

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# REKONSTITUCE LYMFOCYTŮ PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

Bc. PATRIK ZMIJ

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ondřej Souček, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat panu RNDr. Ondřeji Součkovi, Ph.D., který mi poskytl odborné vedení, pomoc a inspiraci při tvorbě této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval panu doc. Dipl.-Math. Erikovi Jurjenovi Duintjerovi Tebbensovi, Ph.D. za odbornou konzultaci statistické analýzy stanovených dat. Velké poděkování patří také prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. za uskutečnění této diplomové práce na Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a kolektivu zde působících odborných pracovníků. Speciální poděkování patří Bc. Renatě Holoubkové, mé přítelkyni a kolegyni za oporu a konzultace při tvorbě této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10. 5. 2024

Bc. Patrik Zmij



# 1. OBSAH

1.	OBSAH .....	5
2.	ABSTRAKT .....	8
3.	ABSTRACT .....	9
4.	ÚVOD .....	10
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	11
6.	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
6.1	Imunitní systém .....	12
6.2	Vrozená imunita .....	12
6.2.1	Vrozená imunita zprostředkována buňkami .....	12
6.2.2	Humorální složky vrozené imunity .....	13
6.3	Specifická imunita .....	14
6.3.1	Specifická imunita zprostředkována buňkami .....	15
6.3.2	Humorální složky specifické imunity .....	15
6.4	Lymfatické tkáně a orgány .....	15
6.5	Vývoj imunitních buněk v kostní dřeni .....	16
6.6	CD znaky .....	17
6.6.1	Povrchové markery leukocytů .....	19
6.6.2	Imunofenotypizace .....	19
6.7	Lymfocyty .....	20
6.7.1	Vývoj a diferenciací T a B lymfocytů .....	20
6.7.2	T lymfocyty .....	21
6.7.3	B lymfocyty .....	24
6.7.4	NK buňky .....	26
6.8	Průtoková cytometrie .....	27
6.8.1	Princip .....	27
6.8.2	Hodnocení .....	28
6.8.3	Uplatnění v imunologii .....	29
6.8.4	Uplatnění v hematologii .....	32

6.8.5	Neonkologická indikace.....	32
6.8.6	Hematoonkologická indikace.....	33
6.9	Onkologická hematologie.....	34
6.9.1	Rozdělení.....	35
6.9.2	Akutní leukémie.....	36
6.9.3	MDS.....	38
6.9.4	Myeloidní sarkomy.....	39
6.10	Transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	39
6.10.1	Autologní HSCT.....	39
6.10.2	Alogenní HSCT.....	40
6.10.3	Příprava před HSCT.....	40
6.10.4	HSCT jako léčba.....	41
6.10.5	Rekonstituce imunitního systému po HSCT.....	42
6.10.6	Reakce štěpu proti hostiteli.....	43
6.10.7	Reakce štěpu proti leukemickým buňkám.....	44
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
7.1	Výzkumné otázky.....	46
7.2	Charakteristika sledovaného souboru.....	46
7.3	Metodická část.....	47
7.3.1	Odběr a zpracování vzorku.....	47
7.3.2	Stanovení na průtokovém cytometru.....	48
7.3.3	Použité monoklonální protilátky ke stanovení.....	48
7.3.4	Gejtovací strategie.....	49
7.3.5	Statistická analýza.....	56
7.3.6	Referenční meze.....	57
8.	VÝSLEDKY.....	58
8.1	Rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT.....	58
8.1.1	Zhodnocení výsledků.....	70
8.2	Vliv věku pacientů na rekonstituci lymfocytů po allo-HSCT.....	74
8.2.1	Zhodnocení výsledků.....	80
8.3	Vliv přípravného režimu na rekonstituci lymfocytů po allo-HSCT.....	82
8.3.1	Zhodnocení výsledků.....	93

9. DISKUSE .....	95
10. ZÁVĚR .....	101
11. POUŽITÉ ZKRATKY.....	102
12. SEZNAM TABULEK .....	106
13. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	108
14. SEZNAM GRAFŮ.....	108
15. POUŽITÁ LETERATURA.....	111

## 2. ABSTRAKT

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Autor:** Bc. Patrik Zmij

**Vedoucí práce:** RNDr. Ondřej Souček, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Rekonstituce lymfocytů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk je nejefektivnější léčebnou možností pro pacienty s hematologickými malignitami, mezi které patří akutní myeloidní leukémie, myelodysplastický syndrom nebo vzácnější myelosarkom. Po úspěšně provedené transplantaci nastává znovuoobnovení buněk imunitního systému a jednou z částí, rekonstitucí lymfocytů se zabývá tato diplomová práce. Výběrovým souborem experimentální části se stali pacienti, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk na základě jejich nepříznivé diagnózy a následně byli sledováni po dobu jednoho roku na Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pozorování pacientů bylo stanoveno po třech měsících až do konečného jednoho roku a metodou stanovení se stala průtoková cytometrie. Na základě různorodých povrchových znaků vybraných imunitních buněk bylo možné sledovat pacienty s hematologickými malignitami a následný průběh rekonstituce lymfocytů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Věk pacientů výběrového souboru a podstoupený přípravný režim před transplantací, byly sledovány jako možné faktory ovlivňující průběh rekonstituce. Dosažené výsledky odhalily úspěšnou rekonstituci B lymfocytů, nedostatečnou obnovu T lymfocytárních populací a možný vliv RIC režimu na průběh rekonstituce.

**Klíčová slova:** lymfocyty, alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk, průtoková cytometrie, imunofenotypizace, akutní myeloidní leukémie



### **3. ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Author:** Bc. Patrik Zmij

**Supervisor:** RNDr. Ondřej Souček, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the most effective treatment option for patients with hematologic malignancies, including acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, or the rarer myelosarcoma. After a successful transplantation, the immune system cells are regenerated, and this master's thesis focuses on one aspect of that process: lymphocyte reconstitution. The experimental part of the study involved patients who underwent allogeneic transplantation of blood-forming cells based on their unfavorable diagnosis. These patients were then monitored for one year at the Institute of Clinical Immunology and Allergology at the Faculty Hospital in Hradec Králové. Observations were conducted at three months and continued until the end of the first year, using flow cytometry as the method of assessment. By analyzing diverse surface markers on selected immune cells, it was possible to track patients with hematologic malignancies and observe the subsequent course of lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Factors such as patient age and the conditioning regimen before transplantation were also studied for their potential influence on the reconstitution process. The results revealed successful reconstitution of B lymphocytes, insufficient recovery of T lymphocyte populations, and a possible impact of the RIC regimen on the reconstitution process.

**Key words:** lymphocytes, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, flow cytometry, immunophenotyping, acute myeloid leukemia

## 4. ÚVOD

Imunitní systém je klíčovou součástí lidského těla a jeho hlavní funkcí je ochrana organismu před škodlivými patogeny a rozpoznávání vlastních a cizích antigenů. K tomuto účelu slouží velké množství vrozených a specifických imunitních mechanismů, čítající humorální složky a také imunitu zprostředkovanou buňkami – leukocyty. Ačkoliv rozdílné buněčné linie leukocytů se od sebe liší svojí strukturou a funkcí, jejich vývoj je ale podobný. Veškerá leukopoéza probíhá v kostní dřeni a společnými prekurzory jsou pluripotentní kmenové buňky.

Jakmile dochází k poruše na úrovni hemopoetických kmenových buněk vznikají hematologické malignity. Při postupném předávání genetické odchylky dceřiným buňkám vznikají nádorové buňky, které za pomoci změny v genetické informaci mají výhodu v neustálém množení. Tento klonální vývoj postupně zapříčiní útlum normální krvinek a nadvládu patologických buněčných klonů. Mezi tyto nádorové choroby krvinek patří různé druhy leukémií, myelodysplastický syndrom, myelosarkom a mnoho dalších nemocí. Ačkoliv laboratorní diagnostika a léčba těchto chorob je na vysoké úrovni, prognóza je leckdy velice nepříznivá a nejefektivnější léčebnou možností je transplantace hematopoetických kmenových buněk.

Transplantace krvinek se rozděluje podle původu kmenových buněk na autologní a alogenní. Při autologní transplantaci je plánovaný odběr kmenových buněk pacienta za účelem jeho vlastní léčby. Ačkoliv autologní transplantace se na první pohled jeví jako ideální řešení, nese s sebou velké riziko relapsu nemoci. Častější indikací je alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk, při které jsou pacientovi podávány kmenové buňky na základě shody dárce a příjemce v HLA systému. Největší riziko alogenních transplantací je reakce štěpu proti hostiteli. Po úspěšně provedené alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk nastává rekonstituce imunitního systému v kostní dřeni. Obnovují se buňky vrozené imunity a postupně dochází i k rekonstituci buněk specifické imunitní odpovědi – lymfocytů, o kterých pojednává tato diplomová práce.

## 5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledování průběhu rekonstituce lymfocytů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk u pacientů s hematologickými onemocněními, metodou průtokové cytometrie. Naměřené hodnoty buněčných populací byly zhodnoceny před provedenou transplantací krvetvorných buněk a následně v časových intervalech po třech měsících až do konečného jednoho roku. V další části byl výběrový soubor rozdělen na základě věku na mladší a starší generaci a byl sledován vliv věku pacientů na průběh rekonstituce lymfocytů. V poslední části byl výběrový soubor rozdělen na základě podstoupeného přípravného režimu před transplantací a byl sledován vliv přípravného režimu RIC a abl na průběh rekonstituce lymfocytů. Zhodnocení spočívalo v porovnání mediánů relativních a absolutních hodnot s referenčními mezemi pro buněčné linie lymfocytů. Při sledování ovlivňujících faktorů byla zpracována statistická analýza.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Imunitní systém

Imunita je nedílnou součástí organismů a je nezbytná pro jejich přežití. Jedná se o základní homeostatický mechanismus, který má schopnost rozeznat „škodlivé“ od „neškodného“. Udržuje tak organismu jeho integritu tím, že ho chrání proti škodlivinám z vnějšku i zevnitř. Základní funkcí imunitního systému je obranyschopnost. V případě savce – lidského těla, jedince chrání zejména před ohrožením způsobeným vnějšími vlivy, především mikroby a jejich toxiny. Autotolerance je další schopností, kdy organismus rozpoznává vlastní tkáň a toleruje jejich přítomnost. Funkce imunitního systému není tak jednoduchá, jak se dříve zamýšlelo a čítá více dovedností jako je například rezistence proti nádorovému množení buněk imunitním dohledem. Staré a poškozené buňky je možné imunitními mechanismy efektivně likvidovat, protože se stávají vnitřní hrozbou. Imunitní systém je také spojen s problematikou transplantací, kdy je nutné předejít nevyžádané imunitní reakci na cizí transplantát, který má být tělu prospěšný. (Jílek, 2019), (Hořejší, 2017)

### 6.2 Vrozená imunita

Imunitní mechanismy zajišťující obranu jsou velice prastaré a je možné je nalézt u všech organismů, které jsou mnohobuněčné. Evolučně se tedy nachází v těle jedince již od narození a mohou použít jednotnou obrannou funkci proti odlišným patogenům. Vrozená imunita se skládá z buněk a molekul, které jsou předem přítomny a jejich funkci cílí obecnými mechanismy na společné rysy „nepřátel“. (Hořejší, 2017)

#### 6.2.1 Vrozená imunita zprostředkována buňkami

Hlavními buněčnými aktéry vrozené imunity jsou granulocyty, především neutrofilie a monocyty. Neutrofilie, někdy též označovány jako polymorfonukleáry jsou imunitní buňky krvetvorby vycházející z myeloidní řady. Jejich přítomnost v periferní krvi může být vyrušena a jsou následně přemístěny do místa zánětu ve tkáních. Monocyty, taktéž buňky vycházející z myeloidní řady jsou přítomny v periferní krvi, ale mohou vycestovat

do tkání, kde se následně přemění na tkáňové makrofágy. Mezi buňky vrozené imunity patří také dendritické buňky, jejichž příkladem mohou být kožní Langerhansovy buňky. Společná funkce neutrofilů a monocytů je fagocytóza. Tento děj je velice prastarý a patří mezi základní imunitní mechanismus obrany proti cizorodým antigenům. Ačkoliv mají neutrofilů a makrofágy spoustu odlišností v morfologii i funkci, tak jejich schopnost fagocytózy je z velké části shodná. Fagocytóza je komplexním dějem, který je možný fungovat, pokud na němž spolupracují rozdílné složky imunitního systému společně. (Jílek, 2019), (Hořejší, 2017)

Fagocytující buňky mají schopnost poznat částice, které jsou určeny k fagocytóze a iniciovat tak jejich následné pohlcení. Pomocí povrchových receptorů je možné započít přímou fagocytózu nebo nepřímou za pomoci opsonizace. Ta je závislá na rozpustných proteinech souhrnně nazývaných jako opsoniny. Převážně se jedná o protilátky, složky komplementu nebo jiné sérové proteiny. Fc receptory fagocytů také rozeznávají protilátky navázané na povrchu mikrobů. Aktivace komplementu na povrchu mikroorganismů je dalším faktorem napomáhající fagocytóze.

Komplementové fragmenty a protilátky označují cizorodé částice, které fagocytující buňky lépe poznají. Po pohlcení mikroorganismu fagocytem nastává jeho likvidace. Ta je zprostředkována řadou baktericidních látek, hydrolytických enzymů a tvorbou reaktivních kyslíkových intermediátů. (Hořejší, 2017), (Šterzl, 2007)

Vrozené složky imunity jsou úzce spjaty s antigenně specifickými a jako spojku je možné jmenovat například dendritické buňky, jejich specializací je zpracování antigenu a jeho následné předložení T lymfocytům. Dendritické buňky patří mezi nejúčinnější buňky, které předkládají antigen. (Hořejší, 2017), (Šterzl, 2007)

### **6.2.2 Humorální složky vrozené imunity**

Mezi humorální složky neadaptivní imunity řadíme komplement, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Reakční doba těchto humorálních mechanismů je velice rychlá a v řádech minut je možné reagovat na škodliviny v lidském organismu. (Hořejší, 2017)

Komplement skládající se z postupně aktivujících se proteinů je tělu prospěšný zejména díky likvidaci nežádoucích buněk jejich lýzou. Komplement je také nedílnou součástí zánětu, kde hraje velice důležitou roli. Systém bílkovin komplementového

systemu je schopen se kaskádovitě měnit z neaktivních forem na aktivované, kdy se jednotlivé proteiny navzájem štěpí. Výsledek komplementového působení na tělu škodlivé buňky je podstatě totožný, ale aktivace komplementu může být rozdílná. Je možné rozlišit základní tři cesty, kterými lze komplement aktivovat. Rozlišujeme klasickou cestu aktivace, lektinovou a alternativní. Jako klasická cesta se popisuje komplex antigenu (Ag) s protilátkou (Ab), která může být třídy IgG a IgM. Komplexem může být například bakterie nesoucí protilátku na níž se následně naváže složka komplementu C1 a její aktivní forma štěpí C4 a společně C3, což nazýváme C3 konvertázou. Lektinová cesta aktivace je velice obdobná, ale nevyžaduje přítomnost komplexu Ag-Ab, ale MBL (lektin vázající manózu). Pokud se nachází na cukerných složkách buněčné stěny, může aktivovat složku C1. Alternativní cesta aktivace je započata složkou C3. Povrch mnoha mikroorganismů je schopen C3 zaktivovat. Po vzniku C3 konvertázy jsou cesty komplementu společné za následného vzniku C5 konvertázy a přes další aktivace složek C6 až C9, které se včleňují do membrány a jejich cílem je vytvoření komplexu atakující membránu (MAC). Lýza buňky spočívá ve vytvoření póru za pomoci kterého je umožněno proudění vody do vnitřního prostředí buňky a díky její přítomnosti v cytoplazmě buňka lyzuje. (Jílek, 2019), (Šterzl, 2007)

### **6.3 Specifická imunita**

Specifická imunita, též nazývána jako získaná, přichází na řadu tam, kde sléhají imunitní vrozené mechanismy. Je evolučně mladší a založená na klonálním anticipačním principu. Vrozená imunita, která má obecné působení je pravým opakem získané imunity, která působí specificky a zásadní roli hraje imunologická paměť. Antigen spouští řetězovou reakci, která aktivuje lymfocyty a vrcholem reakce je tvorba protilátek, které působí právě proti tomuto specifickému antigenu. Imunitní odpověď, která je vyvolána díky jednomu antigenu – imunogenu nám nezajišťuje ochranu proti jinému, který není podobný. Specifickou imunitu je možné rozdělit na buněčnou zprostředkovanou T a B lymfocyty a humorální tvořenou protilátkami. Specifické mechanismy jsou úzce spjaty s imunitou vrozenou a nemohou fungovat bez své spolupráce. (Hamplová, 2019), (Hořejší, 2017)

### **6.3.1 Specifická imunita zprostředkována buňkami**

Buněčně zprostředkované mechanismy specifické imunity jsou převážně založené na T lymfocytech. Pro spuštění adaptivních mechanismů je nezbytné setkání se s antigenem a také aktivace imunitních složek vrozené neadaptivní imunity. T lymfocyty reagují na antigeny předkládané buňkami vrozené imunity, které jsou vystavovány na jejich HLA molekulách. Na základě specifické funkce různých T lymfocytů mohou například pomáhat ostatním buňkám imunitního systému anebo mohou i patologicky změněné buňky usmrcovat. Hlavní funkcí B lymfocytů je tvorba protilátek – imunoglobulinů (Ig). Část T i B lymfocyty se mohou po styku s Ag diferencovat v takzvané buňky paměťové. (Hamplová, 2019), (Hořejší, 2017)

### **6.3.2 Humorální složky specifické imunity**

Základem humorální specifické imunity jsou protilátky. Jsou tvořeny B lymfocyty a jsou přímou odpovědí na určitý antigen, kterým může být například původce infekčního agens. Za protilátky považujeme sérové glykoproteiny, které můžeme zařadit do gama-fraze globulinů séra. Toto zařazení je možné prokázat elektroforetickým dělením. Obecná stavba imunoglobulinu se skládá ze dvou stejných těžkých řetězců a dvou stejných lehkých řetězců navzájem pospojovaných disulfidickými můstky. Rozlišujeme několik tříd protilátek na základě struktury imunoglobulinů můžeme rozlišit několik hlavních typů – IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Odlišují se svojí biologickou funkcí i rolí v imunitní odpovědi. (Hamplová, 2019), (Hořejší, 2017)

## **6.4 Lymfatické tkáně a orgány**

Tkáně a orgány popisovány jako lymfatické jsou tvořeny buňkami imunitního systému, které je společně s pojivovou tkání a dalšími strukturami vytvářejí. Tyto orgány rozdělujeme na primární a sekundární. Mezi primární lymfatické orgány řadíme kostní dřeň a thymus, a to zejména kvůli vzniku, diferenciaci a také zrání buněk imunitního systému. U ptáků je zde zařazena také Fabriciova burza. Do sekundárních lymfatických orgánů řadíme slezinu, lymfatické uzliny a slizniční lymfatickou tkáň nazývanou též MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). Slizniční lymfatická tkáň je složena ze shluků lymfoidních folikulů, které jsou různě organizované. MALT můžeme nalézt

například jako Peyerovy pláty ve střevě, v apendixu anebo také v tonzilách. Dále je rozptýlena i na dalších místech lidského těla, například ve sliznici střev, urogenitálního traktu a dýchacích cest, kde tvoří funkční celky. Hlavní fáze imunitních reakcí specifických na daný antigen probíhají právě v sekundárních lymfatických orgánech. Stejně jako všechny ostatní orgány jsou i ty lymfatické propojeny systémem krevních cév, ale také lymfatických cév. Ty odvádějí z tkání lymfu a spolu s ní antigeny, cytokiny a leukocyty do lymfatických uzlin. Zde se rozdílné antigen prezentující buňky setkávají s T a B lymfocyty a po styku s antigenem může tak dojít k jejich aktivaci. Tento proces probíhá podobně také ve slezině. (Hořejší, 2017), (Makris, 2022), (Bacon, 2006)

## **6.5 Vývoj imunitních buněk v kostní dřeni**

Multipotentní kmenová buňka se nachází v kostní dřeni, udržuje svůj stálý počet identicky totožných buněk (self renewal) a je prekurzorem zralejších kmenových buněk, které dále diferencují (committed cells). Každá řada krvetvorných buněk má své kmenové buňky pro svůj vývoj. Například eozinofily, bazofily a mastocyty vycházejí z kmenových buněk – specifických jednotek tvořících kolonie (CFU) - CFU-Eo, CFU-Ba, CFU-mast. Ne všechny linie krvetvorby mají rozdílné kmenové buňky, můžeme jmenovat B lymfocyty, T lymfocyty a NK buňky, které mají společný lymfoidní progenitor. Při hemopoéze jsou přítomny také cytokiny – interleukiny (IL), kolonie stimulující faktory (CSF). Hemopoetické induktivní mikroprostředí (HIM) neboli interakce kmenových buněk se stromatem orgánů hemopoézy je také velice důležité při tvorbě buněk. Buněčné zastoupení HIM je reprezentováno monocyty (makrofágy) dále jsou zde přítomny retikulární buňky a endotelie a další. Buňky jsou přítomny v extracelulární matrix. Hemopoéza může probíhat až za přítomnosti a správné funkci všech těchto faktorů. Pokud dojde k narušení v části krvetvorby, následky mohou být fatální. Poškození v souvislosti s kmenovými buňkami a/nebo HIM přecházejí v různé patologie. Mezi ně je možné zařadit myelofibrózy, dřevňové útlumy, myelodysplazie nebo akutní hemoblastózy a mnoho dalších. Výzkum kmenových buněk ušel dlouhou cestu a zaznamenal pokrok v oblasti hemopoézy, malignit, ale také při náhradě tkání. (Lucas, 2021), (Zhang, 2023), (Seita, 2010), (Penka, 2011)



Za pomoci kultivačních metod lze studovat kmenové buňky *in vitro*. Pro kultivaci se využívají komponovaná média a pro monitoraci odpovědi kmenových buněk různé růstové faktory, případně kombinace. Na povrchu různých hematopoetických kmenových buněk jsou exprimovány specifické receptory pro růstové faktory, které mají specifické působení. Do růstových faktorů hematopoézy řadíme IL -2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, jako další jsou erythropoetin (EPO), trombopoetin (TPO), c-kit ligand neboli stem cell factor (SCF), granulocytární a makrofágové CSF (GM-CSF), granulocytární CSF (G-CSF) a mnoha dalších. Rekombinantní cestou je v dnešní době možné syntetizovat některé růstové faktory a využít je při terapii (EPO, TPO, G-CSF). (Penka, 2011), (Seita, 2010), (Lucas, 2021)

Identifikace jednotlivých kmenových buněk není možná za pomoci světelné mikroskopie, ale můžeme využít řadu jiných podrobnějších metod. Kmenové buňky, které jsou v patřičném médiu kultivované můžeme sledovat za pomoci ultramikroskopie, průtokové cytometrie (s možností cell-sortingu), transfekce pokusných zvířat, genetiky (aktivace rozdílných genů a detekce mRNA nebo aktivace mnoha genů – multi-array). Při sledování diferenciaci kmenových buněk je možné využít struktury v buněčné membráně (na povrchu buněk) takzvané znaky cluster of differentiation znaky (CD). CD34 je specifický znak pro kmenové buňky. V kostní dřeni se nachází elementy CD34 negativní v počtu vyšším jak 99 %. Pouze daná část CD34+ elementů jsou nezralé kmenové buňky. (Penka, 2011), (Seita, 2010)

## **6.6 CD znaky**

Objev hybridomů tvořící monoklonální protilátky s definovanou specificitou z počátku 80. let se stal závažným zlomem v analýze membránových molekul buněk. Hybridomy vyprodukované totožně specifické monoklonální protilátky „se shlukují“ (cluster) a mají určené vlastní číselné označení. Daná monoklonální protilátka reaguje specificky na cílovou molekulu a získává tak automaticky označení CD. CD znak je dopodrobna popsán jak strukturně, tak i funkčně na molekulární úrovni. Je též známa jeho exprese při fyziologických i patofyziologických stavech a také v ontogenezi. V současnosti je kompletně zaznamenáno CD1-CD371 znaků. (Krejsek, 2016), (Hořejší, 2017)

**Tabulka 1 Seznam základních charakteristických povrchových molekul**

<b>Buněčný typ</b>	<b>Charakteristické povrchové molekuly</b>
leukocyty (všechny)	CD53, CD45, CD43
kmenové buňky, hematopoetické prekurzory	CD34, CD117 (SCF-R), CD135 (FLT3)
T lymfocyty	TCR, CD3, CD2, CD5, CD6, CD7, CD27, CD28, CD96
pomocné T lymfocyty (Th)	CD4
Th1	CD26, membránový IFN- $\gamma$ , CD223 (LAG-3), CD212 (IL-12-R), CD195 (CCR5), CD183 (CXCR3)
Th2	CD62L, CD30, CCR3, CCR4, CCR8, ST2L
cytotoxické T lymfocyty (Tc)	CD8
intestinální epiteliální T lymfocyty	CD103 (HML-1, $\alpha$ E integrinová podjednotka)
B lymfocyty	BCR, CD19, CD20, CD22, CD37, CD39, CD40, CD79
B1 lymfocyty (navíc)	CD53, CD45, LFA-1, CD43
pre-B	CD10 (CALLA), CD9, CD138
plazmatické buňky	CD38, CD138
NK buňky	CD16B, CD56, KIR (CD158), CD94/NKG2, CD161 (NKR-P1), CD2, CD57, CD11b
neutrofily	CD15, CD11b, CD87
bazofily, mastocyty	Fc $\epsilon$ RI
monocyty	CD14, CD33, CD64 (Fc $\gamma$ RI), CD87, CD89 (Fc $\alpha$ RI)
trombocyty	CD41, CD42, CD61
dendritické buňky	CD83, CD86, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209
aktivované lymfocyty	CD25 (IL-2R $\alpha$ ), CD71 (TfR), CD69, CD150 (SLAM)

Zdroj: Hořejší, 2017

### 6.6.1 Povrchové markery leukocytů

Leukocyty mají společné základní funkce a od nich se i odvíjí povrchové znaky, které sdílejí. Mechanické funkce cytoplazmatické membrány, případně membránový transport a adhezivita jsou vlastnosti i jiných buněk než leukocytů, a proto i zde nalezneme společné markery. K určitým specifickým schopnostem leukocytů se však vážou i jejich povrchové molekuly, ty následně můžeme prokázat na určitých subpopulacích. Díky této funkci je možné rozlišovat tyto subpopulace dle jejich povrchových znaků tam, kde není možné použít pouze jednoduchou světelnou mikroskopii na rozlišení buněk. (Hořejší, 2017), (Krejsek, 2016)

Souhrnný název aktivační antigeny jsou takové povrchové znaky, které se nově dostávají na povrch různých typů leukocytů po jejich aktivaci. Část těchto molekul se objevuje na povrchu buněk velmi rychle po jejich aktivaci (minuty), protože jsou již předem připravené v jejich cytoplazmatických granulích. Jiný typ aktivačních molekul se v buňkách syntetizuje až po obdržení aktivačního signálu. Například po aktivaci neutrofilních granulocytů je možné nalézt na jejich povrchu velký nárůst exprese komplementového receptoru CR3 (CD11b/CD18), přítomnost membránové alkalické fosfatázy a také chemotaktických receptorů. Všechny tyto složky se před aktivací skladují v membránách cytoplazmatických granulí uvnitř buňky. Jakmile se tyto buňky aktivují, tak i některé povrchové proteiny mizí. (Hořejší, 2017), (Krejsek, 2016)

### 6.6.2 Imunofenotypizace

Povrchové a intracelulární molekuly buněk, které převážně slouží k určité funkci je možné využít také k buněčné identifikaci. Nejčastěji se používá CD klasifikace, ale je možné sledovat i jiné buněčné znaky. Imunofenotypizace využívá komerčně dostupné monoklonální protilátky nesoucí různorodé fluorochromy k elektronické „vizualizaci“ vazby protilátky s antigenem a znalosti o velikosti a komplexitě analyzovaných buněk. Nejčastější monoklonální protilátky určené ke stanovení jsou fluoroisothiokyanát (FITC), fykoerytrin (PE), krome orange (KO), pacific blue (PB), allophycocyanin (APC) APC alexa fluor 750 (APC\_A750), nebo fluorochromy obsahující fykoerytrin a cyanin – phycocyanin (PC) např. PC5.5, PC7 a mnoho dalších. Pro fenotypizaci leukocytů se používá průtoková cytometrie. (Khenine, 2021), (Flores-Montero, 2019)

## 6.7 Lymfocyty

Lymfoidní buňky tvoří většinu buněk specifické imunitní odpovědi a jsou reprezentovány T a B lymfocyty. Lymfocyty představují asi 20–45 % populace leukocytů, jejich význam v rámci adaptivního imunitního systému je obrovský. (Delves, 2017), (Krejsek, 2016)

Lymfocytární populace vychází z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky z lymfoidní vývojové linie. Odlišnou diferenciací následně vznikají T a B lymfocyty a NK buňky (natural killers). T a B lymfocyty jsou součástí adaptivní imunity a jako jediné buňky v organismu vlastní specifický receptor pro antigen. Ten získávají až po jejich diferenciaci, kdy se z nich stávají imunokompetentní buňky. NK buňky jsou součástí přirozené imunitní odpovědi a specifický receptor nemají. Ačkoliv jsou lymfocytární buněčné linie funkčně odlišné, vzhledově jsou si natolik podobné, že pro jejich diagnostiku je třeba použít charakteristické znaky, které vystavují na svém povrchu. (Krejsek, 2016), (Šterzl, 2007)

### 6.7.1 Vývoj a diferenciace T a B lymfocytů

T i B lymfocyty vznikají z pluripotentní kmenové buňky, přesněji z lymfoidního progenitoru. Lymfocyty T i B jsou tvořeny v kostní dřeni, kde B lymfocyty nadále zůstávají a probíhá jejich diferenciace ve zralé B lymfocyty. T lymfocyty opouštějí kostní dřeň a následně migrují do thymu, který je uzpůsoben k jejich vyžívání. Při diferenciaci lymfocytů dochází ke genetickému přeskupení segmentů C, V, D, J, bez kterého by nebylo možné vytvořit dostatečné množství bílkovinných řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  důležitých k tvorbě jejich receptorů pro antigeny – T buněčného receptoru (TCR) a B buněčného receptoru (BCR). Po vytvoření receptorových struktur pro antigeny je nutné selekčními procesy zajistit, aby v organismu nebyly přítomny autoreaktivní klony T a B lymfocytů. Pozitivně selektované buňky jsou schopny správně rozpoznat daný antigen a odpovědět na něj úměrnou reakcí. Tyto buňky jsou shromažďovány v sekundárních lymfatických orgánech nebo cirkulují v periferní krvi a interagují s případnými antigeny. (Krejsek, 2016), (Šterzl, 2007)

## 6.7.2 T lymfocyty

T lymfocyty se rozdělují do tří subtypů: pomocné (Th), cytotoxické (Tc) a regulační (Treg). Th lymfocyty mají za úkol pomoci především B lymfocytům při tvorbě protilátek, ale i dalším buňkám. K likvidaci virově infikovaných buněk napomáhají Tc lymfocyty a Treg regulují aktivitu jiných T lymfocytů. (Devels, 2017), (Krejsek, 2016)

Po vzniku definitivního TCR, který se skládá z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců, nese také znak CD3 specifický pro T lymfocyty. Již v době thymické diferenciaci při probíhající selekci autoreaktivních klonů se na buňkách objevují i další povrchové markery CD4 a CD8, tyto thymocyty se nazývají dvojité pozitivní. Zralé T lymfocyty exprimují na svém buněčném povrchu právě znaky CD4 nebo CD8, které jsou přímo závislé na jejich funkcích. CD4 dokáže poznat HLA molekuly II. třídy a nachází se na Th lymfocytech, CD8 identifikuje HLA molekuly I. třídy a v tomto případě se jedná o Tc lymfocyty (Devels, 2017), (Krejsek, 2016)

### 6.7.2.1 Naivní T lymfocyty

Naivní T lymfocyty byly dlouho považovány za vývojově synchronizovanou a poměrně homogenní populaci buněk, jejíž velikost závisí na věku, výstupu z brzlíku a předchozích infekcích. Nicméně existuje stále více důkazů o tom, že naivní T lymfocyty jsou heterogenní z hlediska fenotypu, funkce, dynamiky a diferenciačního stavu. Současné strategie pro identifikaci naivních T lymfocytů by měly být upraveny s ohledem na tuto heterogenitu. (Van den Broek, 2018), (Krejsek, 2016)

Nejčastěji používanými povrchovými buněčnými markery k identifikaci naivních T lymfocytů jsou CC-chemokinový receptor 7 (CCR7), CD27, CD28 a především CD45RA (nebo CD45RO). Tento panleukocytární znak lymfocytů se u paměťových T lymfocytů nachází v izoformě CD45RO, ale u naivních T lymfocytů je přítomna izoforma CD45RA. Přesná identifikace naivních T lymfocytů je CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> a CD28<sup>+</sup>. Recent thymic emigrants (RTE) neboli buňky, které časně opustily brzlík exprimují CD45RA<sup>+</sup> a CD31<sup>+</sup>. (Appay, 2008), (Boldt, 2014), (Krejsek, 2016)

Po procházení pozitivní a negativní selekcí v brzlíku migrují T lymfocyty do periferie. Následně naivní T lymfocyty neustále cirkulují mezi sekundárními lymfoidními orgány

a krví prostřednictvím lymfatického systému, přičemž vystavují na svém povrchu lymfoidní homingové receptory, zejména CCR7 a ligand CD62 (CD62L nebo též známý jako L-selektin). Po setkání a interakci s antigeny v periférii se naivní T lymfocyty dále množí a diferencují do odlišných typů efektorových a paměťových T lymfocytů, které mohou migrovat do různých tkání pro lokální kontrolu antigenů. Pro zajištění adekvátních imunitních reakcí proti nově vzniklým patogenům je nutné udržovat velké množství buněk s unikátními receptory TCR na omezeném fyzickém prostoru. Tyto požadavky jsou náročné, protože brzlí involuuje a atrofuje s věkem. Pokud dochází k obnově imunity po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) měla by být sledována pozorněji vzhledem k pomalé rekonstituci naivních T lymfocytů. (Van den Broek, 2018), (Krejsek, 2016)

#### **6.7.2.2 CM, EM a TEMRA T lymfocyty**

Populace CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů lze rozdělit na základě exprese znaků CD27 a CD45RA na čtyři buněčné populace. Naivní T lymfocyty vykazují vysokou expresi CD27 a CD45RA, zatímco získání paměťové funkce vede ke ztrátě CD45RA u centrálních paměťových (CM) T lymfocytů a dále ke společné ztrátě exprese CD27 u efektorových paměťových (EM) T lymfocytů. Navíc populace CD27<sup>-</sup> lze rozdělit do dvou populací: ty, které nevykazují expresi CD45RA, představující podtyp EM a ty, které opět exprimují CD45RA, které jsou označeny jako terminální EM T lymfocyty reexprimující CD45RA (TEMRA). Tyto populace jsou analogické těm identifikovaným na základě exprese CCR7 a CD45RA. Přibližně 60 % buněk TEMRA vyazuje vysoké úrovně senescentních markerů, jako je KLRG1, CD57 a PD1, ve srovnání s pouze 10 % naivními a CM buňkami. Na druhou stranu buňky TEMRA, zejména ty CD8<sup>+</sup>, vykazují vysoké úrovně cytotoxických cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , perforinu a granzymu B, což poukazuje na to, že tyto buňky mají odlišný fenotyp ve srovnání s buňkami EM. Tyto TEMRA T lymfocyty mají nižší proliferační kapacitu a sníženou aktivitu telomerázy ve srovnání s jejich protějšky EM. (Strickland, 2023), (Matos, 2022), (Meraviglia, 2019)

Již dříve bylo prokázáno, že buňky TEMRA představují senescentní populaci buněk, které se akumulují se stářím a v důsledku specifických infekcí, mezi které patří například cytomegalovirus. Přibližně 22 % populace CD8<sup>+</sup> T buněk tvoří buňky TEMRA,

zatímco u populace CD4+ T lymfocytů je tento podtyp mnohem vzácnější, okolo 5 % z celkového počtu CD4+ T lymfocytů. Kompartimentalizace T lymfocytů se s věkem dramaticky mění, s narůstajícím poměrem CD4: CD8 a se zvyšujícím se počtem paměťových T lymfocytů v periférii. Například počet CD8+ buněk TEMRA se zvyšuje z přibližně 30 % u jedinců mladších než 40 let na 60 % u jedinců starších 90 let, zatímco naivní buňky CD8+ klesají z 40 % na 5 % u těchto jedinců. Stojí za zmínku, že změny v populaci CD4+ T lymfocytů často nejsou tak výrazné jako u populace CD8+ T lymfocytů. CD8+ a CD4+ buňky TEMRA vyvíjejí senescenčně asociovaný sekreční fenotyp (SASP), charakterizovaný sekrecí prozánětlivých cytokinů, chemokinů a proteáz. Vazby mezi SASP a metabolickým signálem byly již dříve zkoumány, přičemž nízké úrovně zánětu vyvolané SASP přispívají k různým poruchám spojených se stářím. (Strickland, 2023), (Matos, 2022), (Meraviglia, 2019)

TEMRA CD4+ T lymfocyty jsou ve srovnání s TEMRA CD8+ T lymfocyty a jejich naivními a CM/EM protějšky relativně neznámé. Vzhledem k tomu, že se populace buněk CD4+ TEMRA zvyšuje s věkem, může existovat určitá souvislost mezi buňkami TEMRA a nedostatečnou odpovědí na infekci a očkování u starší populace. (Strickland, 2023)

### **6.7.2.3 Th lymfocyty**

Th lymfocyty jiným jménem pomahači nebo helpery vystavují na svém buněčném povrchu znak CD4. Tento typ buněk rozpoznává antigen za pomoci TCR, který jim předkládají buňky prezentující antigen a rozpozná molekuly HLA II. třídy, pro které je CD4 receptorem. Jakmile nastane setkání buňky s antigenním stimulem, dochází pod vlivem několika faktorů nespecifické i specifické imunity do diferenciaci Th lymfocytů na několik funkčních subtypů pojmenovaných Th1, Th2, Th17, Treg a další. Tyto populace je možné rozlišit díky odlišné produkci cytokinů. Th1 lymfocyty dokáží produkovat interferon gama (IFN- $\gamma$ ) a indukují tak imunitní odpověď založenou na buňkách, Th2 lymfocyty produkují IL-4, IL-5 a jejich funkce je zejména humorální a spolupracují s B lymfocyty na tvorbě protilátek. Th17 lymfocyty jsou charakteristické svojí tvorbou IL-17, který má protibakteriální a protiplísňovou funkci a je schopen aktivace neutrofilů. (Krejsek, 2016), (Bartůňková, 2011)

#### **6.7.2.4 Treg lymfocyty**

Treg lymfocyty patří mezi buňky, jejichž funkcí je tlumit imunitní reakce a tím mohou regulovat jejich rozsah. K tomu jim napomáhá produkce IL-10 a transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ). Tato buněčná populace se vyznačuje především povrchovými molekulami CD4, CD25 a také nízkou expresí CD127. Podtyp CD39+ Treg lymfocytů, za pomoci enzymu CD39, spolupracují na přeměně adenzintrifosfát (ATP), adenzindifosfát (ADP) a adenzinmonofosfát (AMP) na adenzin, který následně dokáže navodit imunopresivní účinky. (Yu, 2012), (Zhao, 2017), (Seddiki, 2014)

#### **6.7.2.5 Tc lymfocyty**

Tc lymfocyty, celým názvem cytotoxické nebo supresorově cytotoxické buňky nesou znak CD8 a podle svého názvu je jejich funkcí cytotoxicita a suprese – zabíjení buněk, které jsou infikované a regulace imunitních reakcí nebo jejich potlačení. Tc lymfocyty stejně jako Th rozpoznávají antigen za pomoci svého TCR receptoru, ale díky povrchovému znaku CD8, který je receptorem, rozpoznávají molekuly HLA I. třídy. Tc lymfocyty je také možné rozdělit do několika funkčních skupin na základě produkce rozdílných cytokinů, ale nejvíce charakteristické pro Tc lymfocyty je produkce perforinů a granzymů a indukce apoptózy. (Krejsek, 2016), (Bartůňková, 2011)

#### **6.7.2.6 Paměťové T lymfocyty**

Paměťové T lymfocyty jsou přítomny v organismu jedince již po první specifické imunitní reakci vyvolané cizorodým antigenem. Jejich přítomnost je velice důležitá pro opakovatelnost imunitních mechanismů při setkání se stejným antigenem, která je o poznání rychlejší a účinnější. Znakem charakteristickým pro paměťové T lymfocyty je CD45RO. (Krejsek, 2016), (Bartůňková, 2011)

### **6.7.3 B lymfocyty**

#### **6.7.3.1 Naivní B lymfocyty**

Proces zrání imunitního systému vede k tvorbě různých subpopulací B lymfoidních buněk, které mají schopnost reagovat specifickým způsobem a exprimovat různé markery na buněčném povrchu. Je možné rozdělit B lymfocyty na subpopulace naivní,



přechodné, ne-paměťové, dvojitě negativní (DN), aktivované a plazmocytoidní.

