

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni**

**Imunitní monitorace a imunoterapie
po alogenní transplantaci
krvetočných kmenových buněk**

Plzeň 2022

MUDr. Lenka Hejretová

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni**

**Imunitní monitorace a imunoterapie
po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk**

**Immune monitoring and adoptive immunotherapy following
allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**



Disertační práce

Studijní program: Anatomie, histologie a embryologie

**Školitel: doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph. D.
Konzultantka: Mgr. Monika Holubová, Ph. D.**

Plzeň 2022

MUDr. Lenka Hejretová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni, 10. května 2022

MUDr. Lenka Hejretová

ABSTRAKT

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloHSCT) je vysoce specializovaná terapeutická metoda, která je potenciálně kurativní pro řadu hematologických i nehematologických onemocnění. Navzdory kontinuálním pokrokům v transplantační medicíně je prognóza pacientů stále limitována řadou potransplantačních komplikací, z nichž dominují relaps původní malignity a reakce štěpu proti hostiteli (Graft-versus-host disease, GvHD). Ty ovlivňují nejenom přežití pacientů, ale také snižují jejich kvalitu života, proto hledáme nové léčebné modalitty, které by jejich prognózu zlepšily. Jedním z nadějných moderních postupů v léčbě GVHD je podání buněk s imunomodulačním potenciálem (imunoterapie). V řadě evropských center, včetně našeho, jsou pacientům po aloHSCT v indikaci steroid-refrakterní GvHD (SR-GvHD) podávány mesenchymální kmenové buňky (MSC). Novou buněčnou populací se slibým potenciálem potlačit GvHD a zároveň potencovat reakci proti leukémii (Graft-versus-leukemia GvL) jsou invariantní NKT lymfocyty. Zavedení aplikace těchto buněčných populací do klinické praxe musí předcházet řada preklinických studií a i v průběhu klinického podávání musí probíhat kontinuální optimalizace výrobních a aplikačních postupů.

V naší práci jsme se zaměřili na porovnání vlastností léčivých přípravků z MSC, jejich imunomodulační potenciál a porovnání single a multi-donor přípravků. Přípravky MSC z šarží od různých dárců se po zpracování, kryokonzervaci a rekultivaci při zachování podmínek správné výrobní praxe v řadě parametrů významně nelišily, nicméně prokázali jsme, že MSC z šarží od různých dárců se liší svým proliferačním potenciálem a rychlostí růstu. Na druhou stranu smíchání MSC od různých dárců (tzv. „poolování“) nezvýšilo jejich imunomodulační potenciál. Celkový počet buněk nemá vliv na imunomodulační vlastnosti MSC, jestliže je splněna minimální výrobní dávka. Pro budoucí praxi aplikace MSC v rámci léčby SR-GvHD se stále zdá výhodné využití MSC v režimu 1 pacient – 1 dárců. Dále jsme porovnali MSC s iNKT lymfocyty z hlediska jejich *in vitro* imunomodulačního potenciálu. V rámci preklinického testování jsme porovnali několik šarží kultivovaných a expandovaných iNKT a MSC od různých dárců. Kvantifikovali jsme expresi aktivačního znaku CD25 na nespecificky stimulovaných mononukleárních buňkách po kokultivaci s MSC nebo s iNKT. Prokázali jsme, že obě buněčné populace jsou schopny srovnatelně modulovat imunitní reakce *in vitro*. Vzhledem k tomu, že při podání léčivých přípravků z iNKT musí být respektována HLA shoda mezi dárcem a příjemcem, hledali jsme vhodný zdroj iNKT buněk. Monitorovali jsme dynamiku regenerace iNKT v kontextu reparace imunitního systému po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a zkoumali jsme, zda lze stanovit ideální timepoint k odběru autologních iNKT u pacientů. Kinetika v průběhu regenerace imunitního systému po aloSCT nebyla lineární a hladina iNKT neměla vzestupnou tendenci u všech pacientů. Dynamika regenerace iNKT je vysoce variabilní a závisí na celé řadě peritransplantačních faktorů, proto nelze s jistotou určit spolehlivý timepoint, kdy bychom mohli detekovat iNKT v periferní krvi u všech pacientů. Z tohoto důvodu se v rámci přípravy výrobního protokolu zaměříme na využití alogenních HLA shodných dárců iNKT. Naším cílem nebude nahradit MSC v léčbě SR-GvHD novou populací iNKT, ale vytipovat pacienty, kteří budou z jednotlivých léčebných modalit profitovat. Předpokládáme, že jednotlivé buněčné populace navzájem nebudou soupeřit, ale mohou se naopak ve specifických situacích doplňovat a tím vést k lepším výsledkům v léčbě potransplantačních komplikací.

ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) is a specialized therapeutic method that is potentially curative for a number of hematological and non-hematological diseases. Despite continuous advances in transplant medicine, the prognosis of patients is still limited by a number of post-transplant complications, dominated by relapse and graft-versus-host disease (GvHD). These complications affect the survival of patients, but also reduce their quality of life. So, we are looking for new treatment modalities that would improve their prognosis. One of the promising procedures in the treatment of GVHD is the administration of cells with immunomodulatory potential (immunotherapy). In a number of European centers, including ours, mesenchymal stem cells (MSCs) are administered to patients after alloHSCT in the steroid-refractory GvHD (SR-GvHD) indication. Invariant NKT lymphocytes are a new cell population with a promising potential to suppress GvHD and at the same time they potentiate the graft-versus-leukemia (GvL) effect. The introduction of these cell populations into clinical practice must be preceded by a number of preclinical studies and continuous optimization of manufacturing and application procedures must take place even during clinical administration.

In our work, we focused on comparing the properties of drugs from MSCs, their immunomodulatory potential and comparing single and multi-donor products. MSCs from batches from different donors did not differ significantly in a number of parameters after processing, cryopreservation and recultivation while maintaining good manufacturing practice, however, we proved that MSCs from batches from different donors differ in their proliferative potential and growth rate. On the other hand, mixing MSCs from different donors (so-called "pooling") did not increase their immunomodulatory potential. The total number of cells does not affect the immunomodulatory properties of MSCs if the minimum production dose is achieved. For our future practice of MSC application in the treatment of SR-GvHD, it still seems advantageous to use MSC in the mode of 1 patient - 1 donor. We also compared MSCs with iNKT lymphocytes in terms of their in vitro immunomodulatory potential. In preclinical testing, we compared several batches of cultured and expanded iNKT and MSCs from different donors. We quantified the expression of the activation marker CD25 on non-specifically stimulated mononuclear cells after co-cultivation with MSC or iNKT. We have shown that both cell populations are able to modulate immune responses in vitro to a similar extent. Because the HLA match between donor and recipient must be respected when administering iNKT drugs, we searched a suitable source of iNKT cells. We monitored the dynamics of iNKT regeneration in the context of immune system repair after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and examined whether an ideal timepoint could be determined for the collection of autologous iNKs in patients. Kinetics during immune system regeneration after alloSCT were not linear and iNKT levels did not increase in all patients. The dynamics of iNKT regeneration was highly variable and depended on a number of peritransplantation factors, so it is not possible to determine with certainty a reliable timepoint when we could detect iNKT in peripheral blood in all patients. For this reason, in the preparation of the production protocol, we will focus on the use of allogeneic HLA of identical iNKT donors. Our goal will not be to replace MSCs in the treatment of SR-GvHD with a new population of iNKT, but to identify patients who will benefit from the individual treatment modalities. We assume that individual cell populations will not compete with each other, but may, on the contrary, complement each other in specific situations and thus lead to better results in the treatment of post-transplant complication

OBSAH

1	ÚVOD – současný přehled problematiky	7
1.1	Alogenní transplantace krvetvorných buněk	7
1.1.1	Transplantace jako imunoterapie	7
1.1.2	Historický kontext	7
1.1.3	Registry dobrovolných dárců hematopoetických kmenových buněk	8
1.1.4	Zdroje hematopoetických kmenových buněk	8
1.1.5	Výběr dárce hematopoetických buněk	11
1.1.6	Přípravný režim před transplantací	12
1.1.7	Manipulace transplantátu	12
1.1.8	Alogenní program na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň	13
1.2	Imunitní rekonstituce po alogenní transplantaci krvetvorných buněk	15
1.2.1	Rejekce štěpu	15
1.2.2	Faktory ovlivňující dynamiku imunitní rekonstituce	16
1.2.3	Rekonstituce imunokompetentních buněk	16
1.3	Potransplantační komplikace	18
1.3.1	Relaps	19
1.3.2	Graft versus host disease	20
1.3.2.1	Akutní GvHD	20
1.3.2.2	Chronická GvHD	22
1.3.3	Léčba GvHD	22
1.3.3.1	Profylaxe GvHD	23
1.3.3.2	Léčba 1.linie	24
1.3.3.3	Léčba 2.linie a steroid-refrakterní GvHD	24
1.4	Imunoterapie v léčbě potransplantačních komplikací	26
1.4.1	Mesenchymální kmenové buňky	26
1.4.2	Invariantní NKT lymfocyty	27
1.4.2.1	iTCR receptor	28
1.4.2.2	CD1d molekula	28
1.4.2.3	L-selektin CD62L	29
1.4.2.4	Subpopulace iNKT	29
1.4.2.5	Protinádorový efekt iNKT	29
1.4.2.6	Imunomodulační potenciál iNKT v léčbě GvHD	30
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	32
3	MATERIÁLY A METODY	33
3.1	Materiál, reagentie a přístrojové vybavení	34
3.2	Srovnání single donor a poolovaných přípravků MSC	34
3.2.1	Izolace MSC z kostní dřeně	34
3.2.2	Kultivace MSC	34
3.2.3	Zamražení MSC	35
3.2.4	Rozmrazení MSC	35
3.2.5	Příprava mononukleárních buněk	35
3.2.6	Smíchání buněk pro sledování imunomodulačních vlastností	35
3.2.7	Měření imunomodulačního potenciálu MSC	36
3.2.8	Porovnání metabolické aktivity	37
3.2.9	Porovnání buněčné proliferace	37
3.2.10	Porovnání buněčného růstu	37

3.3	Porovnání kompozice šarží MSC	37
3.4	Kinetika rekonstituce iNKT po alogenní transplantaci.	38
	3.4.1 Odběr vzorků a soubor pacientů	38
	3.4.2 Zpracování vzorků a měření průtokovou cytometrií	38
3.5	Srovnání imunomodulačního potenciálu MSC a iNKT	40
	3.5.1 Izolace iNKT buněk	40
	3.5.2 Kultivace mezenchymálních kmenových buněk	40
	3.5.3 Imunomodulační vlastnosti MSC a iNKT	40
	3.5.4 Stanovení exprese CD25	41
3.6	Zpracování dat	41
4.	VÝSLEDKY	
4.1	Srovnání single donor a poolovaných přípravků MSC	42
	4.1.1 Kultivace a kontrola imunofenotypu MSC	42
	4.1.2 Měření imunomodulačního potenciálu MSC	43
	4.1.3 Porovnání metabolické aktivity	44
	4.1.4 Porovnání buněčné proliferace	44
	4.1.5 Porovnání buněčného růstu	45
4.2	Porovnání kompozice šarží LP MSC	46
4.3.	Kinetika rekonstituce iNKT po alogenní transplantaci	48
	4.3.1. Kinetika rekonstituce iNKT	48
	4.3.2. Stanovení subpopulací iNKT	50
	4.3.3. Stanovení exprese CD62L na iNKT	52
	4.3.24 Stanovení exprese CD1d na monocytech	53
4.4	Srovnání imunomodulačního potenciálu MSC a iNKT	54
5.	DISKUZE	55
6.	ZÁVĚR	59
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
9.	PODĚKOVÁNÍ	80
	PŘÍLOHY (+ seznam příloh)	81

1 ÚVOD – současný přehled problematiky

1.1 Alogenní transplantace hematopoetických buněk

Alogenní transplantace krvetvorných buněk je vysoce specializovaná terapeutická metoda, která je potenciálně kurativní pro řadu hematologických i nehematologických onemocnění. Převažují indikace pro myeloidní a lymfoidní malignity (Passweg et al. 2021), ale narůstají i počty transplantací pro primárně nehematologické choroby, například pro autoimunitní (Daikeler et al. 2009) nebo metabolická onemocnění (Hirano et al. 2006). Do dnešního dne bylo provedeno celosvětově již přibližně 1,4 milionu transplantací a každý rok podstoupí tuto proceduru kolem 70 tisíc pacientů. Polovina z nich v Evropě (Alois Gratwohl et al. 2015). Dle dat EBMT (The European Group for Blood & Marrow Transplantation) má počet transplantací za rok stále vzestupný trend (Passweg et al. 2021).

1.1.1 Transplantace jako imunoterapie

Alogenní transplantace krvetvorných buněk je formou vysoce efektivní buněčné terapie, zároveň ji samotnou lze chápat jako metodu imunoterapie. Její princip spočívá v převodu multipotentních hematopoetických kmenových buněk pacientovi od zdravého dárce. U pacienta se poté rozvine nová hematopoéza, ale také nový imunitní systém dárce. Nezbytnou podmínkou pro úspěch transplantace je shoda v HLA systému (human leukocyte antigens) mezi dárce a pacientem (Spierings and Fleischhauer 2019). Neshoda vede k selhání štěpu a rozvoji reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Na druhou stranu ani úplná shoda v HLA znacích s omezenou imunologickou interakcí mezi dárce a příjemcem nemusí být pro optimální efekt transplantace žádoucí, a to zejména u agresivních malignit. Výsledný terapeutický efekt alogenní transplantace totiž nespočívá pouze v cytotoxicitě podané chemoterapie či radioterapie, ale významnou měrou se na něm podílí komplexní imunologické mechanismy, které zahrnujeme pod pojmem reakce štěpu proti tumoru (GvT, graft versus tumor) nebo konkrétněji reakce štěpu proti leukémii (GvL, graft versus leukemia)(Appelbaum 2001).

Po alogenní transplantaci dochází v těle pacienta k etablování nového – dárcovského – imunitního systému, který je odlišný od pacientova původního. To je v souladu s našimi znalostmi, že u pacientů s autoimunitními poruchami, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk z jiné indikace, došlo ke zlepšení příznaků i těchto onemocnění. Rozsáhlé recentní retrospektivní studie potvrzují potenciál alogenních transplantací navodit dlouhodobou remisi u řady refrakterních autoimunitních onemocnění, a to s dobrými výsledky a s akceptovatelnou toxicitou zejména u mladších pacientů. U většiny pacientů nedochází ani po alogenní transplantaci k úplnému vyléčení, nastává ale výrazné zlepšení příznaků či jsou navozeny dlouhodobé remise (Greco et al. 2019) (Snowden et al. 2017). Imunitní systém dárce je zároveň schopen reagovat na nádorové antigeny a aloantigeny a prostřednictvím GvHD/GvL reakce eliminovat zbytkovou nádorovou populaci nebo bránit relapsu nádorového onemocnění.

1.1.2 Historický kontext

První kazuistika o léčebné aplikaci hematopoetických buněk pochází již z roku 1939 (Osgood et al. 1939), nicméně jednalo se spíše o nahodilý pokus. Prvním, kdo se systematicky snažil o rozpracování metodiky převodů hematopoetických buněk byl tým Dr. Edwarda Donalla Thomase, pozdějšího držitele Nobelovy ceny za medicínu. V roce 1957 byla po kombinaci radio/chemoterapie aplikována infuze kostní dřeně od zdravých dárců šesti pacientům s hematologickými malignitami. Podání v té době ještě nerespektovalo kompatibilitu v HLA systému, jehož existence a funkce ještě nebyla známá, takže pouze u dvou pacientů došlo

k přihojení štěpu a všichni pacienti zemřeli do dne +100 po transplantaci (Thomas et al. 1957). Zásadní zlom v transplantační medicíně přinesl až objev HLA systému (Dausset 1958) a jeho následná implikace pro klinické využití v 60. letech minulého století. První úspěšnou transplantaci kostní dřeně od příbuzného dárce provedl v roce 1968 tým amerického imunologa Dr. Roberta Gooda. Pacientem byl pětíměsíční chlapec s diagnózou těžkého kombinovaného imunodeficitu (severe combined immunodeficiency, SCID) a dárce kostní dřeně se stala jeho osmiletá sestra. Transplantace vedla k vyléčení a chlapec dosáhl dospělosti (Saxon 2003). Na přelomu 60. a 70. let se poté rozběhly klinické programy alogenních transplantací. V roce 1977 tým Dr. E.D. Thomase reportoval již 100 provedených transplantací (Thomas et al. 1977) a jeho další práce prokázala 50% šanci na vyléčení u pacientů s akutní myeloidní leukémií transplantovaných v první remisi (Thomas et al. 1979). První alogenní transplantace kostní dřeně v ČR byla uskutečněna v roce 1976 v Hradci Králové a první úspěšná nepříbuzenská transplantace alogenních buněk byla provedena na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze v roce 1986.

1.1.3 Registry dobrovolných dárců hematopoetických kmenových buněk

Vhodnými dárce hematopoetických buněk jsou HLA kompatibilní příbuzní pacientů (matched sibling donors, MSD), případně dobrovolníci z českých či zahraničních registrů dárců kostní dřeně (matched unrelated donors, MUD) (Spierings and Fleischhauer 2019). Prvními dárce byli téměř výhradně HLA shodní sourozenci, teprve s rozvojem registrů dárců kostní dřeně a zlepšením techniky testování HLA systému došlo k rozšíření potenciálních dárců o nepříbuzné dobrovolníky. V dalším vývoji transplantačních programů došlo k významným pokrokům na poli profylaxe rozvoje GvHD a v současnosti je již akceptovatelná HLA neshoda v 1-2 testovaných znacích (9/10 nebo 8/10; mismatched unrelated donors, MMUD) (Spierings and Fleischhauer 2019). Výsledky přežití po alogenní transplantaci od příbuzného, nepříbuzného i nepříbuzného dárce s 1 HLA neshodou jsou dnes již prakticky srovnatelné (Saber et al. 2012). V současnosti jsou na vzestupu haploidentické příbuzenské transplantace, kdy zejména díky optimalizaci protokolů prevence GvHD postačuje menší HLA shoda (McCurdy and Luznik 2019). Vzhledem k tomu, že v blízké rodině často nenalezneme vhodného, plně HLA kompatibilního, dárce, byl pro masivní rozšíření transplantačních programů zásadní vznik registrů dobrovolných dárců kostní dřeně. Ten historicky první byl založen v roce 1974 („Anthony Nolan Bone Marrow Donor register“). V 80. letech poté byly zakládány další národní registry, které byly v roce 1988 propojeny formou celosvětové databáze „Bone Marrow Donors Worldwide“ (BMWD) (Jindra, 2018). V roce 1991 vznikl v pražském Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) Český registr dárců kostní dřeně, dnes Český registr dárců krvetvorných buněk (ČRDKB). O rok později, v roce 1992, byl MUDr. Vladimírem Kozou založen v Plzni Centrální registr dárců kostní dřeně, dnes Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD). Oba registry jsou nyní součástí celosvětové sítě nepříbuzných dárců. Aktuální počet dárců ve světových registrech činí více než 32 milionů nepříbuzných dárců a z nich 18 tisíc každoročně daruje kostní dřeň (Jindra, 2018).

1.1.4 Zdroje hematopoetických kmenových buněk

Pro alogenní transplantace kostní dřeně existuje více potenciálních zdrojů pro odběr hematopoetických kmenových buněk. Lze je získat přímou aspirací z kostní dřeně (BMSC, bone marrow stem cells, BM, „kostní dřeň“), případně aferézou z periferního cévního řečiště po stimulaci růstovými faktory (PBSC, peripheral blood stem cells, „periferní buňky“). Alternativním zdrojem jsou hematopoetické buňky získávané z pupečnickové krve.

Až do poloviny 90. let byla jedinou možností odběru hematopoetických buněk přímá aspirace buněk z kostní dřeně (Welniak et al. 2007). Odběry BM probíhají za aseptických podmínek na

operačním sále v celkové anestezii. Trepanobiopstickými odběrovými jehlami je kostní dřev opakovaně aspirována z lopaty kosti kyčelní. Pro dárce je odběr spojen s několikadenní hospitalizací, je zatížen celkovou anestezii a s ní spojenými riziky. Vzhledem k tomu, že dárce jsou převážně mladí jedinci bez komorbidit (v případě dobrovolných dárců z registrů téměř vždy), jsou nežádoucí projevy po odběru minimální (Switzer et al. 2014). Druhou variantou odběru je získávání hematopoetických buněk separací z periferní krve po jejich mobilizaci („vyplavení“). První efektivní mobilizační protokol pro alogenní program byl publikován v roce 1995 (Schmitz et al. 1995) a od té doby se PBSC stávají dominantním zdrojem hematopoetických buněk (Passweg et al. 2019). Dárcům je před naplánovaným odběrem několik dní po sobě aplikován subkutánní injekcí granulocytární růstový faktor (granulocyte-stimulating factor, G-CSF, filgrastim), což vede k mobilizaci hematopoetických buněk z kostní dřevě do periferní krve. Množství buněk cirkulujících v periferní krvi je možné kvantifikovat průtokovou cytometrií na základě detekce exprese CD34+ antigenu na jejich povrchu. Po vyplavení dostatečného množství PBSC jsou buňky odebírány aferézou na separátoru krevních buněk, a to nejčastěji cestou periferního žilního řečiště. Odběry jsou dárce obecně velmi dobře tolerovány a nejčastějšími komplikacemi jsou bolest v místě odběru a přechodná únava (Switzer et al. 2014), které shodně uvádějí dárce obou typů transplantátů. Při odběru PBSC jsou to zejména bolesti skeletu při mobilizaci G-CSF, u odběru kostní dřevě dominují bolesti v místě odběru (82 % dárců) a bolesti související s anestezii (bolesti v krku, bolesti hlavy). Oproti darování PBSC je odběr BM spojen s delší dobou do plného zotavení dárce po odběru (3 týdny versus 1 týden) (Miller et al. 2008). Přestože dárce BM vnímají proceduru bezprostředně po odběru jako fyzicky více stresující, nejsou mezi oběma způsoby odběru dlouhodobé rozdíly ve vnímání kvality života spojené se zdravím (Switzer et al. 2014).

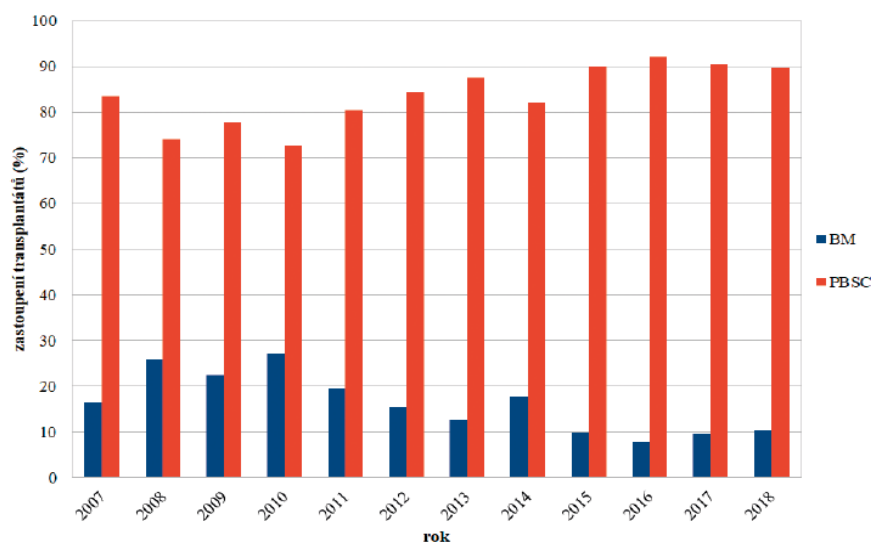
Kompozice transplantátů získaných z kostní dřevě a periferní krve je ovšem rozdílná. Kostní dřev obsahuje výrazně větší množství erytrocytů a periferní kmenové buňky mají oproti kostní dřevě přibližně 10x vyšší množství lymfocytů a také více progenitorů již zadaných do jednotlivých krvetvorných řad. Transplantace s využitím PBSC vedou oproti BMSC k rychlejšímu přihojení štěpu, konkrétně k dřívějšímu dosažení dostatečných počtů neutrofilů a trombocytů, a tedy k časnějšímu obnovení krvetvorby (Welniak et al. 2007). Díky tomu se zkracuje potransplantační období pancytopenie, které je rizikové z hlediska rozvoje peritransplantačních komplikací, zejména infekčních a krvácivých. Zároveň se podání PBSC méně často komplikuje selháním štěpu (Anasetti et al. 2012) (Blaise et al. 2000). Na druhé straně použití BMSC vede méně často k rozvoji GvHD a tím pádem k lepšímu GRFS (graft-versus-host disease-free, relapse-free survival) (Mehta et al. 2018). GRFS je relativně nový terapeutický endpoint vytvořený skupinou Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, který lépe než pojem „celkové přežití“ (overall survival, OS) reflektuje důležitost kvality života pacientů po transplantaci. Někteří pacienti totiž mohou po transplantaci sice žít, ale s významně zhoršenou kvalitou života. To je dáno zejména přítomností chronických komplikací jako je právě cGvHD. PBSC tedy častěji vedou k rozvoji GvHD, zároveň však více podporují GvL efekt, a proto po jejich podání dochází méně často k relapsu. Ve výsledném srovnání obou typů transplantátů proto není prokazován statisticky významný rozdíl v přežití u dospělých pacientů v případě hematologických malignit a to jak u transplantací s redukcí, tak s myeloablativní přípravou (Nagler et al. 2012; Eapen et al. 2015; Holtick et al. 2015; Lee et al. 2016).

Přístup k odběrům a k volbě různých druhů buněk výrazně změnila v čase. Dnes jsou jednoznačně preferovány odběry PBSC, které na některých pracovištích již prakticky nahradily odběry kostní dřevě (viz data EBMT, graf 1). V roce 2017 byla kostní dřev využita pouze u cca 20 % transplantací (Passweg et al. 2019) a lze očekávat udržení tohoto trendu i v dalších letech. Určitou renesanci využívání BMSC v poslední době přinesl poznatek, že příjemci BM mají menší riziko vzniku akutní a zejména chronické GvHD a z nich plynoucích komplikací (Mehta et al. 2018). Zatímco

pro dospělé pacienty s hematologickými malignitami jsou oba transplantáty srovnatelné, odlišná situace je v případě pediatrických pacientů. U těch je preferována BM. Stejně tak je BM preferována u pacientů s nemaligní diagnózou, u kterých by rozvoj fatální formy GvHD mohl zásadně zhoršit kvalitu života (Ayuk and Balduzzi 2019). Nicméně pro řadu center jsou odběry BM organizačně náročné. Je nezbytné mít dostatečně zkušený odběrový tým a zvládnutou metodiku odběru, aby byly výtěžky odběru dostatečné. K tomu se přidávají logistické komplikace. Například v případě potřeby mražení hematopoetických buněk, což byl v nedávné době požadavek transplantačních center při epidemii Covid19, dochází k významnému snížení buněčnosti transplantátu (Fernandez-Sojo et al. 2021), což je významnější komplikací u BMSC, které jsou obvykle méně buněčné než PBSC.

Alternativní možností je odběr hematopoetických buněk z pupečnickové krve. Ty byly poprvé aplikovány při transplantacích pediatrických pacientů (Wagner et al. 1995), později se začaly úspěšně využívat i u dospělých (Laughlin et al. 2004). Zásadní nevýhodou tohoto typu transplantátu je obecně nižší dostupnost pupečnickové krve a dále nízký počet jaderných buněk, což vede k pomalejší rekonstituci hematopoézy. S vysokým rizikem pozdního engraftmentu je spojená potřeba podání vyššího počtu transfuzí v potransplantačním období. Dalším omezením je nemožnost využít infuzí dárcovských lymfocytů (donor lymphocyte infusion, DLI) v rámci léčby případného potransplantačního relapsu (Rocha and Gluckman 2006). To vše značně limituje masivnější využívání pupečnickové krve, přestože některé zdroje poukazují i na některé výhody, které by její využití mohlo mít. Při transplantaci pupečnickové krve postačuje menší míra HLA shody (např. 3/6) a také je tento transplantát v případě potřeby již odebraný, zamražený a připravený kdykoliv k použití. Některé práce také popisují nižší incidenci GvHD (Rocha and Gluckman 2006). Nedostatečnou buněčnost štěpů pupečnickové krve je možné řešit podáním produktů od dvou dárců (Barker et al. 2005) a tzv. double nebo dokonce triple cord blood transplantace se začala využívat u dospělých příjemců. Výsledky byly relativně uspokojivé, nebyla prokázána vyšší míra rejekcí, GvHD či vyšší mortalita (Barker et al. 2005). Pro většinu pacientů je tato metoda však spíše nedostupná a ve většině dárcovských center není pupečnicková krev rutinně využívána. Transplantace pupečnickové krve byla zvažována zejména u pacientů, pro které nebylo možné nalézt HLA shodného příbuzného nebo nepříbuzného dárce. S příchodem haploidentických transplantací je takto klinická situace řešena využitím haploidentických rodinných dárců, a proto počty transplantací pupečnickové krve celosvětově již několik let klesají.

Na našem pracovišti odebíráme periferní kmenové buňky pouze z aferézy nebo z aspirací kostní dřeně. Výsledné rozhodnutí o volbě zdroje krvetvorných buněk závisí na diagnóze, řadě dalších peritransplantačních faktorů (které jsou rozebrány v následující kapitole) a také na osobní preferenci dárce.



Obrázek 1 – Využití BM a PBSC jako zdroje kmenových buněk pro alogenní transplantace v ČR v letech 2007–2018, data vycházející ze statistiky EBMT
Vysvětlivky: BM – bone marrow, PBSC – peripheral blood stem cells

1.1.5 Výběr dárce hematopoetických buněk

Výsledek aloHSCT závisí na řadě peritransplantačních faktorů. Nejzásadnější vliv má základní diagnóza, pro kterou je aloHSCT indikována (refrakterní na předchozí léčbu, fáze onemocnění, klonální abnormality aj.), dále jsou to faktory na straně pacienta (věk, komorbidity, infekční komplikace, osídlení polyrezistentními mikrobiálními kmeny aj.). Nezanedbatelný vliv však má i volba typu transplantátu a výběr dárce hematopoetických buněk (Ayuk and Balduzzi 2019).

Za nejlepšího dárce hematopoetických buněk je považován HLA-identický sourozenec, nicméně je dostupný pro méně než 30 % pacientů (Ayuk and Balduzzi 2019). V řadě studií bylo potvrzeno, že výsledky aloHSCT s plně kompatibilními nepříbuznými dárci jsou srovnatelné. Pravděpodobnost nalezení plně HLA kompatibilního nepříbuzného dárce je mezi 16% a 75% (Gragert et al. 2014; Buck et al. 2016), přičemž s rostoucí etnickou diverzitou se šance snižuje.

Zdokonalení transplantačních protokolů – zahrnující předtransplantační ATG (Huang et al. 2006), PT-CY (Luznik et al. 2008) a TCD (Bertaina et al. 2014) umožnilo rostoucí využití haploidentických příbuzných dárců (Passweg et al. 2014). Retrospektivní studie potvrzují srovnatelné výsledky transplantací haploidentických a MUD dárců (Fuchs 2017). S narůstajícím využitím transplantátů od dárců s větší mírou neshody přichází potřeba detekovat donor specifické anti-HLA protilátky v pacientově séru. Jejich přítomnost je spojována s vyšším rizikem selhání štěpu a obecně s nižším přežíváním pacientů po haploidentických transplantacích (Ciurea et al. 2015).

Nalezení dárce hematopoetických buněk, který splňuje kritérium histokompatibility dárce-pacient, je nezbytnou podmínkou úspěšné transplantace. V situaci, kdy je dostupný více než jeden histokompatibilní dárce, je možné přihlížet i k dalším faktorům, které mají vliv na výsledek transplantace. Jsou to věk, hmotnost a pohlaví dárce, sérologický status CMV a kompatibilita krevních skupin, zejména v ABO systému (Ayuk and Balduzzi 2019). Věk dárce je považován za nejvíce ovlivňující faktor dárce mimo jeho HLA charakteristiky (Kollman et al. 2016; Wang et al. 2018). Nárůst o 10 let věku dárce odpovídá vzestupu hazard ratio celkové mortality o 5,5% (Kollman et al. 2016). V jiné studii vedl výběr dárce o 10 let mladšího k o 3% lepšímu 2-letému přežití po transplantaci (Shaw et al. 2018). Ve výběru proto dostávají prioritu mladší dárci. Další zásadní faktor ovlivňující je CMV sérostatus, přičemž nejlepších výsledků je dosaženo při podání

séronegativního štěpu séronegativnímu pacientovi (Ljungman 2014; Kalra et al. 2016). Vliv rozdílného pohlaví mezi dárcem a příjemcem hematopoetických buněk na výsledek aloHSCT je o něco více kontroverzní a výsledky studií nejsou konzistentní (Gratwohl et al. 2009)(Gratwohl et al. 2017)(Nakasone et al. 2015; Kollman et al. 2016). Nicméně několik studií se shoduje na tom, že rizikovost rozdílného pohlaví dárce-příjemce závisí na typu použitého předtransplantačního režimu. Vliv kompatibility krevních skupin mezi dárcem a příjemcem na celkové přežití je již menší a pravděpodobně souvisí s typem podaného transplantátu. Při podání BMSC, které obsahují větší množství erytrocytů, jsou přitom rizika větší (Kollman et al. 2016; Shaw et al. 2018).

1.1.6 Přípravný režim před transplantací

Kromě GvL efektu závisí úspěch transplantace, zejména v případě malignit, také na cytotoxickém efektu přípravného režimu, tedy na efektu tzv. „conditioningu“. Jedná se o kombinaci chemoterapeutik, které mají za cíl přímo zničit masu nádorových buněk a zároveň potlačit pacientův vlastní imunitní systém natolik, aby nedošlo k rejekci transplantátu hematopoetických buněk. Ideálně by měla chemoterapie snížit riziko rozvoje GvHD bez eliminace GvL efektu a to za přijatelné tkáňové toxicity (Welniak et al. 2007). Splnění všech těchto podmínek nebývá vždy jednoduché docílit a mnohdy upřednostňujeme některý efekt conditioningu na úkor jiných.

Existují dva základní typy transplantační přípravy, myeloablativní (myeloablative conditioning regimen, MAC) a redukováná (reduced intensity conditioning, RIC). Myeloablativní chemoterapii lze nahradit celotělovým ozáření (TBI, total body irradiation). Nověji některé přípravné režimy mohou zahrnovat i séroterapii, specifické cílené léky a monoklonální protilátky (Nagler and Shimoni 2019). Volba chemoterapie závisí na typu dárce a na míře HLA shody. Při aloHSCT od nepříbuzných nebo od dárců s větší mírou neshody jsou dávky chemoterapie obvykle vyšší a je doplňována o ATG. Při aloHSCT od HLA shodného příbuzného dárce (matched sibling donor, MSD) naopak postačují nižší dávky chemoterapeutik. Další faktor, který ovlivňuje volbu transplantačního režimu je choroba, pro kterou je aloHSCT indikována. AloHSCT potom zahrnuje chemoterapii cílicí přímo proti typu malignity – např. melphalan při mnohočetném myelomu nebo karmustin (BCNU) a cyklofosfamid u lymfomů. V případě indikace aloHSCT pro nemaligní diagnózu, kdy neočekáváme významný přínos GvL efektu, je zásadní zvolit chemoterapii, která minimalizuje riziko rozvoje GvHD. Dále je třeba zvážit výkonostní stav pacienta, jeho věk, komorbidity, a i tomu přizpůsobit dávkování chemoterapie. Myeloablativní chemoterapie je spojena s vyšším rizikem toxického postižení, což její využití limituje spíše pro mladší pacienty. Chemoterapie s redukovanou intenzitou je vhodnější pro starší pacienty s komorbiditami. V současnosti byly vyvinuty i specifické přípravné režimy pro aloHSCT od alternativních dárců (nepříbuzných dárců s HLA neshodou, dárců pupečnickové krve a haploidentických dárců) (Nagler and Shimoni 2019).

1.1.7 Manipulace transplantátu hematopoetických buněk

Po odběru od dárce lze štěp hematopoetických buněk různými metodikami *ex vivo* ovlivnit ještě před podáním pacientovi. Snížení rizika rozvoje GvHD lze docílit selektivní deplecí T-lymfocytů *ex vivo* (T-cell depletion, TCD) (Wagner et al. 2005a) (Ruggeri et al. 2007), což však může zároveň zvýšit riziko rozvoje infekčních komplikací, relapsu či rejekce štěpu. To potvrdily výsledky metaanalýzy, která se zabývala ovlivněním GvHD u haploidentických transplantací. Z jejich výsledků vyplynulo, že riziko GvHD může být sníženo použitím TCD metod, ale za cenu zvýšené incidence relapsu a prodloužení času do imunitní rekonstituce (Koh et al. 2007). Riziko rejekce (nepřihojení transplantátu) se snižuje s vyšším počtem hematopoetických buněk ve štěpu (Handgretinger et al. 1999). Navíc se s jejich počtem zkracuje doba engraftmentu, proto existují

snahy o rozvinutí metodik selekce CD34+ buněk a navýšení jejich počtu ve štěpech hematopoetických buněk (Pasquini et al. 2012).

