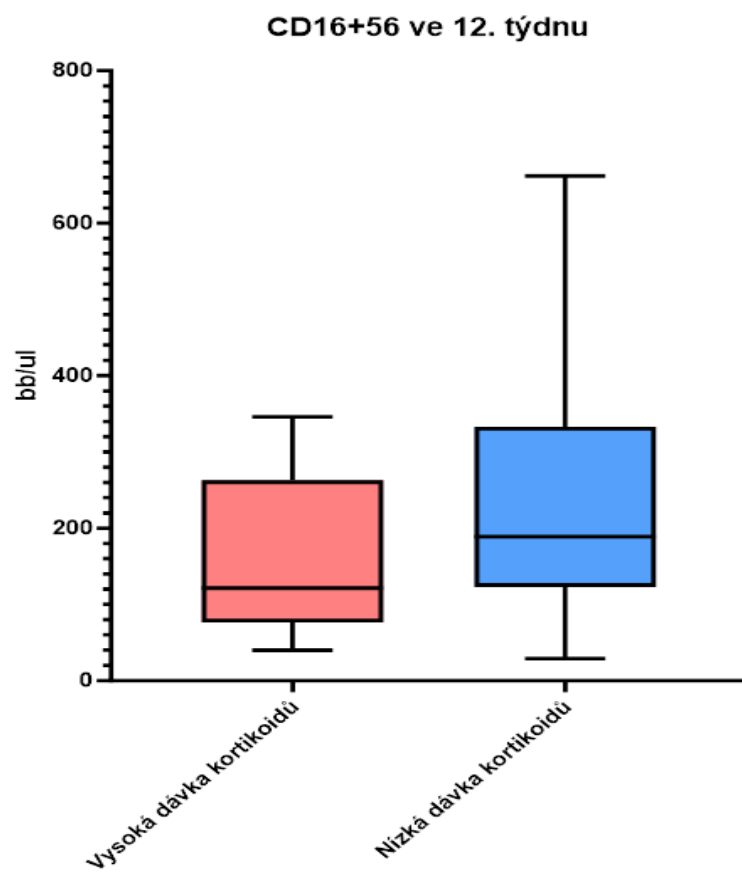
Graf 21. Porovnání vlivu kortikoidů na Th-lymfocyty



Graf 22. Porovnání vlivu kortikoidů na Tc-lymfocyty



Graf 23. Porovnání vlivu kortikoidů na B-lymfocyty



Graf 24. Porovnání vlivu kortikoidů na NK-buňky

Příloha F – Povolení o sběru dat ve Fakultní nemocnici Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
stej Svatobory 88, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669606 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Štěpánka Jansová

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni*

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF Fakultní nemocnice Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním informací o laboratorních metodách / analýzách / výsledcích, používaných na pracovišti *Hematologicko-onkologického oddělení (HOO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem *„Rekonstituce buněčné imunity po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk“*.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní sestra HOO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe na HOO a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **pan Lysák Daniel, doc. MUDr., Ph.D., vedoucí lékař HOO FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

Edvarda Beneše 1128/13, 305 99 Plzeň

Tel: 377 401 663

E-mail: chabrovass@fnplzen.cz

1. 12. 2022