Paměťové buňky se dělí na nezralé paměťové buňky margiální zóny/IgM-only (NSMe) a paměťové buňky s přepnutím (SwMe). Všechny tyto subpopulace je možné stanovit průtokovou cytometrií na základě diferenciální exprese CD19, IgM, IgD, CD21, CD24, CD27 a CD38. (Piątosza, 2010), (Krejsek, 2016)

Nově vytvořené přechodné B lymfocyty s nedotčeným BCR migrují z kostní dřeně do periferní cirkulace a sekundárních lymfoidních orgánů. Nejranější přechodné B lymfocyty v periférii člověka exprimují CD10+, CD38<sup>high</sup>, CD24<sup>high</sup> a *in vitro* jsou tyto buňky schopny postupné diferenciace do zralých naivních fenotypů B lymfocytů. Zralé naivní B lymfocyty jsou popisovány jako CD10<sup>neg</sup> CD38<sup>low/neg</sup>. (Kaminski, 2012)

Aktivované B lymfocyty, které obdržely pomoc od T lymfocytů ve folikulech sekundárních lymfoidních tkání, se mohou stát buňkami germinálního centra (GC). Buňky GC se množí a mohou přepnout konstantní oblast BCR z IgM/IgD na IgG, IgA nebo IgE. Když je periferní tolerance neporušena, tyto B lymfocyty jsou většinou nereaktivní vůči vlastnímu a diferencují se na buňky plazmatické nebo na paměťové B lymfocyty, které mohou rychle reagovat při následném setkání s invazivním organismem. Lidské GC B lymfocyty, *in vitro* aktivované naivní B lymfocyty a paměťové buňky exprimují na buněčném povrchu CD27. Jen málo cirkulujících CD27+ B lymfocytů prokazuje známky probíhající proliferace, a protože jsou GC obecně omezeny pouze na lymfoidní tkáň, jsou většinou CD27+ B lymfocyty v periférii zdravých lidí jsou obvykle považovány za paměťové. V souladu s touto charakterizací mají IgVH oblasti CD27+ B lymfocytů obvykle somatické hypermutace s charakteristickou DNA sekvencí pro výběr antigenu, bez ohledu na to, zda jsou buňky IgD<sup>neg</sup> (SwMe) nebo IgD/IgM+ (NSMe). Informace se liší ohledně toho, zda nepřepnuté paměťové a přepnuté paměťové kompartmenty sdílejí repertoár IgVH. Takže IgD+ CD27+ buňky jsou údajně složeny alespoň ze dvou, ne-li několika funkčních podskupin, pravděpodobně včetně některých prekurzorů s přepnutím. Některé přepnuté B lymfocyty jsou IgD<sup>neg</sup> CD27<sup>neg</sup>, a je jich obvykle méně než 5% populace CD19+ u zdravých jedinců. Analýza mRNA naznačuje, že menší populace této frakce exprimuje IgM bez IgD. (Kaminski, 2012), (Krejsek, 2016)

### **6.7.3.2 Zralé B lymfocyty**

Zralé B lymfocyty se diferencují do stádia plazmatické buňky, kdy na svém povrchu exprimují znaky CD19 a CD138 a mohou tak plnit svojí primární funkci. Plazmatické buňky z velké části putují do kostní dřeně, kde následně tvoří specifické protilátky – imunoglobuliny. Produkce protilátek se odvíjí od BCR buňky, kdy vyprodukované protilátky jsou identické specifity. Vytvořené protilátky se dělí do základních tříd na IgM, IgG, IgA, IgE a IgD a jejich funkcí zajišťují specifickou humorální imunitu. Strukturně se jedná o glykoproteiny složené z těžkých a lehkých řetězců s vazebnými místy pro antigen na N-terminální části každého z řetězců. Jejich imunologická funkce je různorodá, mohou přímo neutralizovat bakterie i viry vyvolávající infekční onemocnění, napomáhat v procesu fagocytózy opsonizací nebo kooperovat s komplementem nebo cytotoxickými buňkami. B lymfocyty stejně jako i T lymfocyty vytvářejí imunologickou paměť svými paměťovými buňkami, které se vyznačují znaky CD19 a CD62L. Po dobu celého života jedince se imunologická paměť vyvíjí na základě styku s různými cizorodými antigeny. Je možné tomuto procesu uměle napomocť aktivní imunizací. (Krejsek, 2016), (Cyster, 2019)

### **6.7.4 NK buňky**

NK buňky, přestože patří mezi lymfocyty, hrají klíčovou roli v rámci vrozeného imunitního systému a dohlížejí tak na přítomnost speciálních antigenů, které jsou prezentovány na buňkách (tzv. HLA molekuly). HLA molekuly jsou přítomny téměř na všech buňkách v těle a hrají klíčovou roli v činnosti adaptivního imunitního systému. NK buňky používají receptory zakódované v genofondu (NK receptory), které jsou odlišné od receptorů T a B lymfocytů a jsou obdařeny schopností ničit buňky, které vykazují abnormální profily HLA receptorů. Viry často strategicky narušují expresi HLA molekul ve snaze uniknout adaptivním imunitním mechanismům, to ale přitahuje pozornost NK buněk, které viry infikované buňky mohou rychle likvidovat. NK buňky také disponují receptory pro určitou třídu protilátek (IgG) a mohou využít tento receptor (CD16) k rozeznávání Fc fragmentu protilátek již navázaných na infikovaných buňkách a tím mohou vyhledávat a zabíjet tyto buňky. Tento proces se nazývá protilátkami závislá buněčná cytotoxicita. (Devels, 2017), (Abel, 2018)

## **6.8 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je instrumentální metoda, která převážně slouží k analýze buněčných subpopulací leukocytů, takzvané fenotypizaci. Touto metodou se analyzují buněčné suspenze barvené fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami, které jsou namířeny proti povrchovým molekulám jednotlivých subpopulací, kterými jsou charakteristické („markery“ subpopulací). Naměřené hodnoty cytometrického stanovení udávají například relativní početné zastoupení leukocytů v krvi na úrovni jejich jednotlivých druhů. Toho je možno využít pro diagnostiku hematologických onemocnění, typizaci leukémií nebo k určení typu imunodeficiencí. (Hořejší, 2017), (Robinson, 2023), (McKinnon, 2018), (Sun, 2021), (Penka, 2011)

### **6.8.1 Princip**

Buněčná suspenze je unášena a hydrodynamickou fokusací usměrněna. Buňky jednotlivě jdoucí za sebou se následně setkávají s laserovým paprskem s předem definovanou vlnovou délkou. Při kontaktu dochází k rozptylu paprsku o buněčný povrch a zároveň k excitaci fluorochromů protilátek navázaných na buňkách cílené na specifické znaky. Emitující záření ve formě fluorescence je následně detekováno a data vyhodnocena. (Robinson, 2023), (McKinnon, 2018), (Sun, 2021), (Penka, 2011)

Forward scatter (FS) neboli rozptyl paprsku laseru v přímém směru (velikost úhlu 0-18° dle typu cytometru) určuje velikost buňky (částice). Dalším parametrem je side scatter (SS) aneb boční rozptyl (velikost úhlu 90°) vypovídající o komplexitě útvaru a poslední fluorescence. Všechny měřené parametry jsou zachyceny na detektorech, které jsou v průtokovém cytometru přítomny ve formě fotonásobičů. Ty následně převádějí světelnou energii na elektrický signál, který je následně zaznamenán a naměřená data uchována a vyhodnocena. (McKinnon, 2018), (Sun, 2021), (Penka, 2011)

Průtoková cytometrie umožňuje měřit obrovské množství analyzovaných částic se současným použitím velkého množství fluorochromů konjugovaných s protilátkami oproti fluorescenční mikroskopii. Pro imunofenotypové analýzy v současné době průtoková cytometrie nabízí použití více laserů k excitaci různorodých fluorochromů a práci s větším množstvím dat z emitovaných fluorescencí. Tento princip využívá

mnohobarevná (multicolor) průtoková cytometrie, případně polychromatická. (McKinnon, 2018), (Cossarizza, 2019), (Sun, 2021), (Penka, 2011)

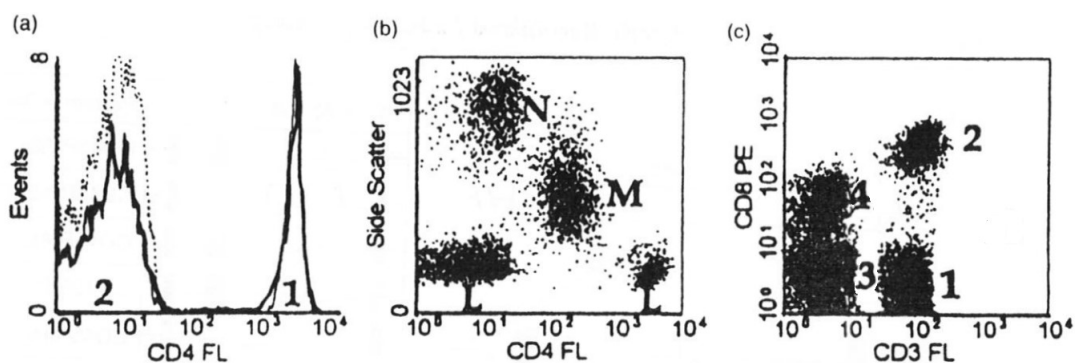
## 6.8.2 Hodnocení

Naměřené parametry (FS, SS, fluorescence) jsou zaznamenány do tzv. listmode s nejběžnějším zobrazením ve formě jednoparemetrového histogramu nebo dotplotu, který je dvouparametrový. Při analýze dat je možné vymezit populaci buněk ohraničením a následně ji podrobit komplexnější analýze, k tomu se používá tzv. gate – gejt (např. ze všech leukocytů analýzy je možné vymezit pouze lymfocyty – lymfocytární gejt). Relativní (%) případně absolutní (bb/ $\mu$ l) počty buněk, pozitivních nebo negativních dle nesoucího znaku jsou nejčastějšími výstupy z cytometrického měření. Hodnotitel by měl být velmi zkušený, protože vyhodnocení těchto výsledků je poměrně subjektivní. (Cossarizza, 2019), (Penka, 2011)

Výsledky cytometrického měření je možné zhodnotit z následujících nejobvyklejších grafů. Příkladem je stanovení lymfocytů v krevním vzorku obarvených fluoresceinem. Tato fluorescenční značená protilátka je namířena proti molekule CD4. (a) Jednoduchý histogram vykresluje podle hodnoty fluorescenční intenzity početní zastoupení buněk. Osa X udává logaritmickou stupnici pro intenzitu fluorescence a osa Y malé rozmezí fluorescenční intenzity pro počet buněk. Vrchol 1 určuje pozitivní populaci CD4+ T lymfocytů a vrchol 2 je negativní populace ostatních lymfocytů. Negativní kontrola je zde znázorněna čárkovanou křivkou (stejný vzorek obarvený fluoresceinylovanou Ab proti jinému znaku). Nenulová fluorescence odpovídá nepatrnou autofluorescenci buněk nebo protilátkami nespecificky navázanými. (b) Osa Y určuje SS – boční rozptyl proti ose X, která odpovídá intenzitě fluorescence. Parametr SS stanovuje vnitřní strukturu buněk (granularitu). V grafu je možné vidět tři druhy leukocytů. Pod písmenem L – lymfocyty, M – monocyty a N – neutrofilů. Body vyobrazené v grafu odpovídají jednotlivým buňkám. Pozitivní populací jsou zde T lymfocyty nesoucí znak CD4, slabě pozitivní můžeme také vyhodnotit populaci monocytů a ostatní buňky jsou vyhodnoceny jako CD4-. V grafu není vyobrazena negativní kontrola. (c) Dvojitě fluorescenční značení. Populace lymfocytů byla obarvena směsí dvou různých fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti odlišným CD znakům.

Pod označením FL se nachází protilátka fluorescein namířena proti CD4 a PE znamená fykoerytrin proti CD8. V logaritmické stupnici je zaznamenána fluorescenční intenzita fluoresceinu na ose X a na ose Y je stejně zaznamenána fluorescenční intenzita pro fykoerytrin. V grafu se nacházejí 3 hlavní populace, kde každým bodem je znázorněna buňka. 1. populace jsou CD4+ CD8- T lymfocyty, 2. populace CD4- CD8+ T lymfocyty, 3. populace odpovídá CD4- CD8- B lymfocytům a 4. populace CD4- a slabě pozitivních CD8 NK buňky. Dvojitým fluorescenčním značením je možné kvantitativně stanovit například expresi dvou odlišných molekul, kterou mohou mít různé subpopulace společnou. (Hořejší, 2017), (Cossarizza, 2019)

**Obrázek 1 grafické zobrazení naměřených hodnot průtokovou cytometrií**



Zdroj: Hořejší, 2017 (upraveno)

### 6.8.3 Uplatnění v imunologii

Imunologie využívá průtokovou cytometrii nejčastěji ke zjištění počtu jednotlivých lymfocytárních subpopulací. To se využívá u podezření na závažné poruchy imunity jako je například těžký kombinovaný imunodeficit (SCID). Dalším využitím je kontrola HIV pozitivních pacientů, vyšetření B lymfocytů u dětí s prokázanou hypogamaglobulinémií, sledování jedinců s intenzivní imunosupresí nebo stanovení integrinů u deficitu adherence leukocytů. Monitorace rekonstituce funkce imunity u pacientů po alogenní transplanataci krvetvorných buněk je také další indikací ke stanovení. (Bartůňková, 2011), (Madkaikar, 2019), (Santos-Argumedo, 2023)

Ačkoliv pro zjištění HLA haplotypu k transplantacím se dnes používají jako standard molekulárně genetické metody, průtokovou cytometrií je možné použít tehdy, kdy potřebujeme zjistit, zdali je pacient pozitivní nebo negativní na určitý haplotyp.

Příkladem může být stanovení HLA B27 při podezření na Bechtěrevovu chorobu (případně jiné reaktivní artritidy, uveitidy a nespecifické záněty střev) za pomoci specifických protilátek proti tomuto haplotypu. Další indikací může být stanovení HLA DR4, které se váže s revmatoidní artritidou. (Bartůňková, 2011), (Levering, 2005)

Stanovení koncentrace vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) uvnitř buněk umožňují nové fluorescenční sondy s následným měřením na průtokovém cytometru. Využití této detekce je možné použít při *in vitro* buněčné aktivaci. Indikátory iontů kalcia jsou FuraRed, Fluo-4 a Indo-1. (Wendt, 2015), (Bartůňková, 2011)

Po stimulaci kostní dřeně a vypuzení hematopoetických kmenových buněk do periferní krve je nutné zvolit jejich optimální zastoupení a čas, kdy je možné stanovit jejich odběr pro následnou transplantaci. Progenitorové kmenové buňky nesou znak CD34, které má molekulovou hmotnost 115 kDa a je možné ho prokázat u 1-4 % buněčných elementů v kostní dřeni. Za fyziologických podmínek se nachází v periférii pouze u 0,01 % buněk, pokud je však kostní dřeň stimulována, kmenové buňky jsou do periferie vyplavovány a je možný jejich sběr leukaferézou. Stanovení počtu CD34+ buněk je možná za pomoci průtokové cytometrie před i po autologní transplantaci kmenových buněk. (Bartůňková, 2011), (Pecka, 2010), (Drénou, 1996)

### **6.8.3.1 Funkční testy granulocytů**

Cytometrický funkční test oxidačního vzplanutí neboli burstest se nejčastěji používá tehdy, kdy je třeba vyloučit přítomnost vzácného imunodeficitu chronické granulomatózní choroby (CGD). Při tomto onemocnění je absence enzymu, který je nutný při tvorbě kyslíkových radikálů. Ty patří mezi hlavní nespecifické mechanismy obrany proti bakteriím, které tvoří řadu reakcí, které za přítomnosti NADPH oxidázy vytvářejí superoxidové ionty, z nichž vzniká peroxid vodíku a další reaktivní radikály. Alternativní necytometrické metody lze k detekci této choroby také použít, ale nasazení průtokové cytometrie má výhodu ve stanovení oxidačního vzplanutí na úrovni jednotlivých buněk a může odhalit i heterozygoty, kteří jsou nosiči poškozeného genu. Test spočívá ve stimulaci buněk za pomoci phorbol-myristoyl acetátem (PMA) a následném detekování oxidovaného indikátoru, například dihydrorhodaminu 123. (Bartůňková, 2011), (Pecka, 2010), (Chen, 2012), (Yu, 2021)

Funkční testy, které sledují schopnost fagocytózy na buněčné úrovni je možné stanovit metodou průtokové cytometrie v různých variantách. Mezi tyto testy patří test ingesce, mikrobicidie, a kombinované testy fagocytózy. Test ingesce využívá mikrosférické hydrofilní partikule (MSHP), případně jsou nahrazeny mikroorganismy (např. *C. albicans*). V průběhu testu jsou sledovány předem označené částice, které jsou následně buňkami fagocytů pohlceny. Kombinované testy fagocytózy spojují metody ingesce a oxidačního vzplanutí. (Bartůňková, 2011), (De Neergaard, 2023)

Aktivaci krevních bazofilů je možné stanovit průtokovou cytometrií za pomoci exprese povrchových CD molekul. Ačkoliv všechny bazofily vystavují na svém povrchu vysokoafinitní receptor FcεRI, tak exprese znaku CD63 je specifická pro jejich degranulaci, která nastává při alergické reakci. Principem tohoto testu je kultivace buněk s alergenem a následné stanovení míry exprese znaku CD63.

(Bartůňková, 2011), (Santos, 2021), (Ebo, 2008)

### **6.8.3.2 Funkční testy lymfocytů**

Stanovení intracelulárních cytokinů je cytometrickou metodou, kterou lze použít k rozdělení T lymfocytární populace na třídy Th1 a Th2 podle koncentrace IFN- $\gamma$  a IL-4. V tomto případě se jedná o zlatý standard pro rozlišení těchto subpopulací. U tohoto stanovení se používá porovnání exprese u nestimulovaných a PMA a ionoforem stimulovaných T lymfocytů. Lze použít ke stimulaci i specifické antigeny nebo alergeny a pro udržení cytokinů uvnitř buněk se používá inkubace s roztokem monesinu nebo brefeldinu A. Pokud jsou lymfocyty nestimulované, jejich produkce je velmi nízká nebo pod hranicí detekce. Metodu je možné kombinovat i se stanovením povrchových markerů. Na podobném principu je možné stanovit i další cytokiny.

(Bartůňková, 2011), (Pecka, 2010), (Mousset, 2019), (Aoki, 2000)

Test blastické transformace je možné stanovit za pomoci radioaktivity, ale s použitím průtokové cytometrie má svoji alternativu. Detekce buněk využívá DNA indikátor propidium iodid, jehož intenzita fluorescence je úměrná množství DNA v buňce. Před stanovením se sledované buňky aktivují mitogenem a následně se stanovuje pomocí propidium iodidu podíl buněčných elementů, které se nachází ve fázi buněčného cyklu S a G2/M. Je možné využít membránové barvy, které jsou zředěné

podle počtu dělení buněk od doby značení. (Bartůňková, 2011), (Pecka, 2010), (Pozarowski, 2004), (Bertuzzi, 1990)

Po inkubaci buněk lymfocytů s mitogenem, případně antigenem, je možné sledovat jejich následnou aktivaci za pomoci exprese povrchových aktivačních znaků.

Mezi mitogeny schopné aktivace lymfocytů patří fytohemaglutinin (PHA) nebo Concavalin A (ConA). Tento test je možné provádět u T i B lymfocytů a je možné sledovat aktivaci v různých časových intervalech. Časnou aktivaci reprezentuje společný znak CD69, který buňky exprimují po 24 hodinách od stimulace mitogenem. Po 48 hodinách se stanovuje pozdní aktivace, při které T lymfocyty exprimují povrchový marker CD25 a B lymfocyty CD23. Vyhodnocením testu je procentuální zastoupení aktivovaných buněk. (Pecka, 2010), (Kurnick, 1976), (Nikš, 1990)

#### **6.8.4 Uplatnění v hematologii**

K hematologickému vyšetření pomocí průtokové cytometrie se nejčastěji používá periferní krev nebo kostní dřeň. Je možné použít i jiné druhy biologického materiálu, jako například mozkomíšni mok, výpotek nebo bronchoalveolární laváž. Analýza lymfatických či tumorózních tkání je též možná, ale je potřeba je důkladně převést do buněčné suspenze. (Penka, 2011), (Pecka, 2010), (Doubek, 2022)

#### **6.8.5 Neonkologická indikace**

##### ***6.8.5.1 Analýza erytrocytů a trombocytů***

Analýza erytrocytů za pomoci průtokové cytometrie může být klíčová pro prokázání paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) jakmile je stanovena absence znaku CD55 a CD59 či jejich snížená exprese. Erytrocyty s tímto defektem jsou lyzovány komplementem. Stanovení průtokovou cytometrií míry vazby eozin-5-maleimidové kyseliny (EMA) na buňky červené řady napomáhá k diagnostice hereditární sférocytózy. Za pomoci průtokové cytometrie lze také analyzovat chimérismus erytrocytů po transplantaci krvetvorných buněk. (Penka, 2011), (Masopust, 2016), (Borowitz, 2010)



Pro prokázání chorob vycházejících z tromocytní řady je možné sledovat expresi povrchových znaků na jejich buněčném povrchu. Komplex CD41/CD61 známý také jako glykoproteinový komplex GPIIb/IIIa má sníženou expresi u Glanzmannovy trombastemie. Deficit CD42b/ CD42a/CD42d aneb GPIb/IX/V je přítomen při Bernardova-Solierova syndromu. Mnoho dalších chorob trombocytů je možné takto jednoduše stanovit cytometricky. Sledování znaku CD62P je také diagnosticky průkazné zejména pro jeho nárůst při aktivaci trombocytů, stejně tak jako analýza protilátek, které jsou namířeny proti nim. Toho využívá imonohematologie pro jejich prokázání u potransfúzních reakcích nebo u imunitní trombocytopenické purpury (ITP). (Penka, 2009), (Ignatova, 2019), (Nurden, 2006), (Beltrame, 2009), (Goubran, 2018)

#### **6.8.5.2 Analýza leukocytů**

Základním stanovením zejména pro transplantační medicínu je především detekce kmenových hematopoetických buněk CD34+. Dále se provádí cytometrické prokázání jednotlivých lymfocytárních subpopulací, které umožňuje tyto buňky přesně určit dle jejich povrchových znaků (T, B a NK). Následně je možné detekovat například množství CD4+ pomocných T lymfocytů, které mohou napomoci u HIV pozitivních pacientů ke studiu progresu nemoci. Pokud bychom se vrátili k PNH je možné také detekovat u leukocytů expresi proaerolyzinu FLAER. (Doubek, 2022), (Penka, 2011)

#### **6.8.6 Hematoonkologická indikace**

V případě hematologických malignit nabízí základní morfologické vyšetření méně informací, a tak se vyhledávají přínosnější metody. Uplatnění průtokové cytometrie v problematice hematologie je velice zásadní především díky detekci povrchových či intracelulárních buněčných antigenů. Rozpoznání patologických buněk na základě exprese povrchových znaků z důvodu odlišného fenotypového profilu buněk je klíčové ke klasifikaci choroby do liniové příslušnosti. Je tak možné rozlišit tyto patologické stavy na myelodní (většina), lymfoidní, monocytární a mnoho dalších. Případně je možné u leukemických pacientů analyzovat smíšený fenotyp a v neposlední řadě je nutné prokázat aberantně exprimované markery. (Shahrabi, 2020), (Penka, 2011)

Indikací pro imunofenotypizaci existuje mnoho a její vyžádání může být po prokázání cytopenie v různých stupních, při vysokých hodnotách leukocytů a subpopulací lymfocytů, monocytů a eosinofilů, při průkazu blastů nebo atypických buněk z periferie, kostní dřeně či jiných tělních tekutin, u vysokých hodnot plazmocytů, u monoklonální gamapatie, případně u průkazu tkáňové masy. U neutrofilie se zralými segmenty a tyčemi, bazofilie, polyklonální hypergamaglobulinemie, polycytemie nebo trombózy, tak indikace není nutná. (Porwit, 2023), (Faber, 2015), (Penka, 2011)

Stav pacientů je možné sledovat za pomoci exprese různých povrchových znaků, jejich detekce tak má prokázaný vztah na predikci nemoci u vybraných diagnóz. V jiném případě je takto provázán určitý fenotyp buněk s genetickými abnormalitami. V tomto případě je cytometrické stanovení jen orientační. Indikaci léčby využívající monoklonální protilátky je též možné stanovit díky prokázání exprese některých povrchových znaků. (Penka, 2011), (Porwit, 2023)

Sledování pacientů v remisním období je možné za pomoci průtokové cytometrie zejména díky senzitivitě této metody, která dokáže prokázat i nízké hodnoty patologických buněk po dokončení léčby. Jedná se o sledování tzv. minimální zbytkové nemoci z angličtiny minimal residual disease (MRD). Pokud bychom srovnávali průtokovou cytometrii a molekulárně biologické metody, došli bychom k závěru, že ačkoliv má nižší citlivost, tak má výhodou v nižších finančních nákladech a v aplikovatelnosti na vyšší počet patientských vyšetření. Je tak možné monitorovat léčbu a její odpověď, brzy zachytit relaps onemocnění, či jeho progresi. (Galtseva, 2018), (Penka, 2011)

## **6.9 Onkologická hematologie**

Hematologické malignity jsou definovány jako klonální choroby způsobené hemopoetickými buňkami, které mohou být zcela nezralé a odchylka je způsobena v pluripotentních nebo totipotentních kmenových buňkách anebo na určitém vývojovém stupni buněk. Pokud je přítomná změna v genetické informaci jedné buňky, která zapříčiní výhodu v jejím růstu, hovoříme tak o klonálním vývoji. Takto změněná buňka předává danou odchylku svým dceřiným buňkám a kaskádovitě tak vzniká nádorová populace buněčných elementů, která na základě

svých vlastností postupně převládá nad normální krvetvorbou. V dnešní době je již možné v řadě případů za pomoci molekulární genetiky odhalit příčinu klonálního vývoje u hematologických malignit. (Penka, 2011), (Doubek, 2022)

Nádory krvetvorné tkáně vycházejí z buněk a jsou tvořeny elementy krvetvorby – erytropoezy, leukopoezy a trombopoezy. Jedná se tak o nádory kostní dřeně a lymfatických uzlin a patří mezi hemoblastózy a hemoblastomy. Existují také myelodysplastické a preleukemické stavy, které se neřadí mezi malignity, ale mohou v ně postupně přecházet. (Mačák, 2012), (Penka 2011)

### **6.9.1 Rozdělení**

Hlavní rozdělení hematologických nádorových onemocnění je dělení na choroby myeloidní a lymfoidní. Pluripotentní kmenová buňka, směřovaná k myeloidním elementům, která za normálního stavu tvoří erytrocyty, trombocyty, monocyty a granulocyty je původcem myeloidních klonálních nemocí. Ty mohou být také způsobeny totipotentní kmenovou buňkou, která může za normálních podmínek tvořit i lymfoidní buňky, ale po vypuknutí choroby nikoliv. Z vyzrálých lymfatických buněk, případně z jejich progenitorů vychází lymfoidní nádory. Rozdělení hemopoetických nádorů je možné určit dle průběhu nemoci na stavy akutní a chronické. Choroby mohou probíhat velmi rychle, akutně, kdy po několika týdnech až měsících může neléčený jedinec zemřít nebo naopak pomalu, chronicky v horizontu let až desetiletí. Toto dělení také napovídá, zdali jsou nádorové buňky schopny či neschopny vyžrávat podle fyziologického schématu hemopoezy. Hematologické nádory je možné rozdělit například do těchto skupin. Přesněji na akutní myeloidní leukémie (AML), myeloproliferativní onemocnění, myelodysplastický syndrom (MDS), akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a lymfomy a jiné lymfoproliferativní onemocnění a mnoho dalších. (Penka, 2011), (Mačák, 2012), (Vydra, 2015), (Doubek, 2022)

Hemoblastózy neboli leukémie jsou systémové choroby a postihují celou hemopoezu, především kostní dřeň, ale také játra, slezinu a lymfatické uzliny. Nádorové elementy jsou zjistitelné v periferní krvi, netvoří solidní útvary (hemoblastomy), ale prostupují také do tkání. Leukémie se rozděluje na akutní a chronické dle průběhu nemoci. Při akutní leukémii jsou nádorové buňky reprezentovány nezralými elementy

neboli blasty, naopak u chronické leukémie se jedná o buněčné množení čítající širší zastoupení elementů a jedná se o buňky zralé. Z pohledu histogeneze je možné leukémie rozlišit na myeloidní, myelogenní, lymfocytové, lymfoblastické a mnoho dalších. (Mačák, 2012), (Penka, 2011), (Vydra, 2015)

## 6.9.2 Akutní leukémie

Akutní leukémie patří mezi maligní hematologická onemocnění a jedná se o heterogenní skupinu chorob, které je možné dělit do určitých podskupin na základě laboratorních a klinických nálezů, rozdílné prognózy a odpovědí na léčbu. Na základě těchto poznatků byla hematologie v roce 1976 ustanovena klasifikace akutních leukemií s názvem odpovídajícím národnosti tvůrců French-American-British ve zkratce FAB. Ke stanovení klasifikace sloužily nátěry periferní krve a kostní dřeně, které byly obarveny standardním hematologickým barvením podle Giemsy-Romanovského a také dalšími cytochemickými barvivy. FAB klasifikace se velice rozšířila a postupně se revidovala. Nové diagnostické metody – průtoková cytometrie, cytogenetika a molekulární biologie napomohly rozšíření vědění o akutních leukemiích i mnoho dalších nádorových chorob. V roce 2001 byla oficiálně vydána Světovou zdravotnickou organizací (WHO) klasifikace všech nádorových onemocnění v hematologii a v roce 2022 byla vydána nejnovější revize. (Penka, 2011), (Haferlach, 2014), (Mrkvová, 2024)

Podezření na výskyt některé formy akutní leukémie se odvíjí od patologického nálezu v krevním obraze. Charakteristickým markerem může být leukocytóza (případně leukopenie) nebo anemie a nízké hodnoty trombocytů. Diferenciální rozpočet leukocytů může pomoci s identifikací patologických buněk, vyplavujících se do periferní krve. U ALL jsou přítomny lymfoblasty (a neutropenie), u AML myeloblasty. Definitivní diagnózu lze potvrdit za pomoci aspirátu kostní dřeně řadou metod. Mezi ně se řadí morfoloická, imunofenotypizační, cytogenetická a molekulárně genetická stanovení, které provádí hematologická centra. Pokud je aspirát kostní dřeně nevyhovující kvůli nízké výtěžnosti (suchá punkce) nebo naředění periferní krví je možné indikovat trepanobiopsii. Pro potvrzení diagnózy akutní leukémie je stanovena hodnota blastů v kostní dřeni nebo v periferní krvi na 20 %. Ačkoliv je tato hodnota zásadní pro confirmaci akutní leukémie, není povinností toto kritérium vždy splnit, pokud je

prokázána příslušná genetická abnormalita. Kompletnost vyšetření doplňují cytogenetické a molekulárně genetické metody standardně využívající fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR). (Šálek, 2023), (Doubek, 2022)