Další ovlivnění štěpu hematopoetických buněk je nutné u tzv. velké neshody v krevní skupině ABO systému, kdy má pacient protilátky proti antigenům dárce hematopoetických buněk. To nastává v situaci, kdy dárce má krevní skupinu A, B nebo AB a příjemce (pacient) krevní skupinu 0. V takové situaci má pacient před transplantací v krevní plazmě přítomny protilátky (aglutininy) anti-A, nebo anti-B proti antigenům dárce. To může vést k řadě komplikací – k akutní hemolýze erytrocytů dárce během převodu buněk, k pozdní hemolýze, k opožděné obnově hematopoézy, která může vyústit až v čistou aplazii červené řady (pure red cell aplasia, PRCA). Aby k tomu nedošlo, je možné před transplantací provést depleci erytrocytů ve štěpu kostní dřeně (Booth et al. 2013). Nevýhodou tohoto procesu je snížení celkového počtu progenitorů. Jinou alternativou je snížení titru inkompatibilních isohematoglutininů příjemce, čehož lze docílit plazmaferézou, cestou imunoabsorpčních kolon (Buckner et al. 1978).

Situace spojená s pandemií COVID-19 vedla k celosvětovým změnám v postupu odběru a transportu štěpů od nepříbuzných dárců. Z logistických důvodů byly odebrané transplantáty mražené v odběrových centrech a v transplantačních centrech rozmrazovány těsně před podáním. Ze zpětné revize tohoto postupu se ukázalo, že mražení vede ke snížení celkového počtu progenitorů v transplantátech s mediánem snížení o 24,2%, nicméně tento rozdíl nevedl k signifikantním rozdílům v době do engraftementu mezi čerstvými a kryoprezervovanými transplantáty a neovlivnil ani dosažení kompletního chimérismu u pacientů (Fernandez-Sojo et al. 2021).

1.1.8 Alogenní program na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň

Transplantační program byl na Hematologicko-onkologickém oddělení (HOO) Fakultní nemocnice v Plzni zahájen v roce 1991, kdy zde byla pod vedením prim. MUDr. Vladimíra Kozy provedena první nepříbuzenská transplantace kostní dřeně, později zde byl zahájen i autologní transplantační program. V současnosti patří HOO počtem transplantací mezi největší transplantační centra v České republice. Recentně je zde prováděno kolem 150 transplantací krvetvorných buněk ročně, z čehož přibližně třetina připadá na alogenní transplantace. V roce 2021 bylo provedeno 52 alogenních transplantací a 99 autologních. Dlouhodobě převažující indikací pro aloHSCT je akutní myeloidní leukémie (viz tab. 1).

Tabulka 1 – Alogenní transplantace na HOO 2018-2021 dle diagnóz

	2018		2019		2020		2021	
		%		%		%		%
AloHSCT celkem	47		44		38		52	
z toho retransplantací	2		0		0		2	
AML	20	43	28	64	18	47	25	48
ALL	3	6	2	5	4	11	5	10
NHL	10	21	4	9	2	5	4	8
CLL	2	4	1	2	1	3	0	0
MH	2	4	2	5	0	0	1	2
CML	1	2	0	0	0	0	0	0
MM	2	4	1	2	4	11	7	13
SAA	0	0	1	2	0	0	0	0
PMF	3	6	1	2	1	3	4	8
MDS	4	9	4	9	8	21	5	10
T-PLL	0	0	0	0	0	0	1	2

% ze všech aloHSCT

Zkratky: AML – akutní myeloidní leukémie, ALL – akutní lymfoblastická leukémie, NHL – nonhodgkinské lymfomy, CLL – chronická lymfocytární leukémie, MH – morbus hodgkin, CML – chronická myeloidní leukémie, MM – mnohočetný myelom, SAA – severe aplastic anemia, PMF – primární myelofibróza, MDS – myelodysplastický syndrom, T-PLL – T-prolymfocytární leukémie

1.2 Imunitní rekonstituce po alogenní transplantaci krvetvorných buněk

Po chemoterapii podané v rámci conditioningu při alogenní transplantaci se u pacienta rozvine aplázie kostní dřeně, která se manifestuje těžkou pancytopenií v periferní krvi. Po aplikaci štěpu krvetvorných buněk dárce dochází k postupnému obnovení krvetvorby, včetně rekonstituce imunitního systému a k obnovení jeho funkcí. Co nejrychlejší obnovení funkčních imunitních mechanismů je důležité pro zkrácení období neutropenie, která pacienta ohrožuje závažnými infekčními komplikacemi. Ty jsou pro pacienty po transplantaci velmi závažné a nezřídka vedou k prudkým septickým stavům a k úmrtím. Spektrum infekčních původců je přitom širší, než u zdravých osob. Časté jsou oportunními infekce vyvolané mikroorganismy pro zdravé osoby nepatogenními.

Opožděná imunitní rekonstituce ale hraje zásadní roli i v rozvoji řady dalších potransplantačních komplikací, jako jsou relaps a GvHD (Bejanyan et al. 2018)(Parody et al. 2006), je proto žádoucí hledat strategie, které by podpořily rychlou a kvalitní imunitní obnovu po transplantaci (de Koning et al. 2016). Správná a rychlá rekonstituce dárcovského imunitního systému je zásadním faktorem, který ovlivňuje výsledek transplantace. Brzké zotavení vrozených imunitních mechanismů je zodpovědné za infekční kompetence organismu a pro schopnost hojení tkání. Rekonstituce mechanismů adaptivní imunity je důležitá pro schopnost eliminovat bakteriální a virové patogeny. Dále na ní závisí rozvoj GvL efektu, se kterým však úzce souvisí i riziko rozvoje GvHD (Andrllová et al. 2021).

Pro pochopení potransplantačních komplikací a ve snaze o jejich terapeutické ovlivnění je zároveň potřeba pochopit patofyziologické mechanismy, které k nim vedou. Proces obnovení imunitního systému je velmi přísně regulován, a i mírné dysbalance v této regulaci mohou způsobit závažné komplikace. Přemrštěná imunitní reakce vede k rozvoji tzv. reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus host disease, GvHD), kdy mechanismy nového dárcovského imunitního systému poškozují tkáň pacienta. Nicméně úplné potlačení imunitních mechanismů není žádoucí, protože jsou nezbytné pro boj organismu s infekcemi a zároveň podněcují i GvL efekt, který se významnou měrou podílí na protinádorovém efektu při alogenní transplantaci a snižuje riziko relapsu původní malignity (Appelbaum 2001). Je prokázáno, že pacienti, kteří rozvinou GvHD mají menší riziko relapsu (Petersen 2007). Potlačení GvHD za současného zachování GvL efektu je ideálním cílem transplantační medicíny (Chang et al. 2018).

1.2.1 Rejekce štěpu

Pro minimalizaci infekčních rizik by mělo k přihojení (engraftmentu) hematopoetických buněk dojít co nejdříve po transplantaci. K vzestupu počtu granulocytů nad $0,5 \times 10^9/l$ by mělo dojít do dne +28 po transplantaci. Nedojde-li k tomu a je-li současně prokázána aplázie při histologickém vyšetření kostní dřeně, jedná se o primární selhání štěpu. Nejčastější příčinou selhání štěpu je imunologická rejekce (Olsson et al. 2013), někdy se uvádí pojem *reakce příjemce proti štěpu* (HvG „host versus graft“) (Welniak et al. 2007). Jedná se o imunologický mechanismus, kdy imunokompetentní buňky pacienta, které nebyly zcela eliminovány chemo/radioterapií, reagují proti buňkám štěpu. Z preklinických studií vyplývá, že rejekce je nejspíše zprostředkována za základě aktivity NK buněk pacienta (Cudkowicz and Bennett 1971a, 1971b), NKT lymfocytů (Haraguchi et al. 2005), $\gamma\delta$ T lymfocytů (Blazar et al. 1996)(Drobyski and Majewski 1997) a CD4+ and CD8+ T lymfocytů (Vallera et al. 1994)(Slavin et al. 1978), které rozpoznávají histokompatibilní antigeny na buňkách štěpu (Welniak et al. 2007) a ničí je. Následkem toho nedojde k homingu dárcovských hematopoetických buněk v kostní dřeni ani k jejich efektivní proliferaci a diferenciaci. U pacienta přetrvává refrakterní aplázie, kterou lze efektivně zvrátit

pouze retransplantací, z pravidla od nového dárce, nicméně obecně se špatnou prognózou (Ayas et al. 2015).

1.2.2 Faktory ovlivňující dynamiku imunitní rekonstituce

Novotvorba imunitních buněk a její dynamika závisí na celé řadě peritransplantačních faktorů. Ukazuje se, že zásadními faktory jsou podaná chemoterapie v rámci transplantančního conditioningu, složení hematopoetického štěpu a zvolená imunosupresivní terapie (Kuball and Boelens 2019). Po podání myeloablativního chemoterapeutického režimu (MAC) je doba do engraftmentu delší, než při podání redukované chemoterapie (RIC). Dále dobu do přihojení prodlužují lymfodepleční *ex vivo* či *in vivo* metody. Konkrétně nejčastěji je aplikováno ATG, které prodlužuje čas do přihojení. Vliv na rychlost engraftmentu má i volba zdroje hematopoetických buněk. Nejrychleji dochází k přihojení v případě aplikace PBSC. Uvádí se, že k rekonstituce neutrofilů dochází již kolem dne +14. Při použití hematopoetických buněk z kostní dřeně se přihojí průměrně kolem dne +21 a k v případě pupečnickové krve dochází k přihojení kolem dne +30. Pupečnicková krev často vede k pomalejšímu a mnohdy inkompletnímu engraftmentu (Seggewiss and Einsele 2010). Pomalejší a někdy inkompletní je rekonstituce i v případě haploidentických transplantací (Fuji et al. 2013) či při rozvoji GvHD. Další faktor zpomalující rekonstituci je imunosupresivní léčba podávaná v rámci profylaxe i léčby GvHD (Ogonek et al. 2016).

Dále se zdá, že rekonstituci ovlivňuje i složení štěpu. Hlavními parametry jsou přitom množství CD34+ buněk a počet T-lymfocytů. Zároveň však mají překvapivě velký význam i některé minoritní lymfocytární subpopulace. Vyšší množství NKT (Malard et al. 2016) a $\gamma\delta$ T lymfocytů (Perko et al. 2015) ve štěpu jsou spojovány s lepší imunitní rekonstitucí a vedou k lepším klinickým výsledkům.

1.2.3 Rekonstituce imunokompetentních buněk

Po transplantaci a po převodu štěpu hematopoetických buněk následuje fáze pancytopenie, která trvá několik týdnů. Poté se jako první začnou tvořit buňky nespecifické imunity. V první řadě jsou to granulocyty – neutrofily, eosinofily a basofily, následované monocytami. První lymfocytární buňky, které se začnou tvořit, jsou NK lymfocyty, které jsou zodpovědné za brzký GvL efekt (Ullah et al. 2016). Převážnou většinu nových NK lymfocytů tvoří CD56^{bright} subpopulace, která produkuje cytokiny. Pozvolna NK buněk ubývá, ale zvýšené hladiny mohou někdy přetrvávat až rok po transplantaci (Seggewiss and Einsele 2010).

Následuje období rekonstituce T lymfocytů, které jsou zásadní pro celou řadu imunitních dějů, ale zároveň v období jejich přihojení je nejvyšší riziko rozvoje akutní GvHD. První nové T lymfocyty jsou tvořeny expanzí paměťových T-lymfocytů, které jsou stimulovány cytokiny v přítomnosti aloreaktivních antigenů. Teprve později je zahájena novotvorba naivních T lymfocytů v thymu (Seggewiss and Einsele 2010). CD8+ lymfocyty se rekonstituují rychleji, než CD4+ a v období po transplantaci je proto „fyziologické“ obrácené CD4/8 ratio (Seggewiss and Einsele 2010). Mechanismy adaptivní imunity se obnovují později a pomaleji než imunita vrozená. T lymfocyty dosahují normálních hodnot v periferní krvi přibližně za 3-6 měsíců po transplantaci (Andrlová et al. 2021).

B lymfocyty se rekonstituují jako poslední ze základních lymfocytárních subpopulací a jejich schopnost produkovat imunoglobuliny je obnovena s dalším zpožděním. V některých případech mohou být jejich počty pod normou i roky po transplantaci (Andrlová et al. 2021). Přitom „tabulkových“ počtů je dosaženo dříve, než dojde k plné funkční restituci imunokompetentních

buněk. Uvádí se, že plně funkční je nový imunitní systém přibližně za rok až dva roky po transplantaci (Ogonek et al. 2016).

Kromě významu rekonstituce „základních“ lymfocytárních subpopulací jako jsou CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, případně NK lymfocytů se nyní stále častěji hovoří o významu méně početných lymfocytárních skupin. Vyrůstají důkazy o významu „nekonvenčních“ subpopulací T lymfocytů jako jsou mucosal-associated invariant T (MAIT) lymfocyty, $\gamma\delta$ T lymfocyty a invariantní NKT (iNKT) lymfocyty. Zároveň je diskutováno jejich vzájemné ovlivnění s potransplantační obnovou intestinálního mikrobiomu (Andrlová et al. 2021). Ten bývá zpravidla u pacientů po transplantaci zcela zásadně alterován z důvodu podávání vysocedávkované chemoterapie a protimikrobiální profylaxe a léčby.

1.3 Potransplantační komplikace

Příčiny potransplantační mortality lze časově vymezit jako časně do dne +100 po transplantaci, eventuálně velmi časně do dne +30. Dále se udává střednědobá mortalita do +1 roku po transplantaci a pozdní do +5 let po transplantaci (Styczynski et al. 2020). Řada komplikací je spojena již se samotným procesem transplantace, zejména jde o projevy toxicity podaných chemoterapeutik, případně komplikace spojené s komorbiditami pacienta. Na druhé straně řada obtíží se může manifestovat s odstupem až několika let po transplantaci (Bhatia 2011). Zde se jedná o širokou škálu komplikací zahrnující například endokrinopatie, obtíže s fertilitou, sekundární malignity a další.

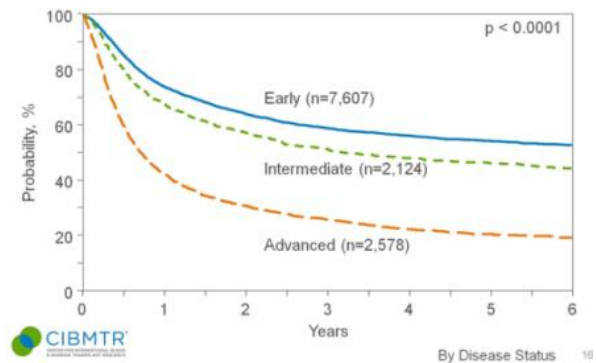
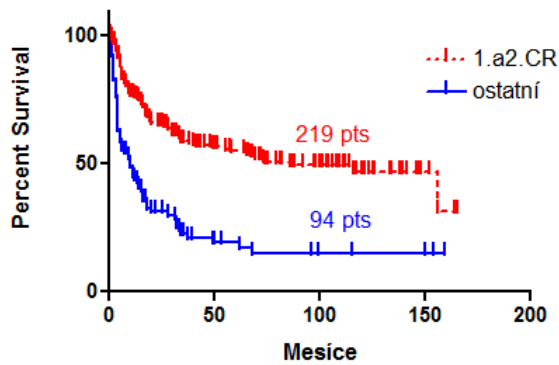
V roce 2018 byla publikována rozsáhlá retrospektivní observační studie (Styczynski et al. 2020), která vycházela z dat EBMT 588 center z 51 zemí. Zahrnula pacienty po HSCT mezi léty 1980 a 2015 napříč spektrem hematologických diagnóz, nezávisle na typu dárce či na zdroji hematopoetických buněk. Výsledky potvrdily, že nejčastějšími příčinami potransplantační mortality jsou relaps (38,7 %), infekční komplikace (23,8 %), GvHD (19 %), a léková toxicita. U 35,1 % pacientů úmrtí nastalo do dne +100 po transplantaci. Až 70 – 80 % pacientů, kteří přežijí první dva roky po transplantaci, má šanci dosáhnout dlouhodobého přežití (Socié et al. 1999). Problémem ale zůstává relativně vysoká morbidita pacientů, která vede k významnému snížení jejich kvality života (Bhatia 2011).

Od zahájení transplantačního programu došlo celosvětově k významnému zlepšení v celkovém přežívání (overall survival, OS) transplantovaných pacientů. Z dat EBMT vyplývá, že k významnému zlepšení došlo mezi 80. a 90. léty minulého století, což bylo dáno zejména významným pokrokem v kontrole infekčních komplikací (Gratwohl et al. 2005). Další pokroky ve snížení celkové mortality potvrdila studie provedená v USA. Zahrnovala dvě kohorty pacientů transplantovaných mezi roky 1993–1997 (1418 pacientů) a 2003–2007 (1148 pacientů). Bylo prokázáno snížení non-relapse mortality (NRM) o 52 % a snížení celkové mortality o 41 %. Došlo ke snížení počtu úmrtí pacientů v důsledku orgánového poškození, infekcí i závažných případů GvHD (Gooley et al. 2010). Navzdory těmto i dalším pokrokům je stále relativně vysoká mortalita významným problémem transplantační medicíny. Zkušenost našeho centra je souladu s celosvětovými daty (NRM viz tab. 2, graf 2 a 3). Zejména relaps původní malignity a GvHD zůstávají dvěma dominantními příčinami potransplantační mortality dosud bez uspokojivých vyhlídek na zásadní zlepšení jejich prognózy (Henig and Zuckerman 2014).

Tabulka 2 – Mortalita bez relapsů – HOO

	2018		2019		2020	
	Počet	%	Počet	%	Počet	%
NRM do dne 100	7	15%	0	0	7	17%
NRM do 1 roku	9	19%	11	25%	9	24%

% ze všech aloHSCT, NRM = Non relapse mortality



Obrázek 2 – Celkové přežívání pacientů po aloSCT pro AML v letech 2005-2019 vlevo data HOO (celkem 313 pacientů), vpravo data CIBMTR

1.3.1 Relaps

Navzdory výraznému snížení mortality po transplantaci v posledních desetiletích, relaps malignity po transplantaci stále zůstává zásadním problémem. Je nejčtenější příčinou selhání transplantace a úmrtí pacientů. Navíc prognóza zrelabovaných malignit je obecně velmi špatná. Například po transplantaci indikované pro akutní myeloidní leukémii některé práce uvádějí relaps stále až v 50 % případů – v závislosti na typu AML a pokročilosti nemoci při transplantaci (de Lima et al. 2014). Pacienti s potransplantačním relapsem AML dosahují 2-letého přežití méně než ve 20% případů nezávisle na volbě salvage chemoterapie (Schmid et al. 2018)(Schmid et al. 2007).

Prognóza pacientů s relapsem závisí na několika faktorech. Význam má čas od aloHSCT do relapsu – nejhorší prognózu mají pacienti s relapsem do 6 měsíců; typ malignity – například pro CML či některé lymfomy existují efektivní léčebné modalitty po relapsu; nádorová masa a místo relapsu – obecně platí, že léčba dříve zachyceného relapsu má větší šanci na úspěch, extramedulární typy relapsu mají horší prognózu; a dále podmínky první transplantace – je-li možnost na zvýšení antileukemického efektu cílenými léky či intenzivnějším conditioningem při druhé transplantaci (Barrett and Battiwalla 2010).

Výhodné je časně zachycení relapsu, proto po transplantaci vždy následuje období důsledné monitorace malignity, resp. reziduální nemoci. Je využíváno molekulárně genetických metod či detekce aberantního imunofenotypu buněk průtokovou cytometrií, eventuálně doplněné o cílené zobrazovací či biochemické metody. Nicméně ne pro každou malignitu máme specifický marker, který by bylo možné detekovat s dostatečnou sensitivitou a specifitou. Významným pojmem v monitoraci relapsu je tzv. minimální reziduální nemoc MRD (minimal residual disease), případně nověji uváděné jako MMD (minimal measurable disease). Tento pojem zahrnuje minimální počet buněk, které v těle přetrvávají i po léčbě a po dosažení klinické remise onemocnění, a které nejsme schopni detekovat rutinními metodami jako je například cytomorfoloické vyšetření kostní dřeně. Tyto buňky mohou vést k relapsu onemocnění u pacientů, kteří klinicky ani laboratorně nejeví žádné známky přetrvávající nemoci. U některých malignit je MRD již považován za nezávislý prediktivní faktor pro přežití (Gillece et al. 2018) (Bader et al. 2002).

Možnosti léčby relapsu se liší podle druhu malignity a jejich úspěšnost je také velmi variabilní. V některých případech je možné podání chemoterapie, pro některé typy malignit existují cílené léky. Standardní praxí je podání dárcovských lymfocytů (blíže v další kapitole). Poslední možností léčby je retransplantace, která však připadá v úvahu spíše pro pacienty v dobré kondici, kteří jsou

schopni tolerovat vyšší toxicitu chemoterapie. Relaps malignity po transplantaci přesto dlouhodobě přežívá pouze minorita pacientů (Barrett and Battiwalla 2010).

1.3.2 Graft versus host disease (GvHD)

Reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease, GvHD) je závažnou komplikací, která se navzdory současným intenzivním profylaktickým imunosupresivním režimům rozvine u vysokého procenta pacientů po transplantaci. Je po relapsu hlavní příčinou krátkodobé potransplantační mortality (do d+100 a do +1 roku) (Holler et al. 2019) a zároveň při ní dochází k rozvoji řady symptomů vedoucích k významné potransplantační morbiditě, která zásadně ovlivňuje život pacientů po transplantaci a limituje je v návratu do běžného života. Příčina rozvoje GvHD spočívá zejména v inkompatibilitě v HLA systému mezi dárce a příjemcem, kdy dárcovské imunokompetentní buňky (zejména T lymfocyty) imunologickými mechanismy poškozují tkáň příjemce, které rozpoznávají jako cizorodé. Základní podmínky nutné pro rozvoj GvHD jsou známy již dlouho. Definoval je britský biolog R.E. Billingham; dárcovský štěp musí obsahovat imunokompetentní buňky; příjemce musí mít na povrchu svých buněk pro dárce cizí antigeny; a zároveň příjemce není schopen eliminovat dárcovské imunokompetentní buňky (Billingham 1966). Alogenní transplantace krvetvorných buněk tyto podmínky naplňuje. Obvykle je rozlišována forma akutní (aGvHD) a chronická (cGvHD), které se liší časovým odstupem od transplantace, klinickými projevy i patofyziologickým mechanismem vzniku.

Tabulka 3 – Klasifikace GvHD

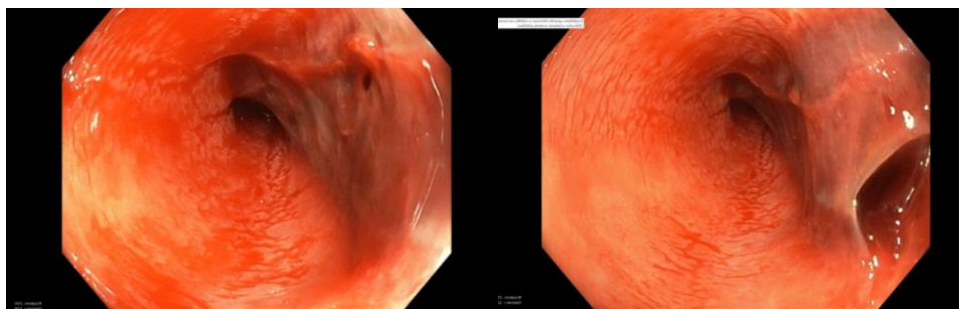
Klasifikace GvHD	Rozvoj po transplantaci
Akutní GvHD	
Klasická aGvHD	< 100 dní
Perzistentní	> 100 dní
Rekurentní	> 100 dní
"Late onset"	> 100 dní
Chronická GvHD	
Klasická cGvHD	bez časového určení
Overlap syndrom	bez časového určení

převzato z EBMT handbook 2019 (Holler, Greinix, and Zeiser 2019)

1.3.2.1 Akutní GvHD

Za akutní formu GvHD jsou tradičně považovány příznaky, které se rozvinou do dne +100 ode dne transplantace. Jestliže příznaky přetrvávají déle, klasifikujeme je jako persistující aGvHD. V situaci, kdy po se příznaky znovu objeví po jejich předchozím vymizení se jedná o rekurentní formu aGvHD. Situaci komplikují případy, kdy dojde k rozvoji symptomů aGvHD po dni +100, k čemuž dochází zejména v případech podání redukováných přípravných režimů (reduced intensity conditioning, RIC) nebo například po podání dárcovských lymfocytů (donor lymphocyte infusion, DLI). aGvHD se potom rozvíjí pod obrazem tzv. aGvHD s pozdním nástupem (late onset aGvHD). Zejména v případech podání redukováných přípravných chemoterapeutických režimů někdy dochází i k rozvoji tzv. překryvných syndromů (overlap syndrom) s klinickými rysy akutní i chronické formy, případně jedna forma může přecházet ve druhou (Filipovich et al. 2005)(Griffith et al. 2008).

Klinickými příznaky akutní GvHD a zároveň jejími diagnostickými parametry jsou postižení kůže, cholestatické postižení jater a postižení gastrointestinálního traktu manifestované nejčastěji profúzními průjmy (viz obr. 3). Příznaky se mohou vyskytovat současně i samostatně a jejich závažnost je variabilní (Holler et al. 2019).



Obrázek 3 – Akutní GVHD – těžké postižení střevní sliznice s ulceracemi a enterorhagií, gastrokopický nález

První vytvořený a stále nejvíce využívaný systém pro klasifikaci závažnosti příznaků aGvHD je Glucksbergova škála (Glucksberg et al. 1974), dle které je postižení každého z orgánů klasifikováno stupni (stage) 0 – 4. aGvHD je podle tohoto postižení rozdělováno na stádia (grade) I-IV. (viz tab. 4 a 5). Středně těžká až těžká aGvHD se projeví přibližně u 40 % všech pacientů, kteří podstoupí alogenní transplantaci (Holler et al. 2019). Přesnou incidenci ovlivňuje celá řada faktorů, ale bez podání efektivní imunosuprese již v rámci profylaktického režimu by došlo k rozvoji příznaků téměř u všech pacientů. Fatální by byly zejména v případě v případě HLA neshody mezi dárce a příjemcem a haploidentické transplantace by nebylo možné provádět.

Tabulka 4 – Staging aGvHD dle Glucksberga

Stádium	Kůže (rozsah exantému)	Játra (hodnota bilirubinu v séru)	Gastrointestinální trakt (intenzita průjmovitých stolic)
+	< 25% povrchu těla	34–50 $\mu\text{mol/L}$	500–1000 ml/den
++	25 – 50 % povrchu těla	51–102 $\mu\text{mol/L}$	1001–1500 ml/den
+++	Generalizovaná erythrodermie	103–255 $\mu\text{mol/L}$	> 1500 ml/den
++++	Generalizovaná erythrodermie s bulami a deskvamacemi	> 255 $\mu\text{mol/L}$	silná abdominální bolest s/bez ileu

Tabulka 5 – Grading aGvHD dle Glucksberga

Stupeň	Postižení kůže	Další orgánové postižení	Klinický stav (kondice)
I	+ až ++		beze změn
II	+ až +++	GIT a/nebo játra +	mírné zhoršení
III	++ až +++	GIT a/nebo játra ++ až +++	významné zhoršení
IV	++ až ++++	GIT a/nebo játra ++ až ++++	významné zhoršení

Nejvýznamnějším faktorem pro rozvoj aGvHD je HLA inkompatibilita mezi dárce a příjemcem. Riziko rozvoje reakce a její závažnost roste se stupněm HLA neshody (Loiseau et al. 2007)(Ratanatharathorn et al. 1998). Mezi další faktory patří vyšší věk pacienta, ženské pohlaví dárce pro mužského příjemce, předchozí aloimunitace dárce a povaha GvHD profylaxe. Je zvažována i řada dalších faktorů. Vyšší riziko je v některých studiích asociováno s faktory jakými jsou vyšší věk dárce, vyšší intenzita přípravného režimu, volba PBSC jako zdroje hematopoetických buněk či pacientova séropozitivita pro CMV (Holler et al. 2019). Recentní

komparativní analýza rizikových faktorů aGvHD a cGvHD provedené výzkumnou skupinou v Seattlu zpochybnila význam věku dárce, volby PBSC a ženského pohlaví pro mužského příjemce. Naopak potvrdila jejich spojení s rozvojem chronické formy GvHD (Flowers et al. 2011).

Patofyziologické mechanismy, které stojí za rozvojem aGVHD jsou stále cílem intenzivního výzkumu. Předpokládá se, že prvotním podnětem pro rozvoj aGvHD je poškození tkání způsobené podáním vysocedávkované chemoterapie v rámci přípravného transplantačního režimu. Z poškozených tkání pacienta se uvolňují molekulární struktury tzv. alarminy (damage-associated molecular patterns, DAMPs), které vedou k rozvoji prozánětlivé reakce (Apostolova and Zeiser 2016). Tu dále zhoršují interkurentní infekční komplikace v peritransplantačním období. Neutrofilní granulocyty v reakci na bakteriální infekci produkují reaktivní kyslíkové radikály, které dále zhoršují poškození tkání. Skrze takto poškozené tkáně může docházet k translokaci bakteriálních molekul (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) do krve nebo lymfatických tkání. To vyvolává cytotoxickou reakci dárcových T-lymfocytů, tvorbu prozánětlivých cytokinů (IL-1, TNF α aj.) a následně nekrotizující poškození tkání. Existuje řada regulačních mechanismů, které tento proces mírní. Zásadní roli v inhibici imunitních reakcí hrají T-regulační buňky (Treg), typ 1 regulační T lymfocyty (Tr1), invariantní NKT lymfocyty (iNKT) a myeloidní supresorové buňky (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) (Teshima et al. 2016).

1.3.2.2 Chronická GVHD

cGvHD patří mezi pozdní transplantační komplikace a je hlavní příčinou dlouhodobé potransplantační mortality, která není způsobena relapsem (non-relapse mortality, NRM) (Socié et al. 1999) (Grube et al. 2016). Postihuje kolem 50% všech transplantovaných pacientů a její incidence stoupá v důsledku řady faktorů jako jsou narůstající počet nepřibuzných dárců a dárců s větší HLA neshodou, zvyšující se věk pacientů, aplikace PBSC, infuze DLI (Lee et al. 2003) (Arai et al. 2015). Tradičně se chronická GvHD odlišovala od akutní GvHD časovým rozvojem příznaků po dni +100 po transplantaci. Od tohoto přístupu se ale v současnosti spíše upouští, protože příznaky cGvHD se mohou rozvinout i dříve, a to buď samostatně nebo jako součást překryvných syndromů. Na druhou stranu k rozvoji může dojít i s větším časovým odstupem od transplantace.

Příznaky cGvHD jsou odlišné od aGVHD a jsou velmi variabilní. Kromě klasických orgánových manifestací mohou imitovat projevy téměř jakékoli autoimunitní choroby. V klinické praxi se stále používá dělení na limitovanou a extenzivní formu (Indrák 2014). Indikace k zahájení léčby cGvHD by měla být podpořena bioptickým nálezem (Indrák 2014). Imunologické mechanismy vedoucí k cGvHD jsou odlišné od těch, které způsobují aGvHD, a naše současná úroveň znalostí je stále nedostatečná pro její účinné terapeutické ovlivnění. Částečně je to zapříčiněno šíří příznaků cGvHD. Mechanismus rozvoje cGvHD je podobný mechanismu vzniku patologických autoimunitních procesů, stejně tak i klinické příznaky cGvHD mohou být obtížně odlišitelné od projevů klasických autoimunitních chorob. Jde o poruchu imunologické tolerance, která vede k narušení mechanismů vrozené i adaptivní imunity. Svou roli zde hrají zároveň autoreaktivní a aloreaktivní T i B lymfocyty a jejich protilátky (Cooke et al. 2017). Dochází k chronickému zánětu, dysregulaci B a T lymfocytů a k fibrotizaci tkání (Zeiser and Blazar 2017).

1.3.3 Léčba GvHD

Značný důraz je kladen již na prevenci rozvoje příznaků GvHD. Problematicnost léčby GvHD zároveň spočívá v tom, že většina současných rutinně používaných terapeutických postupů

prohlubuje pacientův imunodeficit, což vede k vyššímu riziku relapsu a k rozvoji či prohloubení tíže infekčních komplikací. Zároveň s léčbou GvHD je tedy nutná velmi intenzivní a komplexní podpůrná péče a důsledná monitorace relapsu.

1.3.3.1 Profylaxe

Cílem aplikace profylaktického režimu je minimalizace rizika rozvoje GvHD a zároveň minimalizace komplikací plynoucích z její následné léčby imunosupresivními léky, která je zatížena řadou nežádoucích účinků. Postupy profylaxe GvHD se liší dle typu dárce, dle použitého přípravného chemoterapeutického režimu před transplantací a částečně je ovlivněna i zkušeností a zvyklostmi transplantačního centra.

Nejrozšířenější profylaktický režim u myeloablativních transplantací spočívá v podání kombinované imunosuprese, kdy zlatým standardem je kombinace kalcineurinového inhibitoru (calcineurin inhibitor, CNI), nejčastěji cyklosporinu A (CsA), a tzv. „krátkého“ methotrexátu (MTX). Alternativou k cyklosporinu je další kalcineurinový inhibitor – takrolimus (TAC). Ve dvou nezávislých randomizovaných studiích fáze III, ve kterých byla použita kombinace TAC/MTX, bylo prokázáno signifikantní snížení incidence aGvHD stupně II-IV oproti režimům s CsA/MTX, ani jedna ze studií však neprokázala signifikantní zlepšení v celkovém přežití (OS, overall survival) oproti konvenční kombinaci CsA/MTX (Ratanatharathorn et al. 1998) (Nash et al. 2000). Současně ve velkých randomizovaných studiích byly testovány kombinace s mykofenolátem mofetilem (MMF) a se sirolimem (SIR), které vykazují výsledky srovnatelné s kombinací CsA/MTX (Törlén et al. 2016). Profylaktický režim v případě alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované (nemyeloablativní) přípravě se od protokolu po myeloablativní přípravě liší v dávkování uvedených imunosupresiv a v délce jejich aplikace.

Specifická je situace GvHD profylaxe u haploidentických transplantací, kdy je riziko rozvoje GvHD vyšší. Na našem pracovišti je jako prevence rozvoje GVHD podávána kombinovaná imunosuprese složená z potransplantačního cyklofosfamidu následovaného kombinací takrolimu a mykofenolátu mofetilu. Incidence aGvHD není signifikantně nižší, než u jiných kombinací používaných v této indikaci, ale v některých studiích se ukázalo, že vede k nižší incidenci chronické GvHD (Fuchs 2017)

Kombinovaná imunosuprese může být doplněna o některou z lymfodeplečních metod (T-cell depleting, TCD). Snížení množství dárcovských T-lymfocytů ve štěpu lze docílit podáním monoklonálních (např. alemtuzumab, anti-CD52) nebo polyklonálních protilátek (antithymocytární globulin, ATG). Deplece T-lymfocytů je vysoce efektivní ve snížení rizika rozvoje GvHD, ale současně značně zvyšuje riziko rozvoje infekčních komplikací a relapsu (Holler et al. 2019). Dvojitě zaslepená studie fáze II u MUD HSCT prokázala, že podání ATG signifikantně snižuje incidenci aGvHD stupně II-IV a středně těžké cGvHD, nicméně zároveň celkové přežívání bylo v kohortě pacientů s ATG sníženo (Soiffer et al. 2017). Pravděpodobným vysvětlením této skutečnosti je déle trvající lymfopenie po aplikaci ATG, která vede k vyšší incidenci infekčních komplikací a k riziku potransplantační lymfoproliferativní nemoci (Gagelmann et al. 2017). Z tohoto důvodu není ATG rutinní součástí profylaktického režimů, ale je zařazován specificky v situacích, kdy převažuje riziko rozvoje GvHD (např. haploidentické transplantace nebo HLA mismatch mezi dárce a příjemcem).

Existuje ještě řada alternativních přístupů, které nejsou součástí rutinní praxe a jejich význam pro prevenci GvHD vyžaduje další výzkum. Například jsou současně s infuzí hematopoetických buněk aplikovány infuze expandované populace Treg lymfocytů. Dále se zkoušejí přístupy s manipulací

štěpu, které vedou k selektivní depleci α/β T-lymfocytů, případně k selektivní eliminaci aloreaktivních T lymfocytů po jejich *in vitro* či *in vivo* aktivaci (Holler et al. 2019).

1.3.3.2 Léčba 1. linie

Navzdory intenzivním profylaktickým režimům dochází k rozvoji akutní GvHD přibližně u 40 % transplantovaných pacientů. aGVHD je častější po transplantaci od nepříbuzných dárců, přičemž riziko stoupá s mírou HLA neshody, případně při haploidentických transplantacích. Není však zdaleka zanedbatelné ani v případě podání štěpu od shodného příbuzného dárce. V potransplantačním období jsou proto u všech pacientů důsledně monitorovány klinické, laboratorní a případně histologické známky GVHD. Pro management terapie GvHD je zásadní včasná diagnostika a podání imunosuprese s rozvojem prvních příznaků. Čím dříve – tedy v nižším stádiu GvHD – je léčba zahájena, tím vyšší je pravděpodobnost, že dojde k přerušení kaskády patofyziologických dějů vedoucích ke GvHD a k úspěchu léčby.