### **6.9.2.1 AML**

AML patří mezi nádorové choroby krvetvorby s výskytem myeloidních blastů, které klonálně expandují v kostní dřeni, periferní krvi nebo v dalších tkáních. Vyznačují se svojí morfologickou, genetickou i klinickou heterogenitou, která ovlivňuje prognózu jedince. Původ nádorových buněk může být rozdílný a mohou vycházet z různých myeloidních řad nebo také ze všech současně. (Penka, 2011), (Haferlach, 2014)

Při prokázání alespoň 20 % blastů v kostní dřeni nebo periférii je možné stanovit dle ELN 2022 (European LeukemiaNet) diagnózu AML. Stanovení alespoň 10 % blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi se výjimečně udává pro AML s rekurentními genetickými aberacemi. Dle WHO klasifikace 2022 je procentuální blastické kritérium nebráno v potaz, jakmile je prokázána rekurentní genetické aberace. Jedinou podmínkou je však korelace morfologie a rekurentní genetické aberace, která rozvíjí AML. Diagnóza akutní promyelocytární leukémie (APL) se opírá o stanovení patologických promyelocytů ve zhotoveném preparátu aspirátu kostní dřene a jako potvrzení diagnózy slouží molekulárně genetický průkaz výskytu fúzního genu PML/RAR $\alpha$  nebo cytogenetické stanovení translokace t(15;17). (Mrkvová, 2024), (Sotkowski, 2023), (Doubek, 2022)

Nelze uvést přesnou příčinu vzniku AML, ale jsou prokázány vlivy, které mohou zvyšovat pravděpodobnost výskytu nemoci. Při Fanconiho anémii nebo Downově syndromu je prokázané zvýšené riziko vzniku AML, jedná se o genetické vlivy. Naopak mezi vlivy získané můžeme zařadit kontakt s radiačním zářením, různé chemikálie (např. toluen, benzen) případně cytostatika. Patologické buňky potlačují fyziologickou krvetvorbu v kostní dřeni, získávají výhodu při růstu a vývoji a je možné je detekovat i v periferní krvi. (Penka, 2011), (Haferlach, 2014)

Rozdělení AML bylo prvotně ustanoveno v sedmdesátých letech 20. století v rámci FAB klasifikace. Byly stanoveny podtypy AML M0 až M7 na základě mikroskopického

hodnocení patologických buněk. M0 s minimální myeloidní diferenciací; M1 myeloblastická bez vyzrávání; M2 myeloblastická s vyzráváním; M3 promyelocytární; M4 myelomonocytární; M5 monocytární; M6 erytrocytární leukémie; M7 megakaryocytární. Toto rozdělení AML se již nepoužívá. (Kolektiv autorů, 2013)

V revidovaném 5. vydání WHO klasifikace z roku 2022 a v ELN klasifikaci vydané v roce 2022 je AML klasifikována do těchto kategorií: AML s rekurentními genetickými aberacemi; AML/MDS s mutací TP53; AML s mutací TP53; AML/MDS s mutacemi asociovanými s myelodysplázií; AML s mutacemi asociovanými s myelodysplázií; MDS/AML s cytogenetickými abnormalitami asociovanými s myelodysplázií; AML s cytogenetickými abnormalitami asociovanými s myelodysplázií; MDS/AML jinak nespecifikováno; AML jinak nespecifikovaná. (Mrkvová, 2024), (Doubek, 2022)

### 6.9.3 MDS

MDS je definován jako skupina klonálních chorob s charakteristickými příznaky jako cytopenie, dysplázie myeloidní řady (jedna nebo více) a nefungující krvetvorba. Onemocnění vychází z hematopoetické kmenové buňky a je spojené také s abnormální proliferací, diferenciací a také apoptózou, související se zvýšenou incidencí „driver mutací“. Výskyt myelodysplastického syndromu v populaci se udává na 3-5/100 000 a se zvyšujícím se věkem riziko vzniku stoupá. U tohoto onemocnění je o poznaně vyšší riziko v přechodu do AML. Mezinárodní prognostický skórovací systém (International Prognostic scoring Systém – IPSS) stanovil doporučené meze pro cytopenii od hodnotu hemoglobinu pod 100 g/l, neutrofilní granulocyty v absolutním počtu pod  $1,8 \times 10^9/l$  a krevní destičky pod  $100 \times 10^9/l$ . Pokud je učiněn morfologický, případně cytogenetický diagnostický nález, je možné stanovit diagnózu MDS i když jsou naměřeny hodnoty krevního obrazu, které diagnostické kritérium nesplňují. Vedle dysplázie mohou být přítomny zvýšené počty myeloblastů v periferní krvi a kostní dřeni. Pokud je stanoven počet blastů vyšší než 20 %, je zřejmé, že se jedná se o akutní leukémii. (Čermák, 2023), (Penka, 2011)

#### **6.9.4 Myeloidní sarkomy**

Myeloidní sarkomy patří mezi extramedulární nádory, při kterých jsou myeloidní blasty součástí tumorózních struktur. Jedná se o vzácné onemocnění, nejčastěji spojené s AML, i když v některých vzácných případech se může vyskytovat i u neleukemických pacientů. Mohou být sarkomy myelomonocytární, monocytární, monoblastické nebo vycházející z neutrofilních elementů podle schopnosti nebo neschopnosti vyzrávání myeloidních blastů a jejich diferenciaci. Tumory složené z nezralé trilineární hematopoézy jsou velice vzácné a mohou být přítomny i erytroidní prekurzory a megakaryoblasty. Myeloidní sarkomy se mohou vyskytovat na jakémkoli místě v těle, což vede k velmi odlišným klinickým projevům. Nejvíce jsou poškozené lymfatické uzliny, dále kůže, gastrointestinální trakt, varlata a měkké tkáně. Diagnostika je náročná a opírá se o radiologii, histologii, imunofenotypizaci a molekulární analýzy. (Almond, 2017), (Doubek, 2022)

#### **6.10 Transplantace hematopoetických kmenových buněk**

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT – Hematopoetic Stem-cell Transplantation) spočívá ve fyziologickém obnovení celé krevní soustavy příjemce za pomoci znovu osídlení kostní dřeně kmenovými buňkami. Dříve se také používal termín transplantace kostní dřeně, ten je již nahrazen novou terminologií, z důvodu existence modernějších technik získávání kmenových buněk z pupečnickové krve nebo z periferní krve po stimulování dárce růstovými faktory. Z tohoto důvodu se transplantace kmenových buněk rozděluje na základní dva typy na autologní a alogenní. (Jindra, 2023), (Hořejší, 2017)

##### **6.10.1 Autologní HSCT**

Při autologní transplantaci probíhá plánovaný odběr CD34+ kmenových buněk pacienta za účelem jeho vlastní léčby. Ta probíhá na principu zničení vlastní kostní dřeně a zastavení krevní soustavy a následné obnově z původních kmenových buněk. Tato léčba je indikována u hematologických onemocnění nebo jako poslední možný léčebný postup u autoimunitních poruch (roztřesená skleróza, lupus erythematosus). Z důvodu vysokého rizika relapsu u leukemických pacientů po autologní transplantaci

krvetočných buněk se k terapii upřednostňuje spíše transplantace alogenní, kdy jsou pacientovi podány dárcovské kmenové buňky na základě shody v HLA systému.

(Bartůňková 2021), (Hořejší, 2017)

### **6.10.2 Alogenní HSCT**

Výběr vhodných dárců pro alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (allo-HSCT) zahrnuje důkladné posouzení dostupnosti a shody HLA dárce a příjemce.

Nejčastějšími dárci kmenových buněk pro transplantaci jsou sourozenci příjemců nebo HLA kompatibilní dobrovolníci z registru dárců kostní dřeně. Ačkoliv při výběru buněčného štěpu dárce je první volbou HLA identický nebo téměř identický dárce, není možné zajistit HLA shodu u všech pacientů. Zvýšená dostupnost allo-HSCT prostřednictvím využití HLA-neshodných příbuzných a nepříbuzných dárců je dnes možná díky podrobnému porozumění v HLA neshodách. (Park, 2012), (Jindra, 2023)

Štěp allo-HSCT z kostní dřeně a krvetočných buněk z periferní krve po stimulaci se významně liší co do obsahu progenitorových buněk a jejich podskupin, tak i v počtech zralých lymfocytů. Byla zjištěna zlepšená obnova imunity u příjemců alogenních štěpů z periferie ve srovnání s příjemci alogenních štěpů z kostní dřeně. Přestože se v buněčných periferních štepech nachází nižší počet lymfoidních progenitorů (zejména progenitorů B lymfocytů), jsou zde naopak ve velkém počtu zastoupeny zralé lymfocyty. Také obnova imunitních buněk probíhá rychleji po neupravených alogenních štepech než při použití metody *in vivo* nebo *ex vivo* odstranění T lymfocytů. (Abrahamsen, 2005), (Van den Brink, 2015)

### **6.10.3 Příprava před HSCT**

Dříve než je příjemci podán štěp hematopoetických kmenových buněk je nutné, aby podstoupil přípravu před transplantací, která pomůže „uvolnit“ prostor pro přihojení buněk v kostní dřeni. V případě podání alogenního štěpu je také potřeba utlumit imunitní systém příjemce, z důvodu kladného přijetí štěpu. Zničení kmenových buněk příjemce, které již nefungují správně je možné docílit celotělovým ozářením anebo farmakologicky s kombinací cytostatik, tento proces vysocedávkované chemoterapie se nazývá myeloablace. Jakmile pacient podstoupí myeloablativní režim



(abl), je nezbytné, aby dodržoval striktně sterilní prostředí do vykonání transplantace a přihojení štěpu. Do obnovení krvevotvorby má pacient nulovou hodnotu periferních leukocytů a je vystaven vysokému riziku infekce. (Jethava, 2017), (Jindra, 2023), (Hořejší, 2017)

Snažíc se rozšířit možnost použití transplantace krvevotvorných buněk i na starší pacienty a ty s lékařskými komorbiditami, byly vyvinuty režimy s redukovanou intenzitou (RIC), které nevykazují toxické účinky spojené s vysokými dávkami chemoradioterapie. RIC protokoly jsou definovány jako režimy, které nejsou určeny k eradikaci hostitelské hematopoézy, ale stále mají umožnit úplné zakořenění dárcovských kmenových buněk a zároveň dosáhnout účinku proti malignitě. Tato strategie je spojena s minimální hematopoetickou a celkovou toxicitou. I když většina RIC protokolů používá cyklosporin A (CSA) a mycophenolát mofetil (MMF) jako profylaxi proti reakci štěpu proti hostiteli, některé z nich využívají také antitymocyární globulin (ATG) nebo Campath-1H pro in vivo depleci T lymfocytů. Jednou z teoretických výhod RIC režimů je možnost lepší obnovy imunitního systému po transplantaci díky menšímu poškození thymu, což umožňuje regeneraci naivních T lymfocytů. Použití RIC režimů u pacientů starších 60 let může být spjaté s vyšším výskytem NRM – nerelapsovou mortalitou. (Jiménez, 2007), (Vydra, 2021), (Vela-Ojeda, 2004)

#### **6.10.4 HSCT jako léčba**

Kmenové buňky se následně používají pro léčbu některých hemopoetických dysfunkcí, kterou mohou být původem vrozené i získané. Další indikací k transplantaci mohou být myeloidní nebo lymfoidní imunodeficience, a především všechny vážné formy SCID, u kterých je prokázán defekt krvevotvorby na úrovni kmenových buněk. Dále u některých vrozených poruch metabolismu (např. tesaurismózy) a různé typy leukémií. (Hořejší, 2017), (Bartůňková 2021), (Hoang, 2022)

allo-HSCT zůstává jedinou nejefektivnější léčebnou možností pro pacienty s myeloidními malignitami, jako jsou MDS a AML. Na úspěchu alogenní HSCT u pacientů s MDS se výrazně podílejí prognostické markery jako početní zastoupení blastů, skórovací systém IPSS-R a také cytogenetický nále. Bylo prokázáno, že vysoké hodnoty laktát dehydrogenázy (LDH) v krvi před transplantací jsou výrazně spjaty

s relapsem nemoci a ovlivňují tak celkové přežití jedince. (Bělohávková, 2021), (Šťastná Marková, 2021), (Yang, 2022)

Z analýzy dat Českých hematologických center vyplývá, že 50,9 % pacientům s AML byla v jakémkoliv časovém období v průběhu léčby provedena alogenní HSCT. Přežití těchto pacientů v 5 letech od transplantace se dále odvíjí od cytogenetického rizika jedinců a s jeho závažností klesá (riziko nízké – 69 %, střední 47 % a vysoké 21 %). V průměru se 5 let dožívá 44 % transplantovaných. (Semerád, 2021)

U pacientů trpících myeloidním sarkomem alogenní transplantace krvetvorných buněk prokázala slibné výsledky, zejména u těch, kteří dosáhli kompletní remise pomocí režimů podobných AML. (Almond, 2017)

Provedení transplantace krvetvorných buněk je velice jednoduché a suspenzi dárcovských buněk je možné podat příjemci intravenózně. Z periferní krve se hematopoetické buňky přesouvají do kostní dřeně, kde nastává jejich usídlení. O tzv. engraftmentu neboli připojení hovoříme tehdy, jakmile buňky splní svou funkci v kostní dřeni a nastává krvetvorba. Do 3 týdnů po transplantaci by měla být detekovatelná tvorba základních skupin krvetvorby – červené řady, následně granulocytů a krevních destiček a nakonec lymfocytů. (Hořejší, 2017), (Ogonek, 2016)

### **6.10.5 Rekonstituce imunitního systému po HSCT**

Přirozená imunita se obnovuje v prvních měsících po HSCT. Nejprve se tvoří monocyty, následované granulocyty a NK buňkami, naopak adaptivní imunita, která zahrnuje T lymfocyty a B lymfocyty potřebuje 1-2 roky na plnou obnovu a u značného počtu pacientů může přetrvávat i déle. Obnova T lymfocytů po transplantaci může probíhat dvěma mechanismy. Prvním možným způsobem je přežití a periferní expanzí infuzních donorových (paměťových) T lymfocytů. Druhý způsob zahrnuje de novo generaci donorových T lymfocytů v thymu z hematopoetických progenitorů dárce. Thymus je primárním místem vývoje T lymfocytů. Lymfoidní progenitory putují z kostní dřeně do thymu a podstupují komplexní procesy, včetně proliferace, diferenciací a pozitivní a negativní selekce, což vede k exportu funkčních CD4 a CD8 T lymfocytů. Thymopoéza probíhá jako vzájemná komunikace mezi rozvíjejícími se thymocyty a dendritickými buňkami, makrofágy, fibroblasty, endotelovými buňkami, B lymfocyty a buňkami

thymického epitelu (TEC). V prvních měsících po HSCT je periferní expanze donorových T lymfocytů dominantním mechanismem pro jejich obnovu (s výjimkou příjemců T-buněčně redukováného alogenního štěpu) a vede zejména ke klonální expanzi CD8+ T lymfocytů. (van den Brink, 2015), (Yang, 2022), (Ogonek, 2016)

Nicméně relaps a reakce štěpu proti hostiteli stále ovlivňují přežití pacientů podstupujících allo-HSCT, a je třeba použít vhodnější terapeutické strategie ve všech fázích transplantace k prevenci těchto nepříznivých událostí. Jakmile kmenové buňky dárce nepřijme organismus příjemce dochází k odvržení štěpu neboli rejekci a obnovená krvetvorba je následně zastavena. Mezi největší imunologickou komplikací transplantací krvetvorných buněk patří právě již zmiňovaná reakce štěpu proti hostiteli. (van den Brink, 2015), (Yang, 2022), (Kuball, 2019)

### **6.10.6 Reakce štěpu proti hostiteli**

Dárcovské T lymfocyty přítomny ve štěpu hematopoetických kmenových buněk mohou vyhodnotit tkáňové antigeny příjemce jako cizí a spustit tak obranou reakci. Tento nežádoucí stav se nazývá reakce štěpu proti hostiteli neboli GvH (Graft versus Host). Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk není jedinou příčinou vyvolávající GvH, ale může také nastat při krevní transfúzi imunodeficientnímu pacientovi. Tato reakce byla pojmenována jako TA-GvH (Transfusion Associated Graft versus Host) a stejně jako u GvH je způsobena proliferujícími lymfocyty dárce. Jako prevence vzniku TA-GvH se používá ozáření krevní konzervy. Deleukotizace transfúzního přípravku není dostatečně účinná a pacienta před vznikem TA-GvH neochrání. (Řeháček, 2013), (Penka, 2012)

#### **6.10.6.1 Akutní reakce štěpu proti hostiteli**

Jakmile nastává GvH u transplantovaného jedince v řádu dnů až týdnů od zákroku hovoříme o akutní GvH. Četnost výskytu akutní GvH po transplantaci krvetvorných buněk se pohybuje mezi 30 až 60 % a na jejím vzniku se podílejí cytokinové interakce. Postiženy jsou zejména játra, kůže a sliznice střev, dle míry závažnosti se GvH dělí do čtyř kategorií. Prevencí vzniku této reakce je především výběr co nejbližší geneticky

shodného dárce, nepřítomnost T lymfocytů ve štěpu a nasazení efektivní imunosuprese. (Hořejší, 2017), (Řeháček, 2013), (Aladağ, 2020)

#### **6.10.6.2 Chronická reakce štěpu proti hostiteli**

Chronická GvH u pacientů po transplantaci kmenových buněk nevzniká časně po transplantaci, ale v časovém intervalu několika měsíců až let. Četnost výskytu chronické GvH se odhaduje na 60 až 80 % v časovém odstupu, který překračuje více než 100 dnů od alogenní transplantace. Při této pozdní reakci Th2 lymfocyty osídlují orgány a tkáně jedince, které jsou zároveň fibrotizovány pod vlivem produkovaných cytokinů. Charakteristická je i produkce aloprotilátů. Klinicky je možné zaměnit Chronickou GvH s autoimunitními chorobami jako je např. vaskulitida, sklerodermie nebo sicca syndrom. Dochází k trvalému zánětu cév, kůže, vnitřních orgánů nebo žláz, což vede k fibrotizaci, poruchám mikrocirkulace a postižení funkce orgánů a tkání. (Řeháček, 2013), (Strattan, 2021), (Hořejší, 2017)

#### **6.10.7 Reakce štěpu proti leukemickým buňkám**

T lymfocyty dárce přítomné ve štěpu hematopoetických kmenových buněk nejsou spojovány pouze s nežádoucí reakcí GvH, ale mohou být i velice nápomocné svojí reaktivitou proti zbylým leukemickým buňkám příjemce, jehož indikací k transplantaci je léčba nádorové choroby krve tvorby. GvL je spojený se zvýšeným rizikem GvH zejména z důvodu identického mechanismu těchto reakcí. Vznik pozitivní GvL reakce nebo negativní GvH závisí na přítomnosti dárcovských T lymfocytů ve štěpu, jejich absence za pomoci CD34+ selekce však zajišťuje prevenci vzniku GvH, ale opoždí imunitní rekonstituci a také zvyšuje riziko relapsu leukemického onemocnění. Řešení v moderní transplantologii je snaha o oddělení těchto dvou reakcí transplantací štěpu bez T lymfocytů a následné podání malého množství T lymfocytů až po přihojení kostní dřeně. T lymfocyty vycházející z obnovené krve tvorby se učí toleranci v thymu vůči tkáním příjemce a T lymfocyty dárce plní svojí GvL funkci (provázenou i určitým rizikem reakce typu GvH). Další alternativou je cílená deplece určitých subpopulací T lymfocytů (CD8+, NAIVE CD45RA+, a dalších) za účelem snížení aloreaktivity. Po proběhlé cílené depleci přetrvávají ve štěpu jiné buněčné subtypy, mezi které patří například NK buňky,

což napomáhá snazší imunitní rekonstituci. Při relapsu onemocnění je možné použít infuze dárcovských lymfocytů (DLI) jako nescifickou buněčnou imunoterapii. Ta se používá ve zvyšujících se dávkách, z důvodu snahy předejít možnému riziku vzniku GvH. (Lysák, 2021), (Chiad, 2023), (Hořejší, 2017)

Mezi nové terapeutické možnosti by mohlo být využití epigenetických látek, jako jsou hypomethylační látky (HMA) s cílem snížit riziko relapsu prostřednictvím epigenetické modulace, což je zvláště efektivní zejména u pacientů s AML s nevýhodnými mutacemi v epigenetických regulátorech. Navíc jsou epigenetické látky považovány i za profylaktické metody proti GvH bez zrušení efektu GvL. Proto může kombinace epigenetické terapie a HSCT optimalizovat proces transplantace a předejít selhání léčby. (Yang, 2022)

## **7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1 Výzkumné otázky**

1. Jaký je průběh rekonstituce lymfocytů v prvním roce po allo-HSCT?
2. Existuje vliv věku na rekonstituci lymfocytů v prvním roce po allo-HSCT?
3. Má přípravný režim vliv na rekonstituci lymfocytů v prvním roce po allo-HSCT?

### **7.2 Charakteristika sledovaného souboru**

Výzkum byl zpracován z 65 výsledků patientských vzorků poskytnutých ÚKIA FN HK z období 2017-2021. Výběrový soubor obsahoval pacienty s hematologickou diagnózou AML, MDS nebo myelosarkomu, kterým byla indikována allo-HSCT a úspěšně ji podstoupili. U pacientů byly naměřeny hodnoty lymfocytárních subpopulací před provedením allo-HSCT v tzv. nultém měsíci (0M) a po dobu jednoho roku byla sledována rekonstituce lymfocytů v časových intervalech: ve třetím měsíci (3M), v šestém měsíci (6M), v devátém měsíci (9M) a v jednom roce (1R).

Soubor 0M obsahoval 26 stanovení patientských vzorků čítající 12 mužů a 14 žen ve věkovém rozmezí od 23 do 68 let. Hematoonkologické diagnózy v souboru zahrnovaly 21 pacientů s AML, 4 s MDS a 1 pacienta s myelosarkomem. Hodnoty byly naměřeny v letech 2017-2020.

Soubor 3M obsahoval 8 stanovení patientských vzorků čítající 3 muže a 5 žen ve věkovém rozmezí od 63 do 67 let. Hematoonkologické diagnózy v souboru zahrnovaly 6 pacientů s AML a 1 pacienta s MDS a s myelosarkomem. Hodnoty byly naměřeny v letech 2018-2019.

Soubor 6M obsahoval 11 stanovení patientských vzorků čítající 6 mužů a 5 žen ve věkovém rozmezí od 31 do 66 let. Hematoonkologické diagnózy v souboru zahrnovaly 10 pacientů s AML a 1 pacienta s MDS. Hodnoty byly naměřeny letech 2018-2020.

Soubor 9M obsahoval 6 stanovení patientských vzorků čítající 2 muže a 4 ženy ve věkovém rozmezí od 24 do 69 let. Hematoonkologické diagnózy v souboru zahrnovaly 5 pacientů s AML a 1 pacienta s MDS. Hodnoty byly naměřeny v letech 2019-2021.

Soubor 1R obsahoval 14 stanovení patientských vzorků čítající 8 mužů a 6 žen ve věkovém rozmezí od 32 do 69 let. Hematoonkologické diagnózy v souboru zahrnovaly 10 pacientů s AML, 3 s MDS a 1 pacienta s myelosarkomem. Hodnoty byly naměřeny v letech 2019-2021.

Za pomoci průtokové cytometrie byla sledována u pacientů rekonstituce těchto buněčných populací: leukocyty (WBC), lymfocyty, T lymfocyty, B lymfocyty, NK buňky, CD4+ T lymfocyty, CD8+ T lymfocyty, NAIVE CD4+ T lymfocyty, CM CD4+ T lymfocyty, EM CD4+ T lymfocyty, TEMRA CD4+ T lymfocyty, RTE CD4+ T lymfocyty, NAIVE CD8+ T lymfocyty, CM CD8+ T lymfocyty, EM CD8+ T lymfocyty, TEMRA CD8+ T lymfocyty, RTE CD8+ T lymfocyty, Treg, CD39+ Treg, NAIVE B lymfocyty, NSMe B lymfocyty, DN B lymfocyty, SwMe B lymfocyty.

### **7.3 Metodická část**

Odebrané vzorky pacientů byly zpracovány a následně stanoveny na průtokovém cytometru Beckman Coulter Navios (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) v laboratoři ÚKIA FN HK. Pro vyhodnocení a interpretaci naměřených dat byl použit software Beckman Coulter Kaluza, ve kterém proběhlo gejtování sledovaných subpopulací a výsledky byly zaslány na žádající oddělení. Pro účely diplomové práce byla zpracována statistická analýza v počítačovém programu GraphPad Prism 10 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

#### **7.3.1 Odběr a zpracování vzorku**

Veškeré výsledky patientských vzorků byly odebrány na nemocničním oddělení žádajícím vyšetření a následně odeslány ke zpracování na ÚKIA FN HK. Biologickým materiálem vhodným k cytometrickému stanovení byla nesrážlivá periferní krev s protisrážlivým činidlem lithium-heparin. Příprava vzorku ke stanovení proběhla dle standardního operačního postupu

### **7.3.1.1 Pracovní postup**

Před začátkem pracovního postupu je nutné zvážit promytí biologického materiálu ke zvýšení kvality stanovovaných buněk a k eliminaci nespecifických vazeb protilátek odstraněním nežádoucích proteinů a nečistot. Prvním krokem je napipetování příslušné kombinace monoklonálních protilátek k cytometrickému stanovení podle sledovaných povrchových markerů na cílové populaci. Následuje připipetování 40 µl biologického materiálu (plná krev s antikoagulačním činidlem). Směs je potřeba homogenizovat protřepáním a inkubovat 15 min (delší inkubace nenarušuje vazbu protilátek na cílové antigeny). Inkubace by měla probíhat při pokojové teplotě a ve tmě. Následuje přidání 250 µl lyzačního roztoku a homogenizace protřepáním. Lyzace erytrocytů probíhá po dobu 10 min a je nutné tento časový interval dodržet (lyzace delší než 10 min ovlivňuje kvalitu vzorku). Po proběhlé lyzaci je přidán promývací roztok a následuje centrifugace 7 min při 300 g. Slitím je odstraněn supernatant a zbylé buňky jsou resuspendovány ve fyziologickém roztoku. Směs je připravena k měření na průtokovém cytometru.

Pracovní postup byl poskytnut ÚKIA FN HK.

### **7.3.2 Stanovení na průtokovém cytometru**

Jakmile je biologický materiál zpracován a označen příslušnými monoklonálními protilátkami namířenými proti vybraným CD znakům, přichází na řadu měření na průtokovém cytometru. ÚKIA FN HK využívá několik průtokových cytometrů, ale pro problematiku hematologických malignit a sledování rekonstitucí lymfocytů po allo-HSCT se užívá průtokový cytometr Beckman Coulter Navios.

### **7.3.3 Použité monoklonální protilátky ke stanovení**

anti-CD3 APC\_A750; anti-CD4 PB; anti-CD4 PC5.5; anti-CD8 APC; anti-CD19 PC7; anti-CD25 PE; anti-CD31 PB; anti-CD39 PC5.5; anti-CD45 KO; anti-CD45RA FITC; anti-CD127 PC7; anti-CCR7 PE (Beckman Coulter, Miami, FL, USA)

anti-CD27 FITC; anti-IgD PE (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)



### **7.3.4 Gejtovací strategie**

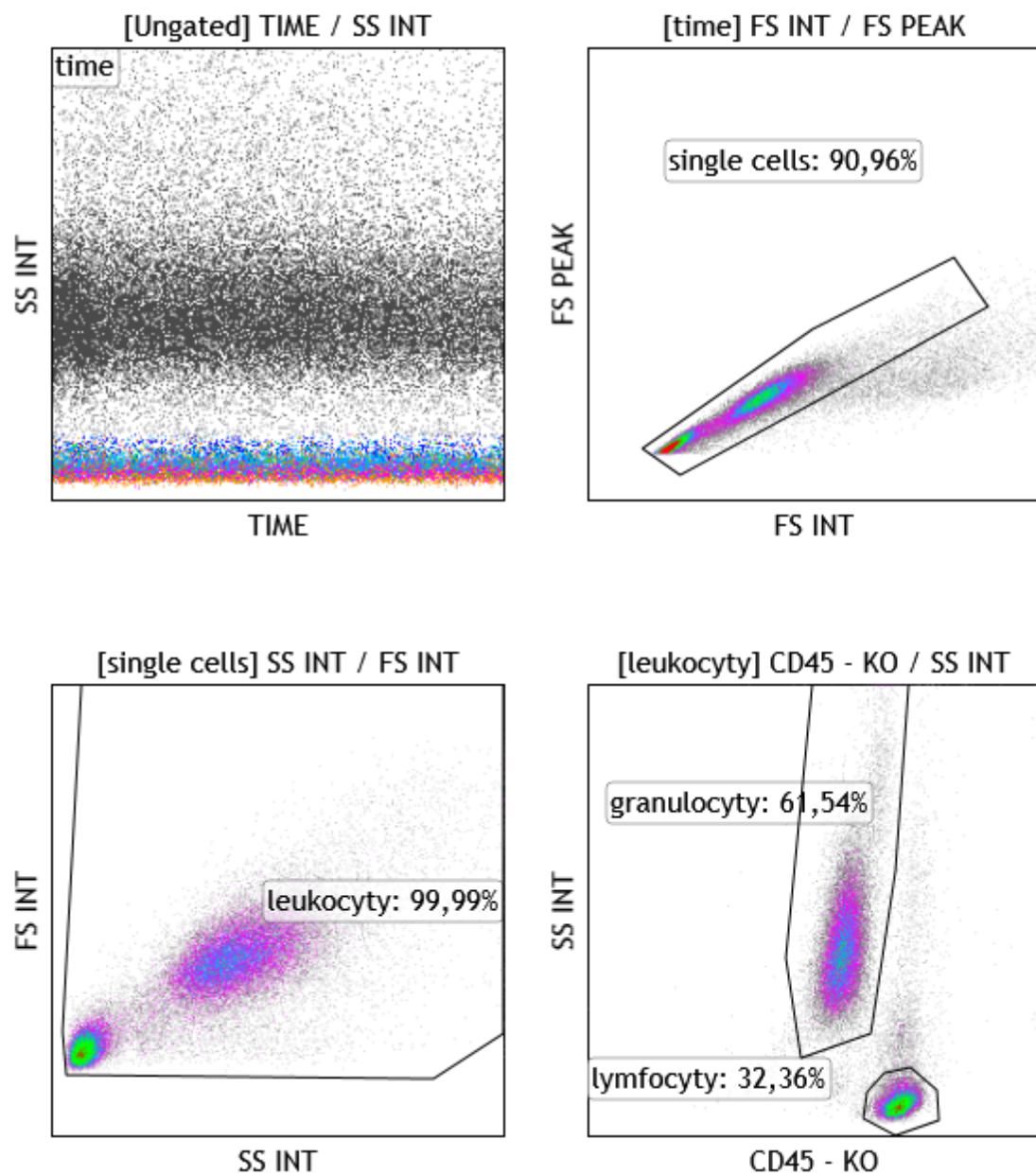
Po cytometrickém stanovení patientských vzorků byla naměřená data přenesena z průtokového cytometru do počítače, ve kterém je přítomen software sloužící k jejich interpretaci. Tento program se nazývá Kaluza, byl vyvinut společností Beckman Coulter, a kromě čtení dat z průtokového cytometru, nabízí i jejich úpravu a vyhodnocení. Ačkoliv průtokový cytometr umožňuje tvorbu gejtů při stanovení, Kaluza disponuje širokým výběrem v možnostech gejtování, které poskytují komplexní analýzu naměřených dat.

Pro účely diplomové práce byla zvolena tato gejtovací strategie:

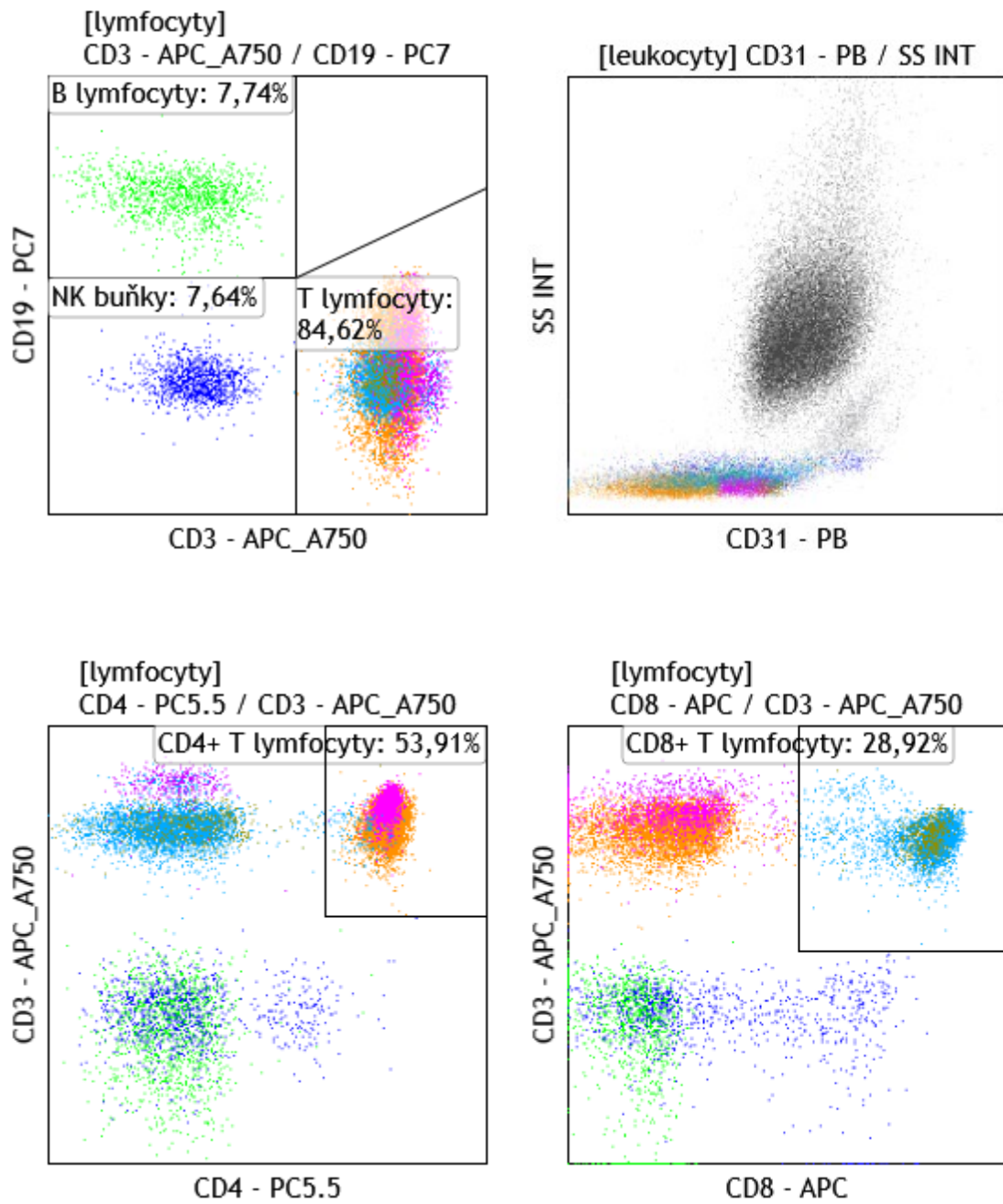
#### **7.3.4.1 T lymfocyty**

Prvním krokem gejtovací strategie T lymfocytů byla úprava signálu z průtokového cytometru a gejt jednotlivých buněk (single cells), který zajišťuje následnou analýzu bez okolního šumu. Gejt jednotlivých buněk v dot plotu při použití SS na ose X a FS na ose Y rozdělil buňky na dvě buněčné linie a společně byly pojmenovány jako celek – leukocyty. V dot plotu z leukocytů za použití monoklonální protilátky proti CD45 – KO byly tyto dvě buněčné linie určeny jako granulocyty a pro analýzu důležité lymfocyty. V následujícím dot plotu byly lymfocyty za pomoci CD3 – APC\_A750 a CD19 – PC7 rozděleny na 3 buněčné linie – T lymfocyty (CD3+, CD19-), B lymfocyty (CD3-, CD19+) a NK buňky (CD3-, CD19-). Procentuální zastoupení těchto buněčných linií bylo přepočítáno na grandparent gate (GP gejt) leukocytů. Následující dot ploty stále využívaly gejt z lymfocytů a s použitím CD4 – PC5.5 nebo CD8 – APC byly stanoveny CD4+ T lymfocyty a CD8+ T lymfocyty, jejichž procentuální zastoupení bylo též vztaženo na leukocyty. Konkrétní subsety CD4+ a CD8+ T lymfocytů byly stanoveny v dot plotech za pomoci protilátek proti CD45RA – FITC a CCR7 – PE. Vzhledem k jejich buněčné příslušnosti byly rozděleny na CD4+ nebo CD8+ NAIVE (CD45RA+, CCR7+), CM (CD45RA-, CCR7+), EM (CD45RA-, CCR7-) a TEMRA T lymfocyty (CD45RA+, CCR7-). Z NAIVE CD4+ a CD8+ T lymfocytů byly vytvořeny gejty pro určení RTE CD31+ T lymfocyty. Tyto gejty byly vytvořeny za pomoci CD31 – PB a CD3 – APC\_A750, jejichž procentuální zastoupení bylo stanoveno z GP gejtu CD4+ nebo CD8+ T lymfocytů.

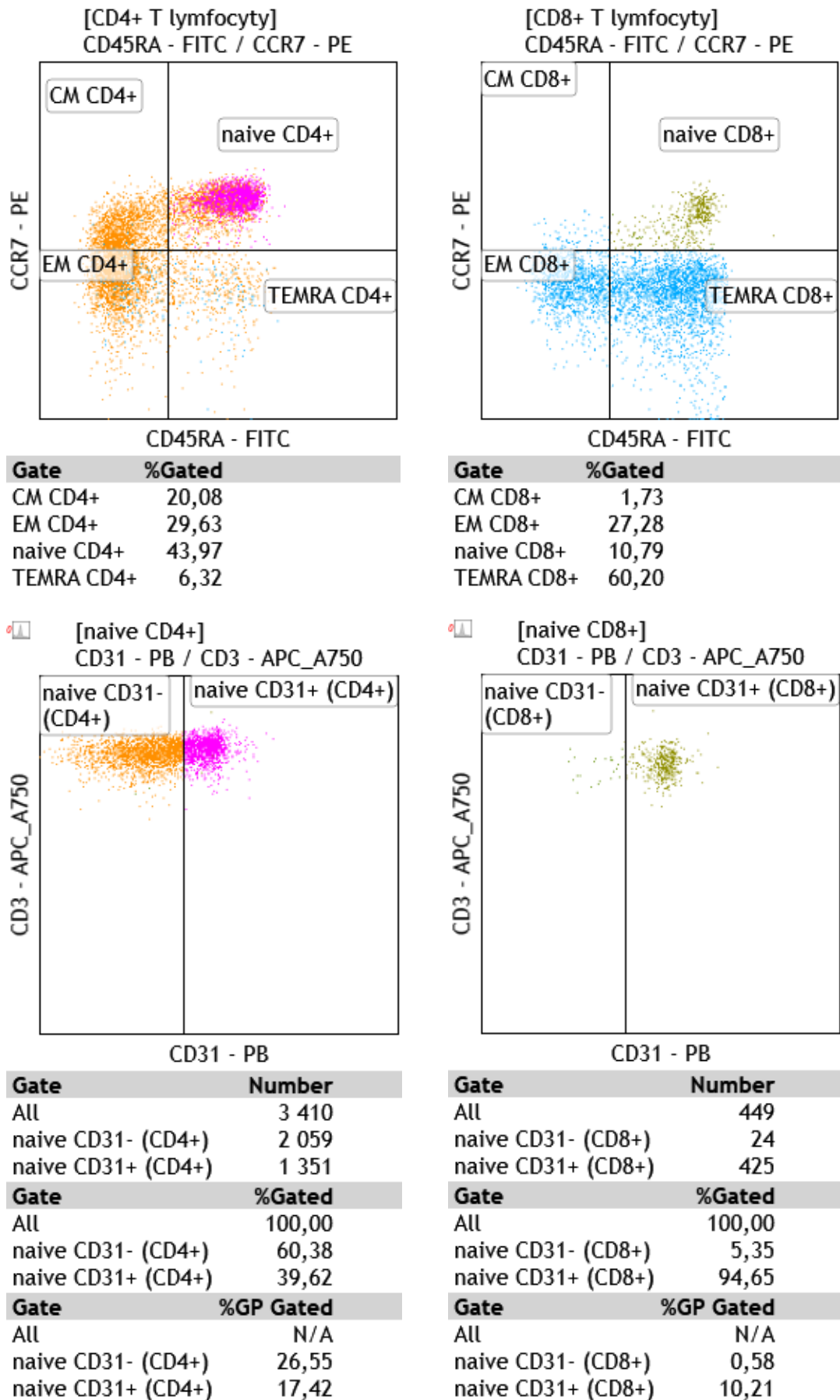
**Obrázek 2** *gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací I. část*



**Obrázek 3** gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací II. část



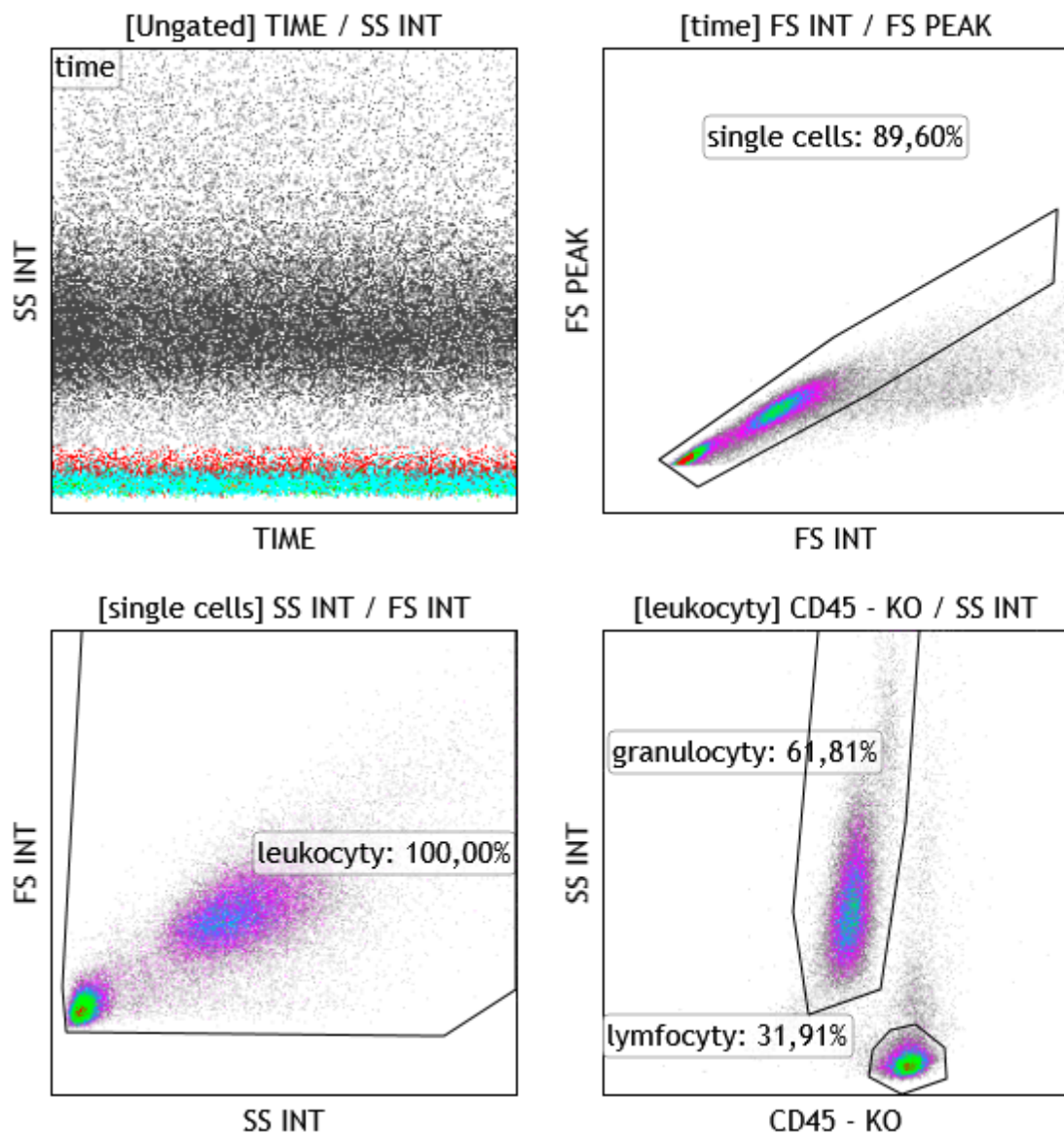
**Obrázek 4** gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací III. část



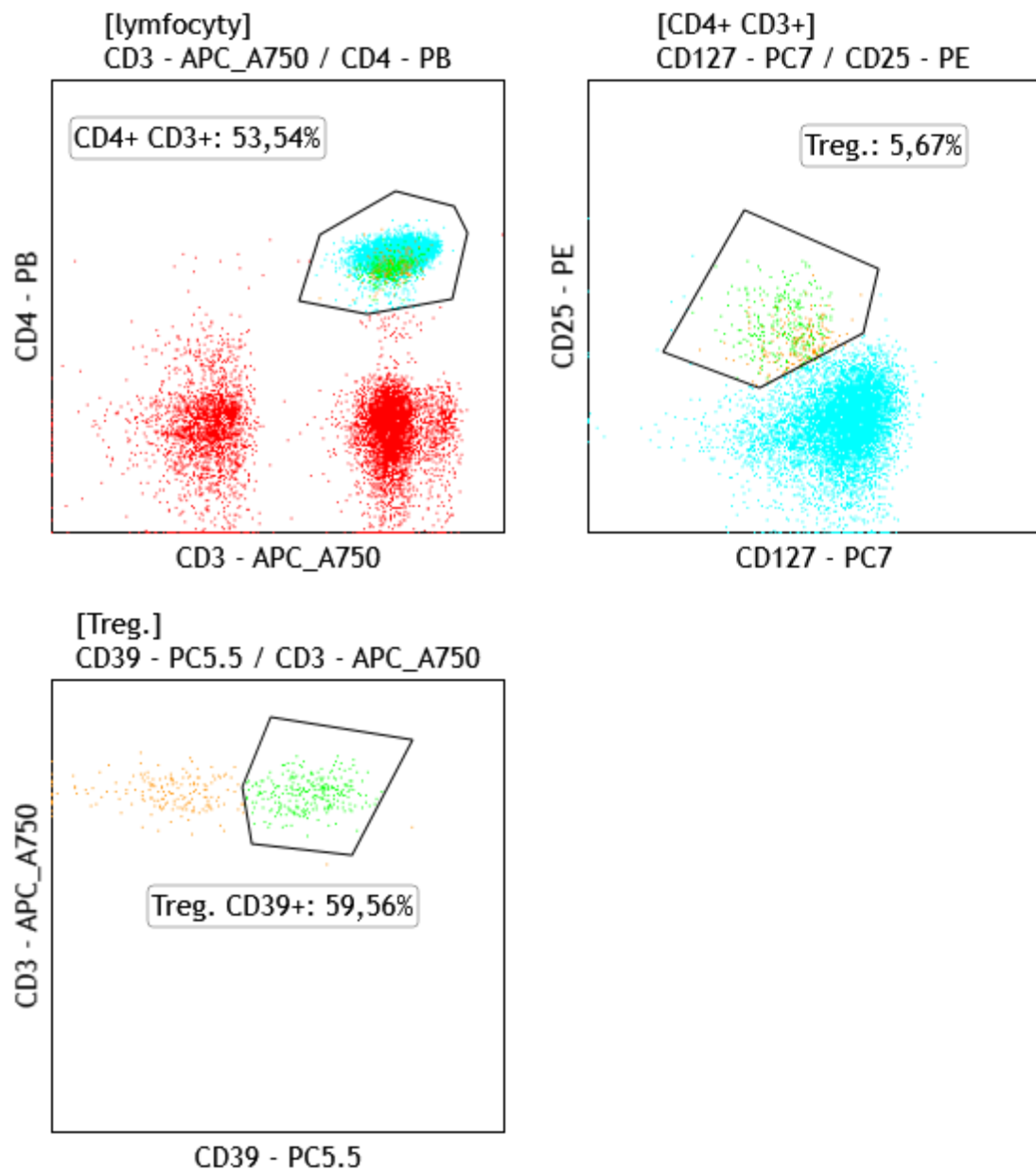
### 7.3.4.2 regulační T lymfocyty

První kroky gejtovací strategie u Treg jsou obdobné jako u T lymfocytů a zahrnují úpravu signálu z průtokového cytometru, gejt jednotlivých buněk, gejt leukocytů a gejt lymfocytů. V dot plotu vycházejícího z lymfocytů byly stanoveny CD4+ T lymfocyty za pomoci CD3 – APC\_A750 a CD4 – PB a jejich gejt byl použit v následujícím dot plotu. S využitím CD127 – PC7 a CD25 – PE bylo možné stanovit buněčnou populaci Treg (CD25+, CD127-). Z vytvořeného gejtu Treg bylo za pomoci CD39 – PC5.5 a CD3 – APC\_A750 určeno procentuální zastoupení Treg CD39+.

**Obrázek 5 gejtovací strategie regulačních T lymfocytů I. část**



**Obrázek 6** *gejtovací strategie regulačních T lymfocytů II. část*

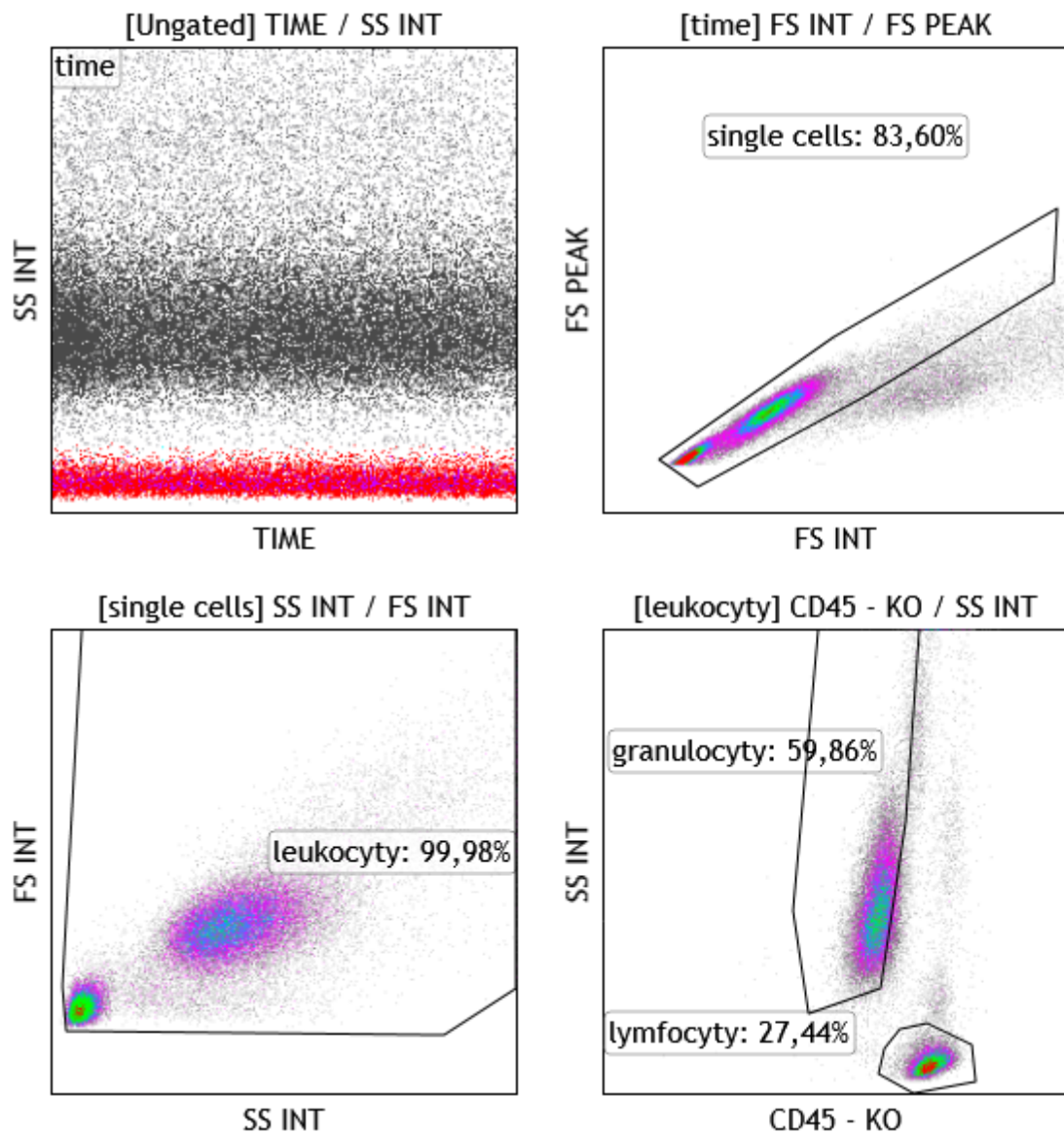




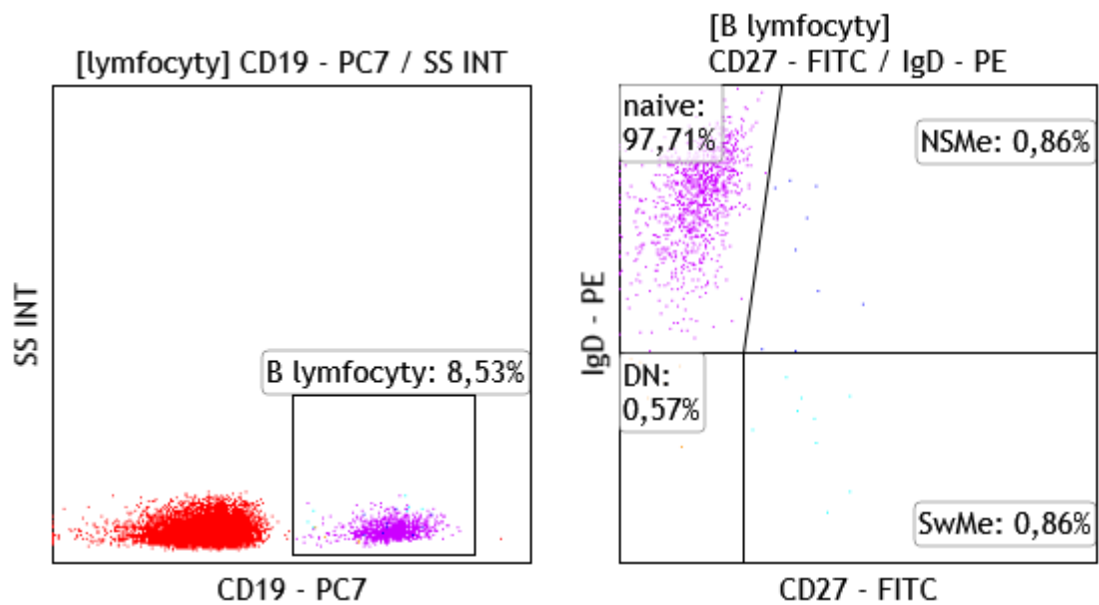
### 7.3.4.3 B lymfocyty

První kroky gejtovací strategie u B lymfocytů jsou stejné jako u T lymfocytů a Treg a zahrnují úpravu signálu z průtokového cytometru, gejt jednotlivých buněk, gejt leukocytů a gejt lymfocytů. V dot plotu vycházejícího z lymfocytů byly stanoveny B lymfocyty za pomoci CD19 – PC7 a SS a jejich gejt byl použit v následujícím dot plotu. Pro určení jednotlivých subpopulací B lymfocytů byly použity tyto monoklonální protilátky namířené proti CD27 – FITC a IgD – PE. jako CD27- s IgD byly určeny NAIVE B lymfocyty, CD27+ s IgD NSMe B lymfocyty, CD27- bez IgD DN B lymfocyty a CD27+ bez IgD představují SwMe B lymfocyty.

**Obrázek 7 gejtovací strategie B lymfocytů a jejich subpopulací I. část**



**Obrázek 8** gejtovací strategie B lymfocytů a jejich subpopulací II. část



### 7.3.5 Statistická analýza

Ke statistické analýze byl zvolen software GraphPad Prism 10 (GraphPad software, San Diego, CA, USA), ve kterém byly zpracovány grafy znázorňující rekonstituci lymfocytárních subpopulací s viditelným mediánem. Pro ověření normálního rozdělení byly při tvorbě grafů také provedeny testy normality (D'Agostino-Pearsonův omnibus test, Anderson-Darlingův test, Shapiro-Wilkův test, Kolmogorov-Smirnovův test). Při přidání faktoru věkové skupiny pacientů nebo přípravného režimu byla provedena statistická analýza Two-way ANOVA využívající blokování z důvodu předpokládaného vlivu faktoru na rekonstituci. Výsledkem této analýzy je p hodnota, která je statisticky významná, pokud její hodnota je nižší než 0,05. Veškeré zjištěné p hodnoty byly uvedeny v příslušných grafech a zhodnoceny.



### 7.3.6 Referenční meze

Naměřené hodnoty leukocytů a subpopulací lymfocytů stanovených průtokovou cytometrií byly vyhodnoceny na základě referenčních mezí v relativních (rel) a absolutních (abs) hodnotách poskytnutých ÚKIA FN HK. Referenční meze byly uvedeny do tabulek 2 a 3.

**Tabulka 2 referenční meze leukocytů a lymfocytárních populací z gejtů WBC**

název metody	rel [%]	abs [ $10^9/l$ ]
leukocyty	-	4,00 – 9,00
<b>z WBC</b>		
lymfocyty	25,00 – 45,00	1,00 – 4,00
CD3+ T lymfocyty	60,0 – 80,0	0,70 – 2,10
CD4+ T lymfocyty	35,0 – 50,0	0,50 – 1,40
CD8+ T lymfocyty	19,0 – 39,0	0,30 – 1,00
CD19+ B lymfocyty	0 – 15,0	0,13 – 0,33
NK buňky	5,0 – 23,0	0,1 – 0,6

**Tabulka 3 referenční meze gejtovaných lymfocytárních subpopulací**

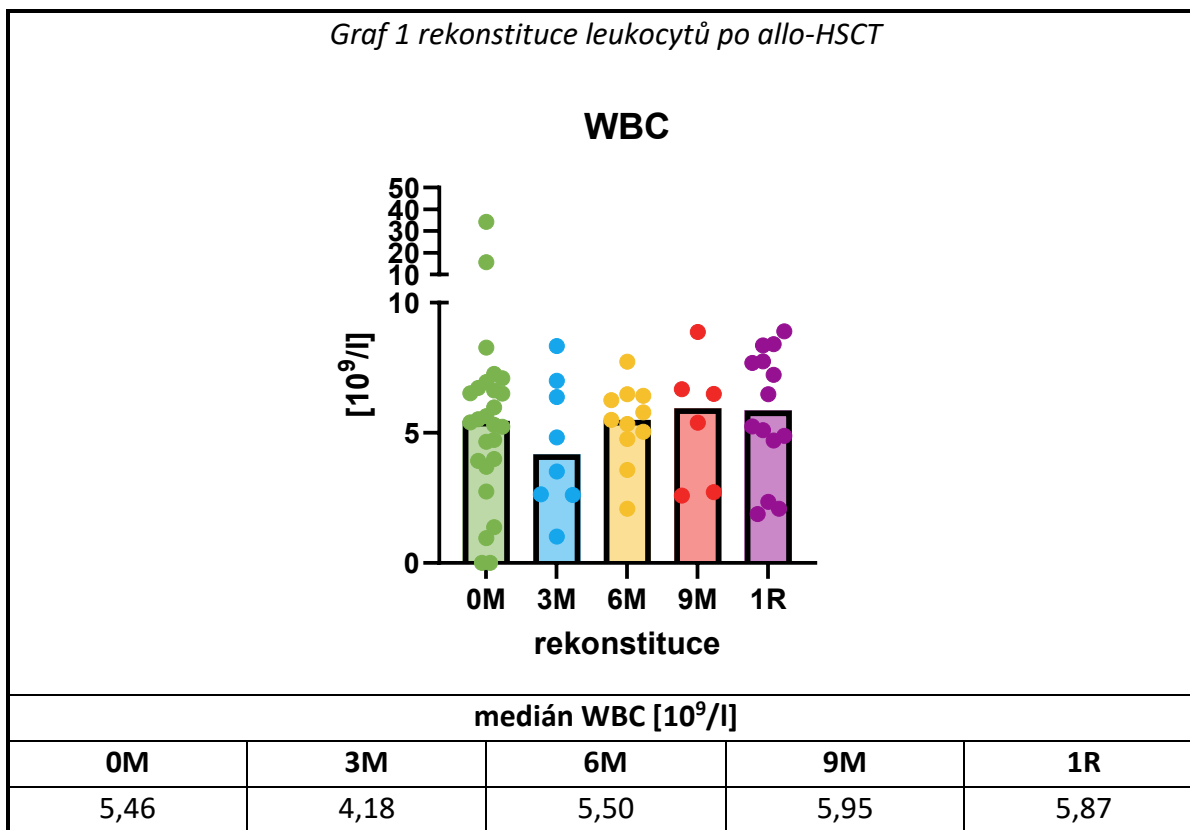
název metody	rel [%]	abs [ $10^6/l$ ]
<b>z CD3+CD4+</b>		
NAIVE CD4+	16,0 – 100,0	100,0 – 2300,0
CM CD4+	18,0 – 96,0	180,0 – 1100,0
EM CD4+	1,0 – 23,0	13,0 – 220,0
TEMRA CD4+	0,0 – 7,0	0,0 – 68,0
RTE CD4+	7,0 – 100,0	50,0 – 2400,0
Treg	4,0 – 17,0	25,0 – 180,0
<b>z Treg</b>		
Treg CD39+	-	-
<b>z CD3+CD8+</b>		
NAIVE CD8+	6,0 – 100,0	16,0 – 1000,0
CM CD8+	1,0 – 20,0	5,0 – 120,0
EM CD8+	14,0 – 98,0	40,0 – 640,0
TEMRA CD8+	7,0 – 53,0	25,0 – 280,0
RTE CD8+	-	-
<b>z CD19+</b>		
NAIVE B lymfocyty	58,0 – 72,1	112,0 – 169,0
NSMe B lymfocyty	13,4 – 21,4	22,0 – 54,0
DN B lymfocyty	2,1 – 5,3	4,0 – 13,0
SwMe B lymfocyty	9,2 – 18,9	18,0 – 40,0

## 8. VÝSLEDKY

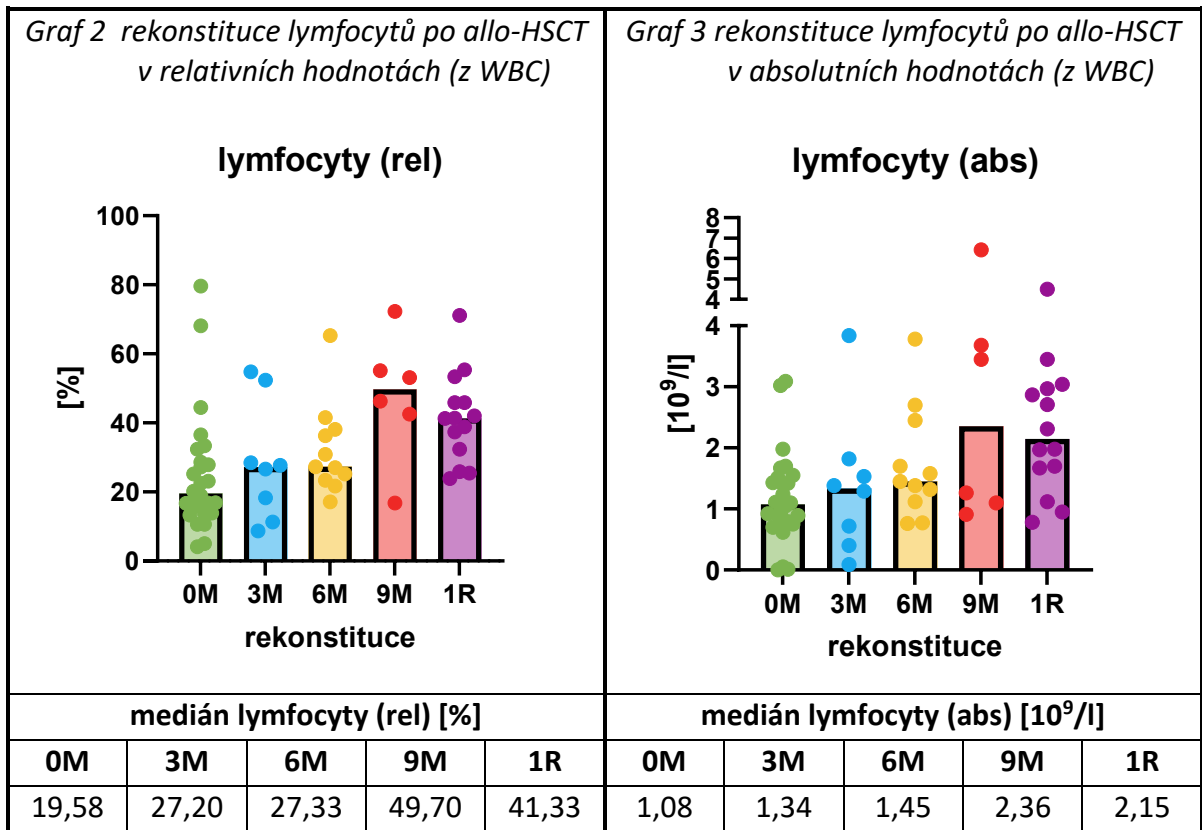
### 8.1 Rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT

Pro vizualizaci výsledků byly zvoleny sloupcové grafy, jejichž výška zobrazuje medián skupiny stanovení. V jednotlivých sloupcích jsou také vizualizovány příslušné hodnoty měření v bodech. Skupiny byly rozděleny na základě výběrového souboru pacientů a jejich vztahu k allo-HSCT. Skupina 0M, jako jediná, určuje pacienty před allo-HSCT, skupiny 3M, 6M, 9M a 1R představují časový interval v měsících a roku od proběhlé allo-HSCT. Osa X byla obecně pojmenována jako rekonstituce. Grafy byly provedeny v duplikátech z důvodu odlišných jednotek měření, které se nachází na ose Y. V prvním grafu byly zvoleny rel hodnoty, které určují procentuální zastoupení buněk daného gejtů. V druhém grafu byly použity abs hodnoty, které jsou vztaženy na počet leukocytů (WBC) pacienta a jejich počty jsou udávány v násobcích  $10^9/l$  nebo  $10^6/l$  podle stanovované buněčné subpopulace. Graf rekonstituce leukocytů po allo-HSCT byl zhotoven pouze v abs.