Diagnóza aGVHD je založena na klinických příznacích, které zahrnují kožní změny (rash nejčastěji v obličejí, na dlaních a ploskách nohou), abdominální příznaky (průjmy) a poškození jaterních funkcí manifestované zvýšením jaterních enzymů. Příznaky se nejčastěji objevují dva až tři týdny po převodu hematopoetického štěpu, v době intenzivního engraftmentu imunokompetentních buněk, ale mohou se manifestovat i s delším časovým odstupem. Diagnostické rozpaky může způsobit řada dalších klinických situací; infekce, projevy orgánové toxicity přípravného režimu nebo léková toxicita, eventuálně alergické projevy. Léčba aGVHD I. stupně, kdy je postižena pouze kůže může být léčena pouze topickými kortikosteroidy. Zdá se, že systémová léčba nemá v tomto případě výhodu (Holler et al. 2019). Léčba všech ostatních forem GvHD je zahajována vysokodávkovanou systémovou kortikoterapií. Lékem volby je methylprednisolon (či jeho alternativy) v dávce 2mg/kg/den po dobu 7-14 dní s následným pozvolným vysazením (Ruutu et al. 2014). Na tuto iniciální léčbu odpoví přibližně 40-50% pacientů (Holler et al. 2019). Probíhají studie, které se zaměřují na kombinace jiných léků v rámci léčby 1.linie, ale zatím žádný jiný lék, případně kombinace imunosupresiv, neprokázala superioritu nad léčbou sólo kortikosteroidy (Rashidi et al. 2016)(Martin et al. 2012). Při dlouhodobém podávání mají kortikosteroidy řadu nežádoucích účinků. Zásadním problémem je zejména snížení schopnosti boje s infekcemi, která může být pro pacienty fatální (Fuji et al. 2013). Dále je ve snaze o potlačení příznaků GvHD vždy nutné brát v úvahu, že podanými imunosupresivy je zároveň potlačen žádoucí GvL efekt. Léčba je tedy zatížena neustálým balancováním mezi potlačením GvHD a minimalizací rizika relapsu potlačením GvL a zvýšením rizika infekčních komplikací.

1.3.3.3 Léčba 2. linie a steroid-refrakterní GvHD

Navzdory terapeutickým a profylaktickým postupům zmíněným výše, incidence středně těžké až těžké formy aGVHD zůstává dle různých zdrojů mezi 20–50 % pacientů, kteří podstoupí transplantaci a u 30–50 % z nich se rozvine rezistence na léčbu kortikosteroidy (Michonneau and Socié 2019). Tato forma GvHD má extrémně špatnou prognózu – jednoleté přežití 30–40 % (Michonneau and Socié 2019) a její léčba je cílem intenzivního výzkumu. Léčba 2. linie je zahájena v případě progresu příznaků po 3-5 dnech na léčbě 1.linie, nedostatečné odpovědi po 7-14 dnech léčby, nebo případně při rozvoji nových příznaků po redukci kortikosteroidů, tedy při dependenci pacienta na vysokých dávkách kortikosteroidů (Holler et al. 2019). Velká část přístupů k léčbě kortikorezistentní GvHD je stále ve fázi studií a zatím není stanoven jednotný terapeutický přístup, který by postup léčby standardizoval napříč transplantačními centry. Je zkoušena celá řada léčiv v monoterapii i jejich kombinace. Nejčastěji se využívají monoklonální protilátky, eventuálně ATG. Využívány jsou například alemtuzumab (pan T-cell marker CD52), daclizumab nebo

inolimomab (α podjednotka receptoru pro IL-2 na T-lymfocytech), infliximab a etanercept (TNF- α). Výsledky jejich využití jsou však většinou pouze časově omezené. Dlouhodobé potlačení GvHD není dosaženo a refrakterní GvHD dosahuje stále až 80% mortality – zejména v případech s postižením GIT (Holler et al. 2019). V prospektivní studii prokázal JAK1 inhibitor itacitinib odpověď ve více než 70% případů a retrospektivní studie zaměřená na ruxolitinib taktéž ukázala dobré výsledky v léčbě steroid-rezistentní GvHD (Zeiser et al. 2015). JAK 1/2 inhibitory jsou nyní testovány v rámci III fáze klinických studií zaměřených na steroid-refrakterní GvHD. Další zajímavou možností je infuze α -1-antitrypsinu, která stimuluje proliferaci Treg lymfocytů a vyvolává protizánětlivou odpověď. Ve dvou recentních studiích fáze II bylo prokázáno dosažení kompletní remise v 35% případů a OR u 60% pacientů v den +28 po zahájení léčby (Marcondes et al. 2016; Magenau et al. 2018). Poměrně dobrých výsledků je dosahováno metodou extrakorporální fotoforézy, jejíž výhodou je nízká toxicita (Jagasia et al. 2013). Celá řada nových a nadějných postupů je testována v rámci preklinických studií (Hill et al. 2018). Nové strategie léčby cílí na signální dráhy cytokinových receptorů (Janus-activated kinase JAK 1 a 2), CD 28 (Aurora kinase), buněčnou migraci (ROCK), nebo růstové signální dráhy (MEK) (Holler et al. 2019).

Možnosti využití buněčné terapie v léčbě GvHD jsou blíže rozebrány v následující kapitole.

1.4 Imunoterapie v léčbě potransplantačních komplikací

Po aplikaci dárcovských hematopoetických kmenových buněk dochází v těle pacienta k tvorbě zcela nového imunitního systému. Již zde bylo zmíněno, že terapeutický potenciál alogenní transplantace ve formě GvL efektu je limitován rizikem rozvoje GvHD. Od prvopočátků HSCT byly rozvíjeny snahy o zmírnění příznaků či úplnou eliminaci GvHD se zachováním GvL efektu. Dosud však nebyl vypracován zcela optimální terapeutický postup, který by toto s jistotou zaručoval. Výzkum v této oblasti je proto intenzivní a objevuje se celá řada nadějných a vysoce inovativních postupů, které by v blízké budoucnosti mohly výrazně zlepšit prognózu pacientů, prodloužit jejich celkové přežívání a snížit jejich morbiditu.

Dalším důvodem k hledání alternativních přístupů k léčbě je řada nežádoucích účinků a komplikací spojených s aktuálními postupy léčby potransplantačních komplikací. Intenzivní systémová imunoprese, včetně kortikosteroidů, v léčbě GvHD navozuje výrazný imunodeficit, se kterým zásadně stoupá riziko infekčních komplikací. To i další rizika vyplývající z nežádoucích účinků a lékové toxicity vede ke komplikacím, které zvyšují morbiditu pacientů. Možnost vysazení nebo alespoň snížení dávek těchto léků by pro kvalitu života pacientů po transplantaci znamenaly zásadní úspěch.

1.4.1 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky jsou multipotentní nehematopoetické buňky, které lze izolovat z kostní dřeni i z řady dalších tkání (tuková tkáň, pupečnicková krev) (Wagner et al. 2005b). V řadě oborů se testuje využití jejich regeneračního potenciálu, zatímco pro léčbu potransplantačních komplikací se zdají být výhodné jejich imunomodulační schopnosti. Velkou výhodou pro jejich použití v souvislosti s transplantacemi je jejich nízký imunogenní potenciál. MSC neexprimují HLA antigeny I. třídy ani kostimulační molekuly (Aggarwal and Pittenger 2005) (Le Blanc and Pittenger 2005) a při jejich podání proto není nutné respektovat shodu v HLA systému mezi dárce a příjemcem.

Využití MSC v hematologii je založeno na jejich schopnosti modulovat imunitní reakce, potlačit příznaky či předcházet rozvoji GvHD a podpořit přijetí štěpu hematopoetických buněk. Navozují nezápovědné prostředí ovlivněním cytokinové produkce, zároveň tlumí proliferaci T lymfocytů (Maccario et al. 2005) (Di Nicola et al. 2002), což prokázaly i naše předchozí studie, ve kterých byly MSC přidány do suspenze lymfocytů stimulovaných buď HLA inkompatibilními mononukleárními buňkami (MNC) anebo nespecifickými lektiny, které potvrdily, že MSC významně ovlivňují aktivaci a proliferaci lymfocytů (Lysák et al. 2016) (Lysak et al. 2015). MSC snižují cytotoxický potenciál T-lymfocytů a zároveň stimuluji Treg (Nauta and Fibbe 2007), snižují sekreci IFN γ v Th1 buňkách a zvyšují expresi IL-4 v Th2 buňkách. Nezralé dendritické buňky a Treg zvyšují v přítomnosti MSC expresi IL-10, zatímco zralé dendritické buňky snižují produkci TNF- α a IL-12 (Ortiz et al. 2003).

První klinicky úspěšné podání MSC s cílem potlačit GvHD uskutečnila skupina pod vedením Katariny Le Blanc u pacienta s kortikorefrakterní aGvHD IV. stupně (Katarina Le Blanc et al. 2004). Podání vedlo k výraznému zlepšení klinických příznaků. Další studie zahrnovala devět pacientů s kortikorefrakterní GVHD, kterým byly aplikovány MSC v dávce $1,0 \times 10^6$ /kg (medián, rozmezí 0,7 – 9,0). Aplikace MSC nebyly doprovázeny žádnými projevy akutní toxicity a 6 z 9 pacientů dosáhlo kompletní odpovědi s vymizením symptomů (Ringdén et al. 2006). MSC byly testovány i pro léčbu chronických forem GVHD. Přestože prozatím výsledky klinických studií spíše prokazují větší efektivitu při podání MSC v léčbě aGvHD, i v této indikaci některé studie prokázaly zlepšení symptomů, možnosti snížení nebo úplného vysazení imunopresivní léčby a

nebyly zaznamenány žádné projevy toxicity (Weng et al. 2010)(Pérez-Simon et al. 2011). V jiné studii však bylo podání MSC v léčbě cGVHD méně průkazné. Řada příznaků nebyla podáním MSC nijak ovlivněna, nejspíše z důvodu již přítomných ireverzibilních fibrotických změn ve tkáních (Herrmann and Sturm 2014).

Využití MSC v léčbě SR-GvHD se dostalo do klinické praxe v řadě evropských zemí, nicméně studie zaměřené na efektivitu této léčby přinášejí kontroverzní výsledky. Z metaanalýzy z roku 2015 vyplývá, že MSC lze využít jako alternativu v léčbě SR-GvHD, ale pro potvrzení jejich efektivity je nezbytné provedení randomizovaných klinických studií (Hashmi et al. 2016), které zatím chybí. Zároveň zůstává řada nevyřešených otázek ohledně optimalizace metodiky zpracování a aplikačních protokolů MSC. Existuje řada studií, které se zaměřují na optimální variantu získávání, zpracování a aplikace MSC. Jejich design a metodika jsou však značně heterogenní a jejich limitací může být i nadále nejednoznačnost výsledků s ohledem na různé výrobní postupy a protokoly napříč výrobními centry (Rizk et al. 2016). Protokoly se liší v řadě parametrů – ve zdroji MSC, podávané dávce, načasování podání či způsobu přípravy finálního produktu. Dle výsledků metaanalýzy 30 klinických studií (Rizk et al. 2016) jako zdroj MSC převažuje kostní dřev (83%), následuje pupečnicková krev (13%) a tuková tkáň. Nejčastěji podávaná dávka MSC se pohybuje mezi 1,0 – 2,0 x 10⁶/kg, až po 10,0 x 10⁶/kg). Nejčastěji se podávají 1-2 dávky, výjimečně i více – až 5 dávek. Víme, že účinky MSC jsou na podané dávce závislé (Ramasamy et al. 2008). Jako optimální se zdá poměr MSC k lymfocytům 1:1 až 1:10. V naší studii vyšší poměr MSC vedl k vyšším imunosupresivním účinkům. Nejlepší výsledky byly dosaženy při poměru 1:5 (Lysak et al. 2015). Dále se zdá, že imunomodulační efekt může podpořit opakované podání MSC. Jako výhodné se dále ukázalo skladování MSC formou kryokonzervace a jejich rekultivace před použitím u konkrétního pacienta. Některé práce poukázaly na to, že proces mražení a rozmražení MSC může negativně ovlivnit jejich imunomodulační vlastnosti v důsledku indukce heat-shock odpovědi (François et al. 2012), nicméně výsledky naší studie to nepotvrdily. Při procesu kryokonzervace a následného rozmražení MSC byly imunomodulační vlastnosti zachovány (Holubova et al. 2014). Výsledky podání MSC se v různých centrech liší, velkou měrou je to pravděpodobně zapříčiněno inkonzistencí výrobních a aplikačních postupů (Rizk et al. 2016), proto by měla být nynějším cílem výrobních center snaha o standardizaci metodik výroby a aplikace léčebných přípravků MSC z důvodu možnosti jejich porovnání mezi jednotlivými centry.

1.4.2 Invariantní NKT lymfocyty

NKT lymfocyty jsou minoritní subpopulací lymfocytů, pro které je charakteristická exprese povrchových antigenů typických pro T-lymfocyty (CD3+) a zároveň exprimují antigeny NK-lymfocytů (CD161, NKp46, NKp30). Dále exprimují antigeny společné pro T a NK buňky (NKG2D, 2B4, DNAM1) (Kuylenskierna et al. 2011) (Nguyen et al. 2008). V lidské periferní krvi se iNKT nacházejí v rozmezí od nedetekovatelných hodnot až k 1% ze všech cirkulujících T lymfocytů, přičemž medián hodnot vycházející ze studií je 0,05% (Berzins et al. 2011; Exley et al. 2011; Brennan et al. 2013). Množství iNKT je vysoce variabilní mezi jednotlivci a je ovlivňováno celou řadou fyziologických i patologických stavů. Nízké počty NKT buněk v periferní krvi byly asociovány s řadou imunologických defektů u lidí i u myši (Godfrey and Kronenberg 2004).

V současnosti jsou popsány dva typy NKT lymfocytů. V popředí našeho zájmu jsou NKT buňky typu I, známé také jako „klasické“ NKT nebo invariantní NKT lymfocyty. Jsou charakteristické expresí invariantního TCR, který se aktivuje po kontaktu s CD1d molekulou na povrchu antigen prezentujících buněk, proto jsou v anglosaské literatuře označovány iNKT buňky I. typu také jako „CD1-dependent“ nebo „CD1d-restricted cells“. NKT lymfocyty typu II mají vlastnosti více podobné konvenčním T lymfocytům (Adams and Luoma 2012), neexprimují invariantní TCR (viz níže) a nejsou předmětem našeho výzkumu.

V závislosti na podmínkách jsou klasické iNKT schopny chovat se jako efektorové buňky s vlastní cytotoxickou aktivitou nebo jako pomocné imunitní buňky secernující cytokiny (Cianferoni 2013). Interakcemi s dalšími buňkami imunitního systému – makrofágy, dendritickými buňkami, B-, T-, NK-lymfocyty – jsou schopny amplifikovat nebo regulovat adaptivní imunitní odpověď. Patří mezi první buňky aktivované v rámci imunitní reakce a propojují vrozenou a adaptivní imunitu (Brigl and Brenner 2004)(Van Kaer 2007)(Wolf et al. 2018). Po aktivaci mohou iNKT produkovat širokou škálu cytokinů jako jsou IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, RANTES, MIP-1 α nebo β a jsou schopny podnítit rozvoj Th1 a zároveň Th2 imunitní odpovědi (Juno et al. 2012). Produkce cytokinů nastupuje u iNKT záhy po setkání s antigenem prezentovaným antigen-prezentujícími buňkami cestou CD1d molekuly a nevyžaduje interakce s dalšími buňkami imunitního systému. Jejich aktivace může vést buďto k amplifikaci nebo k supresi imunitní reakce (Godfrey and Kronenberg 2004) cestou produkce konkrétního spektra cytokinů (prozánětlivé/regulační) a aktivace dalších molekul a buněk imunitního systému. O typu imunitní reakce je pravděpodobně rozhodnuto na základě setkání iNKT s primárním antigenním stimulem (Wolf et al. 2018).

Mechanismy iNKT lymfocytů ovlivňují celou řadu patologických dějů. Mají významnou roli v prevenci autoimunitních onemocnění, protinádorové imunitě, infekční obraně a pravděpodobně hrají roli v zánětlivých mechanismech (Choi et al. 2008)(Kinjo et al. 2013). Jejich dysfunkce či nízké hladiny jsou asociovány se širokou škálou patologických stavů – autoimunitních, infekčních a nádorových onemocnění (Godfrey and Kronenberg 2004)(Cianferoni 2013). Zdá se, že iNKT vykazují přímý i nepřímý protinádorový efekt, a přitom zároveň mohou fungovat jako modulátory imunitních reakcí. Z hlediska hematologických malignit se proto zdají být ideálními buňkami, které by za určitých okolností mohly fungovat jako modulátor rozvoje GvHD a zároveň nepotlačovat, případně ideálně ještě podpořit GvL efekt.

1.4.2.1 iTCR receptor

iNKT typu I exprimují na svém povrchu „invariantní“ T buněčný receptor (invariant T-cell receptor, iTCR), který je složen ze dvou podjednotek, α a β . Každá z nich má variabilní a konstantní doménu. Variabilní domény α řetězce jsou kódovány V a J (joining) genovými segmenty a β řetězce jsou kódovány V, J a D (diversity) segmenty. Lidský iTCR tvoří konzervativní kombinace řetězců V α 24-J α 18/V β 11 (van Schaik et al. 2014) (Dhodapkar and Kumar 2017). Pomocí iTCR rozpoznávají iNKT buňky bakteriální nebo endogenní glykolipidové struktury prezentované cestou CD1d molekuly na antigen prezentujících buňkách. Tato interakce u nich vyvolá rychlou produkci celé řady cytokinů (Meyer et al. 2006), které vedou k aktivaci mechanismů adaptivní imunity, nebo se samy iNKT mohou projevit jako efektorové buňky s přímým cytotoxickým účinkem.

1.4.2.2 CD1d molekula

CD1d je nepolymorfní molekula ze skupiny tzv. neklasických MHC molekul I. třídy (Patterson et al. 2008). iTCR na rozdíl od TCR klasických T-lymfocytů nerozpoznává peptidy ve vazbě na polymorfní molekuly hlavního histokompatibilního komplexu, ale reaguje na lipidové struktury (zejména glykolipidy a glykosfingolipidy) ve vazbě na CD1d molekulu na povrchu antigen prezentujících buněk (např. monocytů). iNKT mohou být aktivovány exogenními lipidy např. mikrobů, stejně jako endogenními lipidy vlastních buněk, tumorózně změněných buněk nebo alergenů (Cianferoni 2013). Pro *in vitro* i *in vivo* aktivaci iNKT skrze vazbu na CD1d molekulu je využíván arteficiální lipidový antigen α -galactosylceramide (krátce α -GalCer, případně KRN7000) (Liao et al. 2013), což je sloučenina izolovaná z výtažku mořské houby *Agelas mauritianus*. Přirozeně se nevyskytuje v buňkách savců a dokáže vyvolat aktivaci a expanzi iNKT

buněk. CD1d antigen je zároveň exprimován na hematopoetických buňkách (Brossay et al. 1997; Roark et al. 1998) a na maligních buňkách myelomonocytární a B-lymfocytární linie (Metelitsa 2011).

1.4.2.3 L-Selektin CD62L

Jako CD62L je označován membránový glykoprotein leukocytů, který má funkci adhezivní molekuly v časném období imunitní odpovědi. Má velký význam pro migraci lymfocytů do sekundárních lymfoidních orgánů a hraje důležitou roli v akutní i chronické zánětlivé reakci (Ye et al. 2017). NKT buňky expandované *ex vivo* byly aplikovány *in vivo* a hladina exprese CD62L jejich na povrchu byla korelována s mírou jejich protinádorového efektu. Ukázalo se, že CD62L pozitivní buňky vykazovaly delší přežívání a významnější míru proliferace po stimulaci jejich TCR receptoru. Naopak buňky, které CD62L neexprimovaly, podléhaly časnější buněčné smrti (Tian et al. 2016)

1.4.2.4 Subpopulace iNKT

Subklasifikace iNKT je založena na expresi CD4 a CD8 antigenů. Z tohoto hlediska mohou být iNKT buď CD4 nebo CD8 pozitivní. iNKT, které neexprimují ani jeden z těchto antigenů, se označují jako dvojité negativní (double negative, DN) a zdá se, že mají potenciál se diferencovat do obou typů CD4⁺/CD8⁺ (Lynch et al. 2015). CD4⁺ iNKT podporují spíše Th2 imunitní odpověď a produkují IL-4. Obvykle jsou spíše inhibiční a mají funkci regulátorů imunitní reakce (Osada et al. 2005)(Bricard et al. 2009), ale za určitých okolností jsou ale zároveň schopny exprimovat i cytokiny podporující Th1 imunitní reakci (Wolf et al. 2018). CD8⁺ iNKT mají funkce podobné cytotoxickým T lymfocytům a mohou způsobovat přímou buněčnou smrt buněk napadených patogeny, nebo vlastních poškozených či nádorových buněk (Gadola et al. 2002; Yuling et al. 2009). Kromě vlastní cytotoxické aktivity mohou produkovat proinflatorní cytokiny, preferenčně IFN γ , a tím potencují rozvoj Th1 zánětlivé imunitní reakce (Wolf et al. 2018). Vzhledem k tomu, že subpopulace CD8⁺ iNKT je v periferní krvi zastoupena v nízkých počtech (Wolf et al. 2018), byla popsána teprve v nedávné době. Do té doby se mělo za to, že iNKT jsou buďto CD4 pozitivní s možností produkovat Th1 i Th2 imunitní odpověď nebo CD4 negativní s vlastnostmi podobnými cytotoxickým T lymfocytům (Gumperz et al. 2002). Na základě tvorby IL-17 lze vymezit Th17-like iNKT, které svými funkcemi a schopností podnítit rozvoj zánětlivé reakce připomínají konvenční Th17 lymfocyty.

Jednotlivé subpopulace vykazují i odlišené rozložení v tělesných orgánech. iNKT asociované s Th1 odpovědí se v nejvyšších počtech kumulují v játrech a ve slezině, zatímco Th2-asociované iNKT se nejvíce nacházejí v plicích a ve střevě (Wolf et al. 2018). Th17-like iNKT jsou v nejvyšších počtech lokalizovány v plicích, střevech, lymfatických uzlinách a v kůži (Monteiro and Graca 2014). Dále byl popsán subtyp iNKT, který se kumuluje ve vysoké míře v tukové tkáni. Tyto adipose-iNKT produkují hlavně protizánětlivé cytokiny jako např. IL-10 a IL-2 (Exley et al. 2014; Lynch et al. 2015), kterými indukují antiinflatorní fenotyp v dalších buňkách imunitního systému, zejména v makrofázích a na rozdíl od ostatních iNKT neexprimují transkripční faktor PLZF (Lynch et al. 2015). Jejich funkce je významně narušena u osob s metabolickým syndromem a s obezitou, kdy převažuje jejich prozánětlivý fenotyp (Exley et al. 2014).

1.4.2.5 Protinádorový efekt iNKT

Nízké hladiny iNKT byly popsány u řady nádorů – u karcinomu plic, prsu, tlustého střeva, melanomu a u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku (Wolf et al. 2018). Vyšší hladiny iNKT

prokazované v nádorech jsou spojeny s lepší prognózou (Cianferoni 2013). Ve studii (Tachibana et al. 2005) byla infiltrace iNKT lymfocytů v nádoru nezávislým prognostickým faktorem lepšího celkového přežití u kolorektálního karcinomu. V souladu s tím (Song et al. 2009; Cianferoni 2013) potvrdili lepší prognózu u pacientů s vyššími hladinami iNKT s CD1d⁺ pozitivními nádory (konkrétně s neuroblastomem). Obdobné jsou výsledky u hematologických malignit. Nízké hladiny iNKT v periferní krvi pacientů s akutní myeloidní leukémií jsou asociovány s horší prognózou a kratším přežíváním (Najera Chuc et al. 2012). Nepřímý antitumorózní efekt iNKT je založen na schopnosti iNKT produkovat řadu cytokinů, které aktivují CD8⁺ T a NK lymfocyty a podněcují jejich cytolytickou aktivitu (Lam et al. 2017). Tato schopnost iNKT byla potvrzena robustními studiemi na myších modelech. Zároveň mají iNKT i vlastní přímý protinádorový efekt, který nevyžaduje zapojení dalších buněk imunitního systému (Wolf et al. 2018). Vlastní cytotoxický potenciál iNKT zahrnuje aktivaci apoptózy buněk nejspíše několika mechanismy podobně jako u aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů –interakci Fas/FasLigand, produkcí IFN γ i sekrecí endogenních perforinů a granzymů. Volba konkrétního mechanismu indukce apoptózy zřejmě závisí na prezentaci konkrétních receptorů buněčné smrti na cílových buňkách (Bassiri et al. 2013). Řada studií na leukemických nádorových liniích (Aoki et al. 2020) i na solidních nádorech (Cianferoni 2013) potvrdila tento přímý protinádorový efekt vůči CD1d-pozitivním nádorovým buňkám, a to zejména, když prezentují glykolipidové antigeny. iNKT však prokazují protinádorový efekt i vůči nádorovým buněčným liniím, které CD1d neexprimují (Bassiri et al. 2013), přestože mechanismus rozpoznání CD1d negativních nádorových buněk a mechanismus přímého protinádorového efektu iNKT vůči nim zatím nebyl zcela uspokojivě vysvětlen. Bylo prokázáno, že aktivované iNKT lymfocyty rozpoznávají leukemické buňky *in vitro* nezávisle na tom, zda exprimují CD1d antigen (Aoki et al. 2020). To vede k závěru, že iNKT by se mohly uplatnit v léčbě hematologických malignit nezávisle na CD1d expresi.

Současný výzkum se zaměřuje na několik možností využití iNKT v rámci jejich klinického podání. Buďto se iNKT mohou podávat profylakticky v souběhu s aloHSCT, nebo se buňky dále upravují do komplexních molekul CAR-iNKT a rTCR-iNKT (Wolf et al. 2018). Podání samostatného α GalCer, který je zásadní pro *in vitro* expanzi iNKT, v rámci protinádorové terapie, bylo již potvrzeno jako bezpečné a pacienty dobře tolerované. Ovšem samostatné podání α GalCer přímo pacientům nepotvrdilo svůj významný protinádorový efekt, vede totiž k indukci IL-4 a k anergii iNKT (Giaccone et al. 2002)(Cianferoni 2013). Naopak největšího protinádorového efektu bylo u solidních tumorů dosaženo při kombinaci podání autologních iNKT v kombinaci s α GalCer-stimulovanými dendritickými buňkami (Motohashi et al. 2011).

1.4.2.6 Imunomodulační potenciál iNKT v léčbě GvHD

iNKT by mohly najít místo v léčbě komplikací po aloHSCT, protože současně se svými protinádorovými vlastnostmi, které by mohly podněcovat GvL efekt, nepřispívají k rozvoji GvHD (Jahnke et al. 2019). Současný výzkum naopak poukazuje na jejich významnou roli při regulaci GvHD. Vyšší hladiny iNKT v časném období po aloHSCT korelovaly s nižším rizikem rozvoje GvHD (Rubio et al. 2012) a naopak nízké hladiny iNKT v dárcovském štěpu jsou spojeny s vyšším rizikem jejího rozvoje (Mavers et al. 2017). Na myších modelech bylo prokázáno, že stimulace pomocí α -GalCer nebo adoptivní přenos iNKT buněk vede k nižšímu riziku rozvoje GvHD, přičemž pro optimální potlačení GvHD se zdá být zásadní role IL-4, který iNKT produkují, a který vede k expanzi T-regulačních buněk (Schneidawind et al. 2014) (Du et al. 2017). Dále bylo prokázáno, že pravděpodobnost vzniku a rozvoje GvHD ovlivňuje aplikovaná dávka iNKT (Chaidos et al. 2012). Účinnost iNKT buněk byla prokázána na myších modelech i v rámci léčby chronické GvHD s projevy orgánové fibrózy a známkami autoimunitního onemocnění. Adoptivní transfer iNKT byl efektivní v rámci preventivního podání před rozvojem známek onemocnění, ale

zároveň došlo ke zlepšení i u již rozvinutých příznaků chronické GvHD (Du et al. 2017). Mechanismus zde spočívá v potlačení autoimunitních mechanismů, produkci IL-4 a indukci tvorby T-regulačních lymfocytů.

2. Cíle práce:

1. Porovnání imunomodulačního potenciálu léčivých přípravků (LP) z poolovaných MSC a LP od jednotlivých dárců
2. Porovnání různých šarží MSC z hlediska kompozice LP
3. Monitorace kinetiky rekonstituce subpopulace iNKT lymfocytů po aloSCT a stanovení ideálního časového okna pro odběr autologních iNKT pro výrobu LP
4. Porovnání imunomodulačních vlastností MSC a iNKT

Pracovní hypotézy:

1. Poolování šarží LP MSC od různých dárců zvýší jejich imunomodulační potenciál
2. Různé šarže LP MSC se vzájemně liší ve svých vlastnostech
3. V průběhu regenerace imunitního systému po aloSCT stoupá hladina iNKT
4. MSC a iNKT se neliší z hlediska imunomodulačního potenciálu

3. Materiály a metody

3.1 Materiál, reagentie a přístrojové vybavení

Materiál a reagentie

- sterilní stříkačka (50ml), sterilní jehly
- zkumavky 4ml EDTA, zkumavky 9ml heparin
- sterilní falkony: 50 ml (Corning /TPP), 15 ml (Corning / TPP)
- sterilní špičky, pipety, strippetor
- sterilní serologické pipety 25ml (Corning)
- sterilní kultivační láhve 175 cm² a kultivační destičky (96, 48, 24 jamkové) (Corning)
- sterilní kultivační zkumavky 20cm² (TPP)
- sterilní pasteurky
- sterilní 12 x 75 mm zkumavky (BD Bioscience)
- stříkačkový filtr Sterifix® (Braun.), velikost pórů 0,22 μm
- sterilní kryozkumavky (Nunc)
- PBS (Gibco)
- Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare)
- Kultivační médium CCM (vlastní produkce HOO) složení: alpha-MEM (Gibco), 10 % destičkový lyzát (pHPL, vlastní produkce HOO), heparin (86IU/ml)
- heparin (Zentiva)
- TrypLE Select (Gibco)
- Phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich)
- RPMI 1640 (Gibco)
- Lyzační roztok – ammonium chlorid (Lékárna FN Plzeň)
- DMSO (CryoSure-DMSO, WAK-Chemie Medical GmbH)
- Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific)
- BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Bioscience)
- E-plate (ACEA Biosciences)
- primární protilátky: CD105-FITC, CD90-APC, CD45-BV510, TCRVβ11-APC, TCR Vα24-Jα18-BV421 (BioLegend, San Diego, USA), CD3-FITC, CD3-PerCP, CD4-Pacific Blue, CD4-APCCy7, CD8-PE, CD62L-PECy7, 7-actinomycin (7AAD) (Exbio, Vestec, Česká republika), CD19-PC7, CD13-APC, HLA-DR-Pacific Blue, CD45-Krome Orange (Beckman Coulter,), CD14-APCCy7, CD73-PE, CD25-APC, CD1d-APC (BD Bioscience)

Přístrojové vybavení

- průtokový cytometr BD FACS Canto II (BD Bioscience)
- chlazená centrifuga Cryofuge 5500i (Thermo Scientific)
- hematologický analyzátor Sysmex-XN-350 (Sysmex)
- laminární box SAFE 2010 – 1.2 (Jouan Nordic-Holten)
- CO₂ inkubátor SteriCycle (Thermo Scientific)
- programovatelný zamrazovač IceCube 14M
- kryokontejner (pro skladování v tekuté fázi LN₂)
- xCELLigence RTCA DP instrument (Roche Diagnostic, Mannheim, Německo)

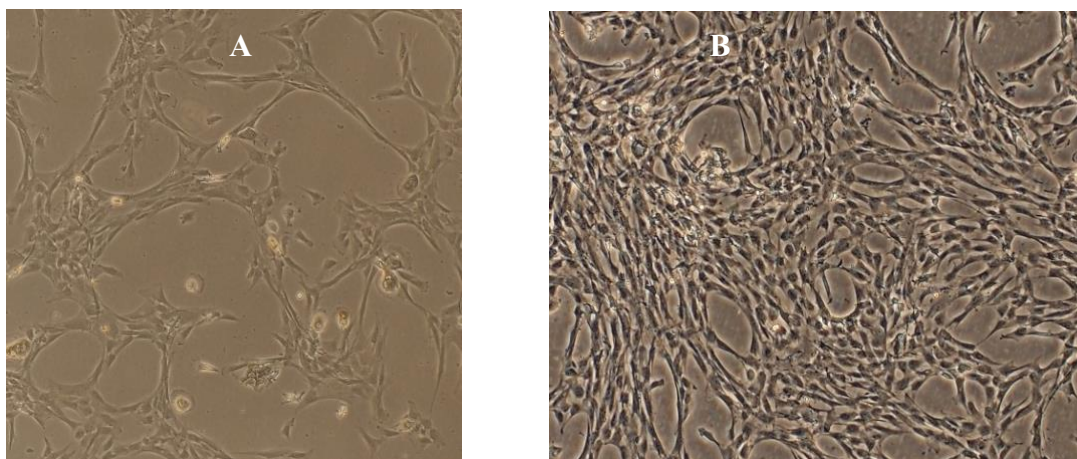
3.2 Srovnání single donor a poolovaných přípravků MSC

3.2.1 Izolace MSC z kostní dřene

MSC byly získány z frakce mononukleárních buněk z 20 ml aspirátu kostní dřene zdravých dárců (5 dárců), kteří podepsali informovaný souhlas schválený společnou etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň. MSC byly získány pomocí gradientové centrifugace s využitím separačního média Ficoll-Paque. Z každého odběrového vaku bylo za sterilních podmínek odebráno 20 ml a v laminárním boxu byla dřeň rozdělena na aliquoty po 10 ml do 2 sterilních 50 ml falkon, poté byla naředěna a promíchána s 10 ml PBS v poměru 1:1. Do dvou nových sterilních 50 ml falkon bylo napipetováno po 10 ml Ficoll-Paque (na každých 20 ml naředěné dřene jedna zkumavka s Ficoll-Paque). Na Ficoll-Paque bylo navrstvena sterilní pasteurkou 20 ml buněčné suspenze. Uzavřené falkony se centrifugovaly (1000g/15min/za pokojové teploty, stupeň rozběhu i brzdění 6). Buffy-coat byl přenesen sterilní pasteurkou do nové 50 ml falkony (na každý buffy-coat 1 nová zkumavka) a byl resuspendován a promíchán s 20 ml PBS. Poté byly zkumavky znovu centrifugovány (1000g/8min, za pokojové teploty, stupeň rozběhu i brzdění 9). Po slití supernatantu byla peleta resuspendována v 1 ml CCM. Do sterilní zkumavky 12x75 mm bylo odebráno 100 μ l pro kontrolu kvality (měření koncentrace). Buňky byly poté umístěny do kultivační lahve s CCM a umístěny do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂) (viz materiál a reagentie).

3.2.2 Kultivace MSC

MSC byly izolovány z frakce mononukleárních buněk na základě 48hodinové adheze. Každých 48 hodin kultivace byla láhev vyjmuta z inkubátoru a přenesena do laminárního boxu, kde bylo odsáto medium s neadherujícími buňkami. Láhev byla poté omyta 10 ml PBS a adherentní buňky byly dále kultivovány, současně byl každé 2-3 dny růst buněk kontrolován pod mikroskopem. Byla hodnocena morfologie buněk a konfluence kultury (viz. obrázek 4). To se opakovalo, dokud nebylo dosaženo 80–90 % konfluence.



Obrázek 4 – konfluence buněk, vlevo (A) 40 % konfluence, vpravo (B) 80 % konfluence

Při dosažení této konfluence byla prováděna pasáž. Nejprve byly adherentní buňky z povrchu uvolněny pomocí TrypLE Select roztoku, poté centrifugovány (480g/8min/20°C, stupeň rozběhu 9, brzdění 9) a následně znovu nasazeny v koncentraci $0,5 \times 10^6$ na 175cm² láhev. V průběhu kultivace byly buňky pasážovány dvakrát.

3.2.3 Zamrazení MSC

Buňky byly zamrazeny v kryomédiu a byly uchovány v tekutém dusíku až do experimentu. Zamrazovací médium bylo připraveno těsně před použitím smísením jednotlivých složek v poměru: 10 % DMSO + 30 % pHPL + 60 % alpha-MEM. Médium bylo přidáno k buněčné suspenzi (množství závisí na koncentraci buněk, max. však 80 μ l), tudíž finální koncentrace DMSO byla cca 10 %. Připravené médium bylo ihned vloženo do termobloku vytemperovaného na 4°C. Z kultivační láhve bylo odsáto staré medium, láhev byla omyta PBS a poté byly adherentní buňky uvolněny od povrchu pomocí TrypLE Select roztoku. Buňky se inkubovaly (5–7 min v 37 °C) a poté byly centrifugovány (480g/8min/20°C, stupeň rozběhu 9, brzdění 9). Do označených kryozkumavek bylo napipetováno vypočítané množství suspenze. Byl přidán 1ml vychlazeného kryomédia a kryozkumavky byly ihned vloženy do zamrazovače. Pro zamrazování vzorků byl použit programovatelný zamrazovač s rychlostí zamrazování: - 1 °C/min až do -80°C. Po dosažení teploty -80 °C byly kryozkumavky přeneseny k uložení do kryokontejneru v kryoskladu, kde byly uloženy do tekuté fáze kapalného dusíku.

3.2.4 Rozmrazení MSC

Kryozkumavky byly vyjmuty z kryokontejneru a za sterilních podmínek a za vizuální kontroly byly rozmrazeny v předem vytemperované vodní lázni (37°C). Po rozmrazení byl obsah kryozkumavek smíchán s 5 ml kultivačního roztoku a centrifugován (480g/5min, pokojová teplota). Buňky byly poté nasazeny do kultivačních lahví o objemu 175cm² se 30 ml CCM a v inkubátoru byly kultivovány po dobu 7-8 dní, každý 2-3 den bylo měněno médium. Následně byly MSC pasážovány a využity na imunomodulační testy.

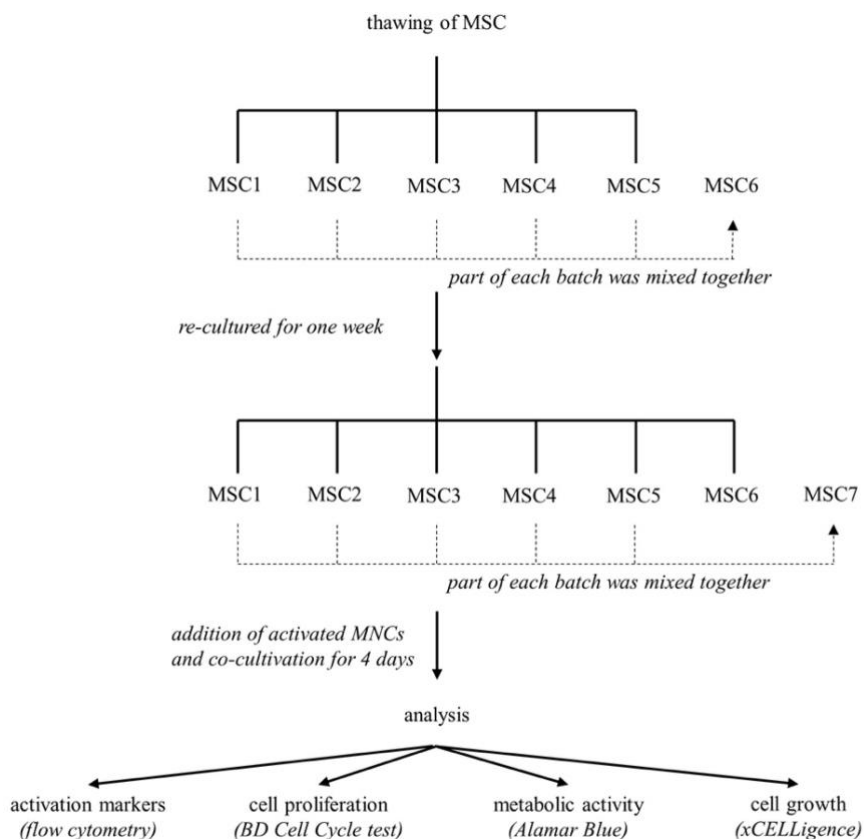
3.2.5 Příprava mononukleárních buněk

Mononukleární buňky byly získány od 10 zdravých dárců (5 žen/5 mužů, medián věku 35 let). Všichni dárce podepsali informovaný souhlas schválený společnou etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň. Dárce MNC nebyli v příbuzenském vztahu s dárci MSC. Od každého dárce byla odebrána 9 ml plné krve do zkumavky s heparinem. MNC byly získány pomocí gradientové centrifugace s využitím separačního média Ficoll-Paque. Krev byla naředěna v poměru 1:1 s PBS a promíchána, poté byla opatrně navrstvena na separační médium Ficoll-Paque v poměru 1:1. Zkumavky byly přeneseny do centrifugy a centrifugovány (1000g/15 min za pokojové teploty, rychlost rozjezdu a brzdění 6). Po centrifugaci byl stažen „buffy coat“ do nové 50ml falkony, kde byl doplněn do 30 ml PBS a opět centrifugován (480g/10 min za pokojové teploty, stupeň brzdy a rozjezdu 9). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna v 1ml RPMI + 10 % pHPL. Koncentrace buněk byla změřena na hematologickém analyzátoru. Bylo určeno množství suspenze obsahující 1x10⁶ buněk.

3.2.6 Smíchání buněk před provedením imunomodulačních testů

Bylo rozmrazeno 5 šarží MSC, které byly označeny jako MSC 1-5. Pro vytvoření „poolovaného“ vzorku označeného jako MSC6 bylo z každé jednotlivé šarže (MSC 1-5) odebráno 300 μ l a smícháno ihned po rozmrazení. Všechny vzorky MSC byly po rozmrazení cca týden kultivovány. Po týdenní kultivaci se provedla pasáž buněk. Poolovaný vzorek MSC7 byl vytvořen odebráním a smícháním 300 μ l ze vzorků MSC1-5 po pasáži, které byly naředěny na stejnou koncentraci, takže jejich množství bylo stejné. Po pasáži byl určen počet buněk na hematologickém analyzátoru a bylo vypočítáno odpovídající množství buněčné suspenze tak, aby každá zkumavka MSC1-7 obsahovala 0,5x10⁶ MSC.

Do všech zkumavek s MSC bylo přidáno stejné množství – 1×10^6 MNC. Buňky tedy byly smíchány v poměru MNC:MSC = 2:1. Pro stimulaci buněk byl využit phytohemagglutinin (PHA) v koncentraci $10 \mu\text{g/ml}$. Do všech zkumavek bylo doplněno vypočítané množství média (RPMI + 10 % pHPL), aby byl po přidání buněk celkový objem 1ml (tj. množství suspenze MNC + množství suspenze MSC – 1000 = množství média). Do zkumavek s negativní kontrolou MNC bylo přidáno pouze kultivační médium. Buňky byly zvortexovány a společně kultivovány v inkubátoru po dobu 96hod. Po uplynutí doby kultivace byl z každé zkumavky odebrány vzorky pro provedení imunomodulačních testů. Schéma experimentu je přehledně zobrazeno na obrázku 5.



Obrázek 5 – Schéma poolování jednotlivých šarží MSC (převzato z vlastní publikace, (Hejretová et al. 2020))

3.2.7 Měření imunomodulačního potenciálu MSC

Po čtyřdenní kokultivaci MSC s MNC byla změřena exprese aktivačního markeru CD25 na CD3+CD4+ buňkách. Zkumavky byly zvortexovány a z každé bylo odebráno 200 μl do zkumavky 12 x 75 mm. Do každé byly přidány protilátky – 5 μl od každé: CD45-Krome Orange, CD3-PerCP, CD4-Pacific Blue, CD25-APC. Po 15minutové inkubaci ve tmě, byly zcentrifugovány (350g/5 min za pokojové teploty). Po centrifugaci byl slit supernatant a peleta rozvolněna v 300 μl PBS. Takto byla zkumavky vložena do cytometru FACS Canto II. Nejdříve byly měřeny negativní kontroly, kde je hodnota exprese CD25 pod 5 %. Podle negativní kontroly byl nastaven gate pro stanovení CD25 u ostatních zkumavek. Expresce CD25 byla stanovena jako MFI (mean fluorescence intensity) a byl vypočten rozdíl v expresi CD25 mezi jednotlivými šaržemi MSC 1-7.

3.2.8 Porovnání metabolické aktivity MSC

K porovnání metabolické aktivity kokultivovaných MSC byla využita próba Alamar Blue. K buněčné suspenzi (200 µl) bylo přidáno 20 µl Alamar Blue na 96jamkovou mikrotitrační destičku v doubletech a vzorky byly opatrně promíchány. Buňky byly inkubovány 4 hodiny v inkubátoru s 5 % CO₂ při 37°. Poté byl měřen fluorescenční signál (excitace 540/35, emise 590/20) metabolizovaného Alamar Blue na Synergy HT. Jako negativní kontrola byla použita Alamar Blue v kultivačním médiu.

3.2.9 Porovnání buněčné proliferace

K analýze buněčné proliferace byl použit BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit. K analyzovaným vzorkům byly postupně přidávány jednotlivé roztoky – roztok A (poté inkubace 10 minut v pokojové teplotě), roztok B (inkubace 10 minut RT) a roztok C (10 minut inkubace v chladu). Po inkubaci byly vzorky změřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, USA) a analyzovány v softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow system).

3.2.10 Porovnání buněčného růstu

xCELLigence RTCA DP instrument byl použit k porovnání buněčného růstu mezi šaržemi MSC. Software stanovuje buněčný index (cell index, CI) jako relativní změnu v naměřené impedanci. MSC (10000 buněk/jamka) byly nasazeny na E-plate (ACEA Biosciences, San Diego, USA) v kvadruplikátech. Buněčný růst byl monitorován po dobu 168 hodin, přičemž každých 12 hodin byly zaznamenávány změny růstu.

3.3 Porovnání kompozice šarží MSC

Kontrola povrchových markerů MSC je prováděna průtokovou cytometrií po každé pasáži. K ověření imunofenotypu MSC jsou stanovovány pozitivní a negativní markery. K suspenzi MSC byly přidány protilátky: CD105-FITC, CD90-APC, CD45-BV510, CD3-PerCP, 7-actinomycin, CD19-PC7, CD13-APC, HLA-DR-Pacific Blue, CD14-APCCy7, CD73-PE. Poté byly buňky inkubovány (15 min ve tmě za pokojové teploty). Po inkubaci byly promyty PBS a centrifugovány (350 g/5 min/20 °C). Peleta byla poté resuspendována v 300 µl PBS a změřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II. Čistota populace je hodnocena pomocí stanovení reziduálních leukocytů, tj. CD45 pozitivních eventů. Viabilita je určena prostupností 7AAD próby, které prochází pouze poškozenou membránou mrtvých buněk.

3.4 Sledování kinetiky rekonstituce iNKT po alogenní transplantaci

3.4.1 Odběr vzorků a soubor pacientů

Invariantní NKT lymfocyty byly získány z odběrů periferní krve pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň. Do studie bylo zařazeno celkem 22 pacientů, z toho 10 žen a 12 mužů, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk pro hematologickou malignitu v období od října 2019 do června 2020. Cílem bylo získat od každého pacienta celkem 8 vzorků iNKT v předem definovaných časových timepointech. Krev byla odebírána v rámci rutinních krevních odběrů v potransplantačním období na transplantačním oddělení HOO, později v průběhu návštěv na transplantační ambulanci. Kontrolní vzorky byly získány z periferní krve 4 zdravých dobrovolníků. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas schválený společnou etickou komisí LF UK v Plzni a FN Plzeň.

Celkem bylo vyšetřeno 146 vzorků. Kompletní počet odběrů (tedy 8) se podařilo uskutečnit u 11 pacientů. V několika případech nebylo možné krevní vzorky získat, protože v očekávaném období neproběhla kontrola v transplantační ambulanci a náběr se neuskutečnil. U 5 pacientů nebylo možné získat kompletní sadu vzorků z důvodu úmrtí v průběhu sledovaného období. V případě nedetekovatelných případně extrémně nízkých hodnot leukocytů byly vzorky již primárně vyloučeny z měření. V timepointech s neměřitelnými hodnotami leukocytů jsme předpokládali i nedetekovatelné počty iNKT.

Medián věku byl pacientů 57,5 (39-70). Indikací k transplantaci byla ve 12 případech akutní myeloidní leukémie, ve 3 případech myelodysplastický syndrom, také ve 3 případech mnohočetný myelom. Zbylé tři případy byly indikovány pro velkobuněčný B-lymfom, chronickou lymfatickou leukémií a myelofibrózu. Ve 14 případech byl donorem hematopoetických buněk nepřibuzný dárc z registrů dárců krve, ve 2 případech byl donorem příbuzný pacienta a v 6 případech se jednalo o haploidentickou transplantaci od příbuzného pacienta. Při tom shoda v HLA znacích mezi dárcem a příjemcem byla ve 13 případech 10/10, ve 2 případech byla shoda 9/10 a v jednom případě byla akceptována shoda 8/10. V 21 případech byly podány pacientům periferní kmenové buňky, pouze 1 pacient obdržel buňky získané odběrem kostní dřeně. Redukovaná chemoterapie (conditioning) ve složení fludarabin + melphalan byla podána 9 pacientům. Zbylých 13 pacientů obdrželo plnou myeloablativní chemoterapii ve složení busulphan + cytarabin (3) nebo busulphan + fludarabin (10). V 16 případech byla přípravná chemoterapie doplněna o antithymocytární globulin, 6 pacientů ji neobdrželo. K rozvoji GvHD došlo u 13 pacientů. Z toho 2 pacienti GvHD 1.stupně, 9 pacientů GvHD 2.stupně a 2 pacienti GvHD 3.stupně.

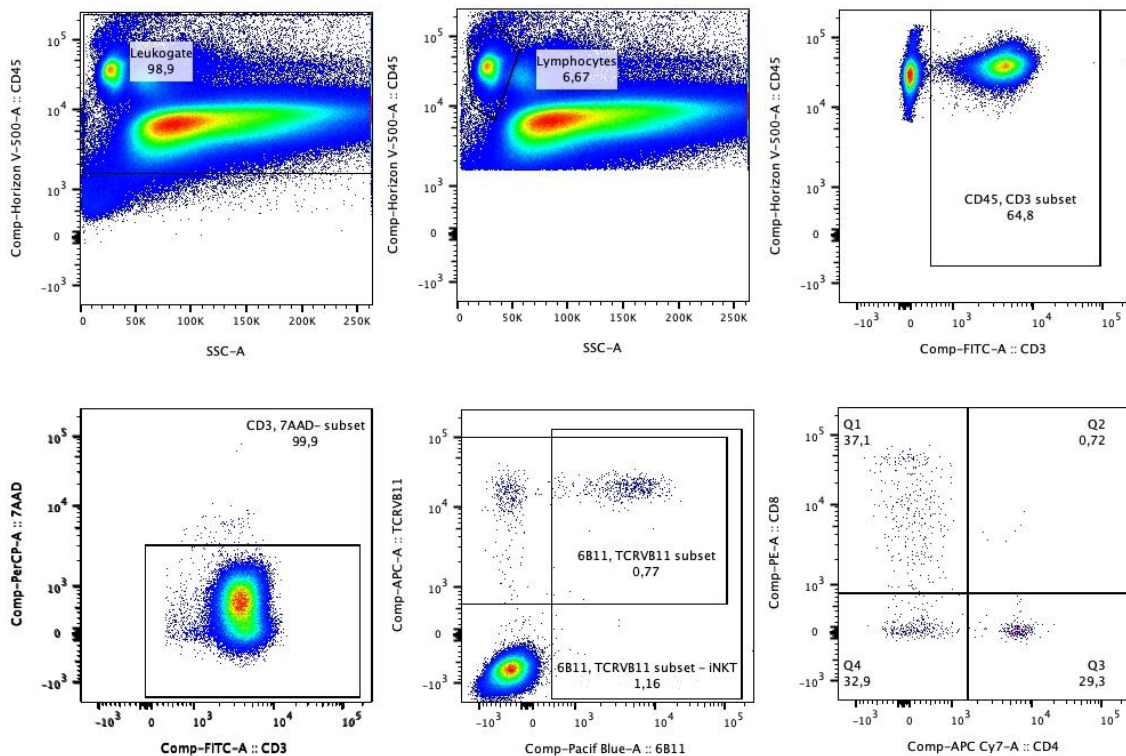
3.4.2 Zpracování vzorků a měření průtokovou cytometrií

Z EDTA zkumavky byl přenesen 1ml krve do zkumavky 12 x 75 mm. Nejdříve byly zlyzovány erytrocyty pomocí lyzačního činidla (4 ml ammonium chlorid). Poté byla zkumavka centrifugována na 350g/5 minut/20°C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna ve 100μl PBS. Byly přidány protilátky CD3-FITC, CD4-APCCy7, CD8-PE, CD45-BV510, CD3-FITC, TCRVβ11-APC, TCRV α24J α18-BV421, CD62L-PECy7, 7AAD. Po opatrném promíchání byla zkumavka s protilátkami inkubována 20 minut ve tmě. Poté byl přidán 1ml lyzačního činidla a zkumavka byla opět inkubována 5 minut ve tmě. Poté bylo přidáno 2 ml PBS a vzorek byl zcentrigugován (350g/5 min za pokojové teploty). Po odstranění supernatantu bylo přidáno 300μl PBS a zkumavka byla vložena k měření do průtokového cytometru BD FACS Canto II.

Tabulka 6 – Seznam protilátek pro detekci invariantních NKT lymfocytů

Protilátka	CD45	CD3	TCRVβ11	TCR Vα24-Jα18	7AAD	CD4	CD8	CD62L
Fluorofor	BV510	FITC	APC	BV421	NA	APCCy7	PE	PECy7

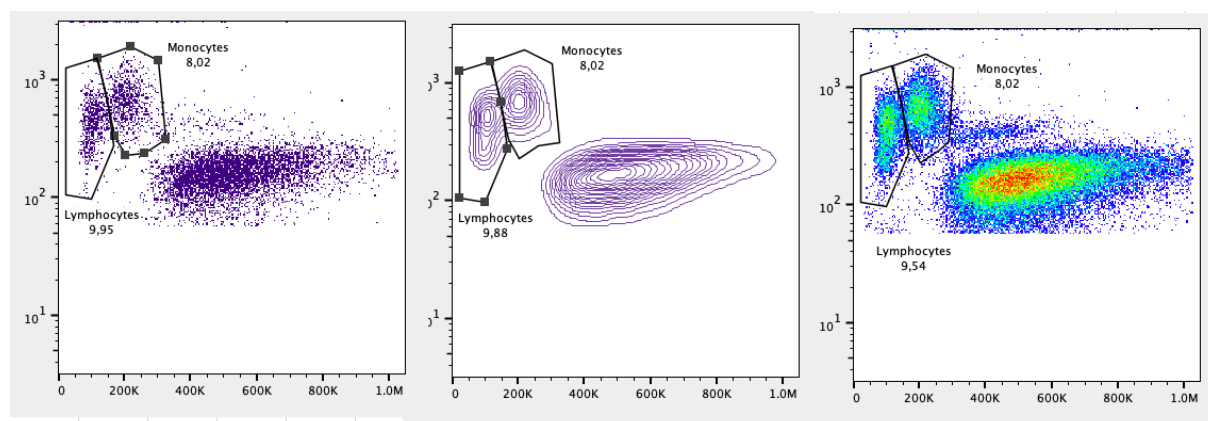
Po změření na průtokovém cytometru FACS Canto II byly vzorky analyzovány v softwaru FlowJo, LLC. Graficky jsou jednotlivé buňky (čili „eventy“) zobrazeny v dot plotech. Zde jsou rozloženy na základě jejich scatter vlastností nebo intenzity fluorescence navázaných protilátek. Prvním krokem analýzy je manuální výběr gate leukocytů, což je krok, při kterém se z analýzy vyloučí buněčný detritus a zlyzované erytrocyty. Další analýza probíhá po výběru v gate lymfocytů. Leukocyty a lymfocyty jsou gatovány na základě kombinace svých side a forward scatter vlastností. Jako T-lymfocyty jsou gatovány buňky exprimující CD3+ antigen. Viabilita buněk je potvrzena díky odfiltrování 7AAD pozitivních buněk. Pro detekci iNKT se používá gate kombinující dvě specifické protilátky, které jsou kombinovány se silnými fluorofory (TCRVβ11-APC a TCR Vα24-Jα18-BV421). Další subpopulace iNKT, single pozitivní CD4+, CD8+ a double pozitivní CD4+8+, byly kvantifikovány pomocí křížového gate na populaci iNKT. V posledním gate byla v populaci iNKT stanovována exprese CD62L. Gatovací strategie je přehledně zobrazena na obrázku 6.



Obrázek 6 – gatovací strategie kvantifikace iNKT

zleva doprava, shora dolů: gate leukocytů a vyloučení singletů; lymfocytární gate; gate CD3+ T lymfocyty; gate viabilních 7AAD negativních buněk; detekce iNKT na základě kombinace protilátek TCRVβ11-APC a TCR Vα24-Jα18-BV421; kvantifikace CD4+, CD8+ a DN subpopulací iNKT (FlowJo, LLC)

Kromě stanovení iNKT byla také hodnocena exprese CD1d na antigen prezentujících buňkách, konkrétně na monocytech. Toto hodnocení probíhalo v rámci diagnostického stanovení zastoupení lymfocytárních subpopulací. Postup barvení odpovídá postupu pro stanovení iNKT, protilátky se však dávají přímo do 100 μ l periferní krve a následuje lýza 1ml lyzačního roztoku po dobu 15 minut. Panel pro imunomonitoraci (CD19, CD4, CD8 CD3/CD16+56+) byl pro účely studie rozšířen o protilátku CD1d-APC. Exprese CD1d byla stanovována v gatu monocytárních buněk. Způsob vymezení monocytární populace je zobrazen na obrázku 7. Výsledky jsou prezentovány jako MFI (medián intenzity fluorescence) protilátky CD1d na monocytech. Analýza probíhala v softwaru FlowJo.



Obrázek 7 – Vymezení monocytární populace na základě side a forward scatter vlastností – porovnání zobrazení v několika variantách grafického zobrazení (FlowJo, LLC)

3.5 Srovnání imunomodulačního potenciálu MSC a iNKT

3.5.1 Izolace iNKT buněk

Invariantní NKT buňky byly izolovány z mononukleárních buněk (MNC) zdravých dárců. Všichni dárce podepsali informovaný souhlas schválený společnou etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň. Mononukleární buňky byly získány pomocí gradientové centrifugace s využitím separačního média Ficoll-Paque. Z této frakce byly pozitivní selekcí s využitím magneticky značených protilátek (Anti-iNKT MicroBeads, human; Miltenyi Biotech) získány iNKT buňky. Ty byly poté nasazeny spolu s autologním ozářeným feederem (MNC ozářené 25 Gy) v poměru 1:1. Pro aktivaci byl přidán IL-15 (Miltenyi Biotech; finální koncentrace 150 IU/ml) a α -GalCer (Cayman Chemical; finální koncentrace 100ng/ml). Buňky byly takto kultivovány po dobu 14 dní v 5 % CO₂ a 37°C. Každý 3-5 den byl aplikován čerstvý IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

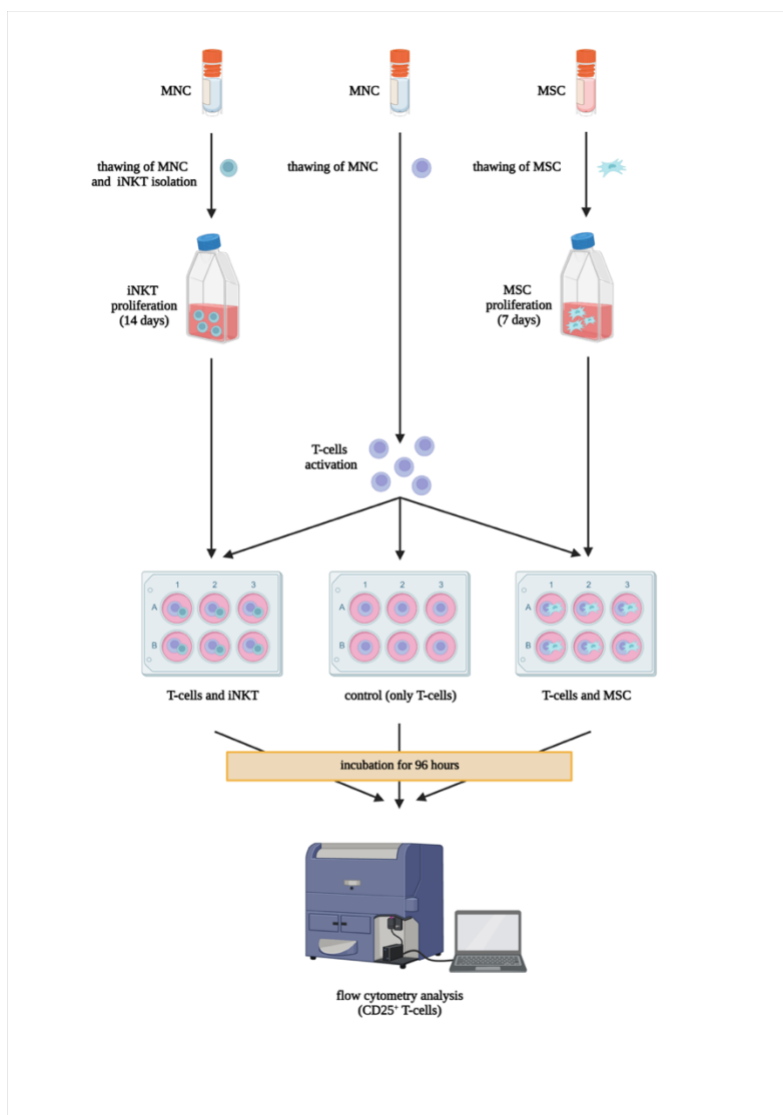
3.5.2 Kultivace mezenchymálních kmenových buněk

Postup izolace a kultivace MSC byl obdobný jako v předešlém pokusu (viz kapitola 3.2.2).

3.5.3 Imunomodulační vlastnosti MSC a iNKT

Pro porovnání byly nejprve izolovány mononukleární buňky zdravých dárců, které byly naředěny na koncentraci 2x10⁶/ml v RPMI médium s přidávkem FBS. Pro stimulaci byl využit phytohemagglutinin (PHA) v koncentraci 20 μ g/ml. Do takto připravené suspenze byly přidána suspenze MSC či iNKT v koncentraci 1x10⁶/ml. Buňky byly smíchány v poměru 2:1 a společně kultivovány po dobu 96hod. Do kontrolních buněk bylo přidáno pouze kultivační médium. Po

uplynutí doby kultivace byl z každé zkumavky odebrán vzorek pro stanovení exprese aktivačního markeru CD25. Grafické schéma experimentu viz obrázek 8.



Obrázek 8 – Grafické schéma experimentu porovnání imunomodulačních vlastností MSC a iNKT

3.5.4 Stanovení exprese CD25

Viz kapitola 3.2.7.

3.6 Zpracování dat

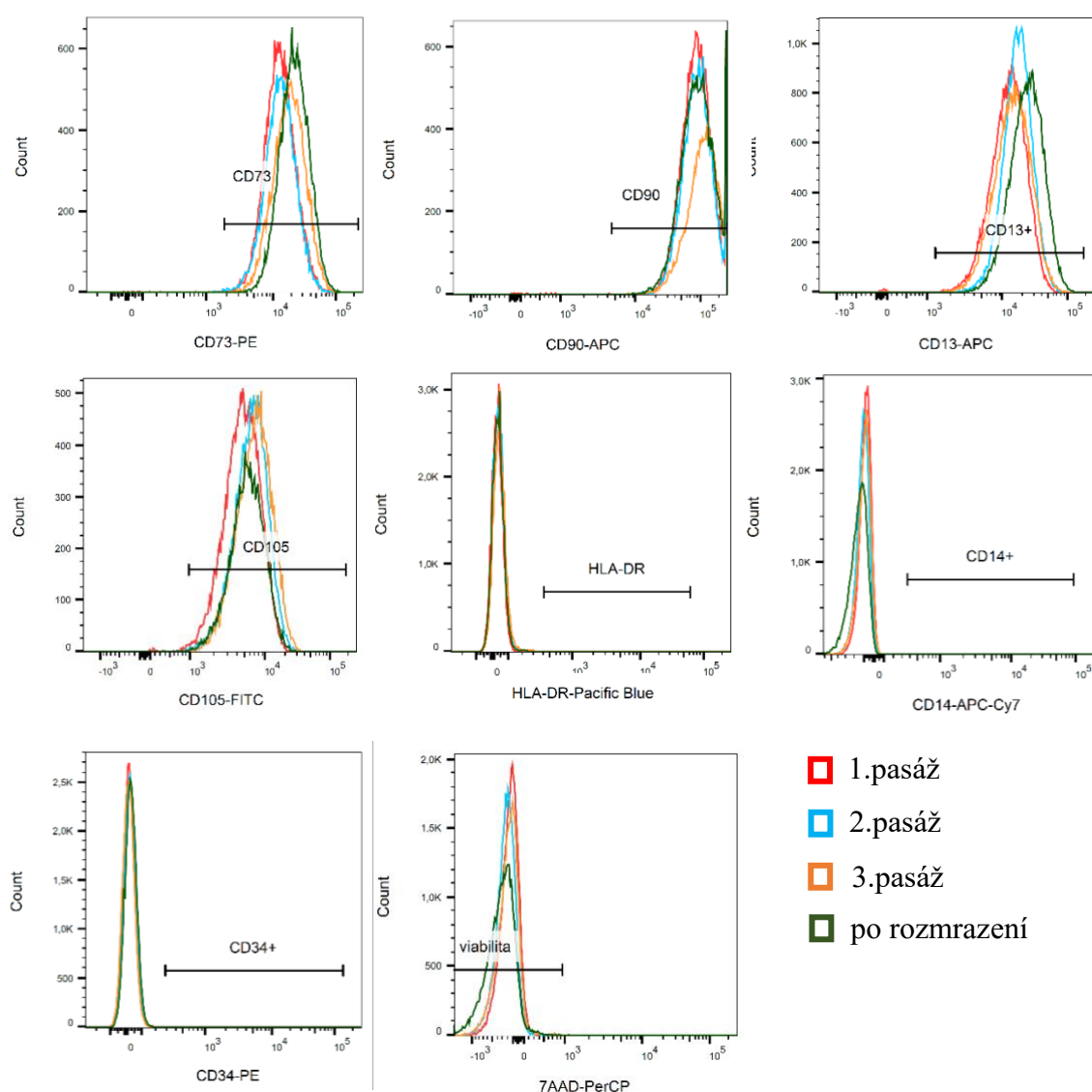
Flowcytometrické analýzy byly provedeny v softwaru FlowJo, LLC. Ke grafickému zpracování dat byl využit program Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Martinem Lebou z Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni. Data byla zpracována s použitím softwaru MatLab (The MatWorks, Inc., USA). Ke zhodnocení statistických rozdílů mezi skupinami v souboru MSC byl zvolen neparametrický Mann-Whitney U-test na hladině významnosti $p < 0,05$. Korelace sledovaných parametrů byla stanovena vyhodnocením Pearson korelačního koeficientu. Koeficient větší než 0,8 a $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

4. Výsledky

4.1. Srovnání single donor a poolovaných přípravků MSC

4.1.1 Kultivace a kontrola imunofenotypu MSC

MSC byly kultivovány přibližně 14 dní, třikrát pasážovány a poté zamrazeny. Klasický fibroblastický tvar MSC se objevil po 5-7 dnech kultivace a zůstal konzistentní po celou dobu kultivace. Po každé pasáži byl kontrolován imunofenotyp průtokovou cytometrií, MSC vykazovaly očekávanou expresi pozitivních i negativních markerů již po první pasáži, po druhé pasáži bylo dosaženo čistoty buněčné linie přes 99 %. Viabilita buněk dosahovala přes 90 % při každé pasáži. Zamražení buněk neovlivnilo expresi žádného z povrchových markerů MSC v žádné ze sledovaných šarží – viz obrázek 9.



Obrázek 9 – exprese povrchových markerů MSC v průběhu kultivace a po rozmrazení

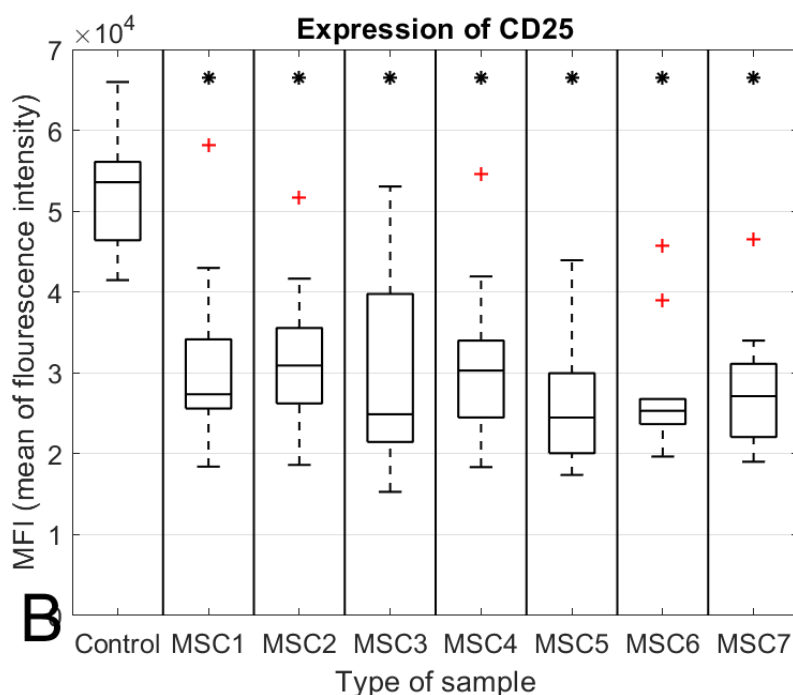
4.1.2. Měření imunomodulačního potenciálu MSC

Mononukleární buňky všech dárců byly aktivovány přidáním PHA. Medián exprese CD25 po aktivaci byl na T-lymfocytech (CD3+ buňky) MFI = 53.587 (rozmezí 41.473 – 65.970). Po přidání MSC poklesla exprese CD25 ve všech vzorcích, medián MFI = 27.125 (rozmezí 24.478 – 30.916) – viz tabulka 7. Ve všech sledovaných šaržích došlo k poklesu exprese CD25 o více než 40 %. Mezi šaržemi jednotlivých dárců a poolovanými vzorky nebyl prokázán signifikantní rozdíl – viz obrázek 10.

Tabulka 7 – Exprese CD25 na CD3+ lymfocytech po aktivaci PHA

	Median MFI of CD25	SD
MNC (CONTROL)	53.184	27.284
NMC + MSC1	27.359	13.950
MNC + MSC2	30.916	15.559
MNC + MSC3	24.884	15.536
MNC + MSC4	30.294	14.930
MNC + MSC5	24.478	12.782
MNC + MSC6	25.319	12.240
MNC + MSC7	27.125	13.651

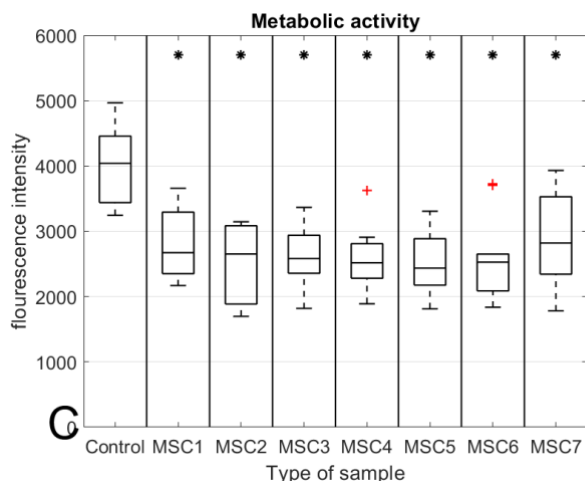
Poznámka – data jsou prezentována jako medián intenzity fluorescence (MFI = mean fluorescence intensity) + standartní odchylka (SD = standard deviation)



Obrázek 10 – MFI (Mean fluorescence intensity) exprese CD25 na CD3+ buňkách
Data jsou prezentována jako medián + standartní odchylka (SD = standard deviation)
(obrázek přejat z vlastní publikace Hejretová et al., 2020)

4.1.3 Porovnání metabolické aktivity

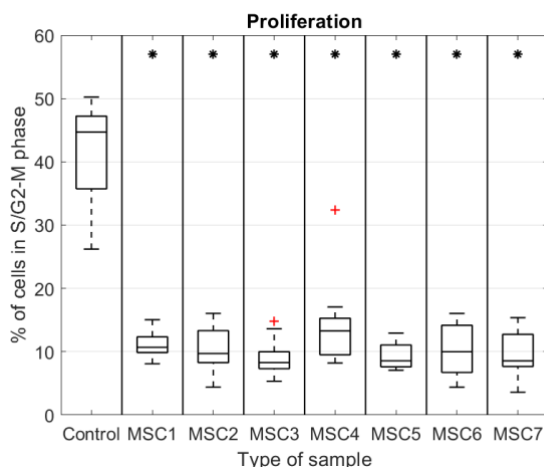
Analýza s využitím Alamar blue prokázala signifikantní rozdíl v poklesu fluorescence mezi vzorky pouze se stimulovanými MNC (medián fluorescence = 4.034 ± 578) a vzorky, do nichž byly přidány MSC (medián fluorescence = 2.556 ± 515). Předpokládáme, že snížení fluorescence po přidání MSC je dáno snížením proliferace a snížením celkového počtu buněk spíše než snížením buněčného metabolismu. Nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi vzorky šarží od jednotlivých dárců a poolovanými šaržemi – viz obrázek 11.