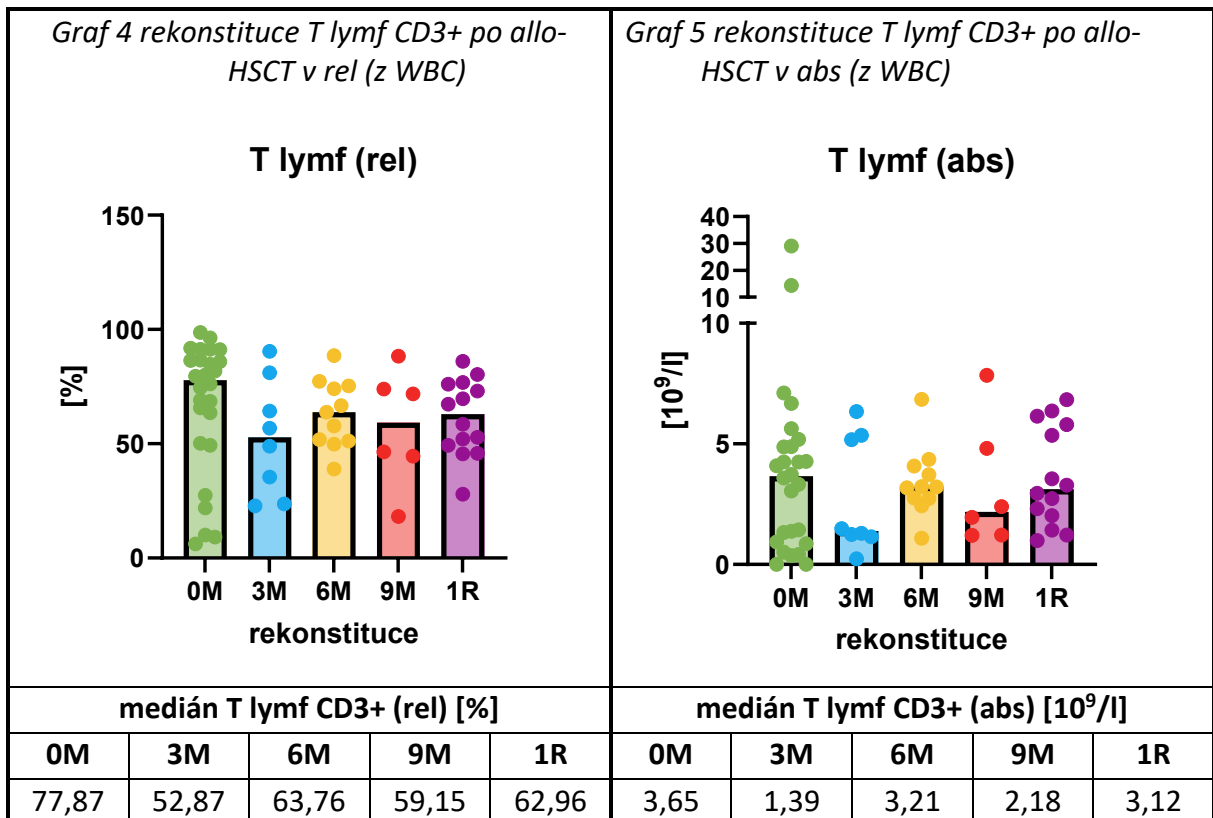
**Tabulka 4 rekonstituce leukocytů po allo-HSCT**



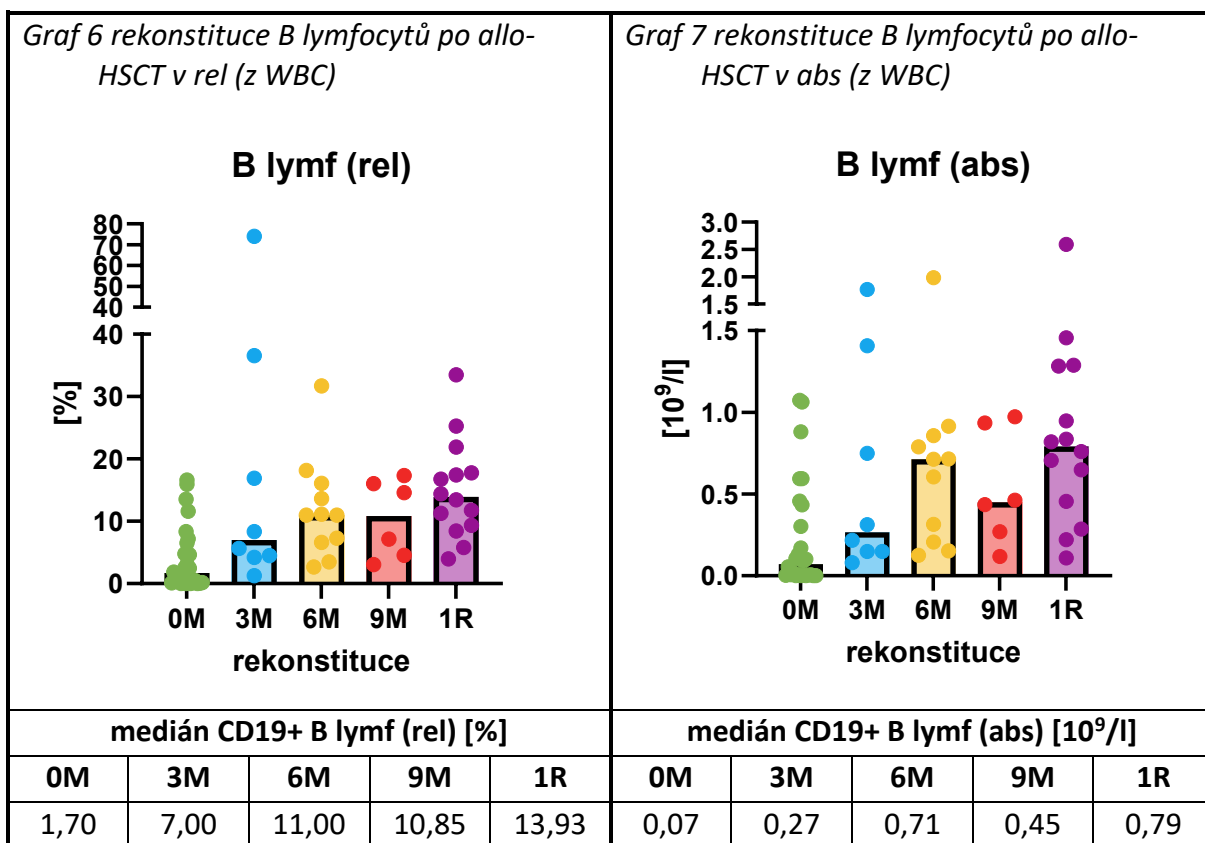
**Tabulka 5 rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT**



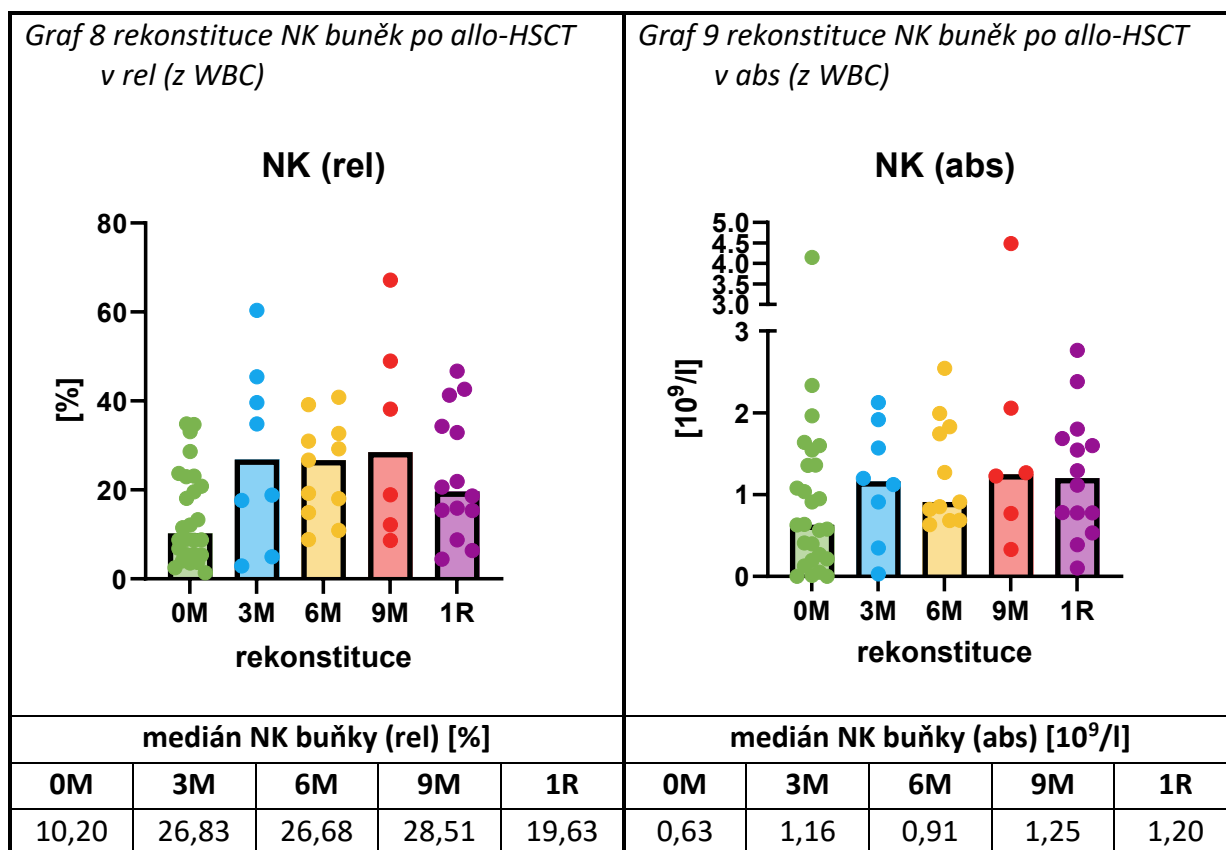
**Tabulka 6 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT**



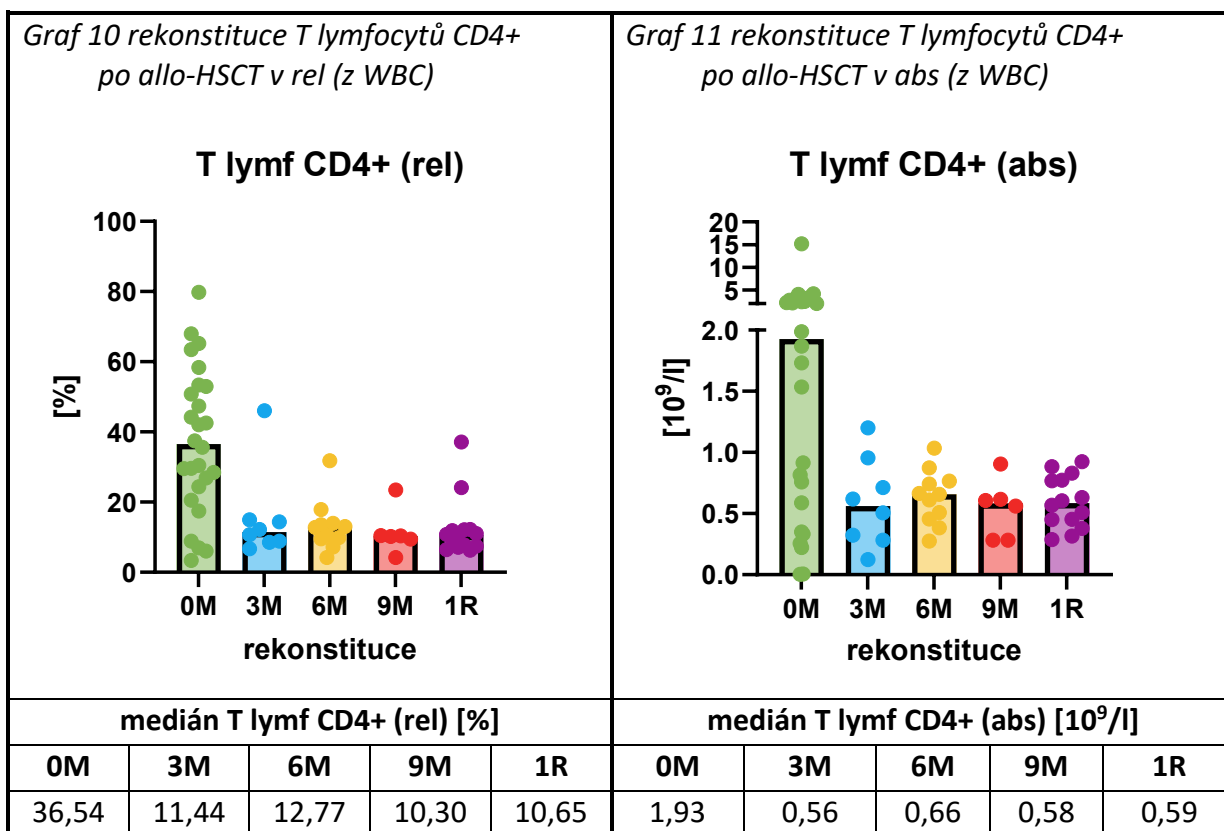
**Tabulka 7 rekonstituce B lymfocytů po allo-HSCT**



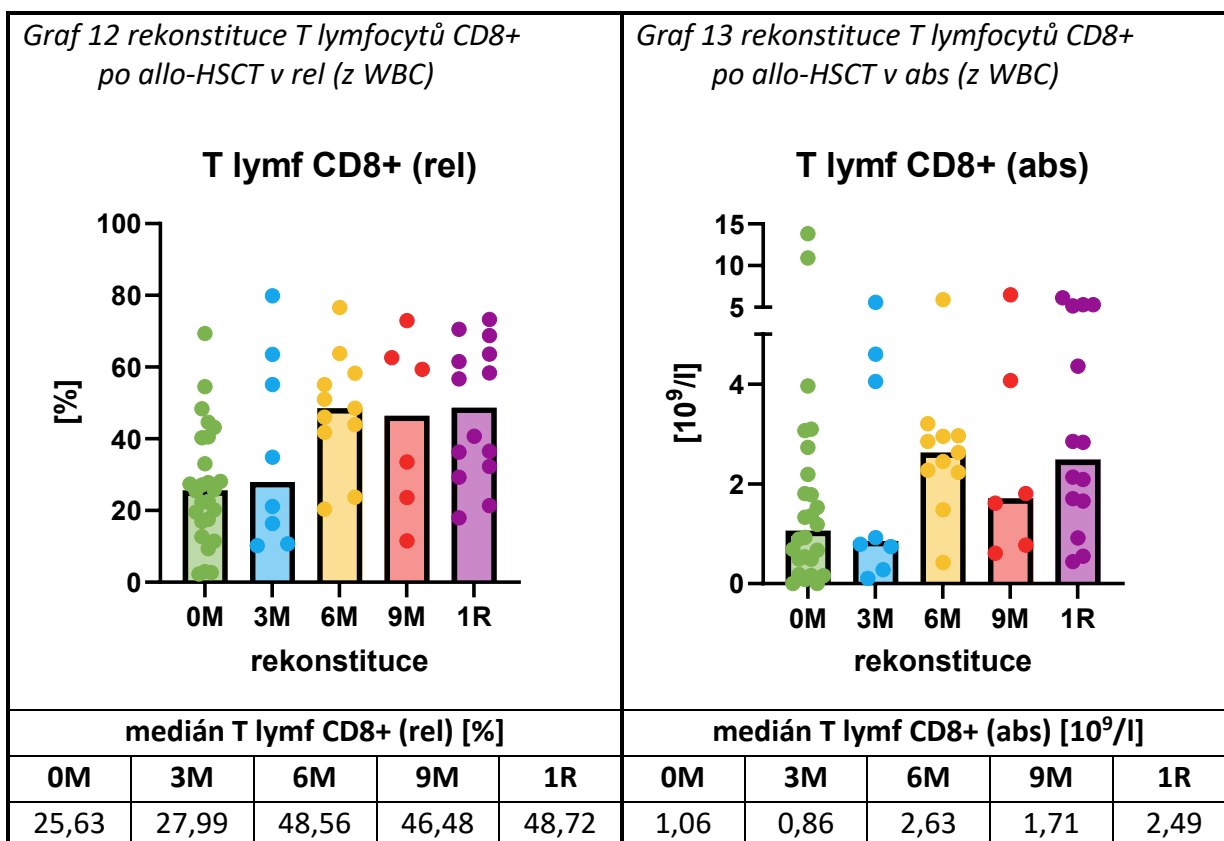
**Tabulka 8 rekonstituce NK buněk po allo-HSCT**



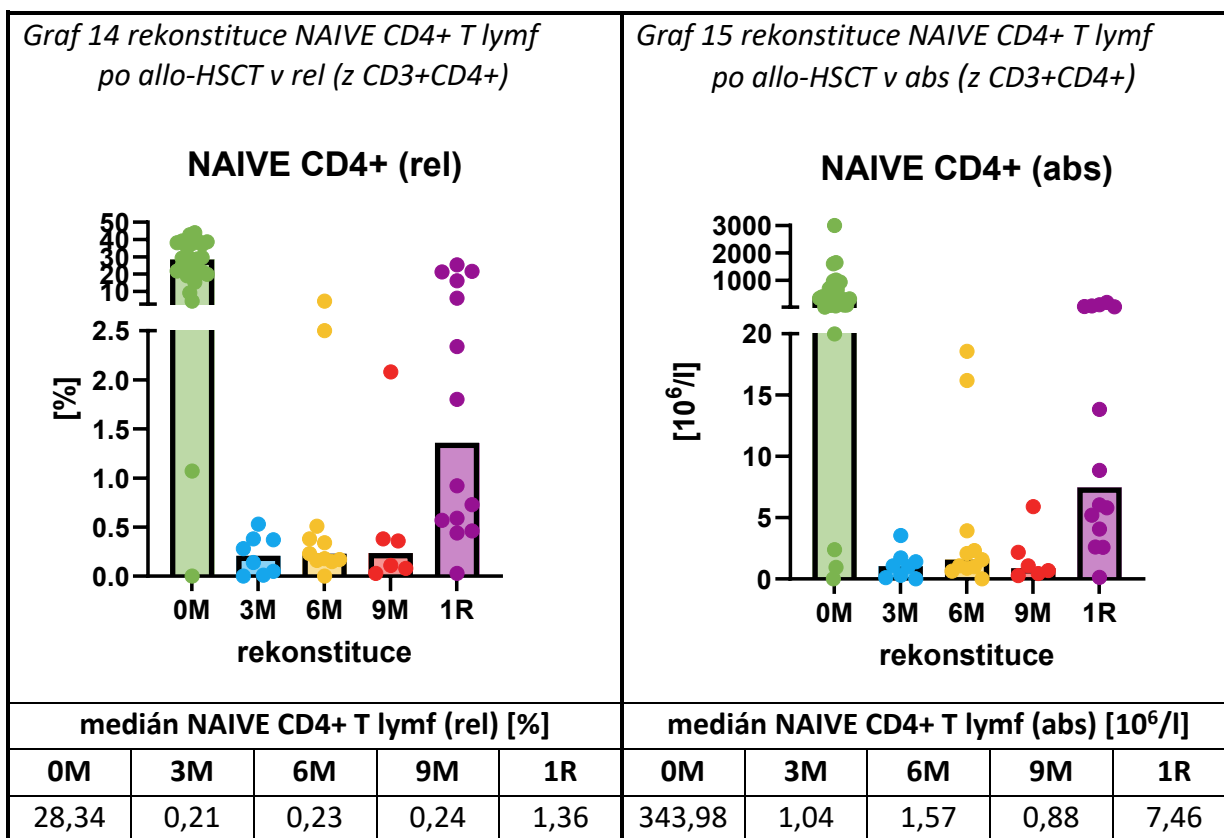
**Tabulka 9 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT**



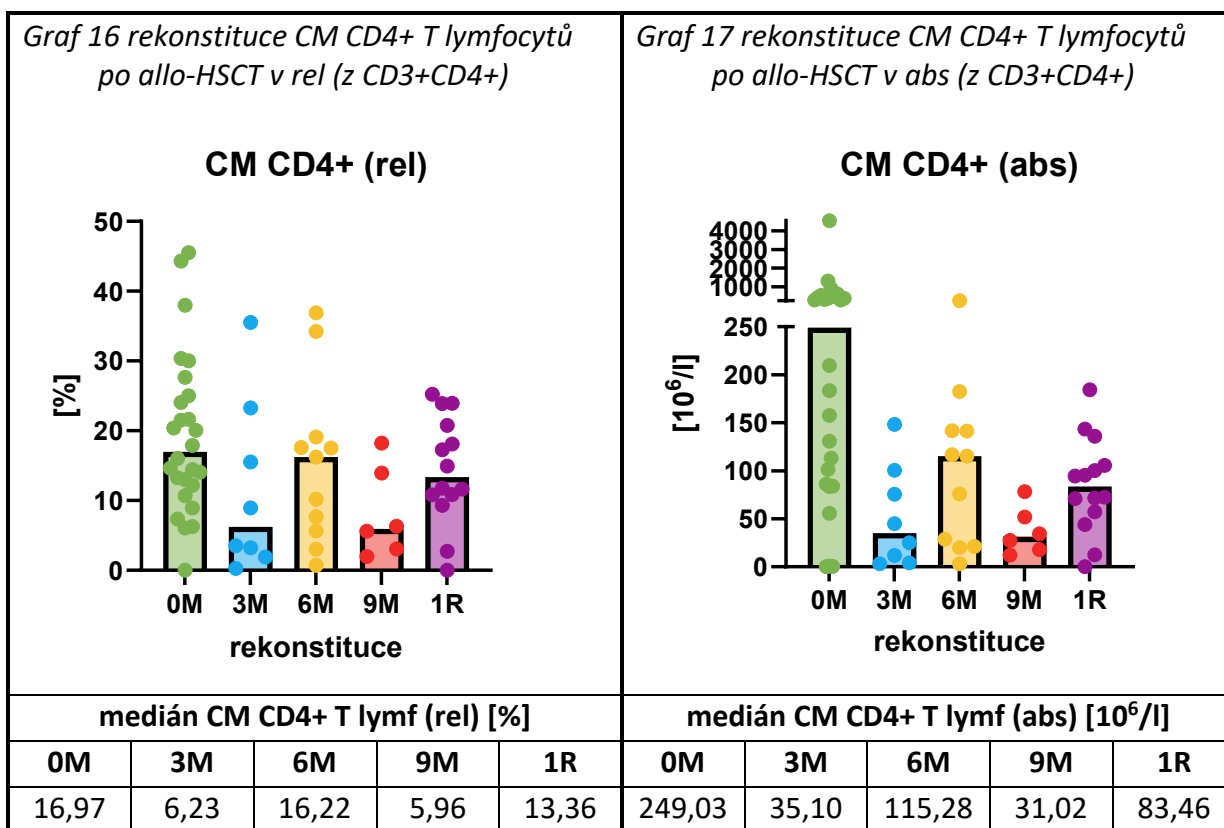
**Tabulka 10 rekonstituce T lymfocytů CD8+ po allo-HSCT**



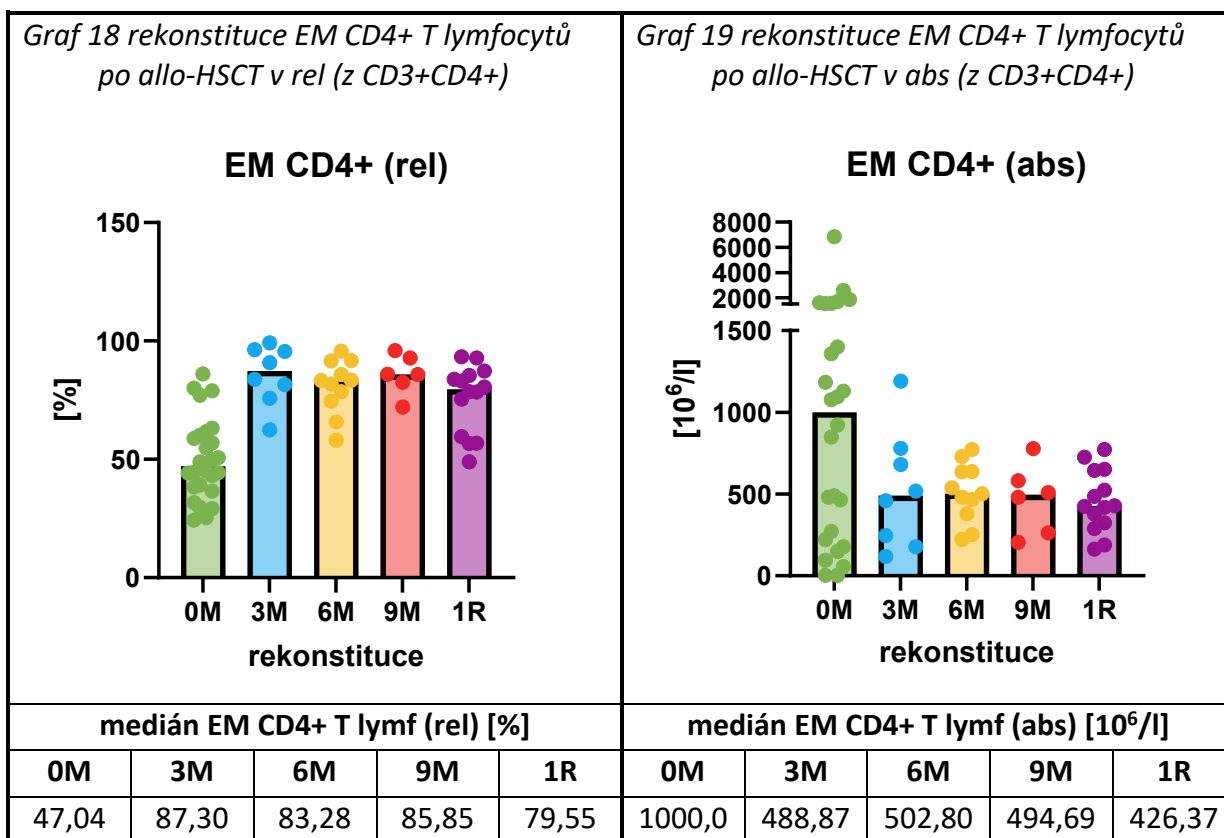
**Tabulka 11 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT**



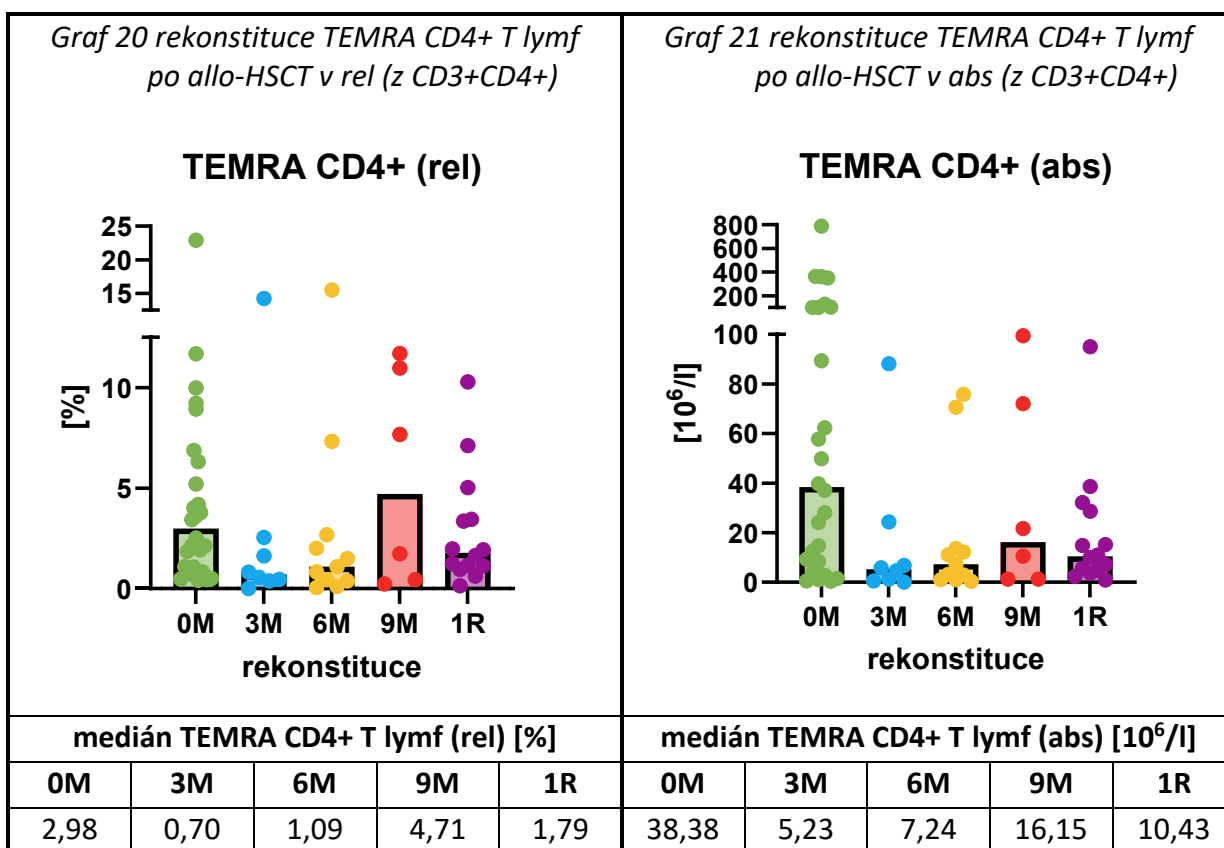
**Tabulka 12 rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT**



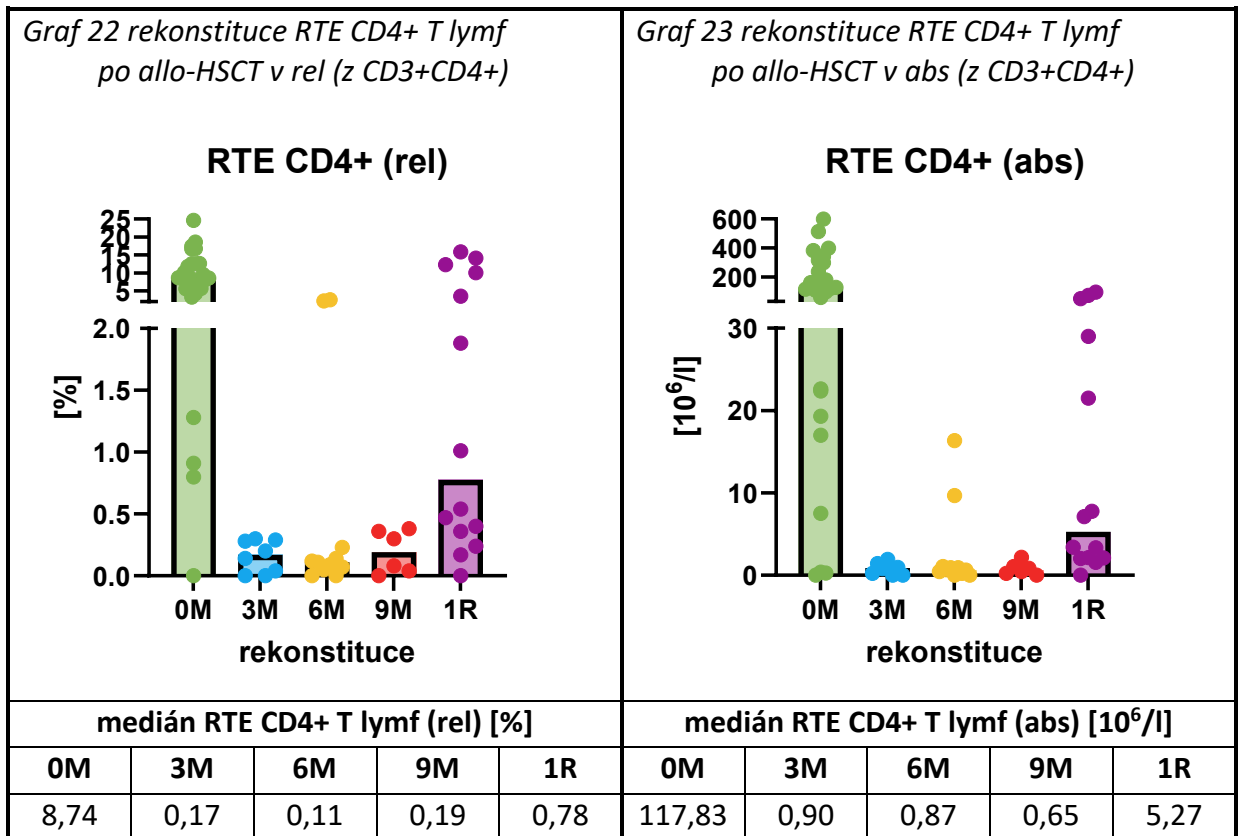
**Tabulka 13 rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT**



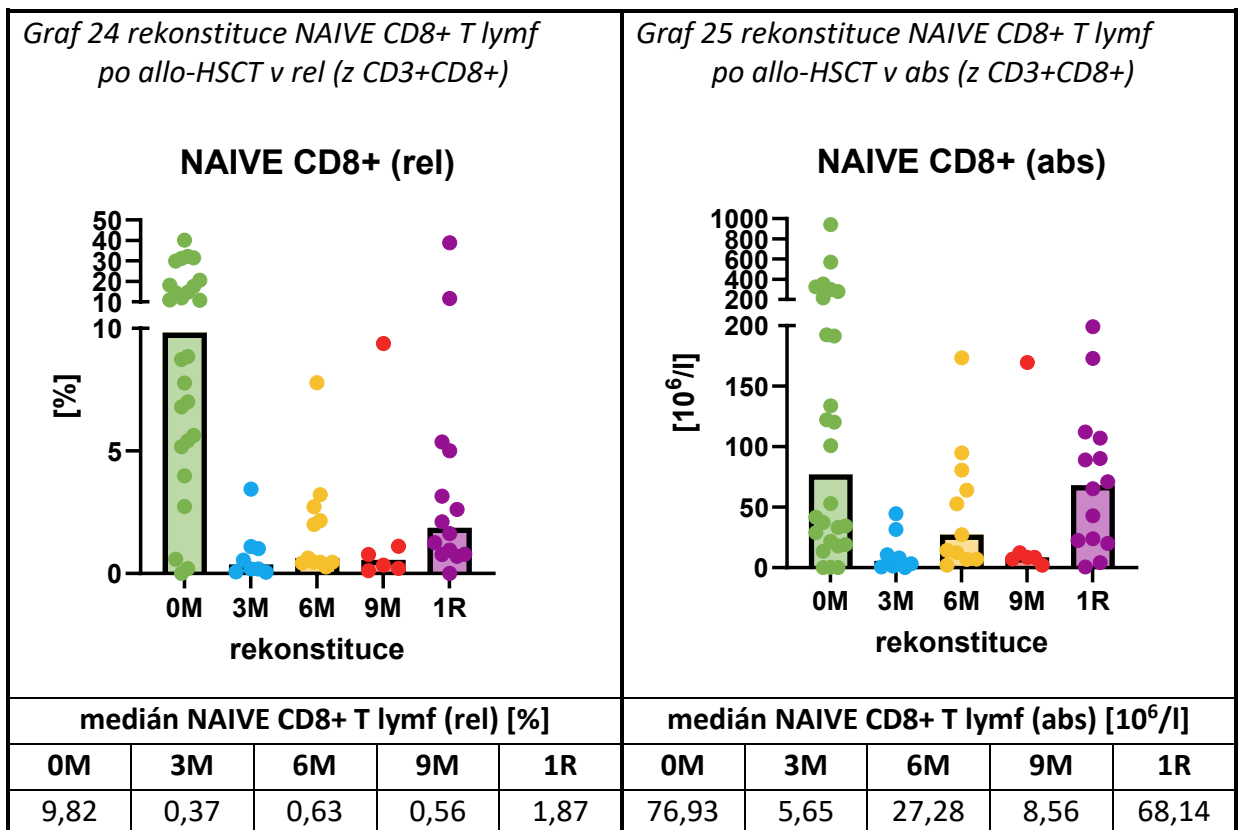
**Tabulka 14 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT**



**Tabulka 15 rekonstituce RTE CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT**

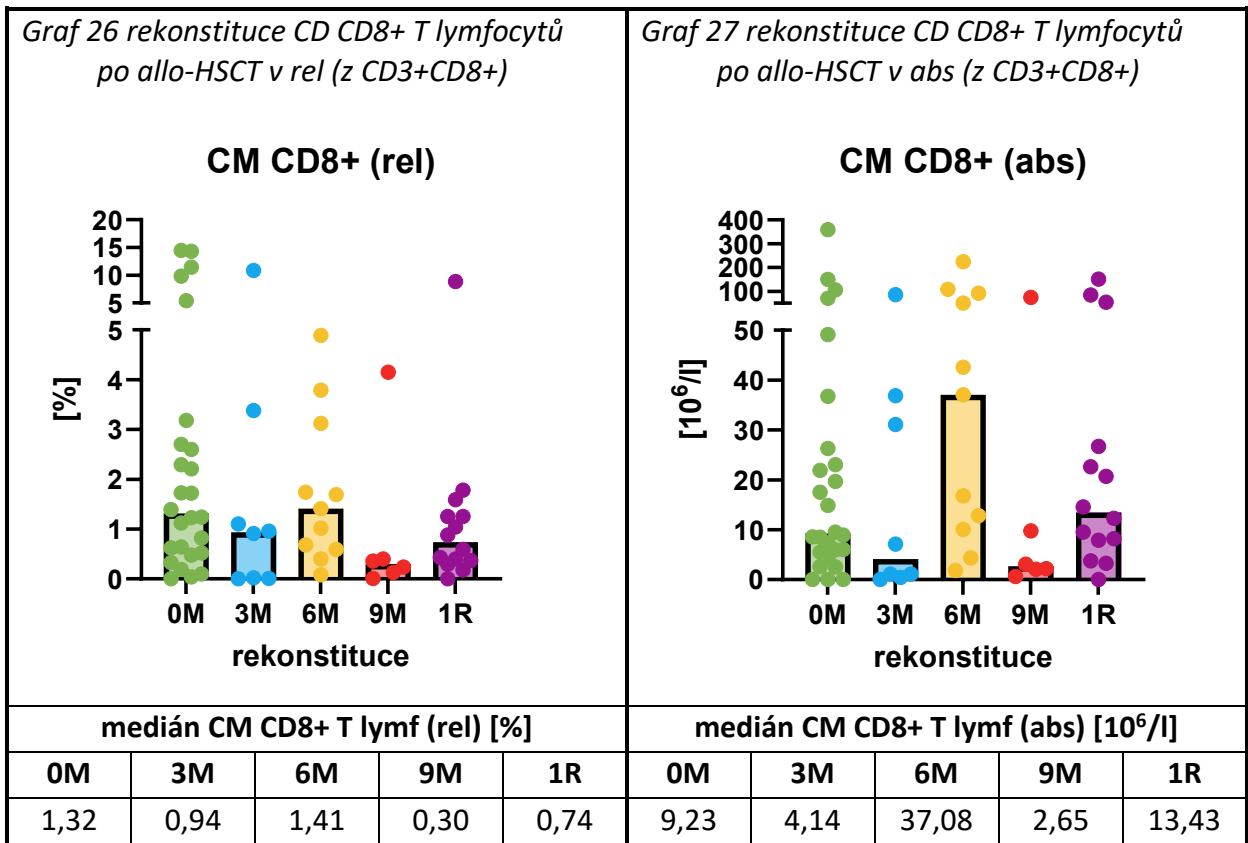


**Tabulka 16 rekonstituce NAIVE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT**

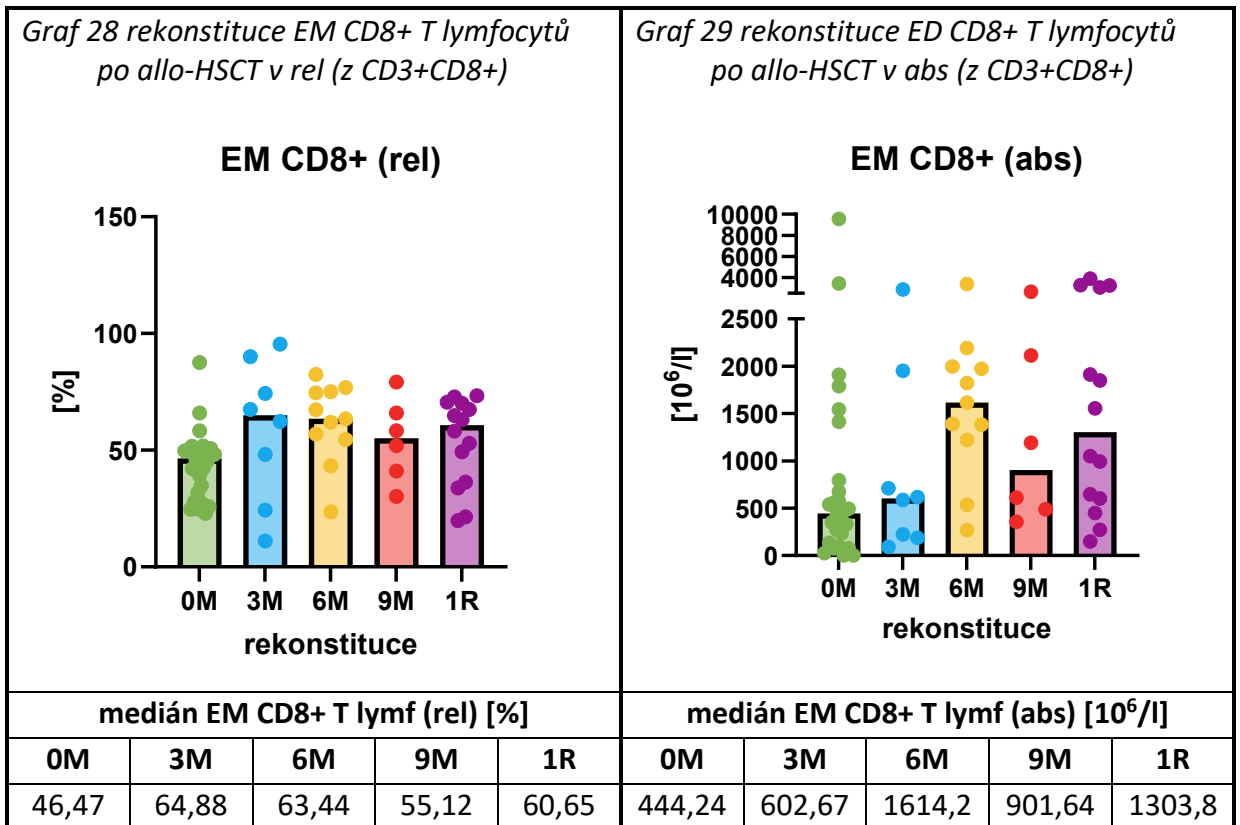




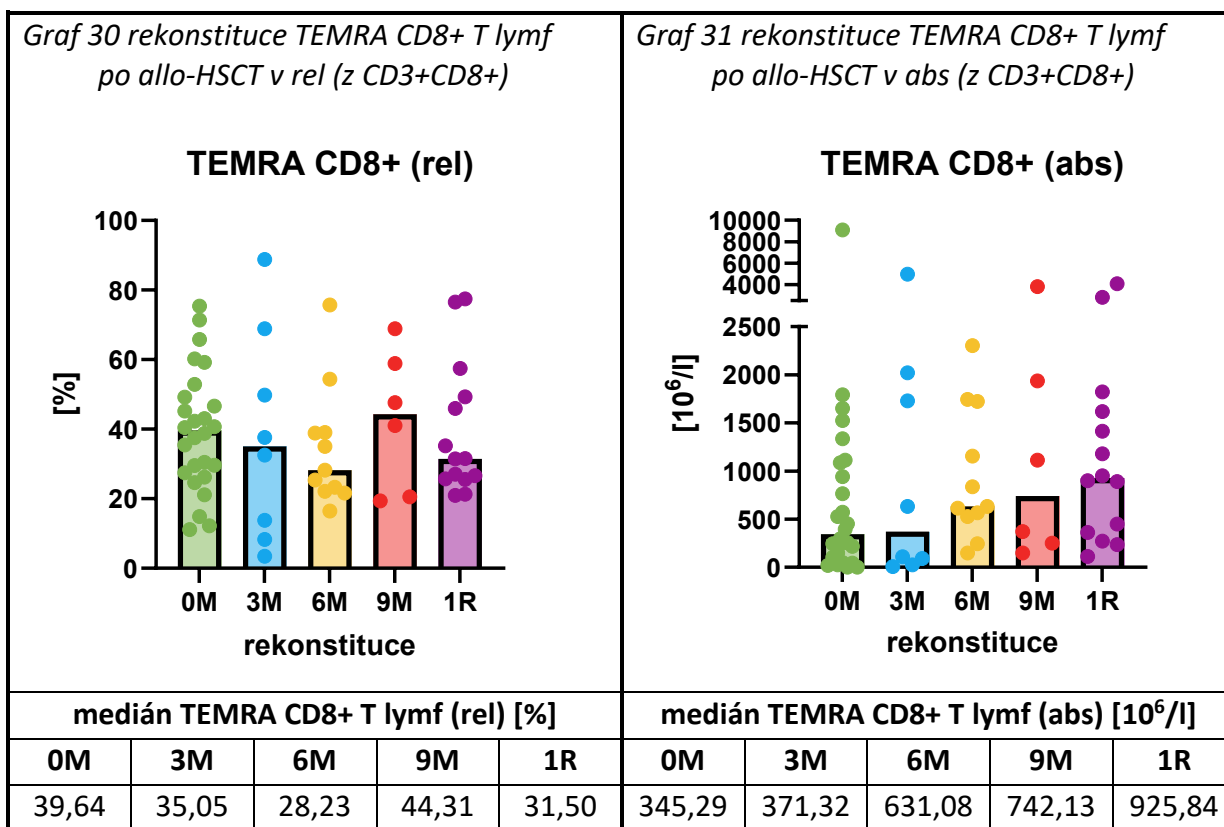
**Tabulka 17 rekonstituce CD CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT**



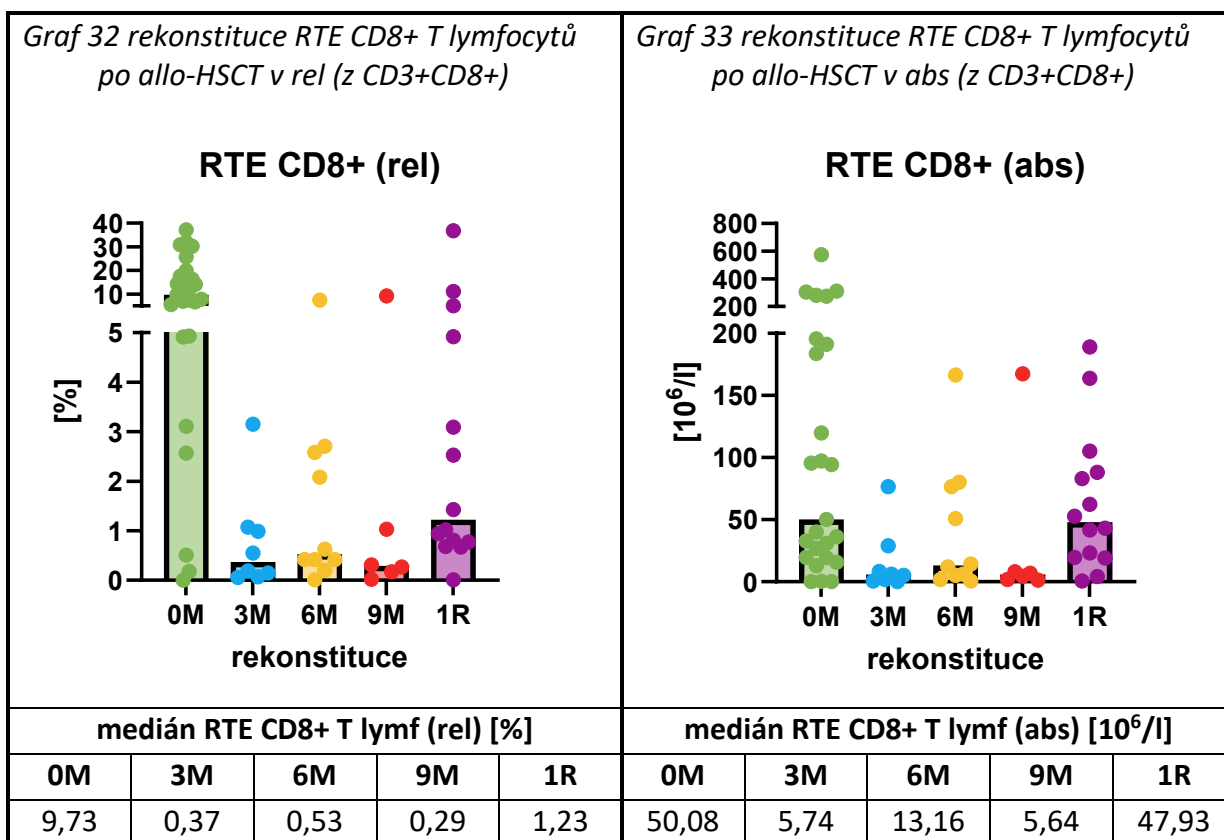
**Tabulka 18 rekonstituce EM CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT**



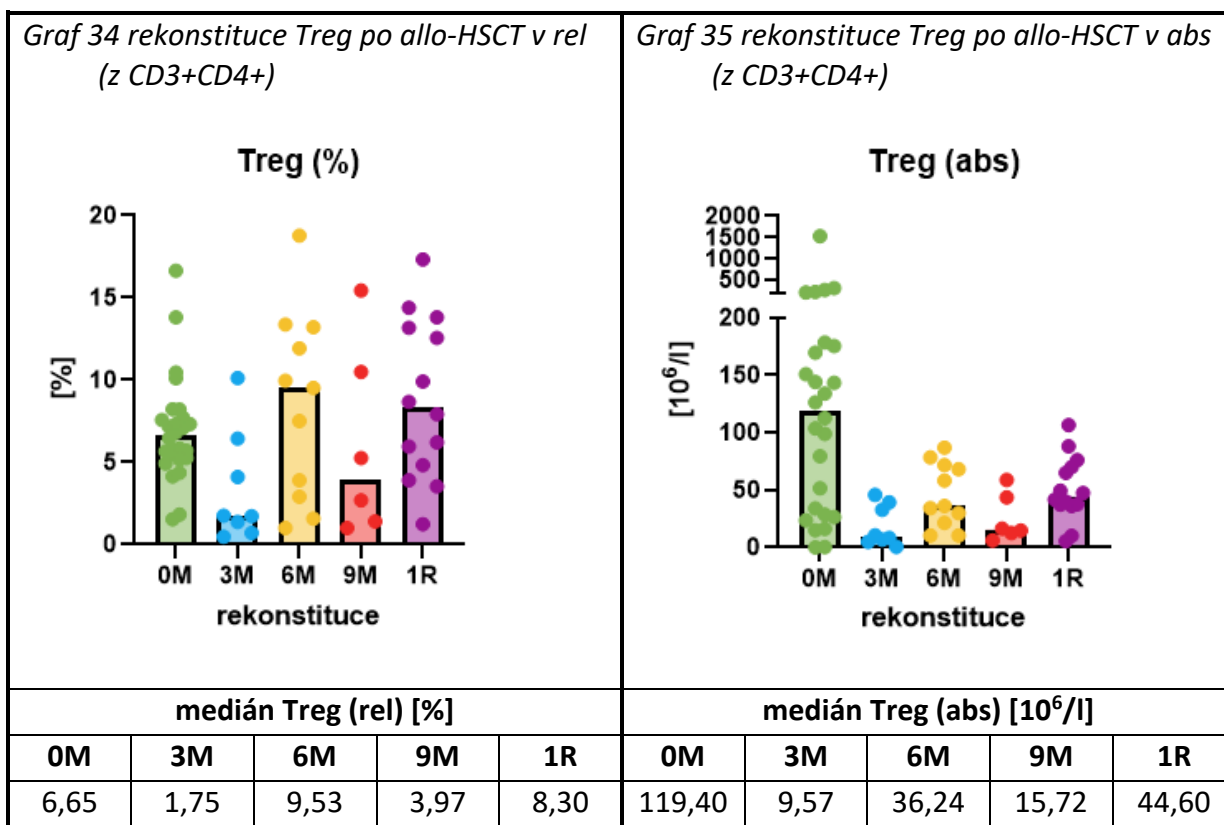
**Tabulka 19 rekonstituce TEMRA CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT**



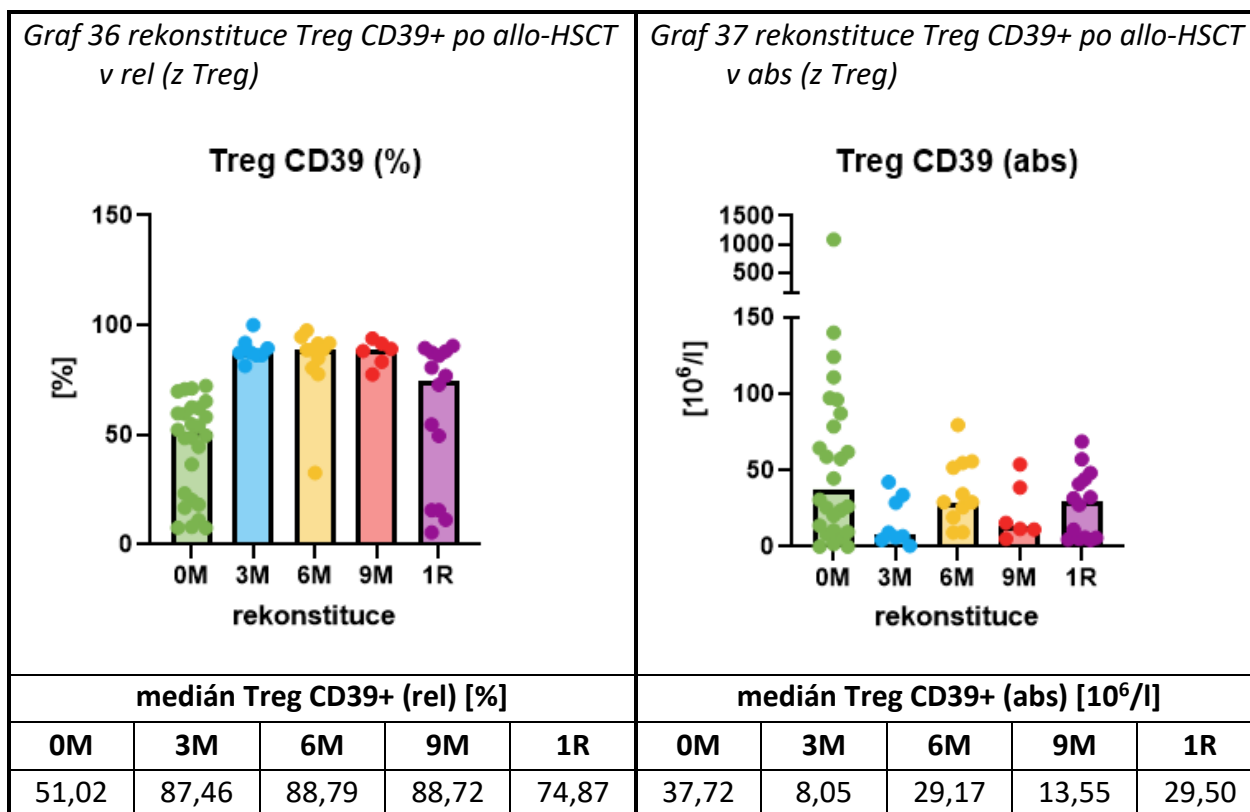
**Tabulka 20 rekonstituce RTE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT**



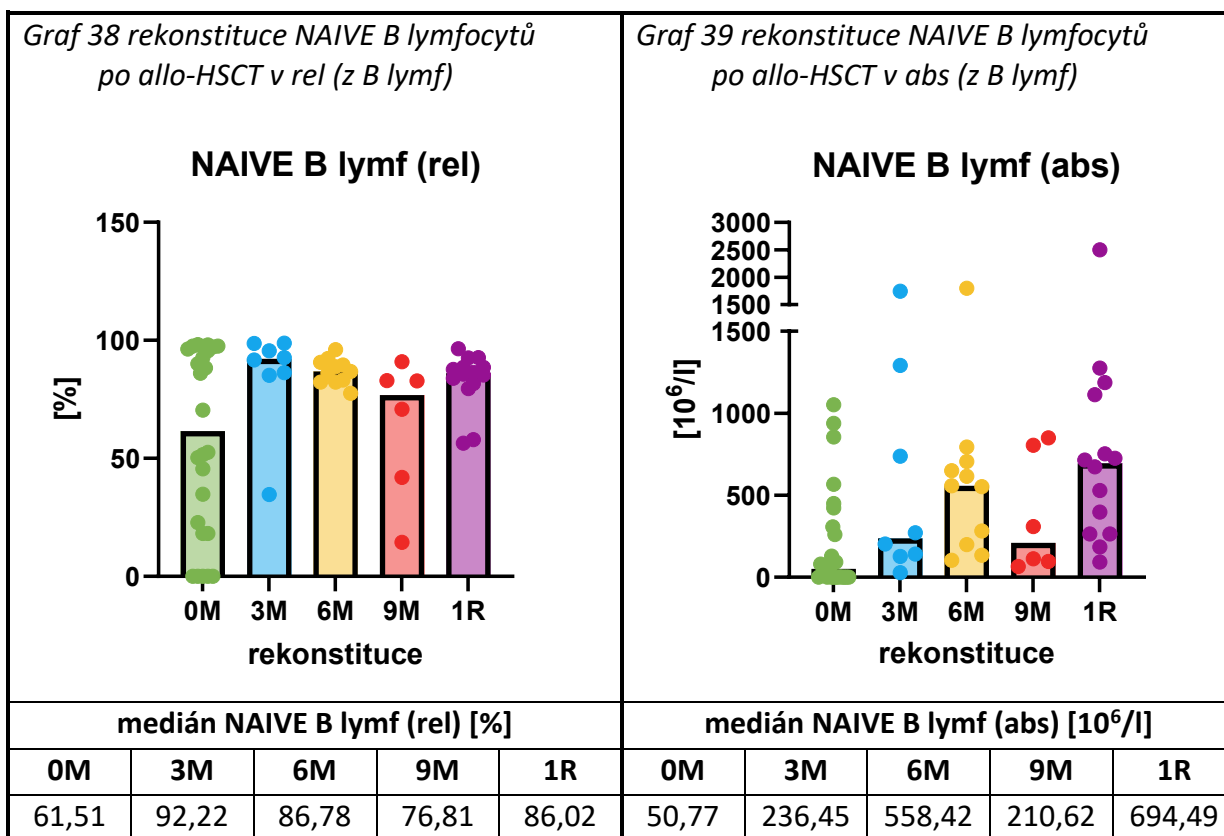
**Tabulka 21 rekonstituce Treg po allo-HSCT**



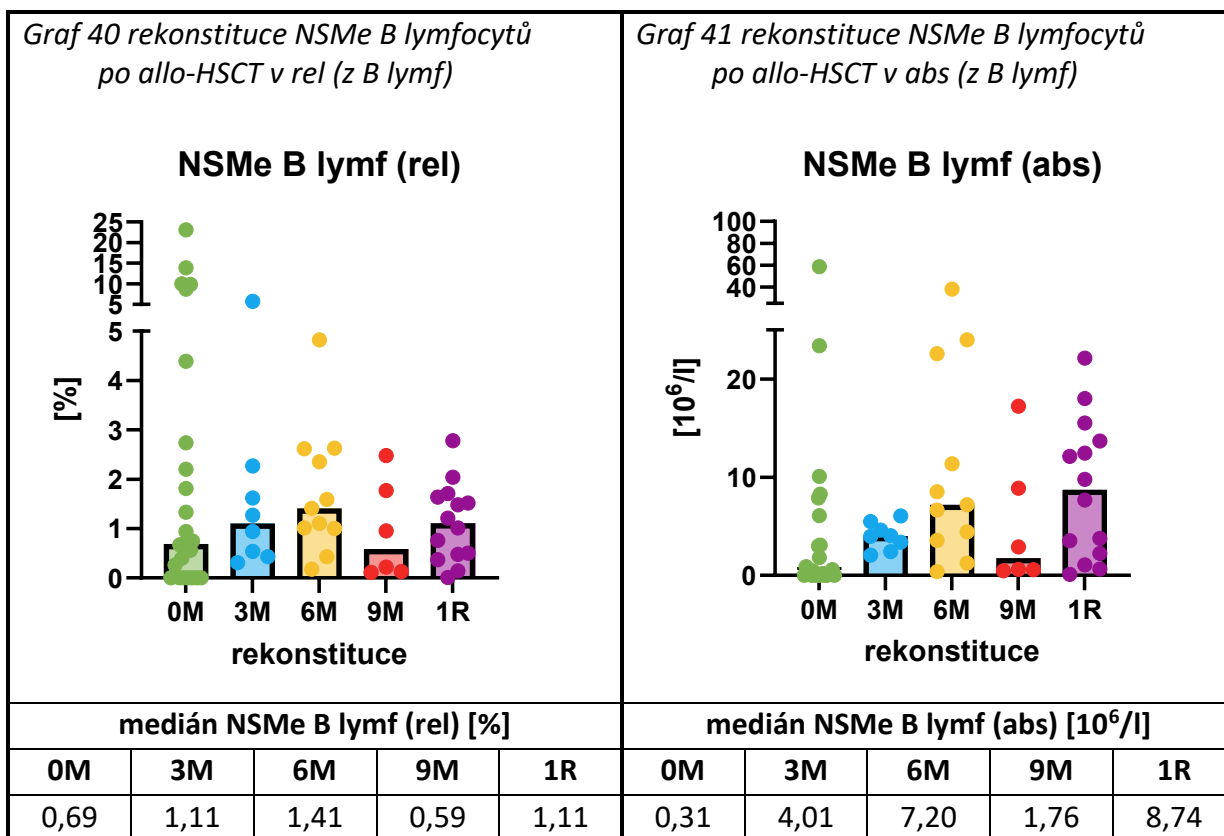
**Tabulka 22 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT**



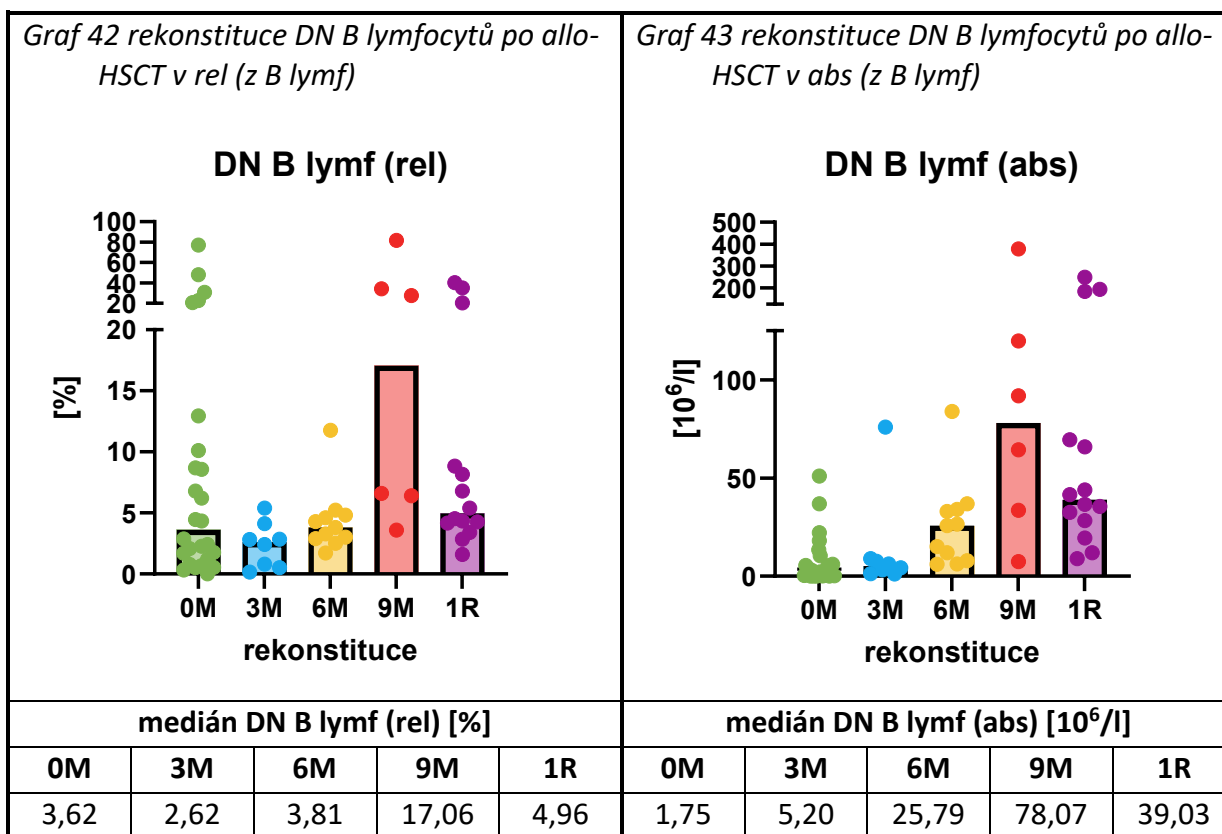
**Tabulka 23 rekonstituce NAIVE B lymfocytů po allo-HSCT**



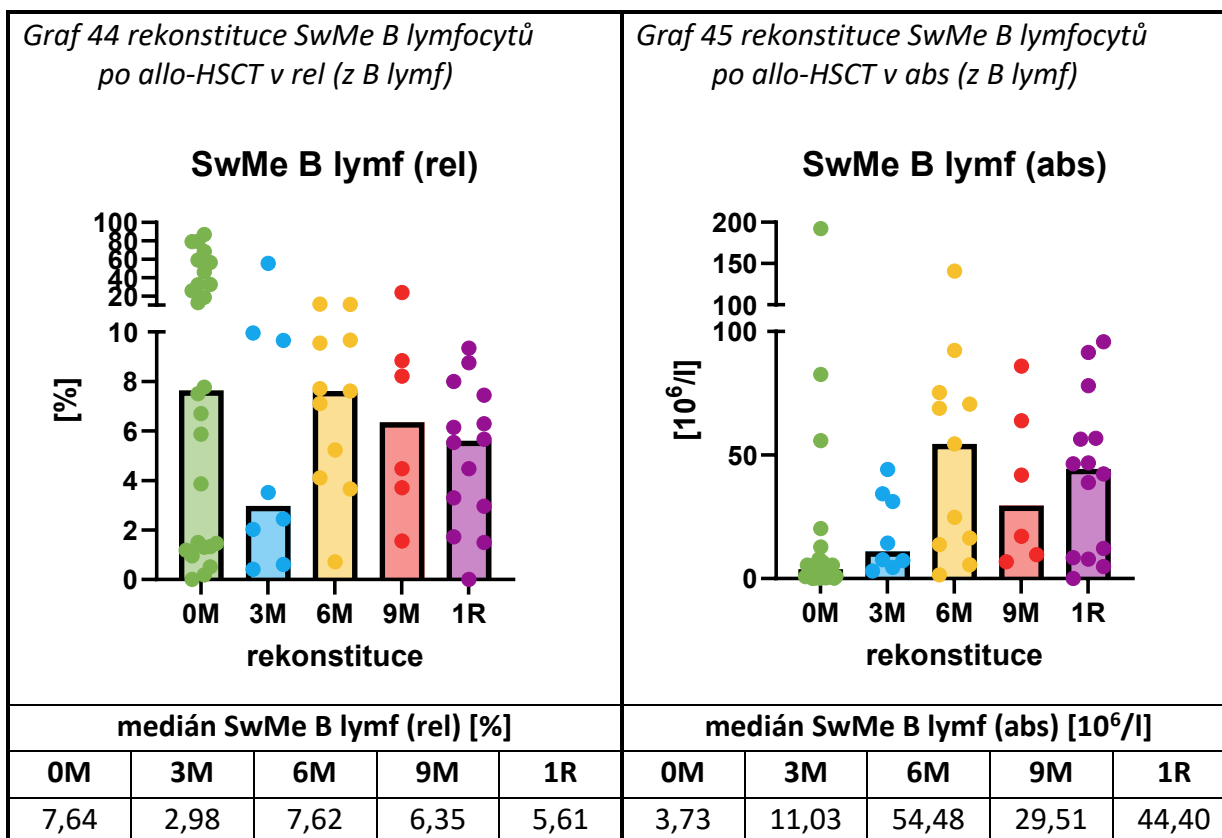
**Tabulka 24 rekonstituce NSMe B lymfocytů po allo-HSCT**



**Tabulka 25 rekonstituce DN B lymfocytů po allo-HSCT**



**Tabulka 26 rekonstituce SwMe B lymfocytů po allo-HSCT**



### 8.1.1 Zhodnocení výsledků

**Tabulka 27 mediány rekonstituce leukocytů a lymfocytárních populací z WBC**

mediány rekonstituce leukocytů a lymfocytárních populací z WBC							
název	0M	3M	6M	9M	1R	ref. meze	jedn.
WBC	5,46	4,18	5,50	5,95	5,87	4,00 – 9,00	10 <sup>9</sup> /l
lymfocyty	19,58	27,20	27,33	49,70	41,33	25,00 – 45,00	%
	1,08	1,34	1,45	2,36	2,15	1,00 – 4,00	10 <sup>9</sup> /l
CD3+	77,87	52,87	63,76	59,15	62,96	60,0 – 80,0	%
T lymf	3,65	1,39	3,21	2,18	3,12	0,70 – 2,10	10 <sup>9</sup> /l
CD19+	1,70	7,00	11,00	10,85	13,93	5,00 – 15,00	%
B lymf	0,07	0,27	0,71	0,45	0,79	0,13 – 0,33	10 <sup>9</sup> /l
NK buňky	10,20	26,83	26,68	28,51	19,63	5,00 – 23,0	%
	0,63	1,16	0,91	1,25	1,20	0,10 – 0,60	10 <sup>9</sup> /l
CD4+	36,54	11,44	12,77	10,30	10,65	35,0 – 50,0	%
T lymf	1,93	0,56	0,66	0,58	0,59	0,50 – 1,40	10 <sup>9</sup> /l
CD8+	25,63	27,99	48,56	46,48	48,72	19,0 – 39,0	%
T lymf	1,06	0,86	2,63	1,71	2,49	0,30 – 1,00	10 <sup>9</sup> /l

Při rekonstituci leukocytů je patrný trend zvyšujících se hodnot s nejvyšším zastoupením v 9M. Mediány jsou v referenčních mezích. Data z rekonstituce lymfocytů v abs hodnotách korelují s rekonstitucí leukocytů. V rel hodnotách je vysoký medián v 9M, tato hodnota přesahuje ref. meze. Před allo-HSCT je medián lymfocytů v rel hodnotách nižší, než udávají ref. meze. Mediány dat rekonstituce CD3+ T lymfocytů v rel hodnotách vykazují hodnoty u dolní hranice ref. mezí anebo snížené. V abs hodnotách rekonstituce je patrný trend zvyšujících se hodnot od fyziologických až po hodnoty přesahující ref. meze. V 9M je medián nižší než v 3M a 1R. Nejvyšší medián v abs hodnotách je však před allo-HSCT. Rekonstituce B lymfocytů v rel hodnotách vykazuje zvyšující se mediány, které jsou v ref. mezích. V abs hodnotách je snížený medián před allo-HSCT a po transplantaci data korelují s rekonstitucí CD3+ T lymfocytů. Rekonstituce NK buněk vykazuje v rel i abs hodnotách mediány dat vyšší než ref. meze. Mediány před allo-HSCT a v 1R v rel hodnotách jsou ve fyziologických hodnotách. Rekonstituce CD4+ T lymfocytů v rel hodnotách obsahuje mediány nižší, než jsou ref. meze. V abs hodnotách se mediány nacházejí na dolní hranici ref. mezí. Před allo-HSCT jsou mediány CD4+ T lymfocytů zvýšené v rel i abs hodnotách. Rekonstituce CD8+ T lymfocytů vykazuje v rel i v abs hodnotách zvyšující se trend mediánů, který překračuje ref. meze. V 9M je patrný mírný pokles. V abs hodnotách je medián před allo-HSCT zvýšený.

**Tabulka 28 mediány CD4+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD4+**

mediány CD4+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD4+							
název	0M	3M	6M	9M	1R	ref. meze	jedn.
NAIVE	28,34	0,21	0,23	0,24	1,36	16,0 – 100,0	%
CD4+	343,98	1,04	1,57	0,88	7,46	100,0-2300,0	10 <sup>6</sup> /l
CM	16,97	6,23	16,22	5,96	13,36	18,0 – 96,0	%
CD4+	249,03	35,10	115,28	31,02	83,46	180,0-1100,0	10 <sup>6</sup> /l
EM	47,04	87,30	83,28	85,85	79,55	1,0 – 23,0	%
CD4+	1000,0	488,87	502,80	494,69	426,37	13,0 – 220,0	10 <sup>6</sup> /l
TEMRA	2,98	0,70	1,09	4,71	1,79	0,0 – 7,0	%
CD4+	38,38	5,23	7,24	16,15	10,43	0,0 – 68,0	10 <sup>6</sup> /l
RTE	8,74	0,17	0,11	0,19	0,78	7,0 – 100,0	%
CD4+	117,83	0,90	0,87	0,65	5,27	50,0 – 2400,0	10 <sup>6</sup> /l
Treg	6,65	1,75	9,53	3,97	8,30	4,0 – 17,0	%
	119,40	9,57	36,24	15,72	44,60	25,0 – 180,0	10 <sup>6</sup> /l
<b>z Treg</b>							
CD39+ Treg	51,02	87,46	88,79	88,72	74,87	-	%
	37,72	8,05	29,17	13,55	29,50	-	10 <sup>6</sup> /l

Mediány stanovení NAIVE CD4+ T lymfocytů se v průběhu jednoho roku zvyšovaly v rel i abs hodnotách, ale jsou nižší než ref. meze. Před allo-HSCT jsou mediány NAIVE CD4+ v ref. mezích. U rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách jsou mediány dat nižší, než ref. meze. Nejvyšší hodnoty dosahují v 6M. Před allo-HSCT je medián CM CD4+ v ref. mezích. Rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách vysoce přesahuje ref. meze, po allo-HSCT jsou mediány 2x vyšší. V abs hodnotách po transplantaci, jsou mediány 2x nižší. Rekonstituce TEMRA CD4+ T lymfocytů má nejvyšší peak v 9M v rel i abs hodnotách. Mediány TEMRA CD4+ jsou před allo-HSCT i po allo-HSCT v ref. mezích. Rekonstituce RTE CD4+ T lymfocytů koreluje s rekonstitucí NAIVE CD4+, ale mediány jsou výrazně nižší. U rekonstituce Treg v rel i abs hodnotách jsou mediány hodnot ve 3M a 9M snižené a v 6M a v 1R v ref. mezích. Medián Treg před allo-HSCT je v ref. mezích. Ačkoliv pro porovnání rekonstituce Treg CD39+ nejsou k dispozici ref. meze, v rel hodnotách mediány dat po transplantaci značně převyšují hodnotu mediánu před allo-HSCT. V 1R však nastává mírný pokles ze stabilní hodnoty cca 88 % na cca 75 %. V abs hodnotách tento trend není viditelný a mediány dat kolísají a nepřevyšují hodnotu mediánu před allo-HSCT.

**Tabulka 29 mediány CD8+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD8+**

mediány CD8+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD8+							
název	0M	3M	6M	9M	1R	ref. meze	jedn.
NAIVE	9,82	0,37	0,63	0,56	1,87	6,0 – 100,0	%
CD8+	76,93	5,65	27,28	8,56	68,14	16,0 – 1000,0	10 <sup>6</sup> /l
CM	1,32	0,94	1,41	0,30	0,74	1,0 – 20,0	%
CD8+	9,23	4,14	37,08	2,65	13,43	5,0 – 120,0	10 <sup>6</sup> /l
EM	46,47	64,88	63,44	55,12	60,65	14,0 – 98,0	%
CD8+	444,24	602,67	1614,2	901,64	1303,8	40,0 – 640,0	10 <sup>6</sup> /l
TEMRA	39,64	35,05	28,23	44,31	31,50	7,0 – 53,0	%
CD8+	345,29	371,32	631,08	742,13	925,84	25,0 – 280,0	10 <sup>6</sup> /l
RTE	9,73	0,37	0,53	0,29	1,23	-	%
CD8+	50,08	5,74	13,16	5,64	47,93	-	10 <sup>6</sup> /l

Mediány rekonstituce NAIVE CD8+ T lymfocytů jsou v rel hodnotách nižší, než udávají ref. meze. V abs hodnotách jsou hodnoty snižené nebo v referenčním rozmezí. V 9M byl zaznamenán menší pokles mediánů v rel i abs hodnotách. Mediány dat před allo-HSCT byly v rel i v abs hodnotách v ref. rozmezí. U rekonstituce CM CD8+ T lymfocytů v rel i v abs hodnotách jsou mediány naměřených dat snižené anebo v ref. rozmezí. Hodnoty průběžně kolísají ale nejvyšší pík je patrný v 6M u rel i abs hodnot. Mediány dat před allo-HSCT byly v rel i v abs hodnotách v ref. rozmezí. Rekonstituce EM CD8+ T lymfocytů v rel hodnotách proběhla v rámci ref. mezích s nejvyšším mediánem v 3M a s výrazným poklesem v 9M. V abs hodnotách byly výrazně překročeny ref. meze v 6M, 9M, 1R. Nejvyšší medián je patrný v 6M, ale je následován výrazným poklesem v 9M podobně jako u rel hodnot. Mediány dat před allo-HSCT byly v rel i v abs v ref. rozmezí. U rekonstituce TEMRA CD8+ T lymfocytů v rel hodnotách jsou přítomny mediány dat v ref. mezích, které kolísají. V abs hodnotách byly stanoveny postupně zvyšující se mediány hodnot, které zároveň výrazně překročily ref. meze. Před allo-HSCT byl medián TEMRA CD8+ v rel hodnotách v ref. rozmezí, v abs hodnotách zvýšený. Ačkoliv pro porovnání rekonstituce RTE CD8+ nejsou k dispozici ref. meze, v rel i abs hodnotách mediány dat po transplantaci nedosahují hodnoty mediánu před allo-HSCT a jsou podobné rekonstituci NAIVE CD8+.