Obrázek 11 – Hodnoty fluorescence Alamar Blue – srovnání kontrolního vzorku stimulovaných MNC a vzorků po přidání MSC. Data jsou prezentována jako medián + standardní odchylka (SD = standard deviation) (obrázek přejat z vlastní publikace Hejretová et al., 2020)

4.1.4 Porovnání buněčné proliferace

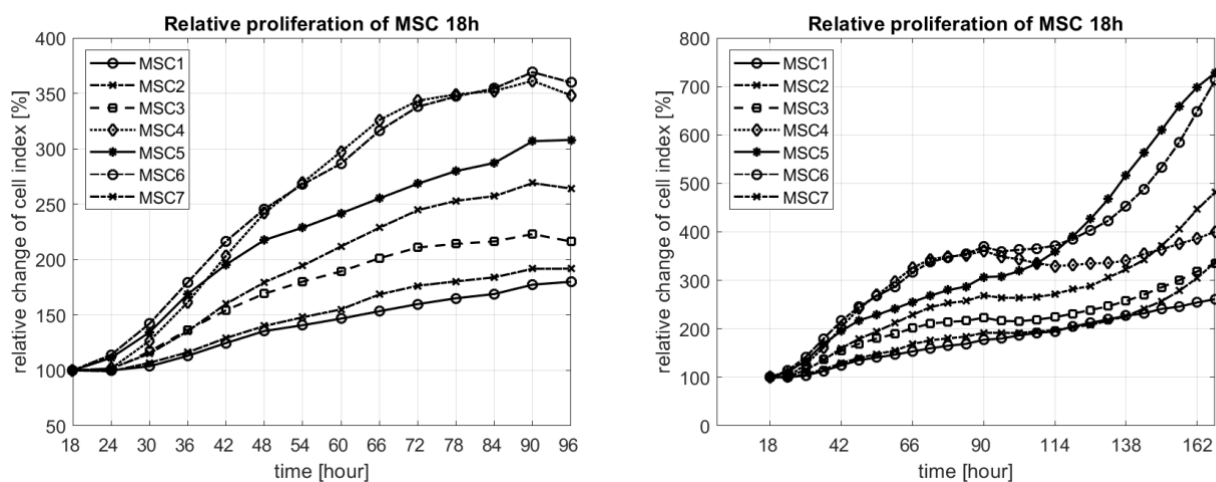
Jako proliferující buňky byly sečteny buňky v G2/M a v S fázi buněčného cyklu. Ve vzorcích před přidáním MSC byl medián proliferujících buněk 45 %. Po přidání MSC došlo k poklesu proliferace ve všech sledovaných vzorcích (medián poklesu o 31 %; rozmezí 31–36 %). Nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi vzorky od jednotlivých dárců a poolovanými vzorky – viz obrázek 12.



Obrázek 12 – Počet buněk v G2/M a S fázi buněčného cyklu
Data jsou prezentována jako medián + standardní odchylka (SD = standard deviation)(obrázek přejat z vlastní publikace Hejretová et al., 2020)

4.1.5 Porovnání buněčného růstu

Buněčný růst mezi vzorky MSC1-MSC7 jsme porovnávali na základě změn buněčného indexu (cell index, CI). Mezi jednotlivými vzorky byly pozorovány statisticky signifikantní rozdíly v rychlosti růstu. Nejrychlejšího růstu dosáhly buňky ve vzorku MSC6 (CI = 4050 %), nejpomalejšího buňky ve vzorku MSC3 (CI= 722 %) – viz obrázek 13. Nicméně navzdory rozdílné rychlosti růstu buněčných populací, nenalezli jsme asociaci mezi rychlostí růstu a imunomodulačním potenciálem buněk v ostatních provedených testech.



Obrázek 13 – Porovnání rychlosti buněčného růstu mezi šaržemi MSC1-MSC7; vlevo v průběhu 96 hodin, vpravo v průběhu 162 hodin kultivace
Data jsou prezentována jako medián + standardní odchylka (SD = standard deviation)
(obrázek přejat z vlastní publikace Hejretová et al., 2020)

4.2. Porovnání kompozice šarží LP MSC

Léčivé přípravky jsme rozdělily podle data výroby na starší (do roku výroby 2016 včetně), které jsou označeny jako MSC A1-A10, a novější (od roku 2017), označené jako MSC B1-B10. Bylo porovnáno celkem 20 šarží léčivých přípravků MSC od různých dárců. Přitom vždy platí 1 dárců = 1 šarže MSC. Byly zvoleny ty šarže, ze kterých byl vyroben největší počet léčivých přípravků. Kromě tohoto parametru nebyl výběr blíže specifikován. Všechny MSC byly izolovány, kultivovány, poté zamrazeny a uchovávány v kryokontejnerech. Před výrobou léčivých přípravků byly rozmrazeny a rekultivovány dle podmínek správné výrobní praxe. Z jednotlivých šarží MSC bylo připraveno 4-11 léčivých přípravků.

Sledovali jsme variabilitu jednotlivých léčivých přípravků v rámci každé z šarží jednotlivě a poté jsme je vzájemně porovnali. Zajímala nás *intrašaržová* a *interšaržová* variabilita. Sledovanými parametry byly celkový zisk MSC, viabilita buněk, čistota buněčné linie a imunofenotyp MSC. Výsledky jsou prezentovány v tabulkách 8–10.

Tabulka 8 – Porovnání celkového zisku MSC

Starší šarže A1-A10					Novější šarže B1_B10				
ŠARŽE	POČET LP	Celkový počet MSC (x10e6)			ŠARŽE	POČET LP	Celkový počet MSC (x10e6)		
		MIN	MAX	MEDIAN			MIN	MAX	MEDIAN
A1	4	5,92	6,18	6,08	B1	7	2,17	5,67	5,31
A2	7	5,61	8,29	6,26	B2	7	2,00	2,88	2,58
A3	6	5,48	8,90	6,50	B3	11	1,84	3,30	2,36
A4	6	5,10	7,52	6,51	B4	10	3,13	5,64	4,68
A5	7	3,14	6,11	4,60	B5	6	3,14	5,25	3,97
A6	6	2,21	3,66	2,71	B6	8	2,75	3,83	3,32
A7	6	1,73	2,79	1,99	B7	10	2,25	5,32	4,31
A8	6	3,00	4,27	3,36	B8	6	2,64	3,78	2,91
A9	6	2,17	4,59	3,79	B9	4	1,09	1,68	1,13
A10	6	2,75	5,34	4,55	B10	4	1,88	2,43	2,13

Pozn. – data jsou prezentována jako celkový počet buněk MSCx10⁶/den kultivace/aliquot

Celkový zisk buněk se mezi staršími šaržemi A1-A10 pohyboval v rozmezí 1,73 – 8,90 x10⁶ na 1 den kultivace a 1 aliquot. Zisk u novějších šarží B1-B10 se byl v rozmezí 1,09 – 5,67 x10⁶ buněk. Množství vyrobených buněk tedy vykazovalo relativně velkou variabilitu, nicméně u všech jednotlivých léčivých přípravků byla vždy splněna minimální terapeutická dávka, která činí 1 x 10⁶ MSC na 1 kg hmotnosti pacienta. Přípravky z novějších šarží buněk dosahovaly mírně nižších výtěžků.

Tabulka 9 – Porovnání viability buněk po rekultivaci

VIABILITA							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	98,70	99,40	99,30	B1	98,90	99,70	99,50
A2	96,50	99,50	97,60	B2	97,00	99,70	98,90
A3	98,40	100,00	99,45	B3	97,80	99,90	99,50
A4	98,60	99,60	99,30	B4	98,60	99,80	99,60
A5	98,60	100,00	99,30	B5	99,00	99,70	99,55
A6	98,80	99,30	99,00	B6	96,80	99,90	99,60
A7	98,70	99,80	99,05	B7	97,00	99,50	99,10
A8	99,00	99,70	99,30	B8	95,50	99,50	99,20
A9	98,40	99,75	99,10	B9	98,80	99,50	99,30
A10	98,90	99,50	99,30	B10	99,40	99,70	99,70

Pozn. – data jsou prezentována v %

Tabulka 10 – Porovnání čistoty buněčné linie po rekultivaci

ČISTOTA BUNĚČNÉ LINIE							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	99,00	100,00	99,50	B1	99,60	100,00	99,90
A2	98,70	100,00	99,70	B2	99,90	100,00	99,90
A3	97,30	99,90	99,20	B3	99,70	100,00	99,90
A4	96,10	100,00	99,65	B4	99,90	100,00	99,90
A5	94,00	100,00	98,90	B5	100,00	100,00	100,00
A6	99,00	100,00	100,00	B6	99,90	100,00	99,90
A7	99,70	100,00	100,00	B7	95,00	100,00	100,00
A8	99,00	100,00	100,00	B8	99,60	100,00	99,75
A9	96,00	100,00	99,90	B9	99,70	99,90	99,80
A10	96,00	100,00	99,95	B10	99,60	99,90	99,90

Pozn. – data jsou prezentována v %

V ostatních sledovaných parametrech byla intrašaržová i interšaržová variabilita mezi přípravky velice nízká. Buňky ve všech vyrobených LP dosahovaly vysoké viability u starších šarží v rozmezí 96,5 – 100 % a u novějších šarží v rozmezí 95,5 – 99,9 %. Obdobně bylo dosahováno vysoké čistoty buněčné linie s rozmezím 94,0 – 100 % u starších šarží a 95,0 – 100 % u novějších šarží. V žádném ze sledovaných parametrů nebyla pozorována významná odchylka buněk od standardního imunofenotypu MSC. Porovnání exprese pozitivních i negativních imunofenotypických markerů MSC je dokumentováno v příloze 5 této práce.

4.3 Rekonstituce iNKT

4.3.1 Kinetika rekonstituce iNKT

Na základě detekce specifických protilátek (TCRV β 11-APC; TCR V α 24-J α 18-BV421) byly průtokovou cytometrií detekovány iNKT ve výše zmíněných timepointech po aloHSCT (viz tab. 11) a byla sledována dynamika jejich regenerace jednotlivě pro každého z 22 pacientů zařazených do studie.

Tabulka 11 – Počet vyšetřených vzorků a kvantita iNKT v timepointech po aloHSCT

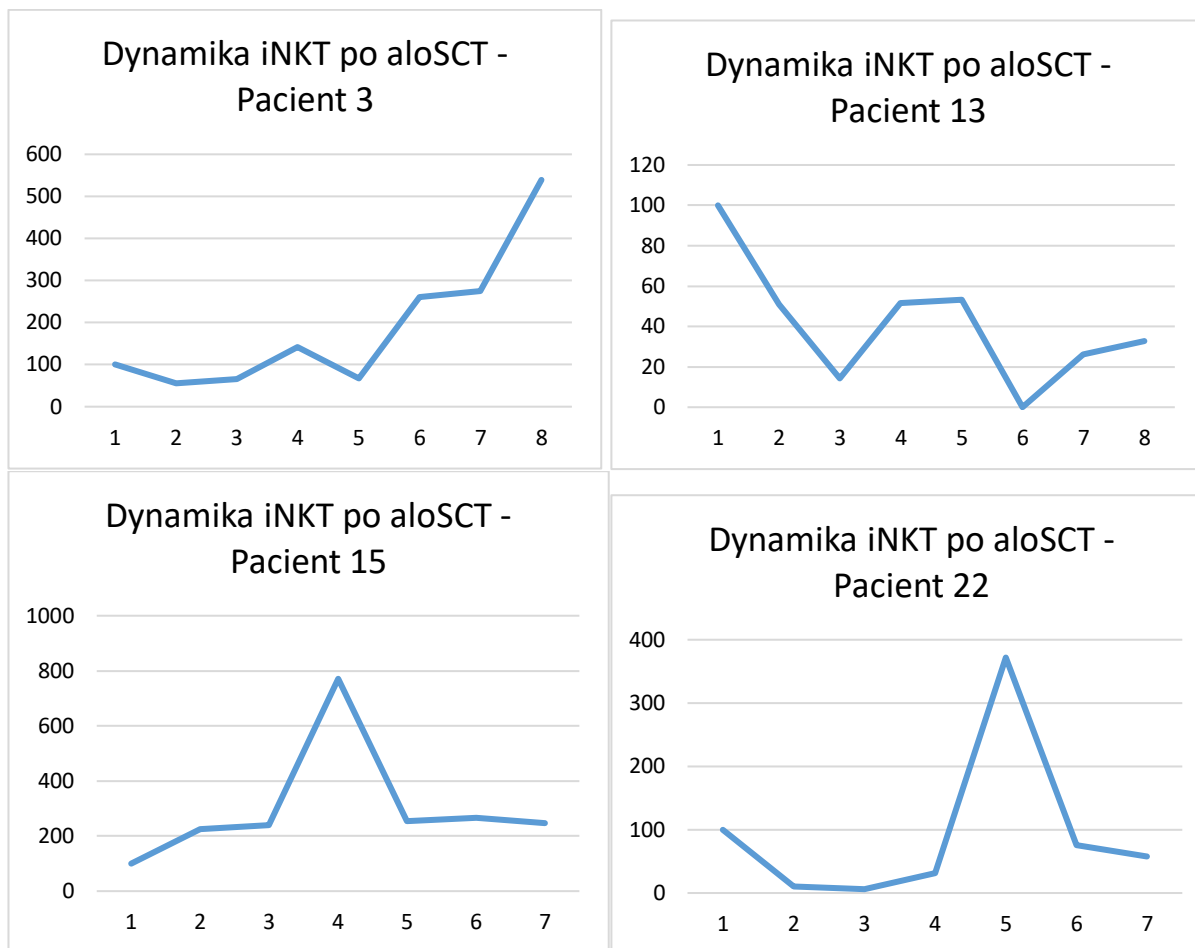
Timepoint	Přibližný odstup od aloHSCT (dny)	Počet vyšetřených vzorků	Medián iNKT/ml
1	30	21	213
2	60	22	162
3	75	19	161
4	90	17	210
5	105	16	237
6	120	18	170
7	150	16	211
8	180	17	423

Absolutní množství iNKT dosahovalo poměrně velkého rozptylu. Medián počtu iNKT se u pacientů pohyboval od 29 do 851 buněk/ml. Přitom absolutní rozpětí sahalo od minimálních hodnot 0-351 buněk/ml až po maximální hodnoty 154-6511 buněk/ml. Konkrétní hodnoty mediánů a rozpětí pro jednotlivé pacienty jsou uvedeny v tab.12. U 7 pacientů došlo minimálně v 1 ze sledovaných timepointů k detekci nulových hodnot iNKT (celkem u 13 vzorků) a to navzdory tomu, že v těchto timepointech byly hladiny leukocytů a lymfocytů u pacientů vždy dostatečně vysoké (dokumentováno v primárních datech v příloze 1).

Tabulka 12 – Absolutní množství iNKT detekované u pacientů po aloHSCT

	Počet iNKT/ml		
	Medián	Min	Max
Pacient 1	249	86	1816
Pacient 2	175	123	278
Pacient 3	57	26	252
Pacient 4	46	6	799
Pacient 5	35	0	154
Pacient 6	113	108	564
Pacient 7	291	36	2784
Pacient 8	329	50	1148
Pacient 9	29	0	950
Pacient 10	88	0	716
Pacient 11	634	0	4958
Pacient 12	318	65	5804
Pacient 13	432	0	1436
Pacient 14	269	0	778
Pacient 15	165	67	516
Pacient 16	851	189	1292
Pacient 17	442	0	988
Pacient 18	169	70	265
Pacient 19	849	351	6511
Pacient 20	275	56	446
Pacient 21	185	134	237
Pacient 22	144	15	286

Ukázalo se, že kinetika regenerace iNKT po aloHSCT není ve lineární a nestoupá s narůstajícím časem od transplantace adekvátně k vzestupu leukocytů. Převážně lineární vzestupný trend počtu iNKT převažoval pouze u 4 pacientů (P3, P4, P8, P14). Naopak ve 4 případech (P5, P7, P9, P13) měl počet iNKT sestupnou tendenci. iNKT 5 pacientů (P2, P16, P17, P20, P22) vykazovaly relativně stálou dynamiku bez větších výkyvů, naopak u 9 pacientů (P1, P4, P5, P9, P10, P11, P12, P15, P19) došlo ve sledovaném období k výraznému skoku o desítky až stovky procent, který byl poté opět následován poklesem. U 4 pacientů nebylo získáno dostatečné množství vzorků (3 a méně) pro vyjádření ke kinetice iNKT (P6, P16, P18, P21). Na obrázku 14 jsou zobrazeny reprezentativní příklady kinetiky regenerace iNKT. Primární data a přehledné grafy pro jednotlivé pacienty zařazené do studie jsou zobrazeny v příloze 1.



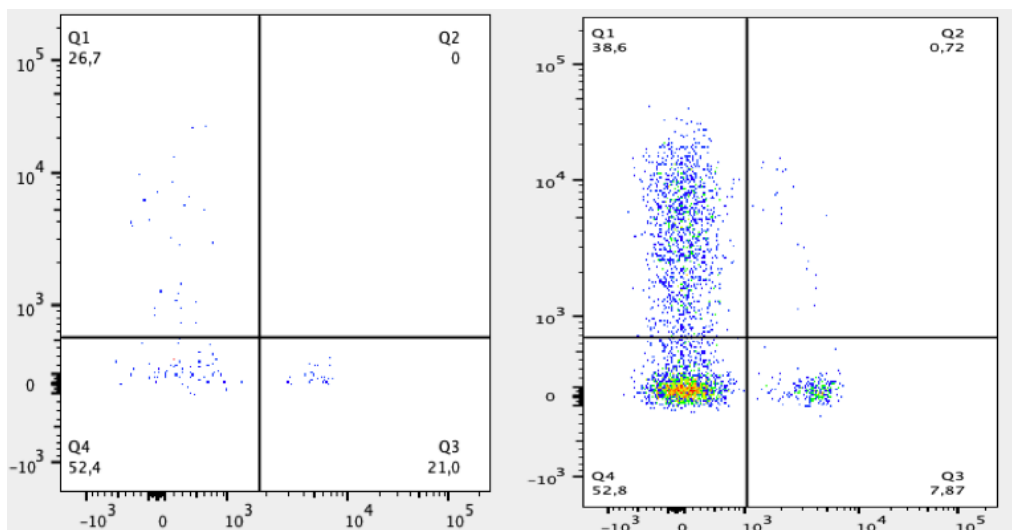
Obrázek 14 – reprezentativní příklady kinetiky iNKT po aloHSCT (FlowJo, LLC)

4.3.2 Stanovení subpopulací iNKT

iNKT byly dále charakterizovány z hlediska imunofenotypu. Byly kvantifikovány CD8+, CD4+, a double negativní (DN) subpopulace. Zastoupení CD4+ buněk se pohybovalo v rozpětí 0-50 %, CD8+ buněk v rozpětí 1-87% a dvojitě negativních 0-87% z celkového počtu iNKT. V souboru dominovaly CD8+ buňky a to u 13 pacientů (to odpovídá 59 % pacientů), z toho u 9 pacientů byla převaha výrazná a CD8+ přesahovaly 70 % zastoupení iNKT. Pouze u 3 pacientů převažovaly CD4+ iNKT a u 5 DN iNKT. Procentuální rozložení subpopulací pro jednotlivé pacienty je dokumentováno v tab. 13. Jsou prezentovány mediány hodnot všech vyšetřených timepointů, minimální a maximální hodnoty pro jednotlivé pacienty. Na obrázku 13 je zobrazeno reprezentativní porovnání těchto subpopulací u pacienta v časně fázi po aloHSCT a u zdravého dobrovolníka. Primární data jsou dokumentována v příloze 2.

Tabulka 13 – Procentuální zastoupení subpopulací iNKT na základě jejich exprese CD4 a CD8 antigenů; exprese CD62L

	Rozložení subpopulací iNKT (% z iNKT)			exprese CD62L (MFI)	
	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)		
Pacient 1	71	17	10	Pacient 1	10
Pacient 2	72	14	18	Pacient 2	15
Pacient 3	83	0	11	Pacient 3	0
Pacient 4	33	42	0	Pacient 4	37
Pacient 5	18	43	19	Pacient 5	39
Pacient 6	1	3	87	Pacient 6	0
Pacient 7	36	18	45	Pacient 7	12
Pacient 8	70	10	13	Pacient 8	11
Pacient 9	30	3	16	Pacient 9	3
Pacient 10	42	28	3	Pacient 10	20
Pacient 11	70	7	6	Pacient 11	3
Pacient 12	87	8	3	Pacient 12	3
Pacient 13	36	7	52	Pacient 13	4
Pacient 14	55	16	21	Pacient 14	12
Pacient 15	70	13	19	Pacient 15	5
Pacient 16	43	6	48	Pacient 16	6
Pacient 17	36	0	47	Pacient 17	0
Pacient 18	77	17	6	Pacient 18	16
Pacient 19	86	3	11	Pacient 19	2
Pacient 20	29	50	9	Pacient 20	31
Pacient 21	66	28	5	Pacient 21	29
Pacient 22	36	20	54	Pacient 22	18
Min	1	0	0	Min	0
Max	87	50	87	Max	39

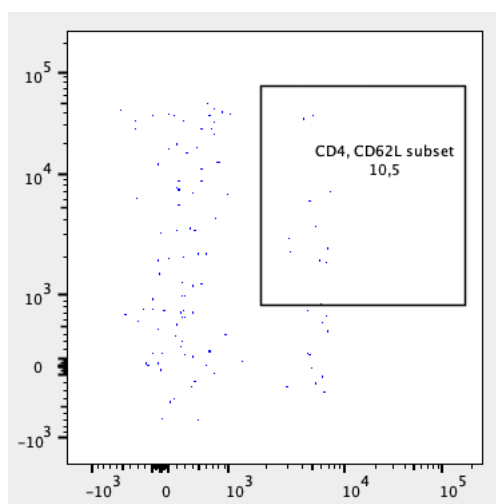


Obrázek 15 – Subpopulace iNKT – exprese CD4+ (osa x) a CD8+ (osa y), porovnání pacient v časné fázi po aloHSCT (vlevo) a zdravý dobrovolník (vpravo) (FlowJo, LLC)

4.3.3 Stanovení exprese CD62L na iNKT

Dále byla sledována exprese CD62L na iNKT. Vymezení části populace iNKT (CD4+), která vykazuje CD62L pozitivitu, je dokumentována na obrázku 16. Mediány exprese CD62L napříč sledovanou populací pacientů se pohybovaly od 0 do 39 % buněk. U 16 pacientů byla exprese minimálně v jednom z vyšetřených timepointů nedetekovatelná – celkem se jednalo o 35 vyšetřených vzorků s nulovými hodnotami. 17 pacientů mělo medián exprese méně než na 20 % buněk a 3 pacienti dosáhly nulového mediánu exprese. Naopak jen u 5 pacientů byla exprese detekovaná na 50 či více procentech iNKT alespoň v jednom z vyšetřených vzorků (celkem se jednalo o 9 vzorků).

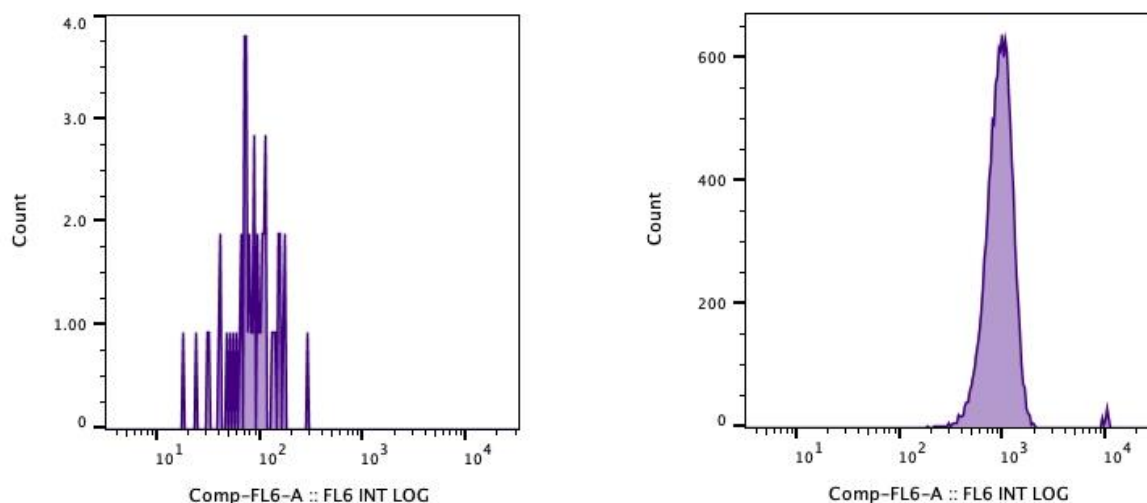
Z celkového počtu 144 vyšetřených vzorků byla exprese CD62L nulová ve 26 % vzorků. U 56 % byla exprese pod 10%, u 76% pod 20% a v 94% nepřesáhla 50%. Mediány a rozpětí exprese pro jednotlivé pacienty jsou uvedeny v tabulce 13. Primární data jsou uvedena v příloze 3.



Obrázek 16 – kvantifikace exprese CD62L na iNKT; na ose x CD4-PB, na CD62L-PeCy7 (FlowJo, LLC)

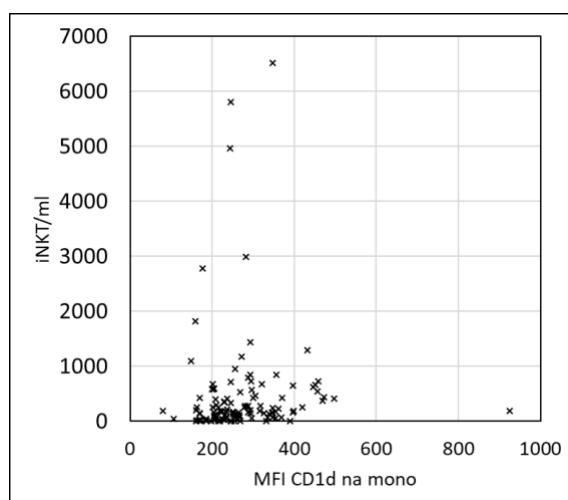
4.3.4 Stanovení exprese CD1d na monocyttech

Byla stanovována exprese CD1d na antigen prezentujících buňkách, konkrétně na monocyttech. Bylo vyhodnoceno celkem 118 vzorků od 22 pacientů, v timepointech, které odpovídaly odběrům iNKT. MFI CD1d na monocyttech se pohybovalo v rozmezí od 80 do 924 (medián 254) – grafické znázornění nízké a vysoké exprese viz histogramy na obrázku 17. Výsledky jsou prezentovány jako MFI (medián intenzity fluorescence). Exprese CD1d byla dynamická, tj. v čase se měnila, nicméně změna byla nelineární. Primární data jsou uvedena v příloze 4.



Obrázek 17 – Exprese CD1d na populaci monocytů; na histogramu vlevo nízká exprese; vpravo vysoká exprese (FlowJo, LLC)

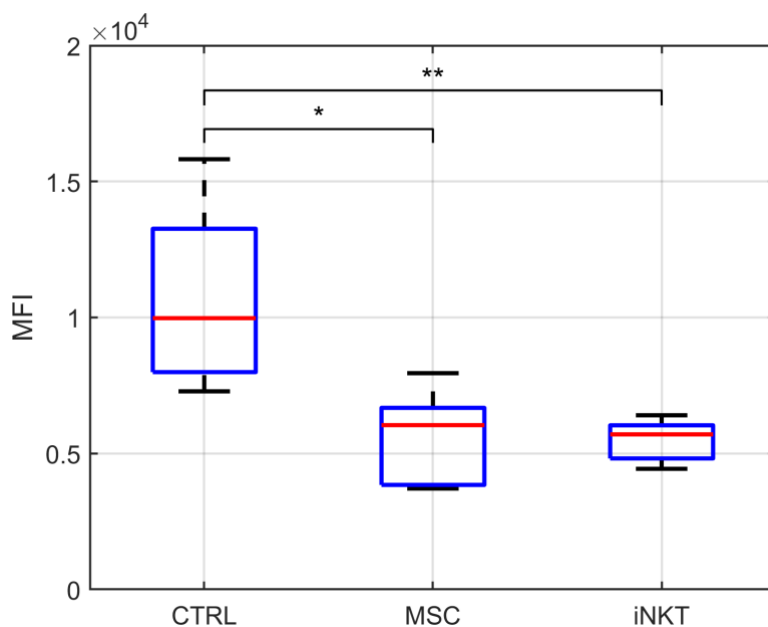
Na obrázku 18 je zobrazena statistická korelace hodnoty CD1d vůči počtu iNKT. Ukázalo se, že hodnota CD1d nekoreluje s celkovým počtem iNKT v čase odběru. Výsledek Pearson koeficient byl 0,04, nicméně výsledek není signifikantní ($p=0,68$).



Obrázek 18 – korelace MFI CD1d na monocytární populaci vůči počtu iNKT u pacientů po aloHSCT

4.4 Srovnání imunomodulačního potenciálu MSC a iNKT

Po kokultivaci aktivovaných MNC s MSC došlo k poklesu mediánu intenzity fluorescence (median fluorescence intensity, MFI) ve všech vzorcích. Výsledná míra exprese CD25 se pohybovala v rozmezí 3710–7951 (medián MFI – 6041). Po kokultivaci aktivovaných MNC s iNKT došlo rovněž k poklesu MFI ve všech sledovaných vzorcích a míra exprese CD25 byla v rozmezí 4435–6404 (medián MFI – 5701). Jako kontrola byla stanovena míra exprese aktivačního znaku CD25 na suspenzi nespecificky stimulovaných MNC bez kokultivace s MSC/iNKT, který byl považován za 100 % míry exprese CD25. MFI kontrolních vzorků se pohybovala v rozmezí 822–15819 (medián MFI – 9974). Míra exprese CD25 na MNC po kokultivaci s MSC tedy poklesla v průměru o 39 % a po kokultivaci s iNKT poklesla průměrně o 43 % vůči kontrolním vzorkům. Pro grafické zobrazení výsledků viz obrázek 14.



Obrázek 18 - Exprese CD25 na nespecificky aktivovaných MNC po kokultivaci s MSC/iNKT

Vysvětlivky: CTRL – kontrola (odpovídá 100% míry exprese CD25), MSC – MNC po kokultivaci s mesenchymálními kmenovými buňkami, iNKT – MNC po kokultivaci s invariantními NKT lymfocyty, MNC – mononukleární buňky, MFI – mean fluorescence intensity

* $p = (0.01 \div 0.05)$

** $p = (0.001 \div 0.01)$

*** $p \leq 0.001$

5. Diskuze

Moderní přípravky buněčné terapie, které zasahují do imunitních procesů, jsou nepochybně součástí budoucnosti léčby potransplantačních komplikací. Lze očekávat, že bude přibývat buněčných populací, které budou využívány v léčbě relapsu, SR-GvHD a v dalších indikacích. Zavádění těchto nových léčebných modalit do klinické praxe musí předcházet řada preklinických studií a optimalizace výrobních a aplikačních postupů.

První část této práce je zaměřena na vliv kompozice léčivých přípravků, které jsou vyráběny z mesenchymálních kmenových buněk, na jejich vlastnosti a imunomodulační potenciál. Porovnali jsme dvě skupiny šarží MSC z různých období výroby – šarže, jejichž meziprodukty byly vyrobeny mezi lety 2013-2016, s druhou skupinou, která byla vyráběna od roku 2017. Každá jednotlivá šarže pocházela od odlišného dárce. Celkem jsme porovnali 20 šarží z hlediska celkového zisku buněk, čistoty buněčné linie, viability a imunofenotypu rekvantovaných a expandovaných MSC po kryokonzervaci. Zajímaly nás rozdíly mezi staršími a novějšími šaržemi, dále rozdíly mezi šaržemi vzájemně a také, jak se mezi sebou liší jednotlivé léčivé přípravky vyrobené z jedné šarže – tedy intrašaržová variabilita. Ukázalo se, že námi vyrobené léčivé přípravky dosahují nízké variability z hlediska většiny sledovaných parametrů. Odchytky z hlediska čistoty linie MSC a viability buněk nepřesáhly 6 % a variabilita v zastoupení imunofenotypických markerů MSC na buňkách se pohybovala v rozmezí od 0 do 4 %. Nicméně poměrně velký rozptyl jsme zaznamenali v celkové výrobní dávce MSC. Rozdíly mezi jednotlivými šaržemi dosahovaly od 1,09 až do 8,90 x10⁶ buněk/aliquot/den kultivace. Přitom přípravky z novějších šarží buněk dosahovaly mírně nižších výtěžků. Předpokládáme, že tento rozptyl může být ovlivněn drobnými odchylkami ve výrobním postupu, například změnou typu destičkového lyzátu. U nových šarží MSC se využívají deleukotizované trombocyty z aferézy resuspendované v náhradním roztoku (TADR). Tato změna neovlivnila splnění požadované dávky a zároveň další vlastnosti MSC. Navzdory variabilitě mezi šaržemi byla u všech jednotlivých léčivých přípravků vždy splněna minimální terapeutická dávka, která činí 1 x 10⁶ MSC na 1 kg hmotnosti pacienta a zisk MSC v léčivých přípravcích vyrobených z jedné šarže byl variabilní mnohem méně. To svědčí pro větší konzistenci MSC vyrobených z jedné výrobní šarže.

Jedním ze způsobů, jak zvýšit standardizaci léčivých přípravků a snížit jejich interindividuální variabilitu je „poolování“ produktů. Poolované přípravky jsou vytvořeny smícháním buněk od několika dárců, „single-donor“ přípravky jsou připravovány z buněk jednoho dárce. Standardizovaný protokol výroby s poolovanými přípravky MSC vyvinula vědecká skupina z centra buněčné terapie v německém Frankfurtu. V *in vitro* studii prokázali vysoký imunosupresivní potenciál takto připravených MSC a publikovali povzbudivé výsledky pilotního klinického výzkumu (Bader et al. 2018). My jsme chtěli ověřit, zda MSC vyráběné v našem centru (v režimu 1 dárce – 1 šarže – 1 pacient) mohou mít tak významnou interindividuální variabilitu oproti poolovaným, že by jejich podání mohlo zásadně znevýhodnit některé pacienty. Testovali jsme několik imunomodulačních parametrů MSC a naše analýza zásadní rozdíly nepotvrdila. Ve všech sledovaných parametrech byl imunomodulační potenciál obou typů přípravků srovnatelný. Parametr, ve kterém MSC vykazovaly velkou variabilitu byl míra proliferace. To odpovídá i našim výsledkům zisku rozdílného množství MSC při výrobě léčivých přípravků z různých šarží. Nicméně z výsledků vyplývá, že celkový počet buněk nemá zásadní vliv na imunomodulační vlastnosti MSC, jestliže je splněna minimální výrobní dávka. Naše výsledky jsou v souladu se starším předpokladem, který vycházel z fáze II klinické studie MSC v léčbě GvHD skupiny Le Blanc, že odpověď pacienta na léčbu GvHD není závislá na dárci mesenchymálních buněk (Le Blanc et al. 2008).

Využití MSC v léčbě steroid-refrakterní GvHD se již dostalo do klinické praxe v řadě evropských zemí, včetně našeho pracoviště, nicméně studie zaměřené na efektivitu této léčby přinášejí stále kontroverzní výsledky. Tyto rozdíly ve studiích jsou částečně způsobené inkonzistencí výrobních a aplikačních postupů napříč výrobními centry, které se liší například ve zdroji MSC, v podávané dávce, načasování podání či ve způsobu přípravy finálního produktu. Existují práce, které se zaměřují na nalezení optimální varianty zpracování a aplikace MSC, nicméně jejich design a metodika jsou značně heterogenní. Z těchto důvodů se úspěšnost aplikace MSC v různých centrech liší (Rizk et al. 2016). Z metaanalýzy z roku 2015 vyplývá, že MSC lze využít jako alternativu v léčbě SR-GvHD, ale pro potvrzení jejich efektivity je nezbytné provedení randomizovaných klinických studií, jejichž výsledky dosud chybí (Hashmi et al. 2016).

V další části výzkumu jsme se věnovali iNKT lymfocytům, které projevily ve studiích *in vitro* a na myších modelech (Schneidawind et al. 2014) (Du et al. 2017) slibný potenciál inhibovat projevy GvHD a zároveň potencovat GvL efekt (Jahnke et al. 2018). Terapeutické podání iNKT pacientům musí, na rozdíl od podání mesenchymálních buněk, respektovat shodu v HLA systému mezi dárce a příjemcem. V případě přítomné HLA neshody by bylo vysoké riziko odhojení iNKT po jejich aplikaci pacientovi. Z tohoto důvodu jsme v rámci preklinické fáze přípravy výrobního protokolu iNKT zvažovali jako potenciální zdroj pro výrobu LP patientské vlastní – autologní buňky. Monitorovali jsme dynamiku regenerace iNKT po alogenní transplataci a hledali jsme ideální časové okno, ve kterém by bylo možné odebrat autologní iNKT s vysokou pravděpodobností jejich zachytu.

Prokázali jsem, že kinetika iNKT po aHSCT není lineární, a že u všech pacientů nelze očekávat kontinuální vzestup počtu iNKT s přibývajícím časem od transplatace adekvátně k vzestupu leukocytů. V našem souboru měla vzestupnou tendenci hladiny iNKT pouze menšina pacientů. Celkové množství iNKT v periferní krvi u pacientů v naší studii se pohybovalo v rozmezí 0–6511 buněk/ml, což odpovídá 0 – 1,42 % z CD3+ lymfocytů (medián 0,05 %). Montoya et al. uvádí, že u zdravých osob se hladiny iNKT v periferní krvi pohybují se v rozmezí 0,01 do 0,92% z celkového počtu lymfocytů, a to bez významného rozdílu mezi pohlavími (Montoya et al. 2007). Řada studií se shoduje, že tyto hladiny jsou stabilní v čase (Montoya et al. 2007)(Lucas et al. 2003)(Dellabona et al. 1993), přestože sledované období žádné z těchto studií nepřesáhlo 12 měsíců a faktory, které mají vliv na množství iNKT jsou zatím nedostatečně známy. Hladiny iNKT u pacientů po aHSCT jsou pravděpodobně navíc významně ovlivněny řadou peritransplantačních okolností, které mohou mít negativní dopad na množství i na kvalitativní vlastnosti lymfocytů.

Některé studie prokazují, že vyšší množství iNKT je protektivní před rozvojem GvHD (Mavers et al. 2017). Rekonstituci iNKT po HLA-haploidentické HSCT se zabývala studie u 22 pediatrických pacientů s leukémií a MDS (Casorati et al. 2012). V této studii dosáhla většina pacientů mediánu 100 iNKT/10⁶ T lymfocytů ve 3 měsících po transplataci, nicméně ve skupině pacientů s relapsem byl dosahovaly mediánů iNKT ve 3 měsících pod 20 iNKT/10⁶ T lymfocytů. Nízké hladiny iNKT mohou být tedy markerem relapsu (Casorati et al. 2012). V další studii byly vysoké počty iNKT v kombinaci s nízkou expresí CD1d na leukemických buňkách multivariantní analýzou potvrzeny jako nezávislý faktor přežití pacientů s CLL (Gorini et al. 2017). Nicméně pro podobné statistické analýzy zatím nemáme dostatečně velký soubor pacientů a ačkoli na jednotlivých případech v naší studii se asociace nízkého počtu iNKT a rozvoje těžkého GvHD či relapsu u pacientů projevila, nelze tyto výsledky považovat statisticky za validní.

Do procesu imunitní rekonstituce zasahuje celá řada peritransplantačních faktorů – velký význam má zvolený typ conditioningu a imunosuprese, lymfodepleční metodiky jako je zařazení ATG nebo potransplantačního cyklofosfamidu u haploidentických transplatací, které snižují hladinu T

lymfocytů (Williams et al. 2020). V důsledku toho nejsme schopni stanovit timepoint v potransplantačním období, ve kterém bychom s vysokou pravděpodobností mohli odebírat dostatečné množství iNKT pro výrobu léčivých přípravků. Tyto výsledky vedou k závěru, že se v přípravě protokolu aplikace iNKT se zaměříme na alogenní HLA haploidentické dárce, což s sebou může nést větší riziko odhojení iNKT buněk. K jeho snížení bude pravděpodobně přínosné zařadit do výrobního/aplikačního protokolu alogenních iNKT lymfodepleční metody, ať už budou iNKT podávány formou „čistých“ iNKT nebo v modifikované podobě jako jsou například CAR-iNKT (Amini et al. 2022).

iNKT jsme dále porovnávali i z hlediska jejich imunofenotypu a stanovili jsme kvantitativní zastoupení CD4+, CD8+ a DN subpopulací u pacientů po aloHSCT. V našem souboru převažovaly CD8+ iNKT buňky. Medián procentuálního zastoupení CD8+ z celkového počtu iNKT byl 49 %, nicméně s velkým rozpětím od 1 do 87 %. CD4+ a DN iNKT byly zastoupeny méně (medián 14%, resp. 15%). CD4+ iNKT nejvíce ze všech subsetů produkují IL-4, iniciují převážně Th2 imunitní reakci a předpokládáme jejich významnější roli v imunomodulaci GvHD. U CD8+ a DN buněk naopak dominuje Th1 imunitní reakce a předpokládáme u nich vyšší cytotoxickou aktivitu (Zeng et al. 2013). Procentuální rozložení subpopulací iNKT u lidí je variabilní a studie, které se zabývaly kvantifikací subpopulací iNKT, nemají konzistentní výsledky. Casorati *et al.* uvádí, že pro dospělé pacienty je typická převaha CD4- > CD4+ iNKT. Ve studii zaměřené na dynamiku rekonstituce iNKT u pediatrických pacientů po haploidentické transplantaci pozorovali dominanci CD4+ iNKT v prvních letech a v průběhu přibližně 7. roku po HSCT pozorovali rychlou expanzi CD4- buněk, která vedla až k obrácení CD4+/CD4- poměru (Casorati et al. 2012). Montoya *et al.* v randomizované skupině 30 zdravých dárců iNKT popsali převažující CD4+ imunofenotyp, nicméně CD4+ iNKT v jejich studii negativně korelovaly s celkovým počtem iNKT. Pacienti s celkově vyšším množstvím iNKT měli vyšší zastoupení CD8+ a DN iNKT (Montoya et al. 2007). Zeng *et al.* ve funkční studii zaměřené na iNKT expandované pomocí α -galcer a kokultivované s B-lymfocyty naměřili následující rozvrstvení subpopulací: DN>CD4+>CD8+ (Zeng et al. 2013). Limitací všech těchto kvantitativních studií, včetně našich výsledků, je ovšem nedostatečný počet sledovaných subjektů. Naš soubor byl navíc heterogenní z hlediska diagnóz, pro kterou pacienti HSCT podstoupili, i dalších peritransplantačních faktorů (použitá chemoterapie, imunosuprese, typ štěpu aj.). Ve studii u pediatrických pacientů může být navíc významným faktorem, který zvyšuje odlišnosti vyžívání T/iNKT lymfocytů oproti dospělým pacientům, přítomnost funkčního thymu.

Kvantifikovali jsme také expresi CD62L molekuly na iNKT. CD62L pozitivní iNKT buňky déle přežívají a vykazují významnější míru proliferace po stimulaci iTCR receptorem (Tian et al. 2016). iNKT pacientů po aloHSCT měly obecně nízkou expresi CD62L (medián 10 %, rozpětí 0-39 %). To odpovídá i kvantitativním studiím iNKT u zdravých dobrovolníků (Montoya et al. 2007) (Zeng et al. 2013). Pro efektivnější využití iNKT je pravděpodobně nezbytné vyvinout strategie, které zvýší expresi CD62L například cestou indukce jejich ligandů na antigen prezentujících buňkách (Tian et al. 2016).

Dále jsme korelovali hladinu antigenu CD1d, hlavní kostimulační molekuly iNKT, na monocytární populaci s počtem iNKT v jednotlivých timepointech po transplantaci. Expresi na dalších důležitých antigen prezentujících buňkách, zejména na B-lymfocytech, jsme nekvantifikovali z důvodu jejich nízké kvantity ve sledovaném období. Hodnota CD1d byla dynamická, tedy v čase se měnila, nicméně změna byla nelineární a exprese CD1d nekorelovala s celkovým počtem iNKT v čase odběru. Na rozdíl od našich výsledků existuje v některých případech významná korelace exprese CD1d a hladiny iNKT s prognózou pacientů. CD1d molekula je například vysoce exprimována na buňkách v časných stádiích rozvoje mnohočetného myelomu a v průběhu progresu tohoto onemocnění její exprese klesá až k nedekovatelným hodnotám. Současně s tím klesá

v průběhu progresu myelomu i počet iNKT. Snížení exprese CD1d a nízké počty iNKT jsou zde asociovány s horším přežíváním (Spanoudakis et al. 2009). V jiné studii byly popsána inverzní korelace mezi počtem iNKT a expresí CD1d na leukemických buňkách u pacientů s CLL. Pacienti s nízkými počty iNKT a vysokou expresí CD1d měli větší tendenci k progresi. Naopak vysoké počty iNKT a nízká či nulová exprese CD1d byla asociována se stabilní nemocí (Gorini et al. 2017). Tyto výsledky napovídají, že pro aktivaci iNKT není jen důležitá přítomnost CD1d, ale také kvalita signálu a ani vysoká exprese CD1d nezaručuje expanzi iNKT buněk.

V poslední části naší studie jsme vzájemně porovnávali MSC a iNKT z hlediska jejich imunomodulačního potenciálu. Potvrdili jsme, že iNKT i MSC buňky vykazují imunomodulační aktivitu a jsou schopny měnit stav T lymfocytů. V rámci kokultivačních experimentů jsme sledovali hlavní marker aktivace T lymfocytů CD25. Nespecifická stimulace zvýšila expresi aktivačního markeru CD25 u všech dárců. Po kokultivaci s MSC či s iNKT došlo k poklesu aktivace, přičemž z hlediska míry poklesu CD25 nebyl mezi buněčnými typy prokázán významný rozdíl. Imunomodulační potenciál MSC včetně schopnosti inhibice exprese CD25 na aktivovaných lymfocytech *in vitro* byl již potvrzen v řadě studií (Le Blanc et al. 2004). Schmid et al. (2022) kokultivovali iNKT s alogenně aktivovanými dendritickými buňkami a také pozorovali pokles aktivačních markerů CD25 a CD69 na lymfocytech (Schmid et al. 2022). Doposud však nejsou k dispozici studie zabývající se rozdílností imunomodulace těchto dvou buněčných linií, nicméně existují již studie zaměřené na společné podání různých buněčných populací a dosud získaná data ukazují, že by tento přístup mohl být velmi efektivní. Například společné podání MSC a Treg vede k delšímu přežívání Treg a k zesílení jejich imunosupresivního potenciálu (Caplan et al. 2021). Z těchto výsledků usuzujeme, že jednotlivé buněčné populace by se mohly vzájemně podporovat a vést tedy k lepším výsledkům v léčbě GvHD. Do budoucna bude jistě přínosné vzájemné porovnání jednotlivých buněčných populací v léčbě potransplantačních komplikací, a to i v kontextu dalších buněčných typů, které se již využívají v rámci klinických studií (NK buňky, Treg, Tr1 regulační buňky, dendritické buňky aj.). Předpokládáme, že jednotlivé buněčné populace spolu nebudou soupeřit, ale mohou se naopak ve specifických situacích doplňovat.

6. Závěr

Hypotéza 1 – Poolování MSC od různých dárců zvýší jejich imunomodulační potenciál – nepotvrzena.

Poolované i single donor MSC prokázaly ve všech sledovaných testech srovnatelné výsledky a ukázalo se, že poolování přípravků nezvýší jejich efektivitu z hlediska schopnosti imunomodulace. Pro jejich klinickou aplikaci v rámci léčby steroid-refrakterní GvHD se tedy zdá výhodné a logisticky schůdnější jejich využití nadále v režimu 1 pacient – 1 dárců

Hypotéza 2 – Různé šarže MSC (1 šarže = 1 dárců) se vzájemně liší ve svých vlastnostech – potvrzena.

Jednotlivé šarže MSC byly z hlediska většiny sledovaných vlastností srovnatelné, nicméně velký rozptyl jsme zaznamenali v celkové výrobní dávce MSC. Rozdíly mezi léčivými přípravky vyrobenými z jedné šarže byly oproti tomu menší. Proliferační potenciál MSC od různých dárců se tedy liší, imunomodulační vlastnosti jsou ale srovnatelné.

Hypotéza 3 – V průběhu regenerace imunitního systému po aloHSCT stoupá hladina iNKT – nepotvrzena.

Dynamika regenerace iNKT po aloHSCT je značně variabilní, u většiny pacientů není lineární a závisí na celé řadě peritransplantačních faktorů. V prvních 6 měsících po aloHSCT nejsme schopni stanovit timepoint, kdy bychom mohli s jistotou odebrat iNKT z periferní krve pacientů. Z tohoto důvodu se v rámci přípravy výrobního protokolu léčivých přípravků zaměříme na využití iNKT od HLA shodných alogenních dárců.

Hypotéza 4 – MSC a iNKT se neliší z hlediska imunomodulačního potenciálu – potvrzena.

iNKT potvrdily svou schopnost inhibovat aktivaci nespecificky stimulovaných MNC a to bez signifikantního rozdílu oproti MSC. Z tohoto hlediska představuje podání iNKT novou slibnou strategii pro ovlivnění SR-GvHD.

7. Seznam používaných symbolů a zkratek (řazeno abecedně)

α -GalCer	α -Galactosylceramid
aGvHD	Akutní reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease)
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AloHSCT/aloSCT	Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation)
AML	Akutní myeloidní leukémie
APCs	Antigen prezentující buňky (antigen presenting cells)
ATG	Antithymocytární globulin
BCNU	1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (Karmustin)
BMSC	Bone marrow stem cells
BMWD	Bone Marrow Donors Worldwide
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	Chronická reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease)
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMV	Cytomegalovirus
CNI	Kalciumneurinové inhibitory
ČNRDD	Český národní registr dárců dřeně
ČRDKB	Český registr dárců krvetvorných buněk
CsA	Cyklosporin A
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DLI	Donor lymphocyte infusion
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
Fox-P3	Forkhead box protein 3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GRFS	Přežití bez GvHD a bez relapsu (graft-versus-host disease-free, relapse-free survival)
GvHD	Reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease)
GVL	Graft-versus-leukemia
GVT	Graft-versus-tumor
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	Human leukocyte antigen
HSC	Hematopoietic stem cells
IFN γ	Interferon γ
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	Interleukin
iNKT	Invariantní NKT lymfocyty
iTCR	Invariantní T buněčný receptor
LP	Léčivý přípravek

MAC	Myeloablativní přípravný režim (Myeloablative conditioning)
MFI	Střední intenzita fluorescence (Medium fluorescence intensity)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Major histocompatibility complex)
MMD	Minimální měřitelná nemoc (Minimal measurable disease)
MMUD	Nepříbuzný dárce s neshodou (mismatched unrelated donor)
MNC	Mononukleární buňky
MRD	Minimální reziduální nemoc (Minimal residual disease)
MSC	Mesenchymální kmenové buňky (Mesenchymal stem cells)
MSD	shodný příbuzný dárce (matched sibling donor)
MTX	Metotrexát
MUD	Shodný nepříbuzný dárce (matched unrelated donor)
NK	Natural killer (lymfocyty)
OS	Celkové přežití (Overall survival)
PAMP	Pathogen-associated-damage patterns
PBSC	Periferní krvetvorné buňky (Peripheral blood stem cells)
PHA	Phytohemaglutinin
PRCA	Čistá aplázie červené krevní řady (Pure red cell aplasia)
PT-Cy	Potransplantační cyklofosfamid
RIC	Redukovaný přípravný režim (Reduced intensity conditioning)
SCID	Těžký kombinovaný imunodeficit (Severe combined immunodeficit)
TAC	Takrolimus
TADR	Trombocyty z aferézy de leukotizované a resuspendované
Tc	Cytotoxické T lymfocyty
TCD	T-lymfodepleční metodiky (T-cell depleting)
TCR	T buněčný receptor (T cell receptor)
TGF- β	Transformující růstový faktor β (Transforming growth factor β)
Th	Pomocné T lymfocyty
TNF- α	Faktor nekrotizující tumory α (Tumor-necrosis-factor)
Treg	Regulační T lymfocyty

8. Seznam literatury

1. Adams EJ, Luoma AM. The yin and yang of CD1d recognition. *Nature Immunology* [Internet]. 2012 Sep [cited 2020 Dec 6];13(9):814–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.2401>
2. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
3. Amini L, Silbert SK, Maude SL, Nastoupil LJ, Ramos CA, Brentjens RJ, et al. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2022 May [cited 2022 May 7];19(5):342–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-022-00607-3>
4. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012 Oct 18;367(16):1487–96.
5. Andrlová H, van den Brink MRM, Markey KA. An Unconventional View of T Cell Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2021 Mar 24];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7930482/>
6. Aoki T, Takami M, Takatani T, Motoyoshi K, Ishii A, Hara A, et al. Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner. *Cancer Sci*. 2020 Jul;111(7):2223–33.
7. Apostolova P, Zeiser R. The Role of Purine Metabolites as DAMPs in Acute Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2016;7:439.
8. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):385–9.
9. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):266–74.
10. Ayas M, Eapen M, Le-Rademacher J, Carreras J, Abdel-Azim H, Alter BP, et al. Second allogeneic hematopoietic cell transplantation for Patients with Fanconi anemia and Bone Marrow Failure. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015 Oct [cited 2021 Apr 2];21(10):1790–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568139/>
11. Ayuk F, Balduzzi A. Donor Selection for Adults and Pediatrics. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2022 Feb 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554000/>
12. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a

- powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. 2002 Sep;16(9):1668–72.
13. Bader P, Kuçi Z, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, Dennis M, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(7):852–62.
 14. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1343–7.
 15. Barrett AJ, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2021 Apr 3];3(4):429–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3426446/>
 16. Bassiri H, Das R, Nichols KE. Invariant NKT cells: Killers and conspirators against cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Dec 1;2(12):e27440.
 17. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, Lazaryan A, Luo X, Curtsinger J, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv*. 2018 Apr 24;2(8):909–22.
 18. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*. 2014 Jul 31;124(5):822–6.
 19. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):131–42.
 20. Bhatia S. Long-term health impacts of hematopoietic stem cell transplantation inform recommendations for follow-up. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 Feb 21];4(4):437–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163085/>
 21. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966 1967;62:21–78.
 22. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(3):537–46.
 23. Blazar BR, Taylor PA, Bluestone JA, Vallera DA. Murine gamma/delta-expressing T cells affect alloengraftment via the recognition of nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4463–72.
 24. Booth GS, Gehrie EA, Bolan CD, Savani BN. Clinical Guide to ABO-Incompatible Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2022 Feb 19];19(8):1152–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879113001456>

25. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):101–17.
26. Bricard G, Cesson V, Devevre E, Bouzourene H, Barbey C, Rufer N, et al. Enrichment of human CD4+ V(alpha)24/Vbeta11 invariant NKT cells in intrahepatic malignant tumors. *J Immunol*. 2009 Apr 15;182(8):5140–51.
27. Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817–90.
28. Brossay L, Jullien D, Cardell S, Sydora BC, Burdin N, Modlin RL, et al. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol*. 1997 Aug 1;159(3):1216–24.
29. Buck K, Wadsworth K, Setterholm M, Maiers M, Confer D, Hartzman R, et al. High-Resolution Match Rate of 7/8 and 9/10 or Better for the Be The Match Unrelated Donor Registry. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Apr;22(4):759–63.
30. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Williams B, Gray M, Storb R, et al. ABO-incompatible marrow transplants. *Transplantation*. 1978 Oct;26(4):233–8.
31. Caplan HW, Prabhakara KS, Furman NET, Zorofchian S, Martin C, Xue H, et al. Human-derived Treg and MSC combination therapy may augment immunosuppressive potency in vitro, but did not improve blood brain barrier integrity in an experimental rat traumatic brain injury model. *PLOS ONE* [Internet]. 2021 5 [cited 2022 Mar 4];16(5):e0251601. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0251601>
32. Casorati G, de Lalla C, Dellabona P. Invariant natural killer T cells reconstitution and the control of leukemia relapse in pediatric haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2022 May 6];1(3):355–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382855/>
33. Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry MS, Dazzi F, Kanfer E, et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 May 24;119(21):5030–6.
34. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Dec 21 [cited 2020 Dec 16];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308132/>
35. Choi HJ, Xu H, Geng Y, Colmone A, Cho H, Wang CR. Bacterial infection alters the kinetics and function of iNKT cell responses. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2020 Dec 6];84(6):1462–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614593/>
36. Cianferoni A. Invariant Natural Killer T Cells. *Antibodies* [Internet]. 2013 Dec 23 [cited 2022 Jan 29];3(1):16–36. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4468/3/1/16>
37. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, Barnes TH, Kongtim P, Carmazzi Y, et al. Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft

- Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1392–8.
38. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Feb;23(2):211–34.
 39. Cudkowicz G, Bennett M. PECULIAR IMMUNOBIOLOGY OF BONE MARROW ALLOGRAFTS. *J Exp Med* [Internet]. 1971a Nov 30 [cited 2021 Mar 4];134(6):1513–28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139114/>
 40. Cudkowicz G, Bennett M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. I. Graft rejection by irradiated responder mice. *J Exp Med*. 1971b Jul 1;134(1):83–102.
 41. Daikeler T, Hügle T, Farge D, Andolina M, Gualandi F, Baldomero H, et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jul;44(1):27–33.
 42. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol*. 1958 Oct;20(1–4):156–66.
 43. Dellabona P, Casorati G, Friedli B, Angman L, Sallusto F, Tunnacliffe A, et al. In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor alpha/beta CD4-8- subset. *J Exp Med*. 1993 Jun 1;177(6):1763–71.
 44. Dhodapkar MV, Kumar V. Type II Natural Killer T (NKT) Cells And Their Emerging Role In Health And Disease. *J Immunol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2020 Dec 6];198(3):1015–21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5300729/>
 45. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838–43.
 46. Drobyski WR, Majewski D. Donor $\gamma\delta$ T Lymphocytes Promote Allogeneic Engraftment Across the Major Histocompatibility Barrier in Mice. *Blood* [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2021 Mar 4];89(3):1100–9. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.V89.3.1100>
 47. Du J, Paz K, Thangavelu G, Schneidawind D, Baker J, Flynn R, et al. Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells. *Blood*. 2017 Jun 8;129(23):3121–5.
 48. Eapen M, Logan BR, Horowitz MM, Zhong X, Perales MA, Lee SJ, et al. Bone marrow or peripheral blood for reduced-intensity conditioning unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):364–9.
 49. Exley MA, Hand L, O’Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol*. 2014 Nov;223(2):R41-48.
 50. Exley MA, Lynch L, Varghese B, Nowak M, Alatrakchi N, Balk SP. Developing Understanding of the Roles of CD1d-restricted T cell Subsets in Cancer: Reversing

- Tumor-induced Defects. *Clin Immunol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Jan 30];140(2):184–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3143311/>
51. Fernandez-Sojo J, Azqueta C, Valdivia E, Martorell L, Medina-Boronat L, Martínez-Llonch N, et al. Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic? *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2021 Oct [cited 2022 Feb 19];56(10):2489–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41409-021-01367-x>
 52. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Dec;11(12):945–56.
 53. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
 54. François M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*. 2012 Feb;14(2):147–52.
 55. Fuchs EJ. Related haploidentical donors are a better choice than matched unrelated donors: Point. *Blood Adv* [Internet]. 2017 Feb 14 [cited 2021 Feb 13];1(6):397–400. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5738988/>
 56. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Monitoring of Pathogen-Specific T-Cell Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Mar 24];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00276/full>
 57. Gadola SD, Dulphy N, Salio M, Cerundolo V. $V\alpha 24-J\alpha Q$ -Independent, CD1d-Restricted Recognition of α -Galactosylceramide by Human CD4⁺ and CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2020 Dec 18];168(11):5514–20. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/168/11/5514>
 58. Gagelmann N, Ayuk F, Wolschke C, Kröger N. Comparison of Different Rabbit Anti-Thymocyte Globulin Formulations in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2017 Dec [cited 2021 Feb 13];23(12):2184–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879117306808>
 59. Giaccone G, Punt CJA, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2002 Dec;8(12):3702–9.
 60. Gilleece MH, Labopin M, Yakoub-Agha I, Volin L, Socié G, Ljungman P, et al. Measurable residual disease, conditioning regimen intensity, and age predict outcome of

allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: A registry analysis of 2292 patients by the Acute Leukemia Working Party European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Am J Hematol*. 2018 Sep;93(9):1142–52.

61. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295–304.
62. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2022 Jan 26];114(10):1379–88. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525753/>
63. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Nov 25 [cited 2021 Feb 21];363(22):2091–101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017343/>
64. Gorini F, Azzimonti L, Delfanti G, Scarfò L, Scielzo C, Bertilaccio MT, et al. Invariant NKT cells contribute to chronic lymphocytic leukemia surveillance and prognosis. *Blood*. 2017 Jun 29;129(26):3440–51.
65. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2014 ervenec [cited 2022 Feb 25];371(4):339–48. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1311707>
66. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Nov;36(9):757–69.
67. Gratwohl A, Stern M, Brand R, Apperley J, Baldomero H, de Witte T, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*. 2009 Oct 15;115(20):4715–26.
68. Gratwohl A, Sureda A, Cornelissen J, Apperley J, Dreger P, Duarte R, et al. Alloreactivity: the Janus-face of hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2017 Aug;31(8):1752–9.
69. Greco R, Labopin M, Badoglio M, Veys P, Furtado Silva JM, Abinun M, et al. Allogeneic HSCT for Autoimmune Diseases: A Retrospective Study From the EBMT ADWP, IEWP, and PDWP Working Parties. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 4 [cited 2021 Mar 6];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6622152/>
70. Griffith LM, Pavletic SZ, Lee SJ, Martin PJ, Schultz KR, Vogelsang GB. Chronic Graft-versus-Host Disease--implementation of the National Institutes of Health Consensus Criteria for Clinical Trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Apr;14(4):379–84.
71. Grube M, Holler E, Weber D, Holler B, Herr W, Wolff D. Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation-Results

- from a Single-Center Observational Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Oct;22(10):1781–91.
72. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):625–36.
 73. Handgretinger R, Schumm M, Lang P, Greil J, Reiter A, Bader P, et al. Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Apr 30;872:351–61; discussion 361-362.
 74. Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A, Asai T, Kanda Y, Kurokawa M, et al. Host-Residual Invariant NK T Cells Attenuate Graft-versus-Host Immunity. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2021 Mar 4];175(2):1320–8. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/175/2/1320>
 75. Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol*. 2016 Jan;3(1):e45-52.
 76. Hejretová L, Čedíková M, Dolejšová M, Vlas T, Jindra P, Lysák D, et al. Comparison of the immunomodulatory effect of single MSC batches versus pooled MSC products. *Cell Tissue Bank*. 2020 Mar;21(1):119–29.
 77. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J* [Internet]. 2014 Oct 29 [cited 2021 Feb 21];5(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4222417/>
 78. Herrmann RP, Sturm MJ. Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells Cloning*. 2014;7:45–52.
 79. Hill L, Alousi A, Kebriaei P, Mehta R, Rezvani K, Shpall E. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Ther Adv Hematol*. 2018 Jan;9(1):21–46.
 80. Hirano M, Martí R, Casali C, Tadesse S, Uldrick T, Fine B, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology*. 2006 Oct 24;67(8):1458–60.
 81. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute Graft-Versus-Host Disease. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2020 Dec 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553993/>
 82. Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Shimabukuro-Vornhagen A, Skoetz N, et al. Comparison of bone marrow versus peripheral blood allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in adults - a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 May;94(2):179–88.
 83. Holubova M, Lysak D, Vlas T, Vannucci L, Jindra P. Expanded cryopreserved mesenchymal stromal cells as an optimal source for graft-versus-host disease treatment. *Biologicals*. 2014 May;42(3):139–44.

84. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Aug;38(4):291–7.
85. Jagasia M, Greinix H, Robin M, Das-Gupta E, Jacobs R, Savani BN, et al. Extracorporeal photopheresis versus anticytokine therapy as a second-line treatment for steroid-refractory acute GVHD: a multicenter comparative analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jul;19(7):1129–33.
86. Jahnke S, Schmid H, Secker KA, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Baur R, et al. Invariant Natural Killer T Cells from Donor Lymphocyte Infusions (DLI-iNKTs) Contribute to Anti-Tumor Immunity after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Blood* [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2022 Feb 5];132(Supplement 1):3340. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111745>
87. Jahnke S, Schmid H, Secker KA, Einhaus J, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, et al. Invariant NKT Cells From Donor Lymphocyte Infusions (DLI-iNKTs) Promote ex vivo Lysis of Leukemic Blasts in a CD1d-Dependent Manner. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 13];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01542>
88. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Aug 16 [cited 2020 Dec 6];8(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420949/>
89. Kalra A, Williamson T, Daly A, Savoie ML, Stewart DA, Khan F, et al. Impact of Donor and Recipient Cytomegalovirus Serostatus on Outcomes of Antithymocyte Globulin-Conditioned Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Sep;22(9):1654–63.
90. Kinjo Y, Kitano N, Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J Infect Chemother* [Internet]. 2013 Aug [cited 2020 Dec 6];19(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822041/>
91. Koh LP, Rizzieri DA, Chao NJ. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Using Mismatched/Haploidentical Donors. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2021 Apr 2];13(11):1249–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879107003837>
92. Kollman C, Spellman SR, Zhang MJ, Hassebroek A, Anasetti C, Antin JH, et al. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2016 Jan 14;127(2):260–7.
93. de Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):195–206.
94. Kuball J, Boelens JJ. Clinical and Biological Concepts for Mastering Immune Reconstitution After HSCT: Toward Practical Guidelines and Greater Harmonization. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham

(CH): Springer; 2019 [cited 2021 Feb 18]. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553945/>

95. Kuylensstierna C, Björkström NK, Andersson SK, Sahlström P, Bosnjak L, Paquin-Proulx D, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol*. 2011 Jul;41(7):1913–23.
96. Lam PY, Nissen MD, Mattarollo SR. Invariant Natural Killer T Cells in Immune Regulation of Blood Cancers: Harnessing Their Potential in Immunotherapies. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 13];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01355>
97. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Nov 25;351(22):2265–75.
98. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008 May 10;371(9624):1579–86.
99. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*. 2005;7(1):36–45.
100. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004 Sep;60(3):307–15.
101. Lee SJ, Logan B, Westervelt P, Cutler C, Woolfrey A, Khan SP, et al. Comparison of Patient-Reported Outcomes in 5-Year Survivors Who Received Bone Marrow vs Peripheral Blood Unrelated Donor Transplantation: Long-term Follow-up of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016 Dec 1;2(12):1583–9.
102. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2003 Apr [cited 2021 Feb 15];9(4):215–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879103000624>
103. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The Functions of Type I and Type II Natural Killer T (NKT) Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 May [cited 2020 Dec 6];19(6):1330–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694171/>
104. de Lima M, Porter DL, Battitwalla M, Bishop MR, Giralto SA, Hardy NM, et al. Proceedings from the National Cancer Institute’s Second International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Part III. Prevention and Treatment of Relapse after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Apr 3];20(1):4–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938421/>
105. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2014 Nov;21(6):466–9.

106. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Aug;13(8):965–74.
107. Lucas M, Gadola S, Meier U, Young NT, Harcourt G, Karadimitris A, et al. Frequency and Phenotype of Circulating V α 24/V β 11 Double-Positive Natural Killer T Cells during Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* [Internet]. 2003 Feb [cited 2022 Apr 20];77(3):2251–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.77.3.2251-2257.2003>
108. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jun;14(6):641–50.
109. Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C, et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):85–95.
110. Lysák D, Koutová L, Holubová M, Vlas T, Miklíková M, Jindra P. The Quality Control of Mesenchymal Stromal Cells by in Vitro Testing of Their Immunomodulatory Effect on Allogeneic Lymphocytes. *Folia Biol (Praha)*. 2016;62(3):120–30.
111. Lysak D, Vlas T, Holubova M, Miklikova M, Jindra P. In vitro testing of immunosuppressive effects of mesenchymal stromal cells on lymphocytes stimulated with alloantigens. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015 Jun;159(2):215–9.
112. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516–25.
113. Magenau JM, Goldstein SC, Peltier D, Soiffer RJ, Braun T, Pawarode A, et al. α 1-Antitrypsin infusion for treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1372–9.
114. Malard F, Labopin M, Chevallier P, Guillaume T, Duquesne A, Riolland F, et al. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. *Blood* [Internet]. 2016 Apr 7 [cited 2021 Feb 18];127(14):1828–35. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-688739>
115. Marcondes AM, Hockenbery D, Lesnikova M, Dinarello CA, Woolfrey A, Gernsheimer T, et al. Response of Steroid-Refractory Acute GVHD to α 1-Antitrypsin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Sep;22(9):1596–601.
116. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the

- American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Aug;18(8):1150–63.
117. Mavers M, Maas-Bauer K, Negrin RS. Invariant Natural Killer T Cells As Suppressors of Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jul 31 [cited 2020 Dec 6];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5534641/>
 118. McCurdy SR, Luznik L. How we perform haploidentical stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Blood* [Internet]. 2019 Nov 21 [cited 2020 Dec 22];134(21):1802–10. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.2019001323>
 119. Mehta RS, Olson A, Ponce DM, Shpall EJ. Unrelated Donor Cord Blood Transplantation for Hematologic Malignancies. In: *Hematology* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2021 Mar 4]. p. 1633-1649.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323357623001074>
 120. Metelitsa LS. Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans. *Clin Immunol*. 2011 Aug;140(2):119–29.
 121. Meyer EH, Goya S, Akbari O, Berry GJ, Savage PB, Kronenberg M, et al. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2782–7.
 122. Michonneau D, Socié G. GVHD Prophylaxis (Immunosuppression). In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2021 Feb 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554020/>
 123. Miller JP, Perry EH, Price TH, Bolan CD, Karanes C, Boyd TM, et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Sep;14(9 Suppl):29–36.
 124. Monteiro M, Graca L. iNKT cells: innate lymphocytes with a diverse response. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(1):81–90.
 125. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* [Internet]. 2007 Sep [cited 2022 Feb 16];122(1):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265989/>
 126. Motohashi S, Okamoto Y, Yoshino I, Nakayama T. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Immunol*. 2011 Aug;140(2):167–76.
 127. Nagler A, Labopin M, Shimoni A, Niederwieser D, Mufti GJ, Zander AR, et al. Mobilized peripheral blood stem cells compared with bone marrow as the stem cell source for unrelated donor allogeneic transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with acute myeloid leukemia in complete remission: an analysis from the Acute

- Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Sep;18(9):1422–9.
128. Nagler A, Shimoni A. Conditioning. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2022 Mar 29]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553926/>
129. Najera Chuc AE, Cervantes LAM, Retiguin FP, Ojeda JV, Maldonado ER. Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Aug;138(8):1427–32.
130. Nakasone H, Remberger M, Tian L, Brodin P, Sahaf B, Wu F, et al. Risks and benefits of sex-mismatched hematopoietic cell transplantation differ according to conditioning strategy. *Haematologica*. 2015 Nov;100(11):1477–85.
131. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2062–8.
132. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499–506.
133. Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in allergic asthma. *Eur J Immunol*. 2008 Jul;38(7):2034–45.
134. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Nov 17 [cited 2020 Dec 16];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112259/>
135. Olsson R, Remberger M, Schaffer M, Berggren DM, Svahn BM, Mattsson J, et al. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Apr;48(4):537–43.
136. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8407–11.
137. Osada T, Morse MA, Lysterly HK, Clay TM. Ex vivo expanded human CD4+ regulatory NKT cells suppress expansion of tumor antigen-specific CTLs. *Int Immunol*. 2005 Sep;17(9):1143–55.
138. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med* [Internet]. 1939 Aug 1 [cited 2021 Mar 1];13(2):357–67. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-13-2-357>

139. Parody R, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Vázquez MJ, de la Cámara R, et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jul;12(7):734–48.
140. Pasquini MC, Devine S, Mendizabal A, Baden LR, Wingard JR, Lazarus HM, et al. Comparative Outcomes of Donor Graft CD34+ Selection and Immune Suppressive Therapy As Graft-Versus-Host Disease Prophylaxis for Patients With Acute Myeloid Leukemia in Complete Remission Undergoing HLA-Matched Sibling Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Sep 10 [cited 2021 Apr 2];30(26):3194–201. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3434978/>
141. Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, et al. The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Feb 6;
142. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2021 Jul [cited 2022 Mar 19];56(7):1651–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41409-021-01227-8>
143. Passweg JR, Baldomero H, Peters C, Gaspar HB, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic SCT in Europe: Data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2014 Mar 17;49.
144. Patterson S, Chaidos A, Neville DCA, Poggi A, Butters TD, Roberts IAG, et al. Human Invariant NKT Cells Display Alloreactivity Instructed by Invariant TCR-CD1d Interaction and Killer Ig Receptors. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2020 Dec 6];181(5):3268–76. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/181/5/3268>
145. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Diez Campelo M, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1072–6.
146. Perko R, Kang G, Sunkara A, Leung W, Thomas PG, Dallas MH. Gamma delta T cell reconstitution is associated with fewer infections and improved event-free survival after hematopoietic stem cell transplantation for pediatric leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jan;21(1):130–6.
147. Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. *Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning*. *Dan Med Bull*. 2007 May;54(2):112–39.
148. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

- target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008 Feb;251(2):131–6.
149. Rashidi A, DiPersio JF, Sandmaier BM, Colditz GA, Weisdorf DJ. Steroids Versus Steroids Plus Additional Agent in Frontline Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Jun;22(6):1133–7.
 150. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiora D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, et al. Phase III Study Comparing Methotrexate and Tacrolimus (Prograf, FK506) With Methotrexate and Cyclosporine for Graft-Versus-Host Disease Prophylaxis After HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplantation. *Blood* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2021 Jan 2];92(7):2303–14. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.V92.7.2303>
 151. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006 May 27;81(10):1390–7.
 152. Rizk M, Monaghan M, Shorr R, Kekre N, Bredeson CN, Allan DS. Heterogeneity in Studies of Mesenchymal Stromal Cells to Treat or Prevent Graft-versus-Host Disease: A Scoping Review of the Evidence. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(8):1416–23.
 153. Roark JH, Park SH, Jayawardena J, Kavita U, Shannon M, Bendelac A. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3121–7.
 154. Rocha V, Gluckman E. Clinical Use of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2020 Dec 26];12(1, Supplement 1):34–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879105006622>
 155. Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, Bouillie M, Milpied P, Coman T, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* [Internet]. 2012 Sep 6 [cited 2020 Dec 6];120(10):2144–54. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/10/2144/30482/Early-posttransplantation-donor-derived-invariant>
 156. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007 Jul 1;110(1):433–40.
 157. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):168–73.
 158. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2012 Apr 26;119(17):3908–16.