**Tabulka 30 mediány B lymfocytárních subpopulací z CD19+ B lymfocytů**

mediány B lymfocytárních subpopulací z CD19+ B lymfocytů							
název	0M	3M	6M	9M	1R	ref. meze	jedn.
NAIVE B lymf	61,51 50,77	92,22 236,45	86,78 558,42	76,81 210,62	86,02 694,49	58,0 – 72,1 112,0 – 169,0	% 10 <sup>6</sup> /l
NSMe B lymf	0,69 0,31	1,11 4,01	1,41 7,20	0,59 1,76	1,11 8,74	13,4 – 21,4 22,0 – 54,0	% 10 <sup>6</sup> /l
DN B lymf	3,62 1,75	2,62 5,20	3,81 25,79	17,06 78,07	4,96 39,03	2,1 – 5,3 4,0 – 13,0	% 10 <sup>6</sup> /l
SwMe B lymf	7,64 3,73	2,98 11,03	7,62 54,48	6,35 29,51	5,61 44,40	9,2 – 18,9 18,0 – 40,0	% 10 <sup>6</sup> /l

Rekonstituce NAIVE B lymfocytů v rel a v abs hodnotách překračuje referenční meze. Mírný pokles mediánu dat v rel hodnotách a výrazný pokles mediánu dat v abs hodnotách je patrný v 9M. Před allo-HSCT byl medián v rel hodnotách v referenčním rozmezí, v abs hodnotách snížený. Při rekonstituce NSMe B lymfocytů byly stanoveny mediány dat v rel i abs hodnotách nižší, než udávají referenční meze. V 9M rekonstituce byl zaznamenán výrazný pokles v rel i abs hodnotách. Před allo-HSCT byly mediány v rel i abs snížené. U rekonstituce DN B lymfocytů byly zjištěny v rel hodnotách mediány odpovídající fyziologickému rozmezí. V abs hodnotách je medián v 3M odpovídající referenčním mezím a následně jsou mediány zvýšené. V rel i abs hodnotách 9M je patrný pík výrazně přesahující referenční meze. Před allo-HSCT byl medián v rel hodnotách v referenčním rozmezí, v abs hodnotách snížený. U rekonstituce SwMe B lymfocytů jsou v rel hodnotách mediány nižší, než udávají referenční meze. V abs hodnotách jsou přítomny mediány nižší, zvýšené i v referenčních mezích. Mediány dat před allo-HSCT byly v rel i v abs hodnotách snížené.

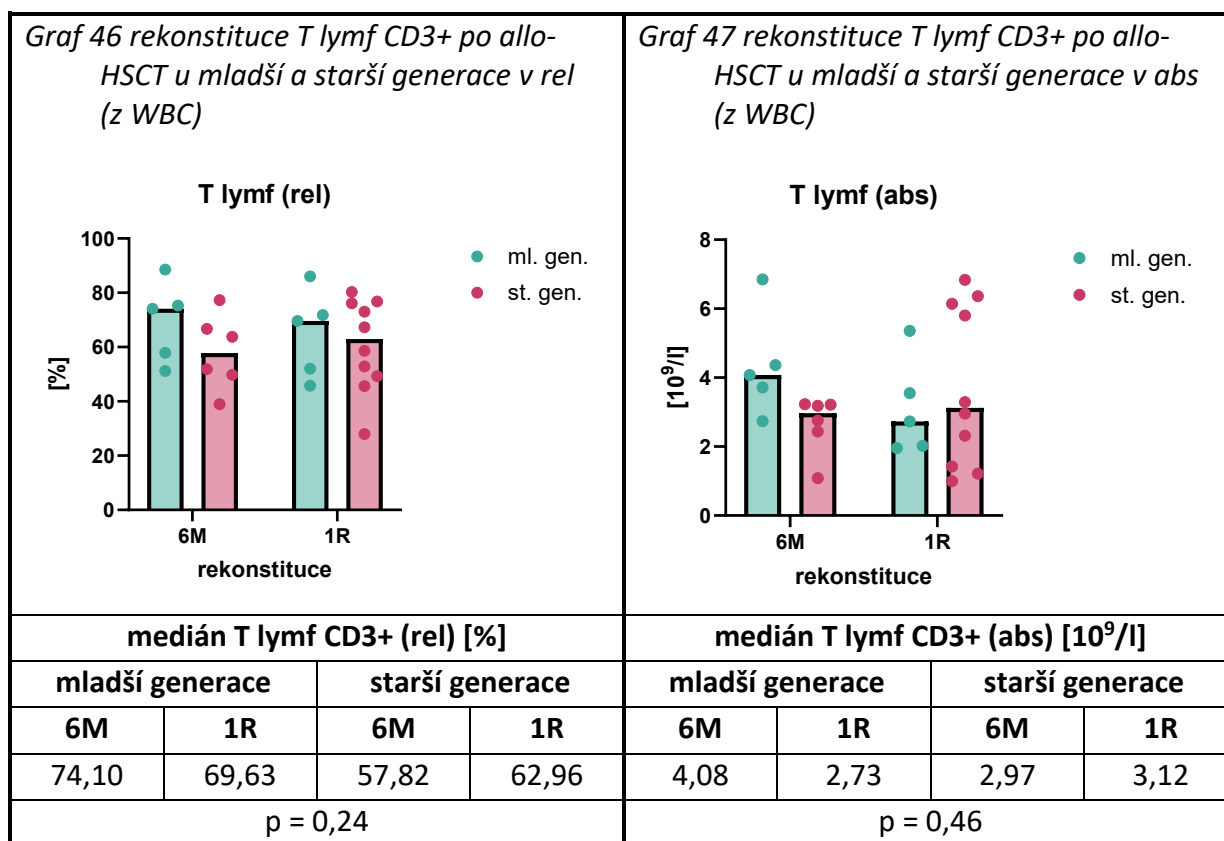
## 8.2 Vliv věku pacientů na rekonstituci lymfocytů po allo-HSCT

Výběrový soubor pacientů byl rozdělen na základě přidaného faktoru věku pacientů. Pacienti ve věku 23–50 let byli zařazení do mladší generace a pacienti ve věku 51-69 let byli zařazení do generace starší. Z důvodu početního zastoupení mladší a starší generace byla zhodnocena data z časového období 6M a 1R. Soubor mladší generace čítá 5 měření v 6M i v 1R. Soubor starší generace čítá 6 měření v 6M a 10 v 1R.

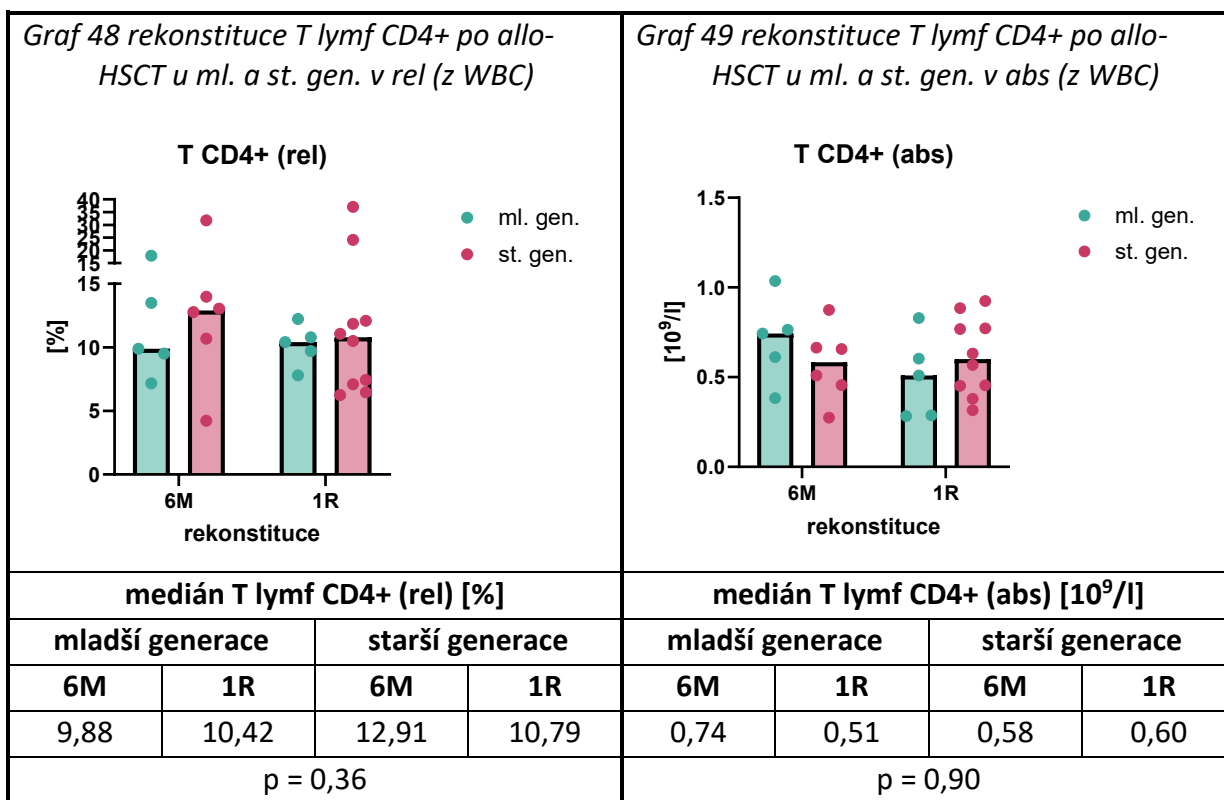
Pro vizualizaci výsledků byly zvoleny sloupcové grafy, jejichž výška zobrazuje medián skupiny stanovení a příslušné hodnoty měření jsou vizualizovány v bodech. Osa X byla obecně pojmenována jako rekonstituce a nachází se zde skupiny 6M a 1R pro mladší a starší generaci. Na ose Y jsou vynesena měření nabývající hodnoty v určitých jednotkách. Grafy byly vytvořeny v duplikátech: první v rel a druhý v abs hodnotách.

Z naměřených dat byla provedena statistická analýza Two-way ANOVA využívající blokování z důvodu předpokládaného vlivu faktoru věku na rekonstituci. Zjištěná p hodnota, která je výsledkem statistické analýzy, nabývá významnosti, pokud její hodnota je nižší než 0,05. Veškeré p hodnoty byly uvedeny u příslušných grafů.

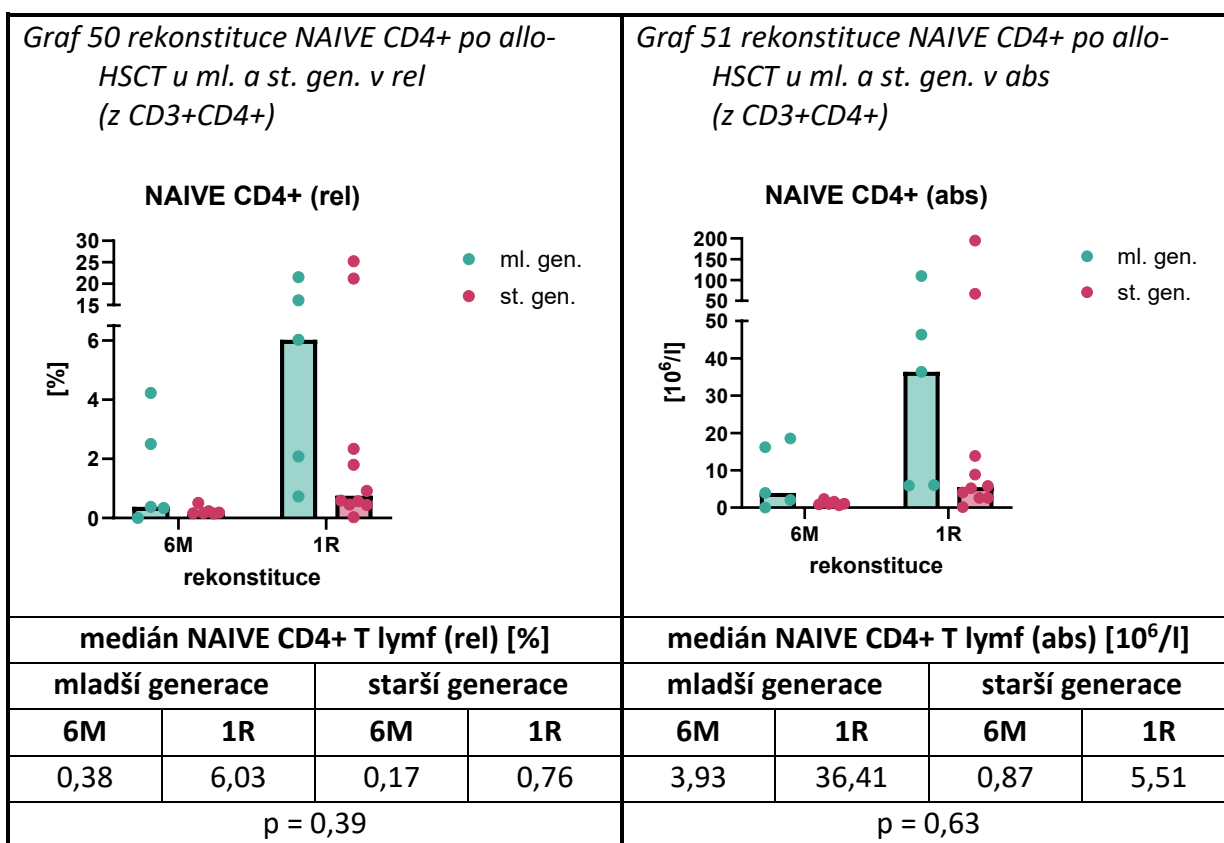
**Tabulka 31 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT u mladší a starší generace**



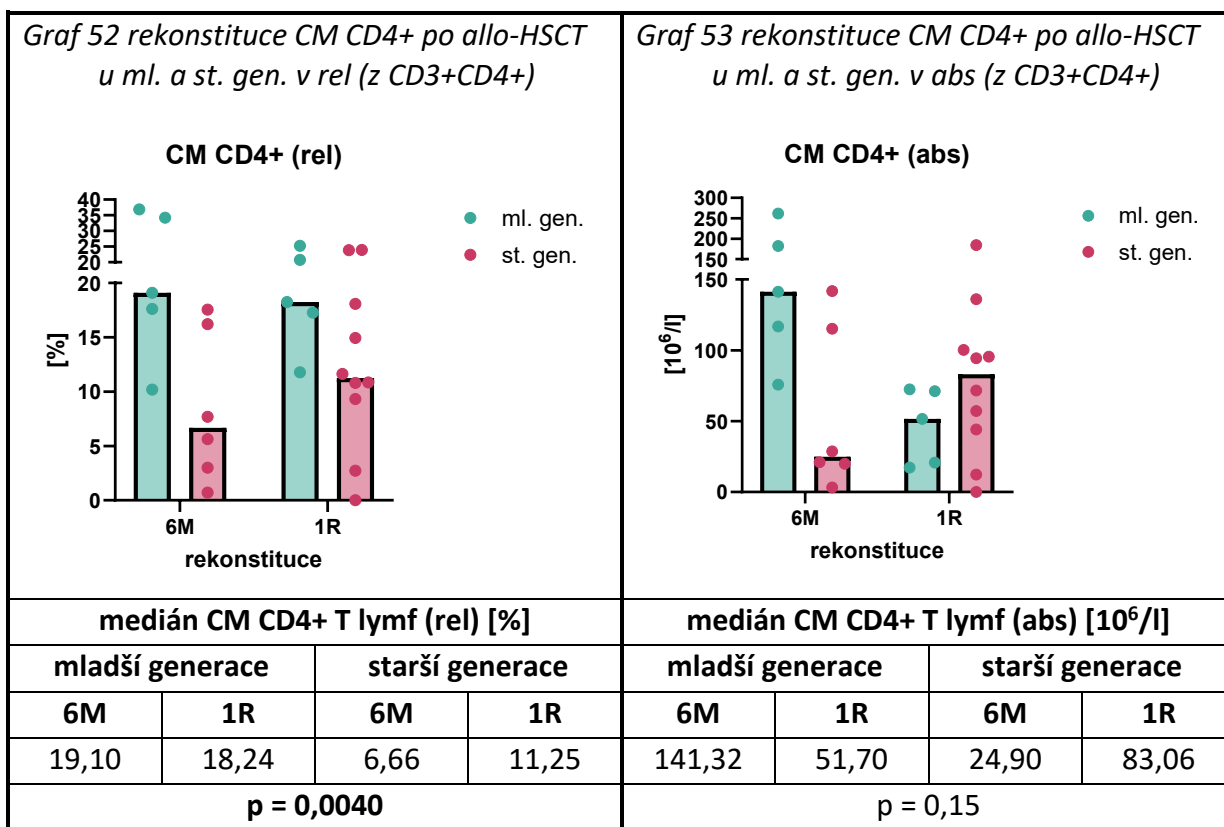
**Tabulka 32 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT u mladší a starší generace**



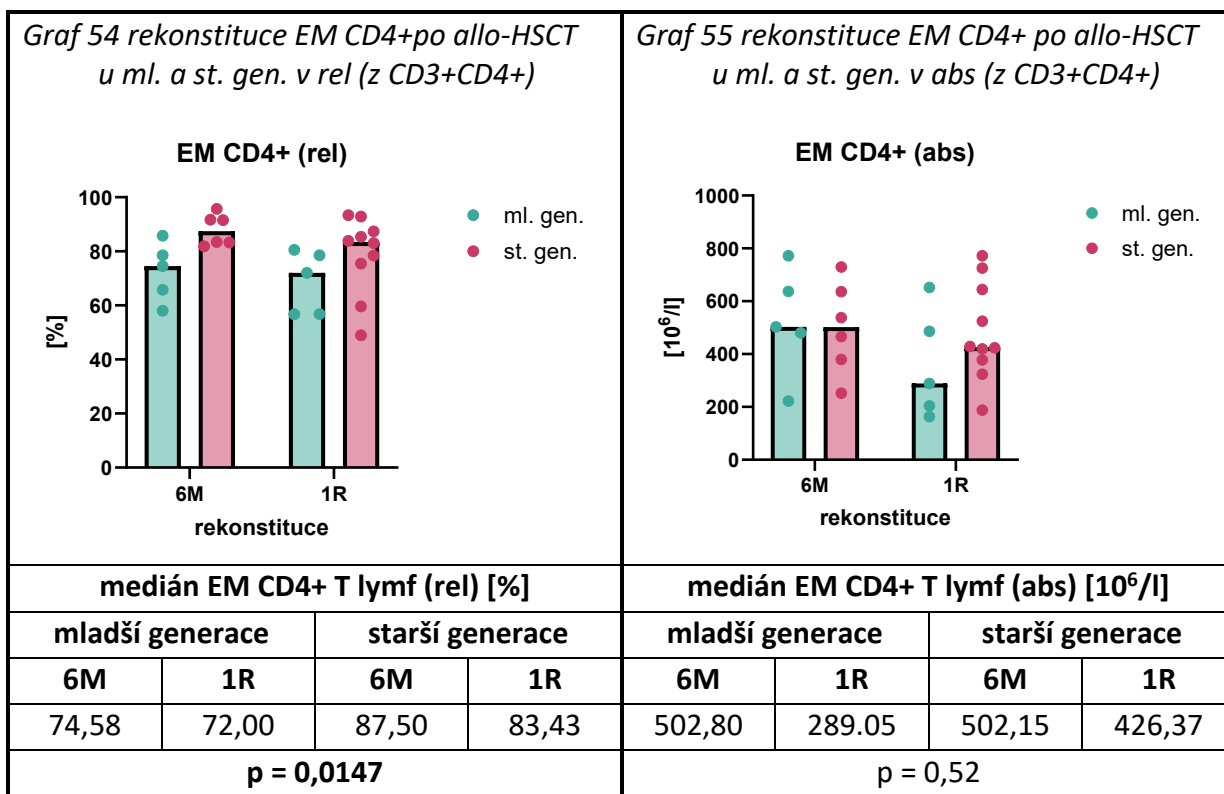
**Tabulka 33 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace**



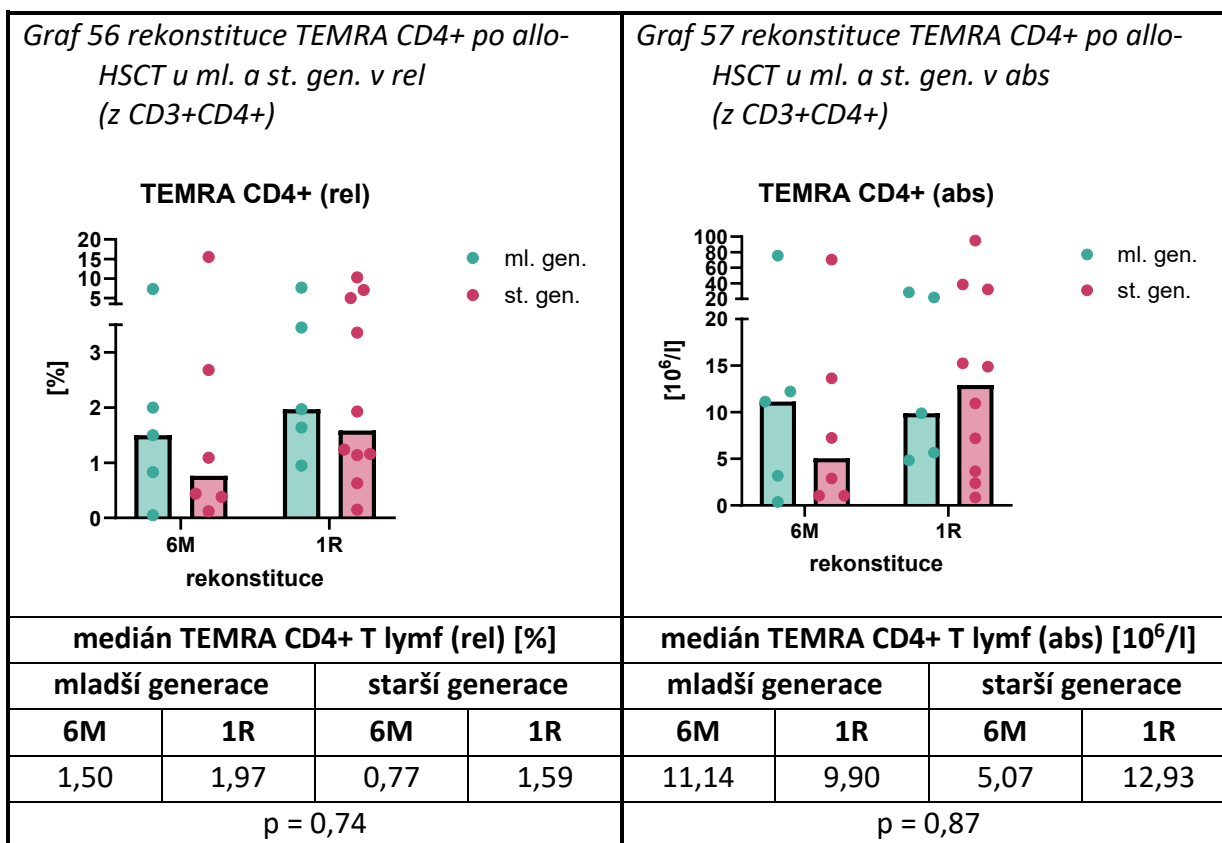
**Tabulka 34 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace**



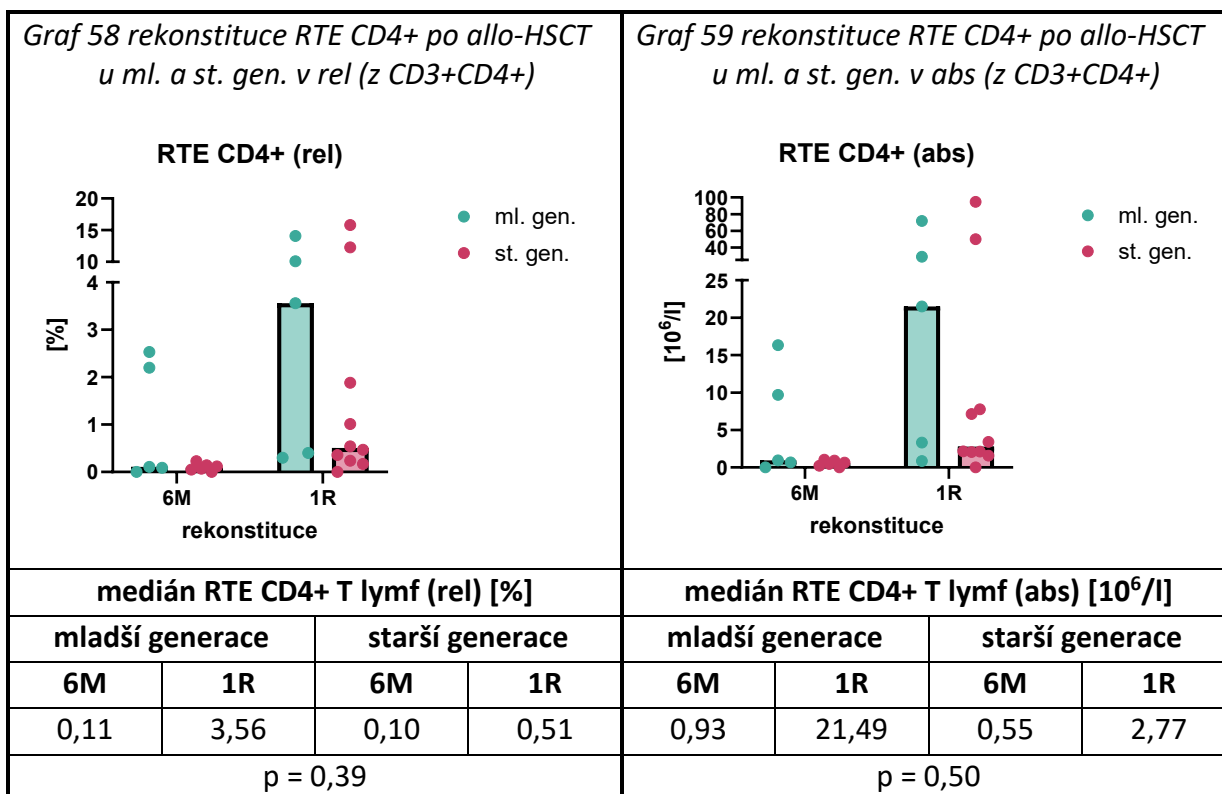
**Tabulka 35 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace**



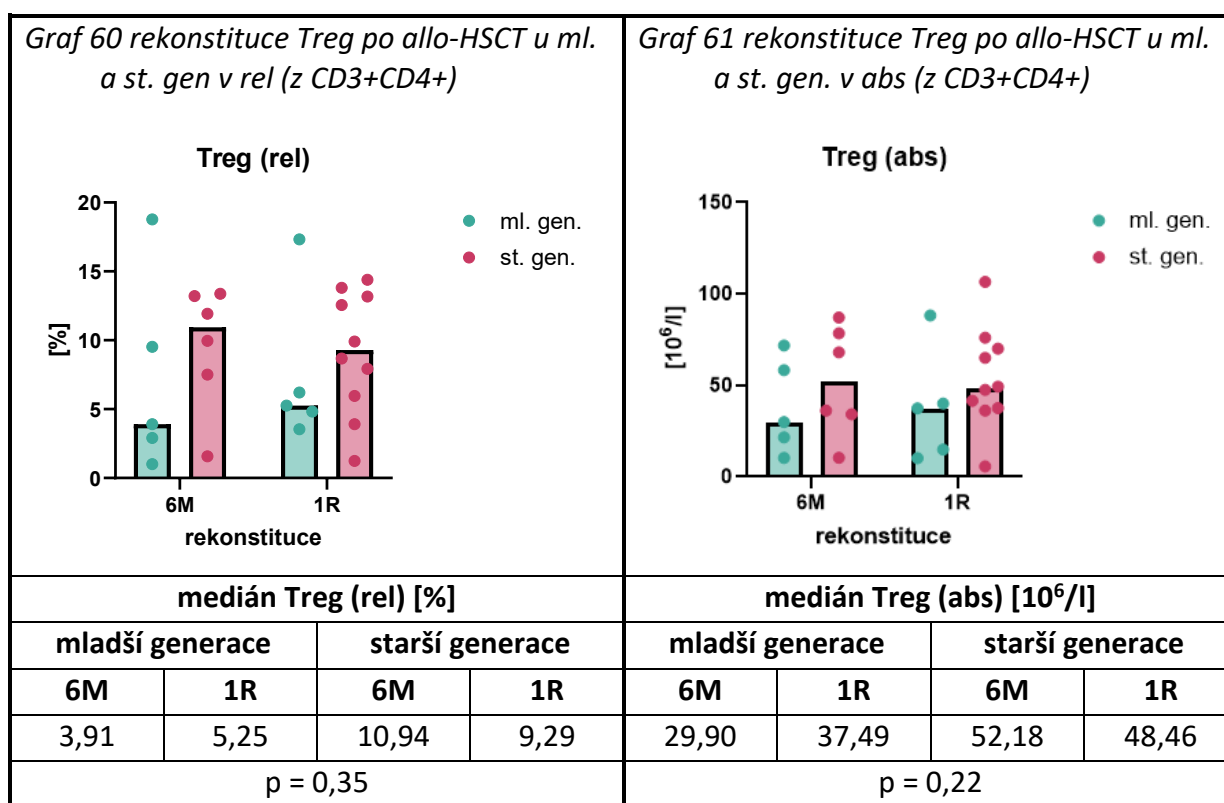
**Tabulka 36 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace**



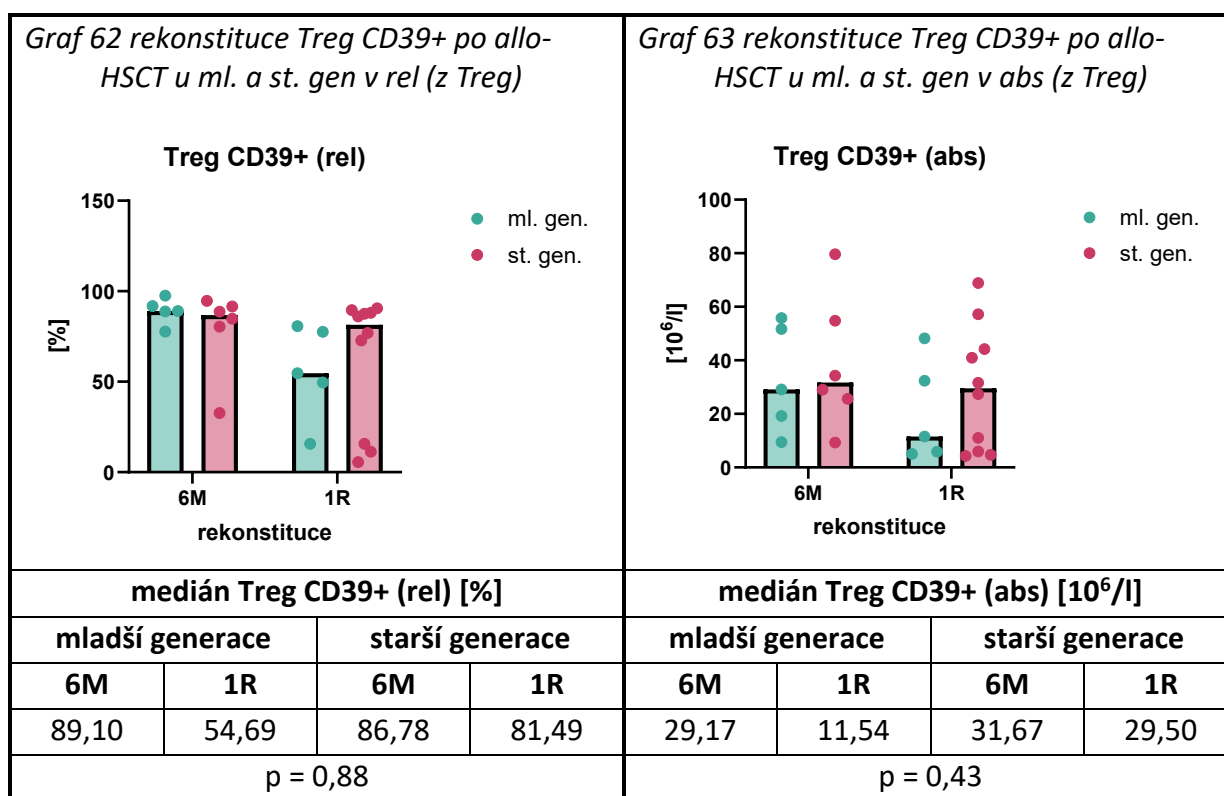
**Tabulka 37 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace**



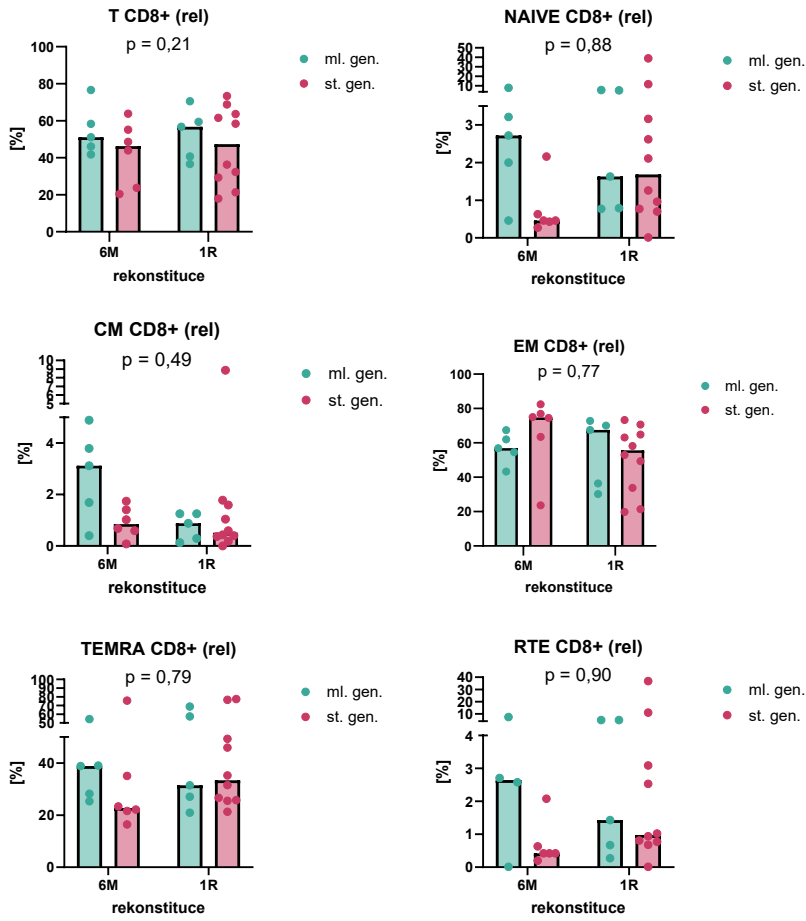
**Tabulka 38 rekonstituce Treg po allo-HSCT u mladší a starší generace**