159. Saxon W, Robert A. Good, 81, Founder Of Modern Immunology, Dies. The New York Times [Internet]. 2003 Jun 18 [cited 2021 Feb 22]; Available from: <https://www.nytimes.com/2003/06/18/us/robert-a-good-81-founder-of-modern-immunology-dies.html>
160. van Schaik B, Klarenbeek P, Doorenspleet M, van Kampen A, Moody DB, de Vries N, et al. Discovery of invariant T cells by next-generation sequencing of the human TCR α -chain repertoire. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):5338–44.
161. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 1;25(31):4938–45.
162. Schmid C, de Wreede LC, van Biezen A, Finke J, Ehninger G, Ganser A, et al. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2018 Feb;103(2):237–45.
163. Schmid H, Ribeiro EM, Secker KA, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Dong R, et al. Human invariant natural killer T cells promote tolerance by preferential apoptosis induction of conventional dendritic cells. *Haematologica*. 2022 Feb 1;107(2):427–36.
164. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Löffler H, et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1666–72.
165. Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M, Pan Y, Baker J, Buechele C, et al. CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2014 Nov 20;124(22):3320–8.
166. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3861–8.
167. Shaw BE, Logan BR, Spellman SR, Marsh SGE, Robinson J, Pidala J, et al. Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 May;24(5):1049–56.
168. Slavin S, Reitz B, Bieber CP, Kaplan HS, Strober S. Transplantation tolerance in adult rats using total lymphoid irradiation: permanent survival of skin, heart, and marrow allografts. *J Exp Med*. 1978 Mar 1;147(3):700–7.
169. Snowden JA, Badoglio M, Labopin M, Giebel S, McGrath E, Marjanovic Z, et al. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Advances* [Internet]. 2017 Dec 20 [cited 2021 Mar 1];1(27):2742–55. Available from: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017010041>
170. Socié G, Stone JV, Wingard JR, Weisdorf D, Henslee-Downey PJ, Bredeson C, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. *Late*

- Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med*. 1999 Jul 1;341(1):14–21.
171. Soiffer RJ, Kim HT, McGuirk J, Horwitz ME, Johnston L, Patnaik MM, et al. Prospective, Randomized, Double-Blind, Phase III Clinical Trial of Anti-T-Lymphocyte Globulin to Assess Impact on Chronic Graft-Versus-Host Disease-Free Survival in Patients Undergoing HLA-Matched Unrelated Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017 Dec 20;35(36):4003–11.
 172. Song L, Asgharzadeh S, Salo J, Engell K, Wu H wei, Sposto R, et al. V α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2022 Jan 29];119(6):1524–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689106/>
 173. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, Terpos E, Melo V, Reid A, et al. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood* [Internet]. 2009 Mar 12 [cited 2022 May 5];113(11):2498–507. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-161281>
 174. Spierings E, Fleischhauer K. Histocompatibility. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2022 Feb 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553927/>
 175. Styczynski J, Tridello G, Koster L, Iacobelli S, Biezen A, Werf S, et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplantation*. 2020 Jan 1;55:1–11.
 176. Switzer GE, Bruce JG, Harrington D, Haagenson M, Drexler R, Foley A, et al. Health-related quality of life of bone marrow versus peripheral blood stem cell donors: a prespecified subgroup analysis from a phase III RCT-BMTCTN protocol 0201. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Jan;20(1):118–27.
 177. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, et al. Increased intratumor V α 24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7322–7.
 178. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):11–6.
 179. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1977 Apr;49(4):511–33.
 180. Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N Engl J Med*. 1979 Sep 13;301(11):597–9.
 181. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491–6.

182. Tian G, Courtney AN, Jena B, Heczey A, Liu D, Marinova E, et al. CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Jun 1;126(6):2341–55. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI83476>
183. Törlén J, Ringdén O, Garming-Legert K, Ljungman P, Winiarski J, Remes K, et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine/methotrexate and tacrolimus/sirolimus as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2016 Nov;101(11):1417–25.
184. Ullah MA, Hill GR, Tey SK. Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2021 Mar 25];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831973/>
185. Vallera DA, Taylor PA, Sprent J, Blazar BR. The role of host T cell subsets in bone marrow rejection directed to isolated major histocompatibility complex class I versus class II differences of bm1 and bm12 mutant mice. *Transplantation*. 1994 Jan;57(2):249–56.
186. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):354–64.
187. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, Unrelated Donor Marrow Transplantation Trial. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet*. 2005a Sep 27;366(9487):733–41.
188. Wagner JohnE, Steinbuch M, Kernan NancyA, Broxmayer HaleE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *The Lancet* [Internet]. 1995 Jul 22 [cited 2021 Mar 8];346(8969):214–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673695912681>
189. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005b Nov;33(11):1402–16.
190. Wang Y, Wu DP, Liu QF, Xu LP, Liu KY, Zhang XH, et al. Donor and recipient age, gender and ABO incompatibility regardless of donor source: validated criteria for donor selection for haematopoietic transplants. *Leukemia*. 2018 Feb;32(2):492–8.
191. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2021 Mar 4];25(1):139–70. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606>
192. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Dec;45(12):1732–40.
193. Williams L, Cirrone F, Cole K, Abdul-Hay M, Luznik L, Al-Homsi AS. Post-transplantation Cyclophosphamide: From HLA-Haploidentical to Matched-Related and

- Matched-Unrelated Donor Blood and Marrow Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Apr 9 [cited 2022 May 7];11:636. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177152/>
194. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:384.
195. www.MeDitorial.cz. 25 let nepříbuzenského darování krevetvorných buněk [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2019-1-23/25-let-nepribuzenskeho-darovani-krvetvornych-bunek-112724>
196. Ye Z, Liu J, Zheng J, Zhang J, Huang R. L-selectin Promotes the Maturation of Dendritic Cells via Up-regulation the Expression of TLR4 in vitro. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2017 Jan 8 [cited 2022 Jan 26];47(4):389–94. Available from: <http://www.annclinlabsci.org/content/47/4/389>
197. Yuling H, Ruijing X, Li L, Xiang J, Rui Z, Yujuan W, et al. EBV-induced human CD8+ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV-associated malignancies. *Cancer Res*. 2009 Oct 15;69(20):7935–44.
198. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. 2017 Nov 30;377(22):2167–79.
199. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2062–8.
200. Zeng SG, Ghnewa YG, O'Reilly VP, Lyons VG, Atzberger A, Hogan AE, et al. Human Invariant NKT Cell Subsets Differentially Promote Differentiation, Antibody Production, and T Cell Stimulation by B Cells In Vitro. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2022 Feb 19];191(4):1666–76. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/191/4/1666>

9. PODĚKOVÁNÍ

Za vedení disertační práce a za odborné vedení při práci v laboratoři morfologie a průtokové cytometrie na Hematologicko-onkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni děkuji svému školiteli doc. MUDr. Danielu Lysákovi, PhD a své konzultantce Mgr. Monice Holubové, PhD. Za pomoc se statistickým zpracováním výsledků děkuji Mgr. Martinovi Lebovi ze Západočeské univerzity v Plzni, Fakulta aplikovaných věd. Zároveň děkuji všem ostatním kolegům z Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, dárcům imunokompetentních buněk i pacientům, kteří souhlasili s účastí ve studii, díky nimž mohla být práce realizována.

Dílní práce vedoucí k sepsání této disertace byly finančně podpořeny grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň – FNPl, 00669806).

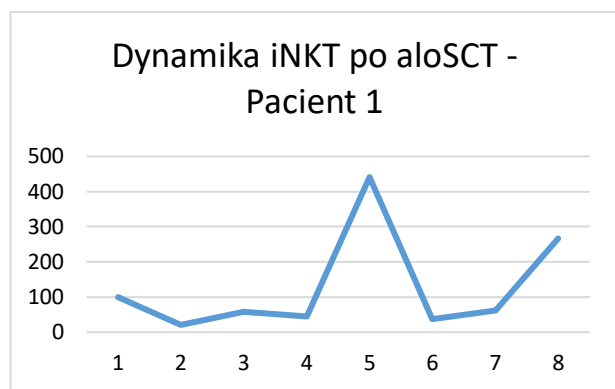
Přílohy:

Příloha 1 – Dynamika rekonstituce invariantních NKT lymfocytů po aloHSCT – grafické zobrazení pro jednotlivé pacienty a primární data.....	82
Příloha 2 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – primární data.....	93
Příloha 3 – Exprese CD62L na iNKT po aloHSCT – primární data.....	100
Příloha 4 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech v čase, primární data...	108
Příloha 5 – Porovnání imunofenotypu šarží LP MSC – primární data.....	113

Příloha 1 – Dynamika rekonstituce invariantních NKT lymfocytů po aloHSCT – grafické zobrazení pro jednotlivé pacienty a primární data

Tabulka P1.1 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 1

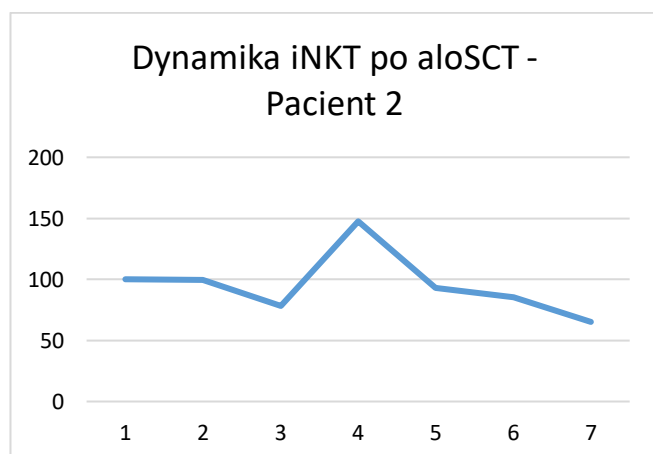
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	03.12.2019	29,00	1,42	0,41	100	412
2	23.12.2019	57,00	0,15	0,09	21	86
3	14.01.2020	247,00	0,10	0,24	59	242
4	30.01.2020	331,00	0,06	0,19	45	185
5	13.02.2020	454,00	0,40	1,82	441	1816
6	03.03.2020	680,00	0,02	0,16	38	156
7	26.03.2020	1027,00	0,03	0,26	62	257
8	30.04.2020	1249,00	0,09	1,10	267	1099



Obrázek P1.1 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 1

Tabulka P1.2 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 2

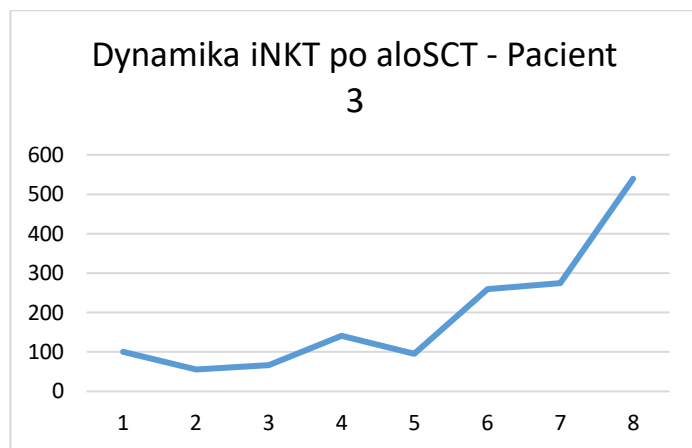
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	15.01.2020	608,00	0,03	0,19	100	188
2	05.02.2020	551,00	0,03	0,19	99	187
3	19.02.2020	736,00	0,02	0,15	78	147
4	04.03.2020	632,00	0,04	0,28	148	278
5	18.03.2020	700,00	0,03	0,18	93	175
6	22.04.2020	849,00	0,02	0,16	86	161
7	27.05.2020	1024,00	0,01	0,12	65	123



Obrázek P1.2 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 2

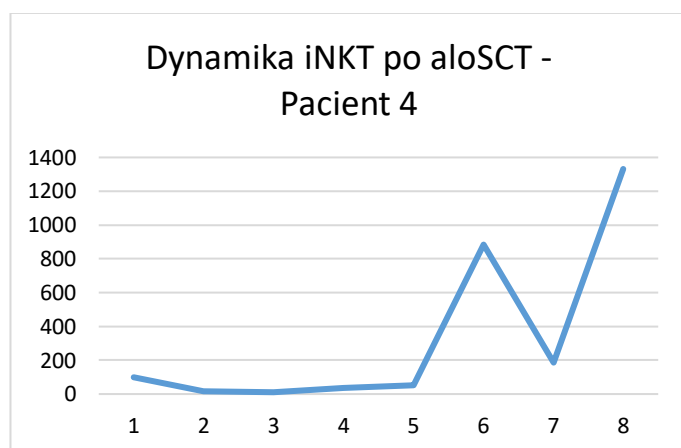
Tabulka P1.3 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 3

Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	19.12.2019	36,00	0,13	0,05	100	47
2	23.01.2020	26,00	0,10	0,03	56	26
3	06.02.2020	69,00	0,05	0,03	66	31
4	18.02.2020	195,00	0,03	0,07	142	66
5	03.03.2020	127,00	0,04	0,04	95	44
6	24.03.2020	468,00	0,03	0,12	260	122
7	16.04.2020	176,00	0,07	0,13	275	128
8	22.05.2020	647,00	0,04	0,25	539	252



Obrázek P1.3 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 3
 Tabulka P1.4 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 4

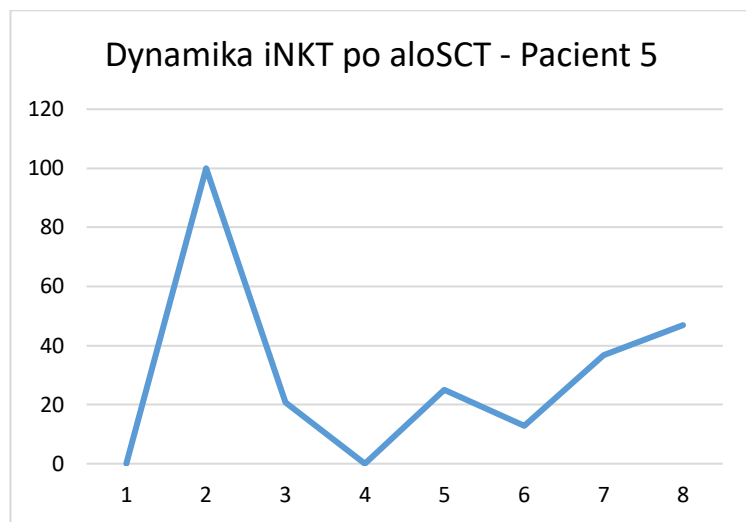
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	20.01.2020	60,00	0,10	0,06	100	60
2	20.02.2020	51,00	0,02	0,01	18	11
3	05.03.2020	24,00	0,03	0,01	11	6
4	19.03.2020	190,00	0,01	0,02	35	21
5	30.03.2020	226,00	0,01	0,03	53	32
6	20.04.2020	553,00	0,10	0,53	885	531
7	19.05.2020	658,00	0,02	0,11	186	112
8	30.06.2020	799,00	0,10	0,80	1332	799



Obrázek P1.4 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 4

Tabulka P1.5 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 5

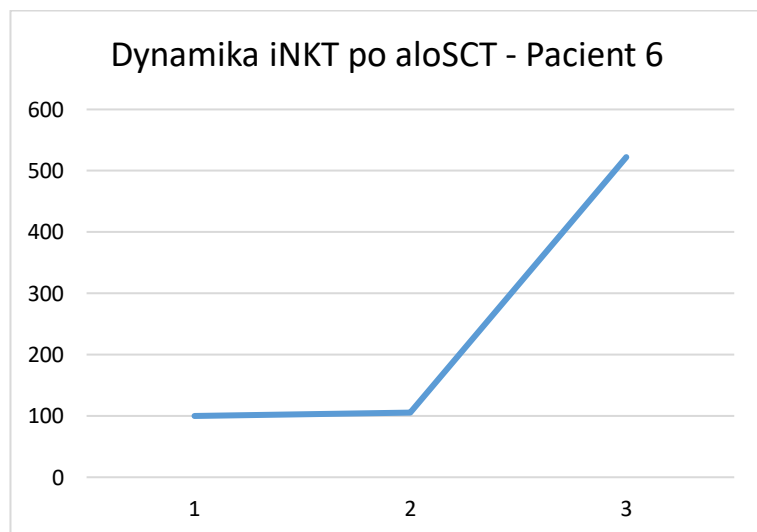
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	20.01.2020	100,00	0,00	0,00	0	0
2	19.02.2020	55,00	0,28	0,15	100	154
3	04.03.2020	200,00	0,02	0,03	21	32
4	18.03.2020	200,00	0,00	0,00	0	0
5	02.04.2020	63,00	0,06	0,04	25	38
6	16.04.2020	86,00	0,02	0,02	13	20
7	22.05.2020	68,00	0,08	0,06	37	56
8	15.06.2020	103,00	0,07	0,07	47	72



Obrázek P1.5 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 5

Tabulka P1.6 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 6

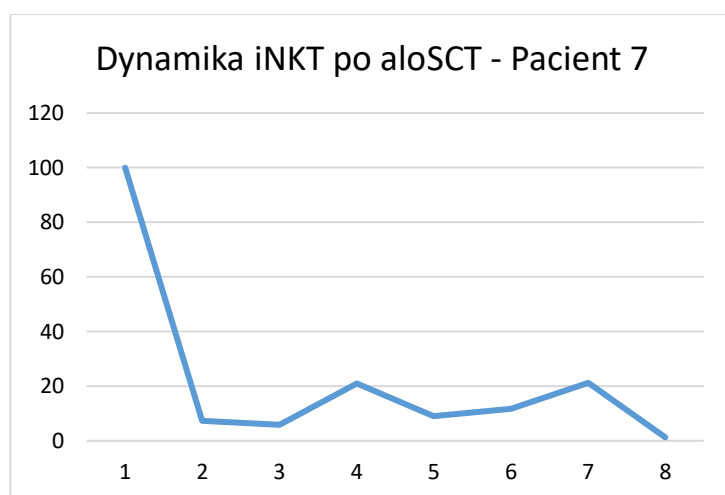
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	03.02.2020	45,00	0,24	0,11	100	108
2	16.03.2020	117,00	0,10	0,11	105	113
3	27.03.2020	470,00	0,12	0,56	522	564



Obrázek P1.6 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 6

Tabulka P1.7 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 7

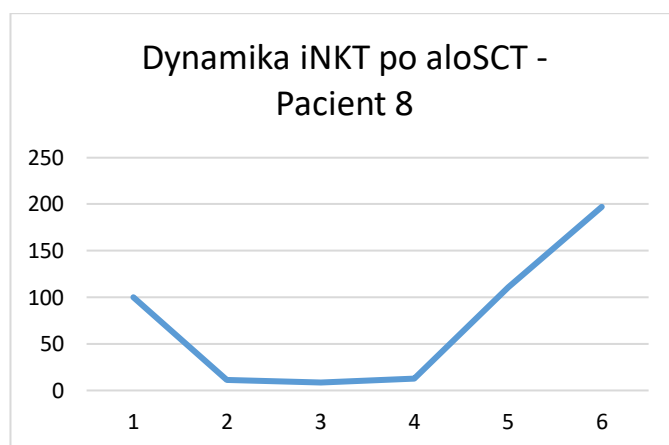
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	13.02.2020	232,00	1,20	2,78	100	2784
2	19.03.2020	84,00	0,24	0,20	7	202
3	27.03.2020	74,00	0,22	0,16	6	163
4	14.04.2020	101,00	0,58	0,59	21	586
5	27.04.2020	169,00	0,15	0,25	9	254
6	13.05.2020	173,00	0,19	0,33	12	329
7	22.06.2020	245,00	0,24	0,59	21	588
8	20.08.2020	36,00	0,10	0,04	1	36



Obrázek P1.7 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 7

Tabulka P1.8 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 8

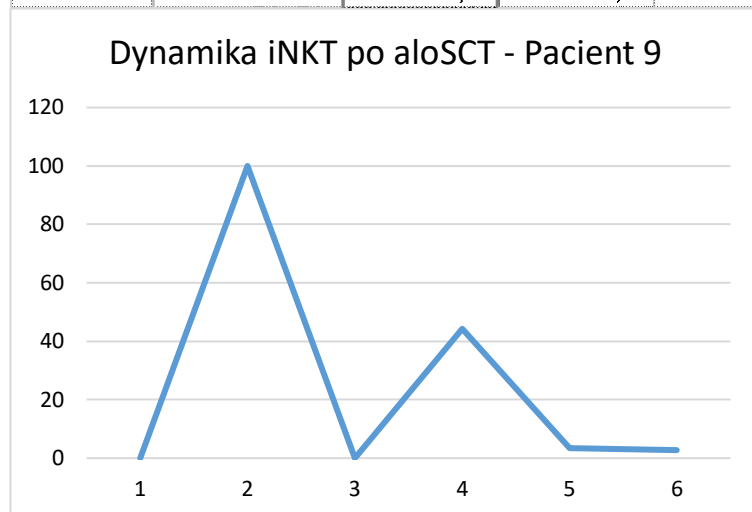
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	03.03.2020	253,00	0,23	0,58	100	582
2	26.03.2020	236,00	0,03	0,06	11	64
3	23.04.2020	226,00	0,02	0,05	9	50
4	26.05.2020	194,00	0,04	0,08	13	76
5	01.07.2020	874,00	0,07	0,65	111	647
6	06.08.2020	765,00	0,15	1,15	197	1148



Obrázek P1.8 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 8

Tabulka P1.9 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – Pacient 9

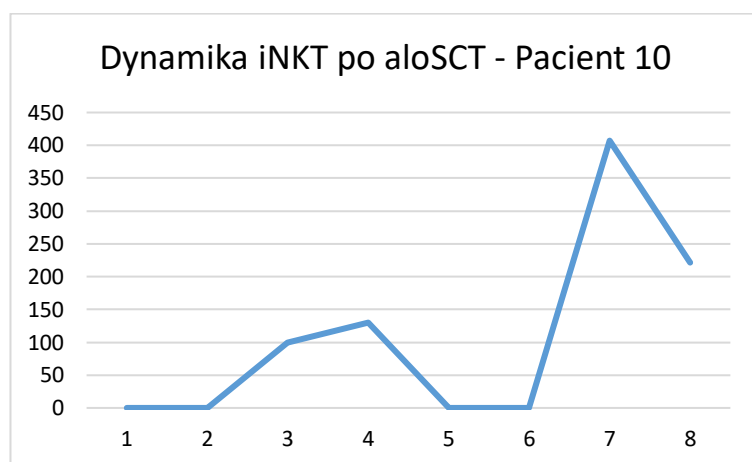
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	04.03.2020	70,00	0,00	0,00	0	1
2	01.04.2020	413,00	0,23	0,95	100	950
3	15.04.2020	273,00	0,00	0,00	0	0
4	06.05.2020	56,00	0,75	0,42	44	420
5	22.05.2020	98,00	0,03	0,03	3	32
6	04.06.2020	78,00	0,03	0,03	3	26



Obrázek P1.9 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 9

Tabulka P1.10 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 10

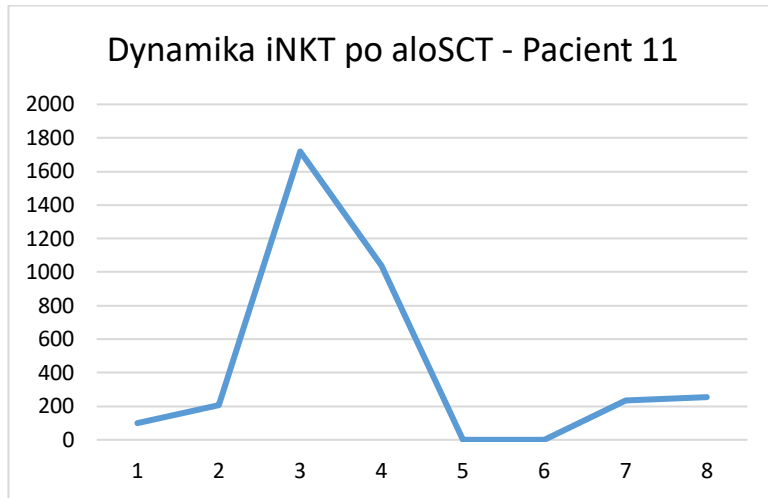
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	18.03.2020	88,00	0,00	0,00	0	1
2	15.04.2020	325,00	0,00	0,00	0	0
3	04.05.2020	359,00	0,05	0,18	100	176
4	18.05.2020	245,00	0,09	0,23	130	228
5	01.06.2020	285,00	0,00	0,00	0	0
6	15.06.2020	388,00	0,00	0,00	0	0
7	15.07.2020	551,00	0,13	0,72	407	716
8	24.08.2020	904,00	0,04	0,39	221	389



Obrázek P1.10 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 10

Tabulka P1.11 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 11

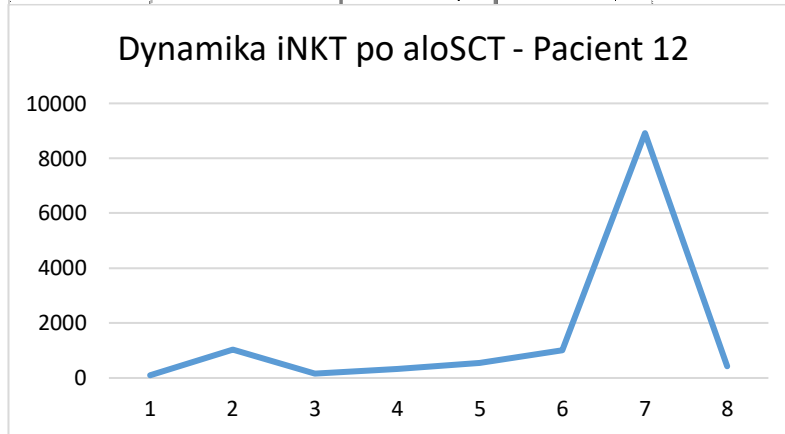
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	12.03.2020	206,00	0,14	0,29	100	288
2	16.04.2020	1294,00	0,05	0,60	206	595
3	28.04.2020	1907,00	0,26	4,96	1719	4958
4	12.05.2020	1196,00	0,25	2,99	1037	2990
5	01.06.2020	33,00	0,00	0,00	0	0
6	11.06.2020	768,00	0,00	0,00	0	0
7	21.07.2020	2104,00	0,03	0,67	233	673
8	10.08.2020	1464,00	0,05	0,73	254	732



Obrázek P1.11 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 11

Tabulka P1.12 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 12

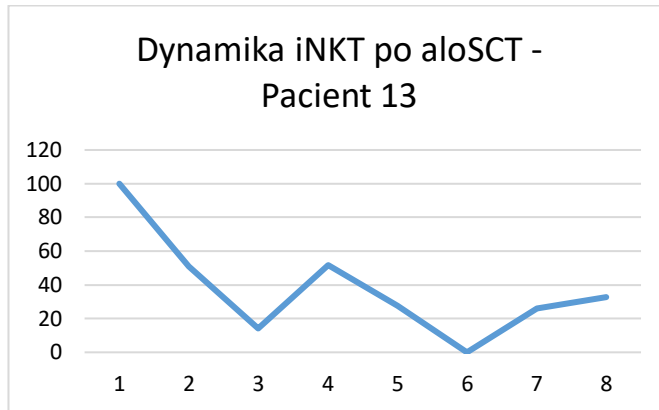
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	26.03.2020	93,00	0,07	0,07	100	65
2	28.04.2020	970,00	0,07	0,68	1043	679
3	19.05.2020	711,00	0,02	0,11	164	107
4	28.05.2020	874,00	0,02	0,21	322	210
5	11.06.2020	1085,00	0,03	0,36	550	358
6	25.06.2020	2077,00	0,03	0,66	1021	665
7	28.07.2020	2764,00	0,21	5,80	8916	5804
8	25.08.2020	1159,00	0,02	0,28	427	278



Obrázek P1.12 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 12

Tabulka P1.13 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 13

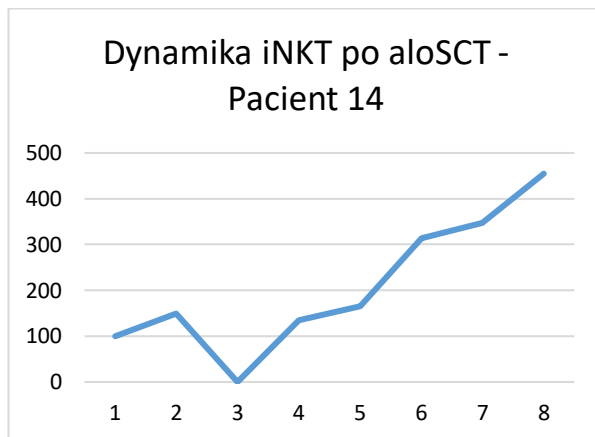
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	09.04.2020	718,00	0,20	1,44	100	1436
2	13.05.2020	870,00	0,08	0,73	51	731
3	27.05.2020	539,00	0,04	0,20	14	205
4	08.06.2020	1091,00	0,07	0,74	52	742
5	22.06.2020	444,00	0,09	0,40	28	395
6	14.07.2020	615,00	0,00	0,00	0	0
7	10.08.2020	476,00	0,08	0,38	26	376
8	07.09.2020	539,00	0,09	0,47	33	469



Obrázek P1.13 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 13

Tabulka P1.14 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 14

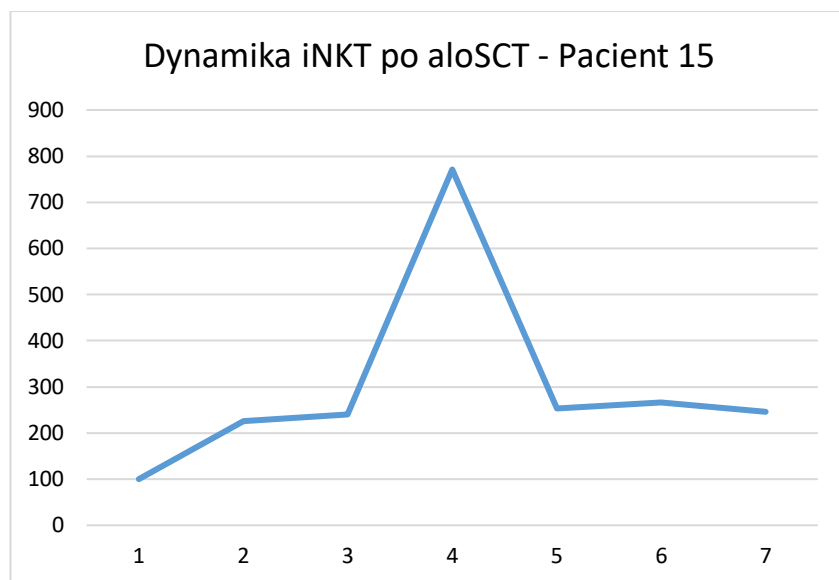
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	27.04.2020	349,00	0,05	0,17	100	171
2	25.05.2020	1160,00	0,02	0,26	149	255
3	08.06.2020	1104,00	0,00	0,00	0	0
4	17.06.2020	1045,00	0,02	0,23	134	230
5	13.07.2020	834,00	0,03	0,28	166	284
6	10.08.2020	814,00	0,07	0,54	314	537
7	31.08.2020	873,00	0,07	0,59	347	594
8	21.09.2020	894,00	0,09	0,78	455	778



Obrázek P1.14 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 14

Tabulka P1.15 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 15

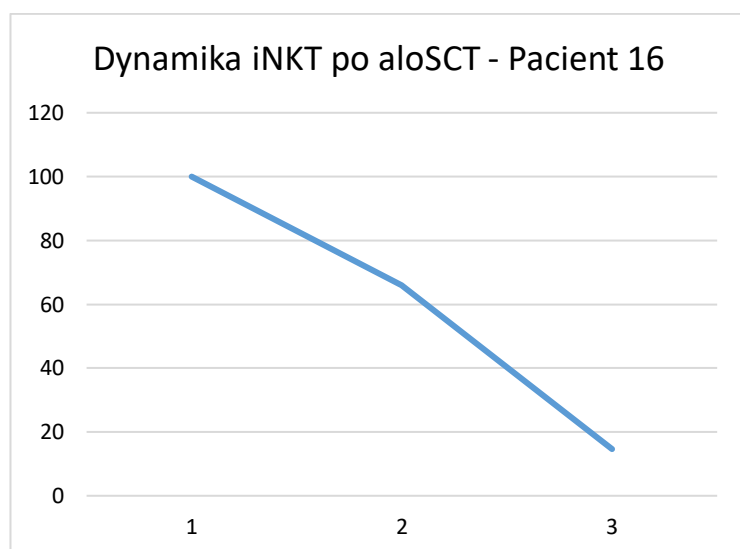
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	04.06.2020	515,00	0,01	0,07	100	67
2	02.07.2020	314,00	0,05	0,15	225	151
3	11.08.2020	701,00	0,02	0,16	241	161
4	25.08.2020	727,00	0,07	0,52	771	516
5	08.09.2020	999,00	0,02	0,17	254	170
6	22.10.2020	1623,00	0,01	0,18	267	179
7	05.11.2020	1497,00	0,01	0,16	246	165



Obrázek P1.15 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 15

Tabulka P1.16 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 16

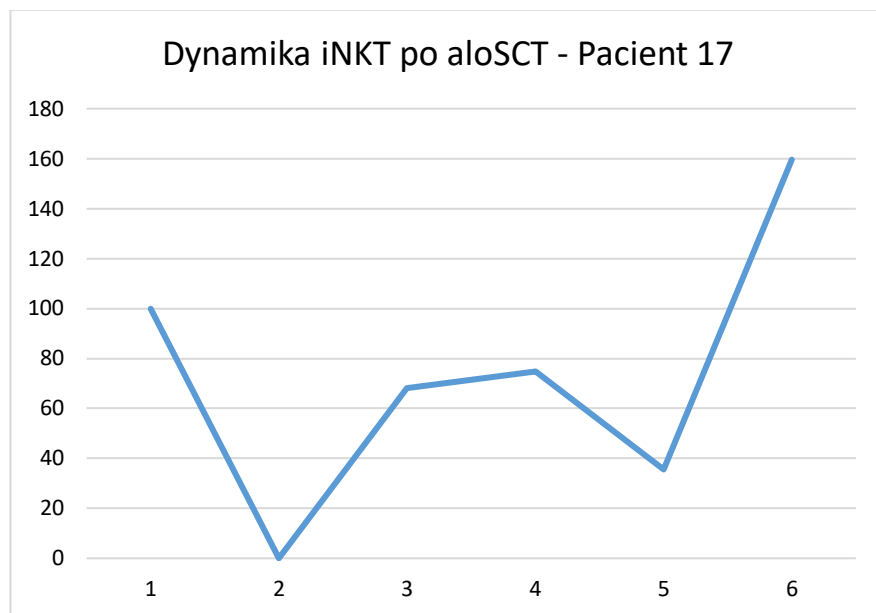
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	09.06.2020	105,00	1,23	1,29	100	1292
2	13.07.2020	112,00	0,76	0,85	66	851
3	28.07.2020	42,00	0,45	0,19	15	189



Obrázek P1.16 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 16

Tabulka P1.17 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 17

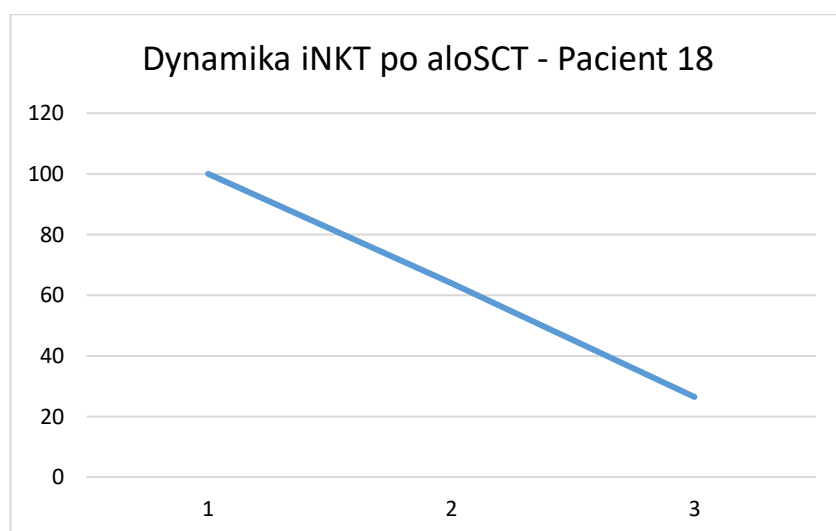
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	24.06.2020	344,00	0,18	0,62	100	619
2	15.07.2020	101,00	0,00	0,00	0	0
3	05.08.2020	103,00	0,41	0,42	68	422
4	12.08.2020	289,00	0,16	0,46	75	462
5	01.09.2020	122,00	0,18	0,22	35	220
6	21.09.2020	366,00	0,27	0,99	160	988



Obrázek P1.17 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 17

Tabulka P1.18 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 18

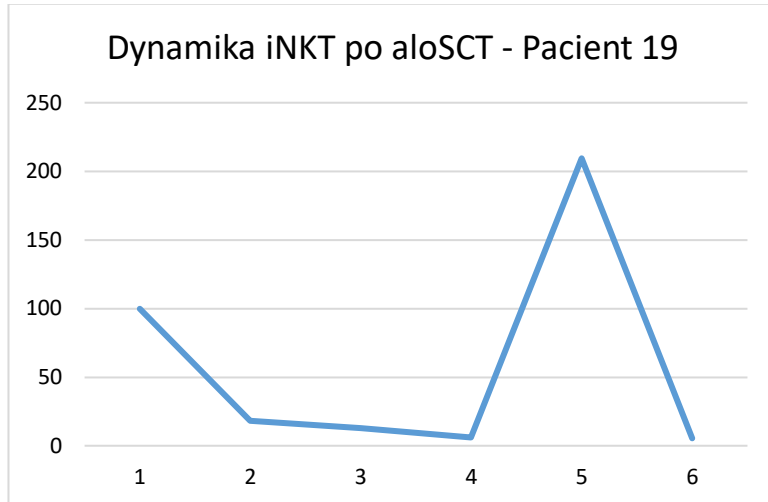
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	26.06.2020	241,00	0,11	0,27	100	265
2	29.07.2020	141,00	0,12	0,17	64	169
3	04.08.2020	123,00	0,06	0,07	26	70



Obrázek P1.18 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 18

Tabulka P1.19 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 19

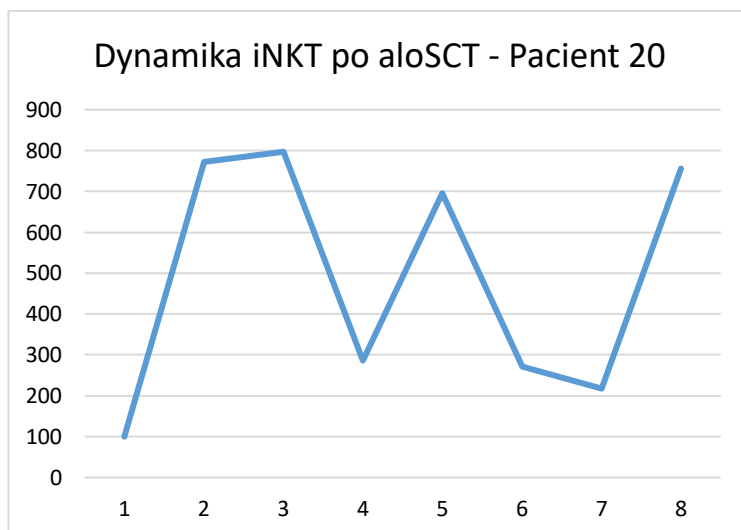
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	01.07.2020	5426,00	0,12	6,51	100	6511
2	16.07.2020	3650,00	0,03	1,17	18	1168
3	13.08.2020	2928,00	0,03	0,85	13	849
4	07.10.2020	1095,00	0,04	0,41	6	405
5	21.10.2020	1768,00	0,05	0,85	209	849
6	18.11.2020	1301,00	0,03	0,35	5	351



Obrázek P1.19 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 19

Tabulka P1.20 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 20

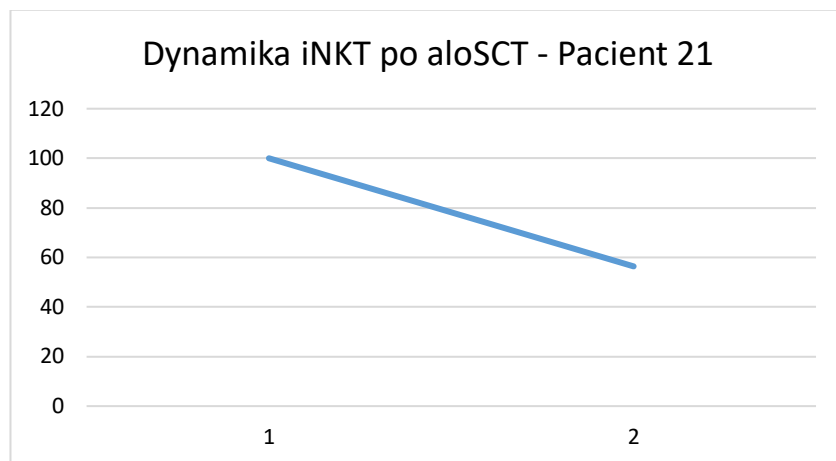
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	15.07.2020	160,00	0,04	0,06	100	56
2	05.08.2020	627,00	0,07	0,43	773	433
3	19.08.2020	480,00	0,09	0,45	797	446
4	23.09.2020	341,00	0,05	0,16	286	160
5	30.09.2020	458,00	0,09	0,39	695	389
6	07.10.2020	310,00	0,05	0,15	271	152
7	16.11.2020	939,00	0,01	0,12	218	122
8	30.11.2020	2016,00	0,02	0,42	756	423



Obrázek P1.20 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 20

Tabulka P1.21 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 21

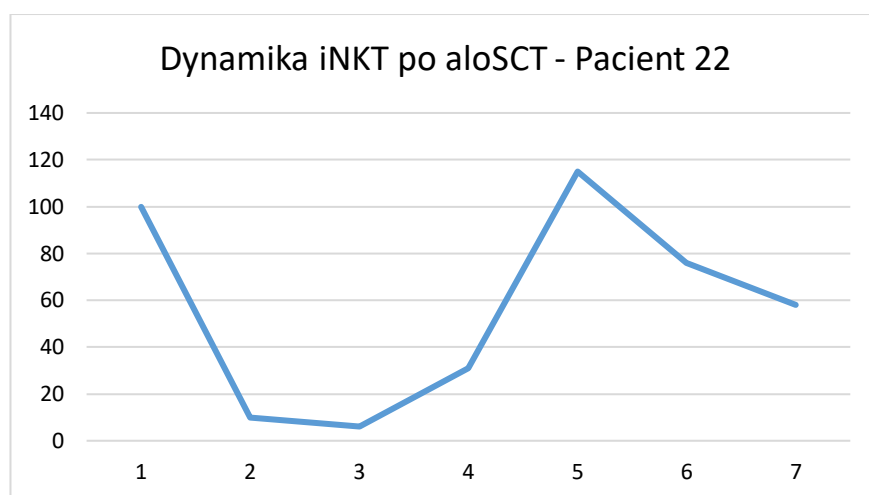
Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	29.07.2020	37,00	0,64	0,24	100	237
2	12.08.2020	150,00	0,09	0,13	56	134



Obrázek P1.21 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 21

Tabulka P1.22 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 22

Timepoint	Datum	CD3+ (uL)	procento iNKT	iNKT (uL)	STANDARDIZACE	iNKT/ml
1	06.08.2020	108,00	0,23	0,25	100	248
2	20.08.2020	95,00	0,03	0,02	10	25
3	03.09.2020	58,00	0,03	0,02	6	15
4	16.09.2020	48,00	0,16	0,08	31	77
5	07.10.2020	56,00	0,51	0,29	115	286
6	14.10.2020	54,00	0,35	0,19	76	189
7	25.11.2020	60,00	0,24	0,14	58	144



Obrázek P1.22 – rekonstituce iNKT po aloHSCT – pacient 22

Příloha 2 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – primární data

Tabulka P2.1 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 1

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	03.12.2019	75,0	10,7	14,3
2	23.12.2019	61,4	22,7	13,6
3	14.01.2020	83,2	9,2	6,1
4	30.01.2020	76,4	18,7	4,9
5	13.02.2020	59,9	5,7	34,3
6	03.03.2020	66,1	31,2	1,8
7	26.03.2020	80,0	20,0	0,0
8	30.04.2020	37,1	14,5	48,4
Medián hodnot		70,6	16,6	9,9
MIN		37,1	5,7	0,0
MAX		83,2	31,2	48,4

Pozn. – data jsou prezentována jako % z celkového počtu iNKT

Tabulka P2.2 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 2

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	15.01.2020	75,6	19,2	1,3
2	05.02.2020	80,0	0,0	20,0
3	19.02.2020	72,0	14,0	14,0
4	04.03.2020	0,0	0,0	100,0
5	18.03.2020	54,5	27,3	18,2
6	22.04.2020	76,5	18,5	2,5
7	27.05.2020	50,0	0,0	50,0
Medián hodnot		72,0	14,0	18,2
MIN		0,0	0,0	1,3
MAX		80,0	27,3	100,0

Tabulka P2.3 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 3

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	19.12.2019	45,5	9,1	45,5
2	23.01.2020	84,6	0,0	15,4
3	06.02.2020	100,0	0,0	0,0
4	18.02.2020	81,0	0,0	19,0
5	03.03.2020	94,3	0,0	5,7
6	24.03.2020	96,0	0,0	4,0
7	16.04.2020	81,2	12,5	6,3
8	22.05.2020	61,8	0,0	38,2
Medián hodnot		82,9	0,0	10,8
MIN		45,5	0,0	0,0
MAX		100,0	12,5	45,5

Tabulka P2.4 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 3

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	20.01.2020	0,0	100,0	0,0
2	20.02.2020	25,0	50,0	25,0
3	05.03.2020	14,3	85,7	0,0
4	19.03.2020	0,0	0,0	0,0
5	30.03.2020	41,2	64,7	0,0
6	20.04.2020	79,6	19,8	0,3
7	19.05.2020	66,7	33,3	0,0
8	30.06.2020	73,2	25,1	1,5
Medián hodnot		33,1	41,7	0,0
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		79,6	100,0	25,0

Tabulka P2.5 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 5

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	20.01.2020	0,0	0,0	0,0
2	19.02.2020	52,6	45,6	1,8
3	04.03.2020	0,0	37,5	62,5
4	18.03.2020	0,0	0,0	0,0
5	02.04.2020	30,4	43,5	21,7
6	16.04.2020	25,0	50,0	16,7
7	22.05.2020	15,2	42,4	36,4
8	15.06.2020	20,0	43,3	33,3
Medián hodnot		17,6	42,9	19,2
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		52,6	50,0	62,5

Tabulka P2.6 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 6

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	03.02.2020	0,0	26,7	53,3
2	16.03.2020	9,7	3,2	87,1
3	27.03.2020	0,7	0,4	98,9
Medián hodnot		0,7	3,2	87,1
MIN		0,0	0,4	53,3
MAX		9,7	26,7	98,9

Tabulka P2.7 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 7

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	13.02.2020	18,8	16,1	65,1
2	19.03.2020	35,0	14,6	49,5
3	27.03.2020	64,6	2,1	17,7
4	14.04.2020	36,8	19,4	42,6
5	27.04.2020	23,8	25,4	50,8
6	13.05.2020	23,3	34,7	42,1
7	22.06.2020	42,1	30,3	27,3
8	20.08.2020	39,1	13,0	47,8
Medián hodnot		35,9	17,8	45,2
MIN		18,8	2,1	17,7
MAX		64,6	34,7	65,1

Tabulka P2.8 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 8

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	03.03.2020	73,6	15,5	10,0
2	26.03.2020	66,7	33,3	0,0
3	23.04.2020	66,7	16,7	16,7
4	26.05.2020	100,0	0,0	0,0
5	01.07.2020	73,7	2,7	23,6
6	06.08.2020	55,8	4,9	39,1
Medián hodnot		70,2	10,2	13,4
MIN		55,8	0,0	0,0
MAX		100,0	33,3	39,1

Tabulka P2.9 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 9

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	04.03.2020	0,0	0,0	0,0
2	01.04.2020	33,9	6,6	59,5
3	15.04.2020	0,0	0,0	0,0
4	06.05.2020	45,5	20,8	32,5
5	22.05.2020	100,0	0,0	0,0
6	04.06.2020	26,3	26,3	47,4
Medián hodnot		30,1	3,3	16,3
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		100,0	26,3	59,5

Tabulka P2.10 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 10

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	18.03.2020	0,0	0,0	0,0
2	15.04.2020	0,0	0,0	0,0
3	04.05.2020	67,5	23,1	7,7
4	18.05.2020	52,1	33,1	11,3
5	01.06.2020	0,0	0,0	0,0
6	15.06.2020	31,9	45,1	20,9
7	15.07.2020	64,7	35,3	0,0
8	24.08.2020	51,6	38,6	5,2
Medián hodnot		41,8	28,1	2,6
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		67,5	45,1	20,9

Tabulka P2.11 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 11

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	12.03.2020	40,0	16,7	43,3
2	16.04.2020	66,7	3,3	30,0
3	28.04.2020	84,0	12,8	3,2
4	12.05.2020	74,0	14,8	11,2
5	01.06.2020	0,0	0,0	0,0
6	11.06.2020	0,0	0,0	0,0
7	21.07.2020	90,8	4,6	4,6
8	10.08.2020	83,5	8,9	7,0
Medián hodnot		70,4	6,8	5,8
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		90,8	16,7	43,3

Tabulka P2.12 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 12

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	26.03.2020	0,0	0,0	0,0
2	28.04.2020	85,3	4,4	10,3
3	19.05.2020	100,0	0,0	0,0
4	28.05.2020	67,1	8,2	23,5
5	11.06.2020	62,5	25,0	12,5
6	25.06.2020	87,7	7,5	4,8
7	28.07.2020	89,7	8,6	0,9
8	25.08.2020	90,0	10,0	0,0
Medián hodnot		86,5	7,9	2,8
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		100,0	25,0	23,5

Tabulka P2.13 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 13

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	09.04.2020	33,0	4,6	61,9
2	13.05.2020	44,0	8,0	48,0
3	27.05.2020	0,0	0,0	100,0
4	08.06.2020	32,7	7,5	59,5
5	22.06.2020	38,2	6,0	55,2
6	14.07.2020	0,0	0,0	0,0
7	10.08.2020	45,3	7,1	46,3
8	07.09.2020	44,7	12,1	42,1
Medián hodnot		35,6	6,6	51,6
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		45,3	12,1	100,0

Tabulka P2.14 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 14

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	27.04.2020	20,9	16,4	62,7
2	25.05.2020	67,9	14,9	17,2
3	08.06.2020	0,0	0,0	0,0
4	17.06.2020	44,6	14,5	41,0
5	13.07.2020	53,8	0,0	38,5
6	10.08.2020	64,9	21,3	12,9
7	31.08.2020	56,1	22,5	20,6
8	21.09.2020	57,5	19,2	21,4
Medián hodnot		55,0	15,7	21,0
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		67,9	22,5	62,7

Tabulka P2.15 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 15

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	04.06.2020	38,5	15,4	46,2
2	02.07.2020	50,0	0,0	50,0
3	11.08.2020	57,1	23,8	19,0
4	25.08.2020	69,6	7,1	23,2
5	08.09.2020	71,4	14,3	14,3
6	22.10.2020	79,5	13,3	7,2
7	05.11.2020	75,0	12,5	11,1
Medián hodnot		69,6	13,3	19,0
MIN		38,5	0,0	7,2
MAX		79,5	23,8	50,0

Tabulka P2.16 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 16

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	09.06.2020	39,3	3,1	57,1
2	13.07.2020	44,9	6,3	48,0
3	28.07.2020	42,9	10,5	45,9
Medián hodnot		42,9	6,3	48,0
MIN		39,3	3,1	45,9
MAX		44,9	10,5	57,1

Tabulka P2.17 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 17

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	24.06.2020	28,1	1,1	70,8
2	15.07.2020	0,0	0,0	0,0
3	05.08.2020	35,3	0,0	64,7
4	12.08.2020	60,0	0,0	33,3
5	01.09.2020	37,5	0,0	61,3
6	21.09.2020	69,3	2,9	27,7
Medián hodnot		36,4	0,0	47,3
MIN		0,0	0,0	0,0
MAX		69,3	2,9	70,8

Tabulka P2.18 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 18

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	26.06.2020	79,8	18,0	2,3
2	29.07.2020	75,0	17,0	8,0
3	04.08.2020	77,1	17,1	5,7
Medián hodnot		77,1	17,1	5,7
MIN		75,0	17,0	2,3
MAX		79,8	18,0	8,0

Tabulka P2.19 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 19

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	01.07.2020	93,0	0,0	7,0
2	16.07.2020	97,3	0,0	2,7
3	13.08.2020	86,7	1,9	11,1
4	07.10.2020	76,8	3,8	19,5
5	21.10.2020	84,5	3,2	11,4
6	18.11.2020	63,4	5,2	30,6
Medián hodnot		85,6	2,5	11,3
MIN		63,4	0,0	2,7
MAX		97,3	5,2	30,6

Tabulka P2.20 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 20

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	15.07.2020	31,4	57,1	8,6
2	05.08.2020	7,1	92,9	0,0
3	19.08.2020	16,9	82,0	0,6
4	23.09.2020	27,3	50,0	22,7
5	30.09.2020	15,5	37,3	47,3
6	07.10.2020	50,0	50,0	0,0
7	16.11.2020	60,5	27,9	9,3
8	30.11.2020	53,8	6,5	39,7
Medián hodnot		29,4	50,0	8,9
MIN		7,1	6,5	0,0
MAX		60,5	92,9	47,3

Tabulka P2.21 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 21

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	29.07.2020	77,8	21,1	1,1
2	12.08.2020	54,5	35,1	9,1
Medián hodnot		66,2	28,1	5,1
MIN		54,5	21,1	1,1
MAX		77,8	35,1	9,1

Tabulka P2.22 – Rozložení subpopulací iNKT po aloHSCT – pacient 22

Timepoint	Datum	CD8+	CD4+	CD4- CD8- (DN)
1	06.08.2020	72,7	20,0	7,3
2	20.08.2020	0,0	0,0	100,0
3	03.09.2020	36,4	27,3	36,4
4	16.09.2020	35,6	4,6	58,6
5	07.10.2020	20,0	20,0	60,0
6	14.10.2020	45,8	38,6	13,3
7	25.11.2020	12,5	33,9	53,6
Medián hodnot		35,6	20,0	53,6
MIN		0,0	0,0	7,3
MAX		72,7	38,6	100,0

Příloha 3 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – primární data

Tabulka P3.1 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 1

Timepoint	Datum	CD62L
1	03.12.2019	3,6
2	23.12.2019	18,2
3	14.01.2020	5,3
4	30.01.2020	13,8
5	13.02.2020	4,1
6	03.03.2020	23,9
7	26.03.2020	10,0
8	30.04.2020	10,5
Medián hodnot		10,3
MIN		3,6
MAX		23,9

Pozn. – data jsou prezentována jako % z celkového počtu iNKT

Tabulka P3.2 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 2

Timepoint	Datum	CD62L
1	15.01.2020	15,4
2	05.02.2020	0,0
3	19.02.2020	8,0
4	04.03.2020	0,0
5	18.03.2020	18,2
6	22.04.2020	16,0
7	27.05.2020	50,0
Medián hodnot		15,4
MIN		0,0
MAX		50,0

Tabulka P3.3 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 3

Timepoint	Datum	CD62L
1	19.12.2019	0,0
2	23.01.2020	0,0
3	06.02.2020	0,0
4	18.02.2020	0,0
5	03.03.2020	0,0
6	24.03.2020	0,0
7	16.04.2020	10,0
8	22.05.2020	0,0
Medián hodnot		0,0
MIN		0,0
MAX		10,0

Tabulka P3.4 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 4

Timepoint	Datum	CD62L
1	20.01.2020	100,0
2	20.02.2020	50,0
3	05.03.2020	85,7
4	19.03.2020	0,0
5	30.03.2020	41,2
6	20.04.2020	16,5
7	19.05.2020	33,3
8	30.06.2020	18,0
Medián hodnot		37,3
MIN		0,0
MAX		100,0

Tabulka P3.5 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 5

Timepoint	Datum	CD62L
1	20.01.2020	0,0
2	19.02.2020	36,8
3	04.03.2020	37,5
4	18.03.2020	0,0
5	02.04.2020	52,2
6	16.04.2020	66,7
7	22.05.2020	42,4
8	15.06.2020	40,0
Medián hodnot		38,8
MIN		0,0
MAX		66,7

Tabulka P3.6 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 6

Timepoint	Datum	CD62L
1	03.02.2020	46,7
2	16.03.2020	0,0
3	27.03.2020	0,4
Medián hodnot		0,4
MIN		0,0
MAX		46,7

Tabulka P3.7 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 7

Timepoint	Datum	CD62L
1	13.02.2020	6,3
2	19.03.2020	12,6
3	27.03.2020	10,4
4	14.04.2020	10,8
5	27.04.2020	13,9
6	13.05.2020	24,3
7	22.06.2020	24,0
8	20.08.2020	8,7
Medián hodnot		11,7
MIN		6,3
MAX		24,3

Tabulka P3.8 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 8

Timepoint	Datum	CD62L
1	03.03.2020	15,5
2	26.03.2020	33,3
3	23.04.2020	16,7
4	26.05.2020	0,0
5	01.07.2020	3,1
6	06.08.2020	5,6
Medián hodnot		10,6
MIN		0,0
MAX		33,3

Tabulka P3.9 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 9

Timepoint	Datum	CD62L
1	04.03.2020	0,0
2	01.04.2020	5,5
3	15.04.2020	0,0
4	06.05.2020	18,2
5	22.05.2020	0,0
6	04.06.2020	26,3
Medián hodnot		2,7
MIN		0,0
MAX		26,3

Tabulka P3.10 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 10

Timepoint	Datum	CD62L
1	18.03.2020	0,0
2	15.04.2020	0,0
3	04.05.2020	21,4
4	18.05.2020	31,0
5	01.06.2020	0,0
6	15.06.2020	33,0
7	15.07.2020	17,6
8	24.08.2020	27,5
Medián hodnot		19,5
MIN		0,0
MAX		33,0

Tabulka P3.11 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 11

Timepoint	Datum	CD62L
1	12.03.2020	8,3
2	16.04.2020	3,3
3	28.04.2020	5,5
4	12.05.2020	6,9
5	01.06.2020	0,0
6	11.06.2020	0,0
7	21.07.2020	2,1
8	10.08.2020	2,7
Medián hodnot		3,0
MIN		0,0
MAX		8,3

Tabulka P3.12 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 12

Timepoint	Datum	CD62L
1	26.03.2020	100,0
2	28.04.2020	2,9
3	19.05.2020	0,0
4	28.05.2020	5,9
5	11.06.2020	25,0
6	25.06.2020	3,1
7	28.07.2020	2,2
8	25.08.2020	0,0
Medián hodnot		3,0
MIN		0,0
MAX		100,0

Tabulka P3.13 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 13

Timepoint	Datum	CD62L
1	09.04.2020	1,7
2	13.05.2020	8,0
3	27.05.2020	0,0
4	08.06.2020	4,8
5	22.06.2020	3,8
6	14.07.2020	0,0
7	10.08.2020	5,0
8	07.09.2020	5,9
Medián hodnot		4,3
MIN		0,0
MAX		8,0

Tabulka P3.14 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 14

Timepoint	Datum	CD62L
1	27.04.2020	11,8
2	25.05.2020	11,2
3	08.06.2020	0,0
4	17.06.2020	8,4
5	13.07.2020	7,7
6	10.08.2020	16,0
7	31.08.2020	17,5
8	21.09.2020	14,9
Medián hodnot		11,5
MIN		0,0
MAX		17,5

Tabulka P3.15 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 15

Timepoint	Datum	CD62L
1	04.06.2020	15,4
2	02.07.2020	0,0
3	11.08.2020	20,6
4	25.08.2020	5,4
5	08.09.2020	0,0
6	22.10.2020	4,8
7	05.11.2020	8,3
Medián hodnot		5,4
MIN		0,0
MAX		20,6

Tabulka P3.16 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 16

Timepoint	Datum	CD62L
1	04.06.2020	15,4
2	02.07.2020	0,0
3	11.08.2020	20,6
4	25.08.2020	5,4
5	08.09.2020	0,0
6	22.10.2020	4,8
7	05.11.2020	8,3
Medián hodnot		5,4
MIN		0,0
MAX		20,6

Tabulka P3.17 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 17

Timepoint	Datum	CD62L
1	24.06.2020	0,0
2	15.07.2020	0,0
3	05.08.2020	0,0
4	12.08.2020	0,0
5	01.09.2020	0,0
6	21.09.2020	0,7
Medián hodnot		0,0
MIN		0,0
MAX		0,7

Tabulka P3.18 – Expresie CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 18

Timepoint	Datum	CD62L
1	26.06.2020	15,7
2	29.07.2020	16,0
3	04.08.2020	14,3
Medián hodnot		15,7
MIN		14,3
MAX		16,0

Tabulka P3.19 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 19

Timepoint	Datum	CD62L
1	01.07.2020	0,1
2	16.07.2020	0,0
3	13.08.2020	1,3
4	07.10.2020	3,4
5	21.10.2020	3,4
6	18.11.2020	3,7
Medián hodnot		2,3
MIN		0,0
MAX		3,7

Tabulka P3.20 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 20

Timepoint	Datum	CD62L
1	15.07.2020	60,0
2	05.08.2020	57,1
3	19.08.2020	59,0
4	23.09.2020	34,1
5	30.09.2020	27,3
6	07.10.2020	25,0
7	16.11.2020	16,3
8	30.11.2020	5,5
Medián hodnot		30,7
MIN		5,5
MAX		60,0

Tabulka P3.21 – Expresse CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 21

Timepoint	Datum	CD62L
1	29.07.2020	22,2
2	12.08.2020	35,1
Medián hodnot		28,7
MIN		22,2
MAX		35,1

Tabulka P3.22 – Exprese CD62L na iNKT po aloHSCT – pacient 22

Timepoint	Datum	CD62L
1	06.08.2020	18,2
2	20.08.2020	0,0
3	03.09.2020	18,2
4	16.09.2020	3,5
5	07.10.2020	0,0
6	14.10.2020	34,9
7	25.11.2020	32,1
Medián hodnot		18,2
MIN		0,0
MAX		34,9

Příloha 4 - Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech v čase – primární data

Tabulka 4.1 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 1

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
03.12.2019	497	412
23.12.2019	212	86
30.01.2020	399	185
13.02.2020	159	1816
03.03.2020	204	156
26.03.2020	162	257
30.04.2020	149	1099

Tabulka 4.2 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 2

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
15.01.2020	315	188
05.02.2020	219	187
19.02.2020	251	147
04.03.2020	317	278
18.03.2020	220	175
22.04.2020	346	161
27.05.2020	255	123

Tabulka 4.3 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech Pacient 3

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
19.12.2019	225	47
23.01.2020	169	26
06.02.2020	227	31
18.02.2020	254	66
03.03.2020	106	44
24.03.2020	208	122
16.04.2020	170	128
22.05.2020	216	252

Tabulka 4.4 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 4

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
20.02.2020	204	11
05.03.2020	171	6
19.03.2020	162	21
30.03.2020	183	32
20.04.2020	268	531
19.05.2020	231	112
30.06.2020	287	799

Tabulka 4.5 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 5

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
20.01.2020	254	0
19.02.2020	170	154
18.03.2020	161	0
02.04.2020	186	38
16.04.2020	167	20
22.05.2020	234	56
15.06.2020	266	72

Tabulka 4.6 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 6

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
03.02.2020	205	108
16.03.2020	262	113
27.03.2020	296	564

Tabulka 4.7 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 7

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
13.02.2020	176	2784
19.03.2020	161	202
27.03.2020	287	163
14.04.2020	200	586
27.04.2020	202	254
13.05.2020	246	329
22.06.2020	203	588

Tabulka 4.8 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 8

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
26.03.2020	204	64
23.04.2020	354	50
26.05.2020	335	76
01.07.2020	396	647
04.03.2020	331	1

Tabulka 4.9 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 9

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
01.04.2020	255	950
15.04.2020	219	0
06.05.2020	170	420
22.05.2020	231	32

Tabulka 4.10 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monoccytech – Pacient 10

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
18.03.2020	185	1
04.05.2020	216	0
18.05.2020	250	176
01.06.2020	198	0
15.06.2020	389	0
15.07.2020	245	716

Tabulka 4.11 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monoccytech – Pacient 11

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
12.03.2020	210	288
16.04.2020	205	595
28.04.2020	243	4958
12.05.2020	283	2990
11.06.2020	268	0
21.07.2020	321	673
10.08.2020	458	732

Tabulka 4.12 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monoccytech – Pacient 12

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
26.03.2020	233	65
28.04.2020	202	679
19.05.2020	267	107
28.05.2020	236	210
11.06.2020	230	358
25.06.2020	451	665
28.07.2020	246	5804

Tabulka 4.13 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monoccytech – Pacient 13

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
09.04.2020	292	1436
13.05.2020	294	731
27.05.2020	292	205
22.06.2020	209	395
14.07.2020	246	0
10.08.2020	468	376

Tabulka 4.14 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 14

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
27.04.2020	225	171
25.05.2020	279	255
17.06.2020	362	230
13.07.2020	288	284
10.08.2020	457	537

Tabulka 4.15 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 15

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
04.06.2020	369	67
02.07.2020	326	151
11.08.2020	397	161
22.10.2020	355	179
05.11.2020	264	165

Tabulka 4.16 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 16

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
09.06.2020	432	1292
13.07.2020	292	851
28.07.2020	80	189

Tabulka 4.17 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 17

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
24.06.2020	446	619
15.07.2020	247	0
05.08.2020	371	422
12.08.2020	305	462

Tabulka 4.18 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 18

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
26.06.2020	286	265
29.07.2020	234	169
04.08.2020	347	70

Tabulka 4.19 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 19

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
01.07.2020	348	6511
16.07.2020	271	1168
07.10.2020	237	405
21.10.2020	357	849
18.11.2020	230	351

Tabulka 4.20 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 20

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
15.07.2020	296	56
05.08.2020	472	433
07.10.2020	348	152
16.11.2020	252	122
30.11.2020	300	423

Tabulka 4.21 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 21

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
29.07.2020	348	237
12.08.2020	338	134

Tabulka 4.22 – Korelace hladiny iNKT a MFI exprese CD1d na monocytech – Pacient 22

Datum	MFI CD1d na mono	iNKT/ml
06.08.2020	420	248
07.10.2020	281	286
14.10.2020	924	189
24.11.2020	292	144

Příloha 5 – Porovnání imunofenotypu šarží LP MSC – primární data

Tabulka P5.1 – Porovnání imunofenotypu – exprese HLA DR

IMUNOFENOTYP MSC - NEGATIVNÍ MARKER HLA-DR							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	0,0	0,6	0,4	B1	0,10	0,20	0,20
A2	0,1	0,2	0,2	B2	0,00	0,90	0,35
A3	0,0	0,4	0,1	B3	0,50	1,60	1,20
A4	0,5	1,6	1,2	B4	0,00	0,00	0,00
A5	0,0	0,1	0,0	B5	0,00	0,30	0,15
A6	0,0	0,0	0,0	B6	0,20	0,40	0,25
A7	0,0	0,3	0,2	B7	0,00	0,61	0,10
A8	0,2	0,4	0,3	B8	0,00	0,10	0,00
A9	0,0	0,6	0,1	B9	0,00	0,10	0,10
A10	0,0	0,1	0,0	B10	0,00	0,00	0,00
A1 - A10	0,00	1,60	0,13	B1 - B10	0,00	1,60	0,13

Tabulka P5.2 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD14

IMUNOFENOTYP MSC - NEGATIVNÍ MARKER CD14							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	0,0	1,7	0,4	B1	0,10	0,80	0,40
A2	0,1	0,8	0,4	B2	0,00	1,70	0,40
A3	0,0	1,5	0,1	B3	0,00	1,00	0,30
A4	0,0	0,7	0,3	B4	0,00	0,20	0,00
A5	0,1	0,7	0,3	B5	0,00	2,00	0,35
A6	0,0	0,2	0,0	B6	0,00	0,40	0,10
A7	0,0	2,0	0,4	B7	0,00	2,80	0,22
A8	0,0	0,4	0,1	B8	0,00	0,40	0,15
A9	0,0	2,8	0,2	B9	0,00	0,00	0,00
A10	0,0	0,4	0,2	B10	0,00	0,10	0,00
A1 - A10	0,00	2,80	0,26	B1 - B10	0,00	2,80	0,19

Tabulka P5.3 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD19

IMUNOFENOTYP MSC - NEGATIVNÍ MARKER CD19							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	0,0	0,4	0,0	B1	0,00	0,10	0,00
A2	0,0	0,1	0,0	B2	0,00	0,40	0,00
A3	0,0	0,5	0,1	B3	0,10	3,90	0,30
A4	0,1	3,9	0,3	B4	0,10	1,90	0,15
A5	0,0	0,4	0,1	B5	0,10	0,70	0,25
A6	0,1	1,9	0,2	B6	0,00	0,30	0,10
A7	0,1	0,7	0,3	B7	0,00	0,40	0,25
A8	0,0	0,3	0,1	B8	0,00	0,20	0,05
A9	0,0	0,4	0,3	B9	0,00	0,00	0,00
A10	0,0	0,2	0,1	B10	0,00	0,20	0,00
A1 - A10	0,00	3,90	0,10	B1 - B10	0,00	3,90	0,08

Tabulka P5.4 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD34

IMUNOFENOTYP MSC - NEGATIVNÍ MARKER CD34							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	0,0	0,0	0,0	B1	0,00	0,20	0,00
A2	0,0	0,2	0,0	B2	0,00	0,00	0,00
A3	0,0	0,0	0,0	B3	0,00	0,10	0,00
A4	0,0	0,1	0,0	B4	0,00	0,10	0,00
A5	0,0	0,0	0,0	B5	0,00	0,10	0,00
A6	0,0	0,1	0,0	B6	0,00	0,00	0,00
A7	0,0	0,1	0,0	B7	0,00	0,10	0,04
A8	0,0	0,0	0,0	B8	0,00	0,10	0,00
A9	0,0	0,1	0,0	B9	0,00	0,00	0,00
A10	0,0	0,1	0,0	B10	0,00	0,40	0,00
A1 - A10	0,00	0,20	0,00	B1 - B10	0,00	0,40	0,00

Tabulka P5.5 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD45

IMUNOFENOTYP MSC - NEGATIVNÍ MARKER CD45							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	0,0	0,0	0,0	B1	0,00	0,00	0,00
A2	0,0	0,0	0,0	B2	0,00	0,00	0,00
A3	0,0	0,0	0,0	B3	0,00	0,00	0,00
A4	0,0	0,0	0,0	B4	0,00	0,00	0,00
A5	0,0	0,0	0,0	B5	0,00	0,00	0,00
A6	0,0	0,0	0,0	B6	0,00	0,00	0,00
A7	0,0	0,0	0,0	B7	0,00	0,11	0,00
A8	0,0	0,0	0,0	B8	0,00	0,00	0,00
A9	0,0	0,1	0,0	B9	0,00	0,00	0,00
A10	0,0	0,0	0,0	B10	0,00	0,00	0,00
A1 - A10	0,00	0,11	0,00	B1 - B10	0,00	0,11	0,00

Tabulka P5.6 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD90

IMUNOFENOTYP MSC - POZITIVNÍ MARKER CD90							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	99,4	100,0	99,9	B1	98,60	99,80	99,50
A2	98,6	99,8	99,5	B2	99,40	100,00	99,90
A3	99,5	100,0	99,9	B3	98,90	99,90	99,60
A4	98,9	99,9	99,6	B4	99,90	100,00	99,95
A5	99,5	100,0	99,8	B5	99,60	100,00	99,90
A6	99,9	100,0	100,0	B6	99,50	100,00	99,80
A7	99,6	100,0	99,9	B7	99,50	100,00	99,85
A8	99,5	100,0	99,8	B8	97,50	100,00	99,85
A9	99,5	100,0	99,9	B9	99,90	100,00	100,00
A10	97,5	100,0	99,9	B10	99,60	100,00	100,00
A1 - A10	97,50	100,00	99,85	B1 - B10	99,50	100,00	100,00

Tabulka P5.7 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD105

IMUNOFENOTYP MSC - POZITIVNÍ MARKER CD105							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	99,6	99,8	99,7	B1	99,30	99,80	99,60
A2	99,3	99,8	99,6	B2	99,60	99,80	99,70
A3	99,4	99,9	99,6	B3	98,40	99,60	99,30
A4	98,4	99,6	99,3	B4	99,20	99,90	99,60
A5	99,2	99,7	99,3	B5	99,20	99,80	99,50
A6	99,2	99,9	99,6	B6	98,20	99,20	99,00
A7	99,2	99,8	99,5	B7	98,90	99,81	99,55
A8	98,2	99,2	99,0	B8	99,70	99,90	99,75
A9	98,9	99,8	99,6	B9	100,00	100,00	100,00
A10	99,7	99,9	99,8	B10	100,00	100,00	100,00
A1 - A10	98,20	99,90	99,60	B1 - B10	98,20	100,00	99,60

Tabulka P5.8 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD13

IMUNOFENOTYP MSC - POZITIVNÍ MARKER CD13							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	98,2	100,0	100,0	B1	99,80	100,00	100,00
A2	99,8	100,0	100,0	B2	98,20	100,00	100,00
A3	99,8	100,0	100,0	B3	99,60	100,00	100,00
A4	99,6	100,0	100,0	B4	99,90	100,00	100,00
A5	99,8	100,0	100,0	B5	99,80	100,00	100,00
A6	99,9	100,0	100,0	B6	99,70	100,00	100,00
A7	99,8	100,0	100,0	B7	99,89	100,00	100,00
A8	99,7	100,0	100,0	B8	98,20	100,00	100,00
A9	99,9	100,0	100,0	B9	98,90	100,00	100,00
A10	98,2	100,0	100,0	B10	98,60	100,00	99,90
A1 - A10	98,20	100,00	100,00	B1 - B10	98,20	100,00	100,00

Tabulka P5.9 – Porovnání imunofenotypu – exprese CD73

IMUNOFENOTYP MSC - POZITIVNÍ MARKER CD73							
Starší šarže				Novější šarže			
ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN	ŠARŽE LP	MIN	MAX	MEDIAN
A1	99,7	100,0	100,0	B1	99,80	99,90	99,90
A2	99,8	99,9	99,9	B2	99,70	100,00	100,00
A3	99,9	100,0	100,0	B3	99,80	100,00	99,90
A4	99,8	100,0	99,9	B4	99,90	100,00	100,00
A5	99,9	100,0	100,0	B5	100,00	100,00	100,00
A6	99,9	100,0	100,0	B6	99,90	100,00	99,95
A7	100,0	100,0	100,0	B7	99,90	100,00	99,99
A8	99,9	100,0	100,0	B8	99,50	100,00	100,00
A9	99,9	100,0	100,0	B9	99,90	100,00	100,00
A10	99,5	100,0	100,0	B10	99,90	100,00	100,00
A1 - A10	99,50	100,00	100,00	B1 - B10	99,50	100,00	100,00