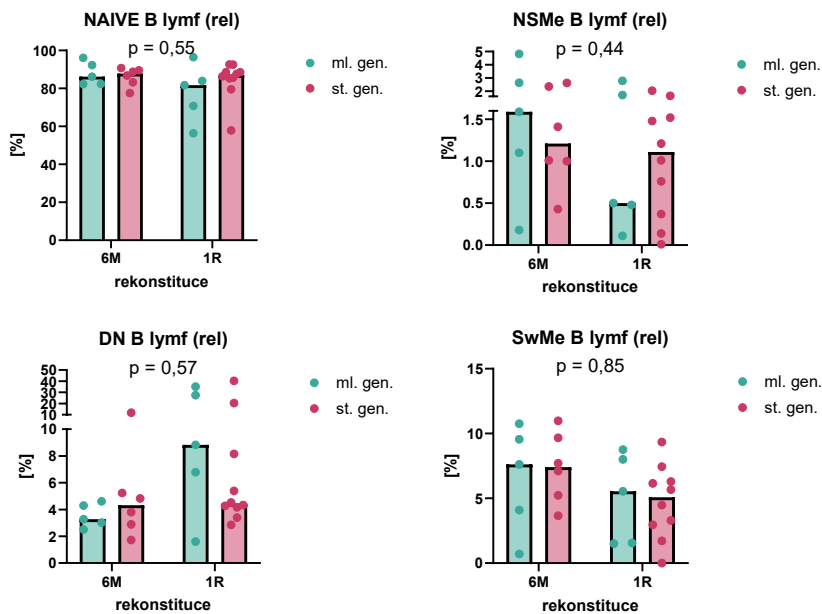
**Tabulka 39 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT u mladší a starší generace**



**Graf 64 rekonstituce subpopulací T lymf CD8+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD8+)**



**Graf 65 rekonstituce subpopulací B lymf po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z B lymf)**



## 8.2.1 Zhodnocení výsledků

**Tabulka 40 mediány rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT u ml. a st. gen**

mediány CD4+ T lymfocytárních subpopulací						
název	ml. gen.		st. gen.		ref. meze	jedm.
	6M	1R	6M	1R		
<b>z WBC</b>						
CD3+	74,10	69,63	57,82	62,96	25,00 – 45,00	%
T lymf	4,08	2,73	2,97	3,12	1,00 – 4,00	10 <sup>9</sup> /l
CD4+	9,88	10,42	12,91	10,79	60,0 – 80,0	%
T lymf	0,74	0,51	0,58	0,60	0,70 – 2,10	10 <sup>9</sup> /l
<b>z CD3+CD4+</b>						
NAIVE	0,38	6,03	0,17	0,76	16,0 – 100,0	%
CD4+	3,93	36,41	0,87	5,51	100,0-2300,0	10 <sup>6</sup> /l
CM	19,10	18,24	6,66	11,25	18,0 – 96,0	%
CD4+	141,32	51,70	24,90	83,06	180,0-1100,0	10 <sup>6</sup> /l
EM	74,58	72,00	87,50	83,43	1,0 – 23,0	%
CD4+	502,80	289,05	502,15	426,37	13,0 – 220,0	10 <sup>6</sup> /l
TEMRA	1,50	1,97	0,77	1,59	0,0 – 7,0	%
CD4+	11,14	9,90	5,07	12,93	0,0 – 68,0	10 <sup>6</sup> /l
RTE	0,11	3,56	0,10	0,51	7,0 – 100,0	%
CD4+	0,93	21,49	0,55	2,77	50,0 – 2400,0	10 <sup>6</sup> /l
Treg	3,91	5,25	10,94	9,29	4,0 – 17,0	%
	29,90	37,49	52,18	48,46	25,0 – 180,0	10 <sup>6</sup> /l
<b>z Treg</b>						
CD39+ Treg	89,10	54,69	86,78	81,49	-	%
	29,17	11,54	31,67	29,50	-	10 <sup>6</sup> /l

**Tabulka 41 výsledky statistické analýzy rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT u ml. a st. gen**

CM CD4+	rel	<b>p = 0,0040</b>
EM CD4+	rel	<b>p = 0,0147</b>



Mediány rekonstituce CD3+ T lymfocytů v rel hodnotách převyšují ref. meze a u mladší generace dosahují vyšších hodnot než u starší. V abs hodnotách je medián v 6M u mladší generace mírně vyšší, než udávají ref. meze, ostatní mediány jsou v ref. mezích. U rekonstituce CD4+ T lymfocytů v rel hodnotách jsou veškeré mediány nižší než ref. meze a u starší generace dosahují vyšších hodnot. V abs hodnotách je medián v 6M u mladší generace v ref. rozmezí, ostatní mediány jsou snižené. Rekonstituce NAIVE CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách obsahuje mediány nižší, než udávají ref. meze. Ačkoliv jsou mediány snižené, je patrné, že mediány rekonstituce dosahují vyšších hodnot u mladší generace. Mediány rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů v rel hodnotách jsou u mladší generace v ref. mezích a u starší generace snižené. Rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů v rel hodnotách dosahuje vyšších mediánů u mladší generace a tato skutečnost je i potvrzena statistickou významností  $p = 0,0040$ . V abs hodnotách rekonstituce jsou mediány nižší, než udávají ref. meze a trend podobný rel hodnotám zde není přítomen. U rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách jsou mediány dat vyšší než ref. meze. Rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů v rel hodnotách dosahuje vyšších mediánů u starší generace a tato skutečnost je i potvrzena statistickou významností  $p = 0,0147$ . V abs hodnotách se tento trend neopakoval. Mediány rekonstituce TEMRA CD4+ T lymfocytů dosahují v rel i abs hodnotách fyziologických mezí. Rekonstituce RTE CD4+ T lymfocytů nabízí v rel i abs hodnotách mediány dat nižší než ref. meze, ale je patrný trend vyšších mediánů u mladší generace. U rekonstituce Treg v rel hodnotách je medián v 6M u mladší generace snižený, ostatní mediány jsou v ref. mezích. V rel i abs hodnotách dosahuje rekonstituce Treg vyšších hodnot u starší generace. Ačkoliv pro porovnání rekonstituce Treg CD39+ nejsou k dispozici ref. meze, v rel hodnotách jsou mediány v 6M podobné, ale medián v 1R u mladší generace je zřetelně nižší než u generace starší. V abs hodnotách je tento trend potvrzen.

Hodnoty mediánů rekonstituce CD8+ T lymfocytárních subpopulací a B lymfocytárních subpopulací nebyly zhodnoceny, protože nevykazovaly dostatečnou průkaznost vlivu věku pacientů na rekonstituci.

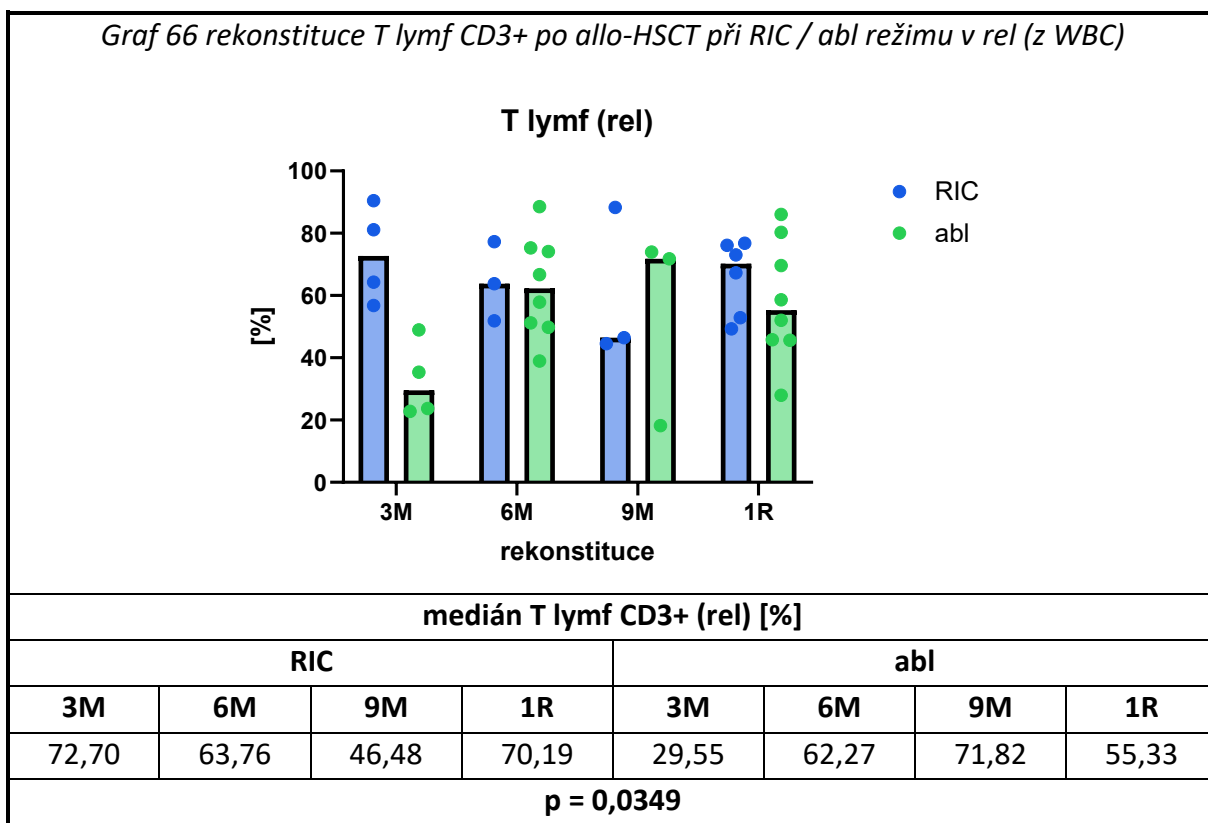
### **8.3 Vliv přípravného režimu na rekonstituci lymfocytů po allo-HSCT**

Výběrový soubor pacientů byl rozdělen na základě přidaného faktoru přípravného režimu před allo-HSCT. Pacienti, kteří podstoupili RIC režim byli zařazeni do skupiny RIC a pacienti s abl režimem, byli zahrnuti do skupiny abl. Naměřená data probíhající rekonstituce lymfocytů u pacientů po RIC a abl režimu byla zhodnocena z časového období 3M, 6M, 9M a 1R.

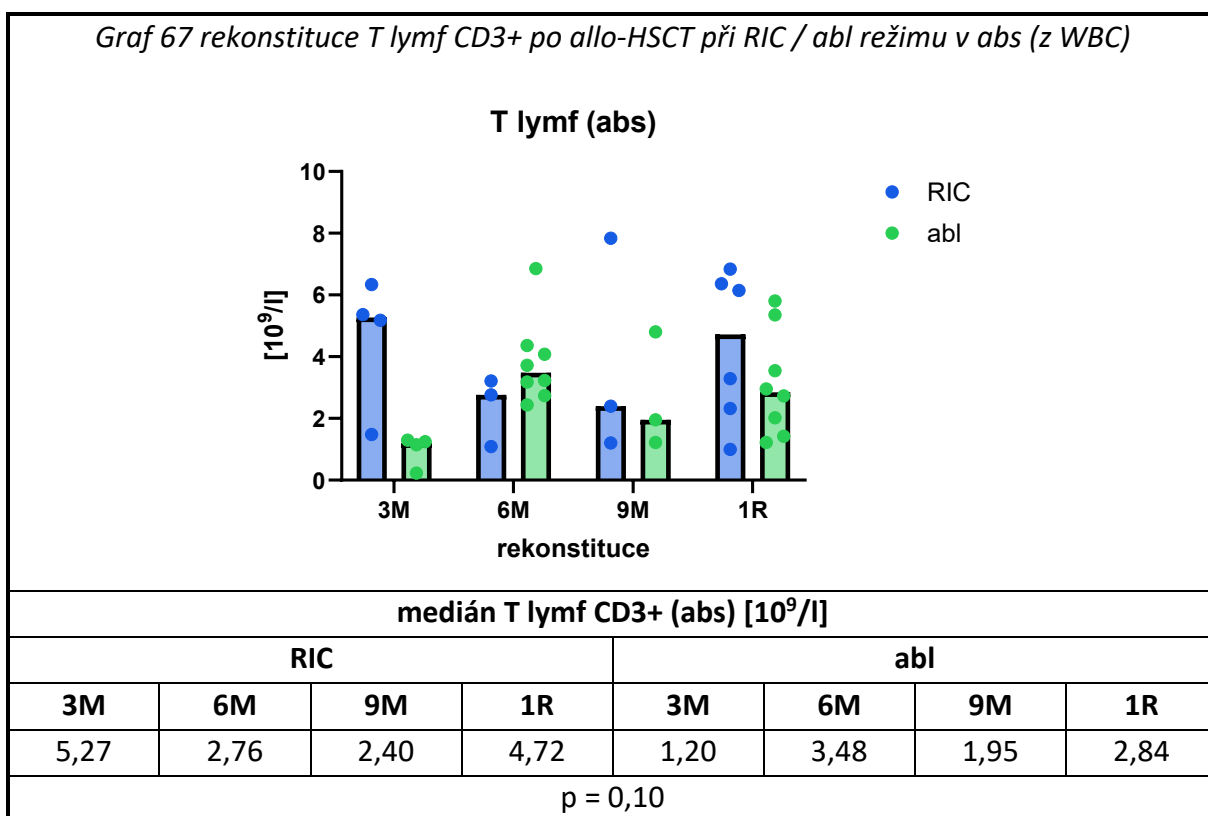
Pro vizualizaci výsledků byly zvoleny sloupcové grafy, jejichž výška zobrazuje medián skupiny stanovení a příslušné hodnoty měření jsou vizualizovány v bodech. Osa X byla obecně pojmenována jako rekonstituce a nachází se zde skupiny 3M, 6M, 9M a 1R pro pacienty s RIC a abl režimem. Na ose Y jsou vynesena měření nabývající hodnoty v určitých jednotkách. Grafy byly vytvořeny v duplikátech: první v rel a druhý v abs hodnotách.

Z naměřených dat byla provedena statistická analýza Two-way ANOVA využívající blokování z důvodu předpokládaného vlivu faktoru přípravného režimu na rekonstituci. Zjištěná p hodnota, která je výsledkem statistické analýzy, nabývá významnosti, pokud její hodnota je nižší než 0,05. Veškeré p hodnoty byly uvedeny u příslušných grafů.

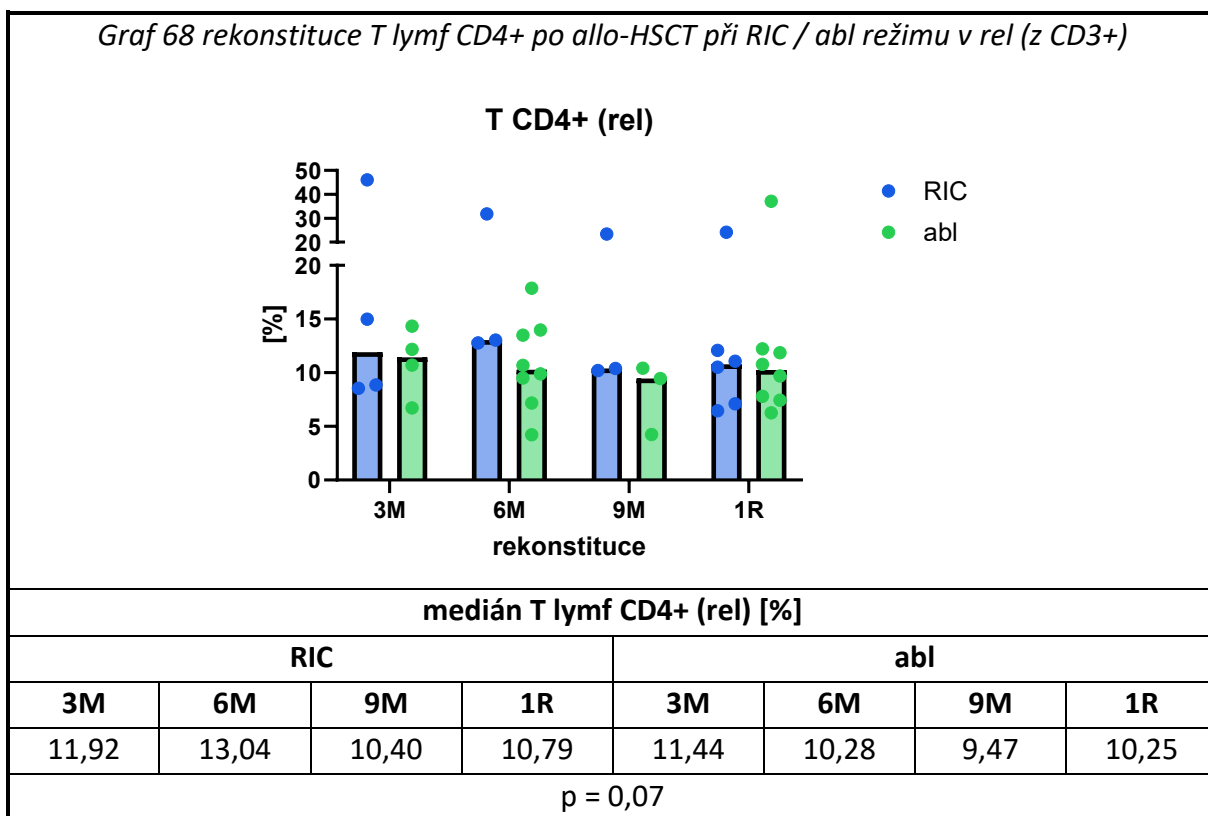
**Tabulka 42 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**



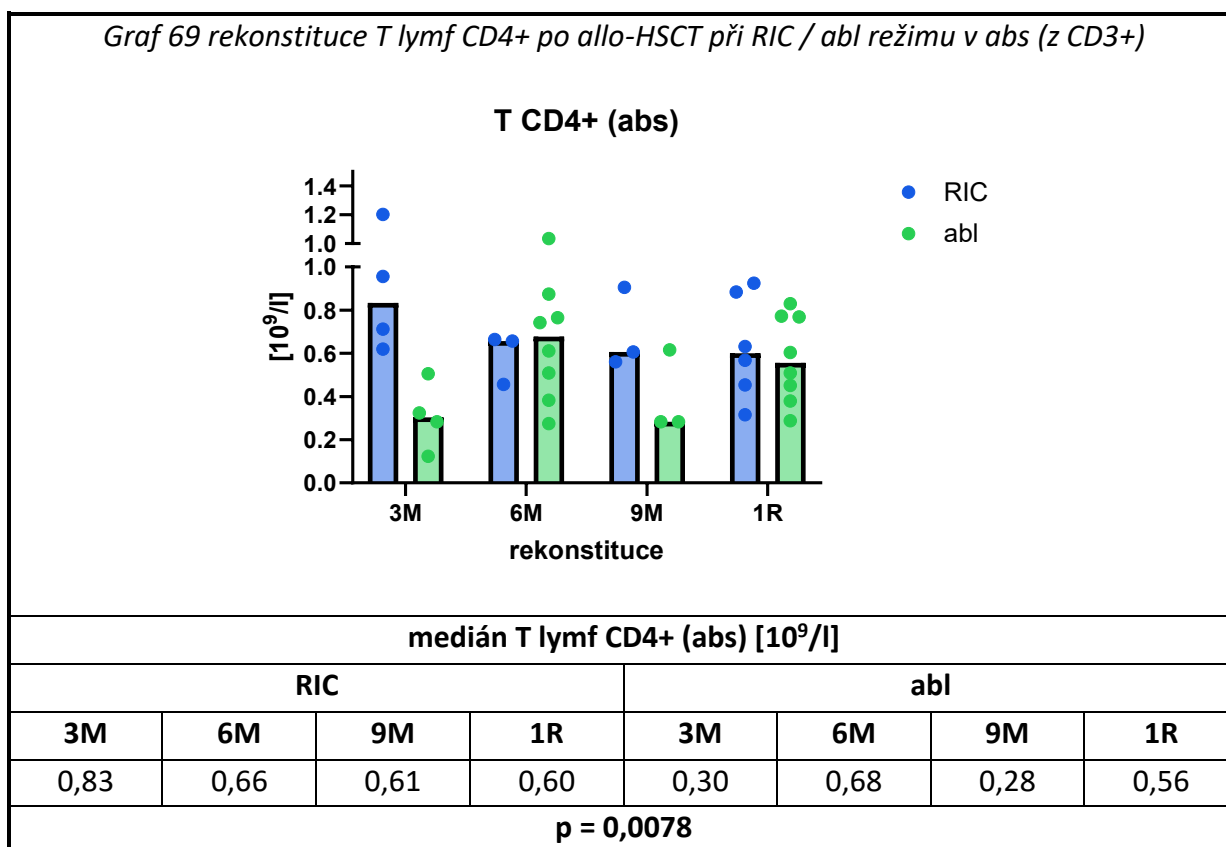
**Tabulka 43 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**



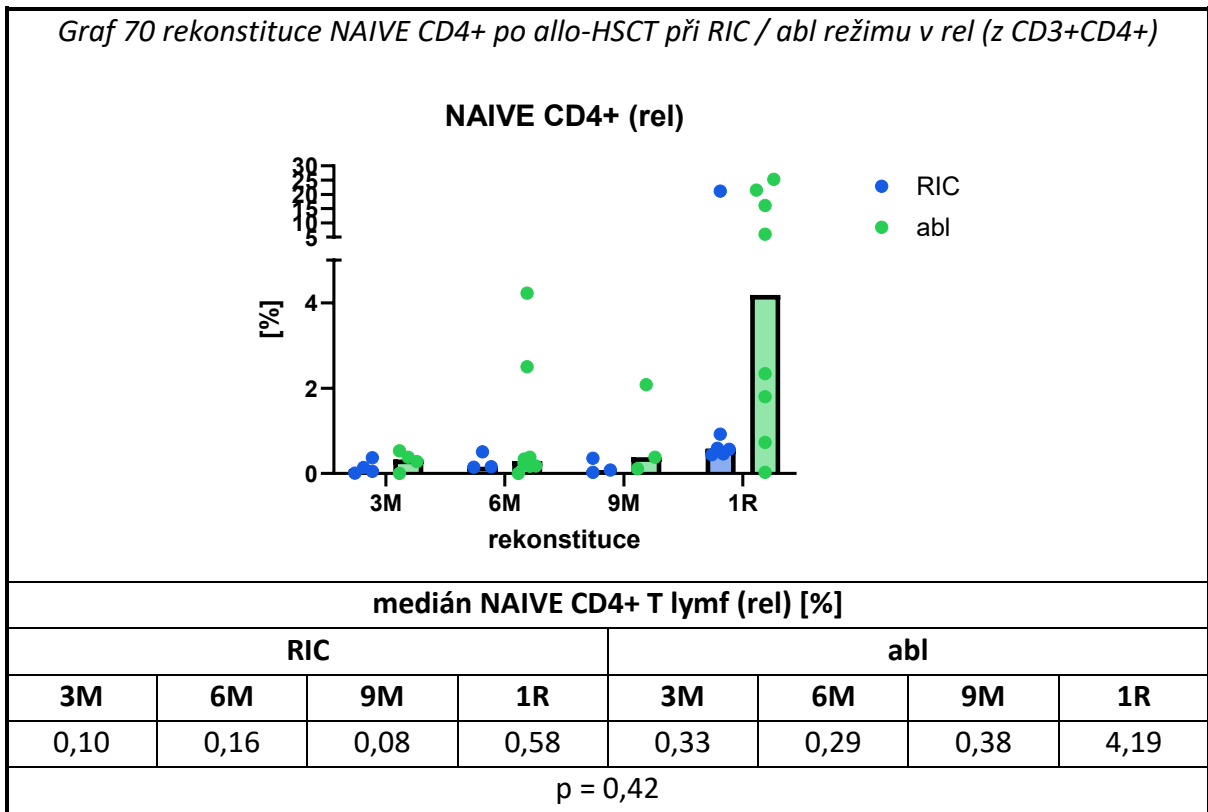
**Tabulka 44 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**



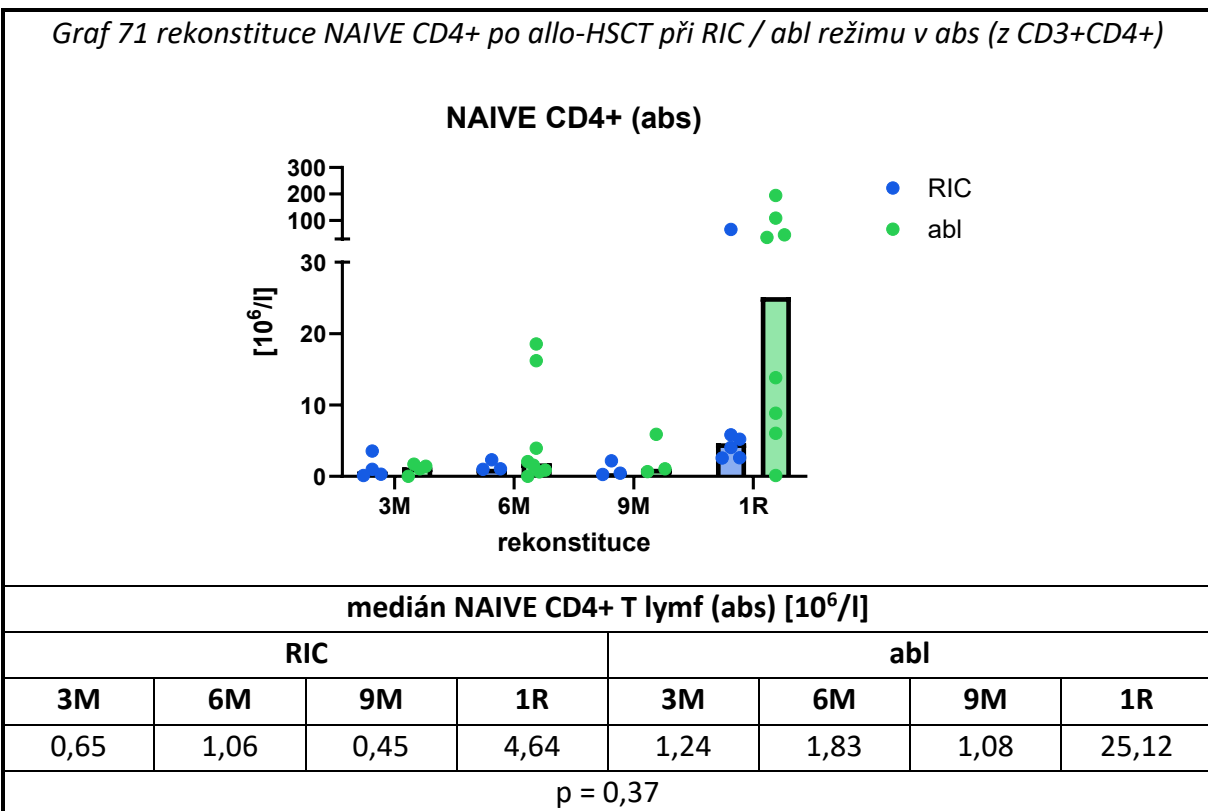
**Tabulka 45 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**



**Tabulka 46 rekonstituce NAIVET CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**

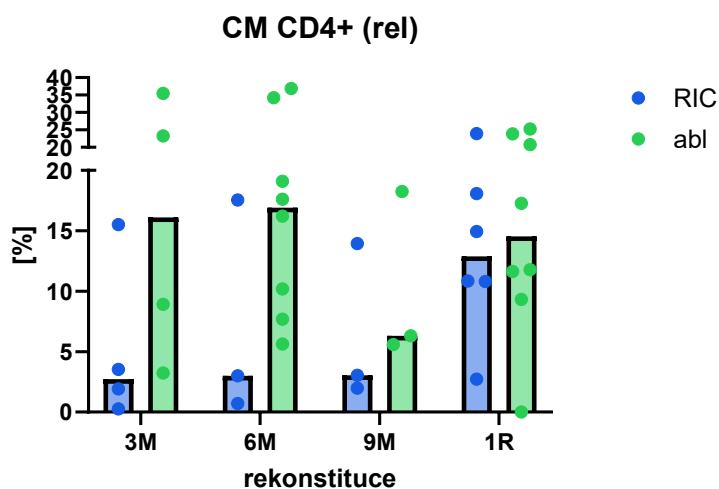


**Tabulka 47 rekonstituce NAIVET CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**



**Tabulka 48 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**

**Graf 72 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+)**

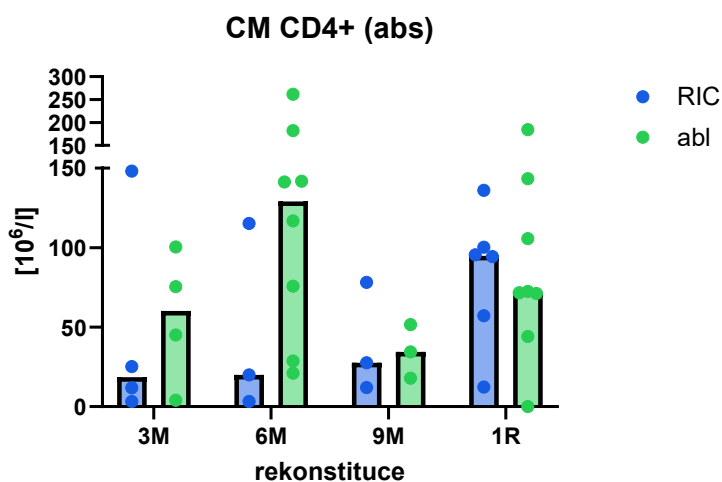


**medián CM CD4+ T lymf (rel) [%]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
2,72	3,01	3,05	12,90	16,10	16,92	6,32	14,53
<b>p = 0,0366</b>							

**Tabulka 49 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**

**Graf 73 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+)**

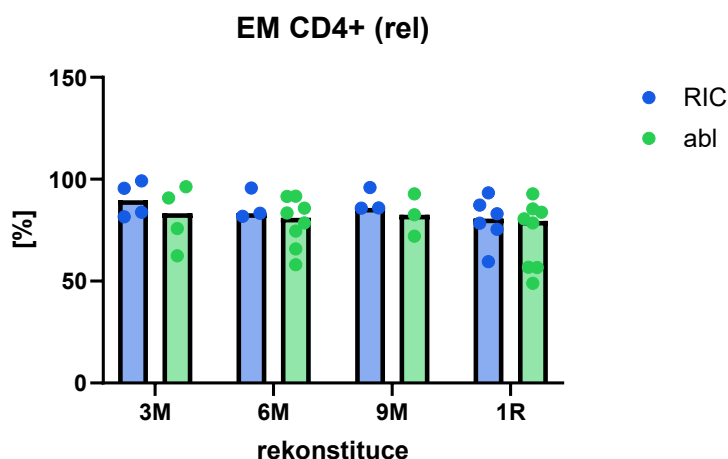


**medián CM CD4+ T lymf (abs) [10<sup>6</sup>/l]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
18,49	20,01	27,63	94,93	60,25	129,06	34,41	72,11
<b>p = 0,31</b>							

**Tabulka 50 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**

*Graf 74 rekonstituce EM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+)*

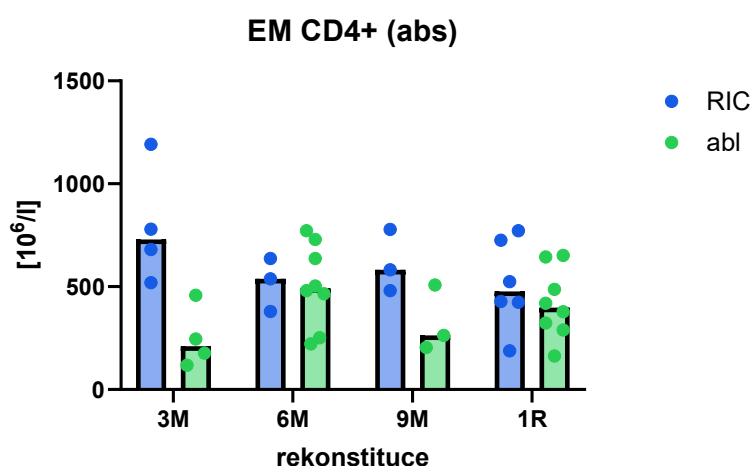


**medián EM CD4+ T lymf (rel) [%]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
89,66	83,28	85,95	80,72	83,31	81,02	82,61	79,55
p = 0,09							

**Tabulka 51 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**

*Graf 75 rekonstituce EM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+)*

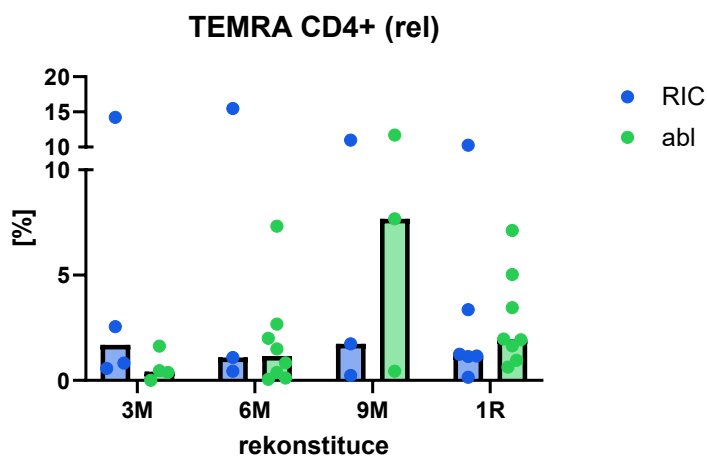


**medián EM CD4+ T lymf (abs) [10<sup>6</sup>/l]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
729,91	538,06	581,96	476,64	211,21	491,59	262,98	398,63
p = 0,0015							

**Tabulka 52 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**

*Graf 76 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+)*

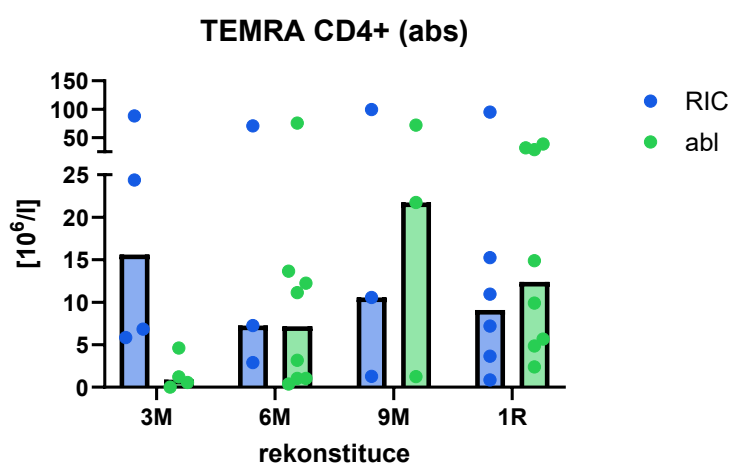


**medián TEMRA CD4+ T lymf (rel) [%]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
1,69	1,09	1,74	1,20	0,42	1,17	7,67	1,95
p = 0,35							

**Tabulka 53 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**

*Graf 77 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+)*



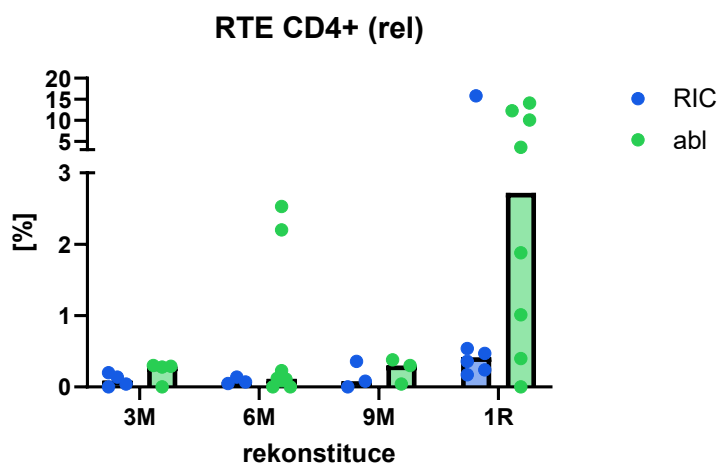
**medián TEMRA CD4+ T lymf (abs) [10<sup>6</sup>/l]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
15,61	7,24	10,56	9,08	0,90	7,16	21,74	12,40
p = 0,22							



**Tabulka 54 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**

*Graf 78 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+)*

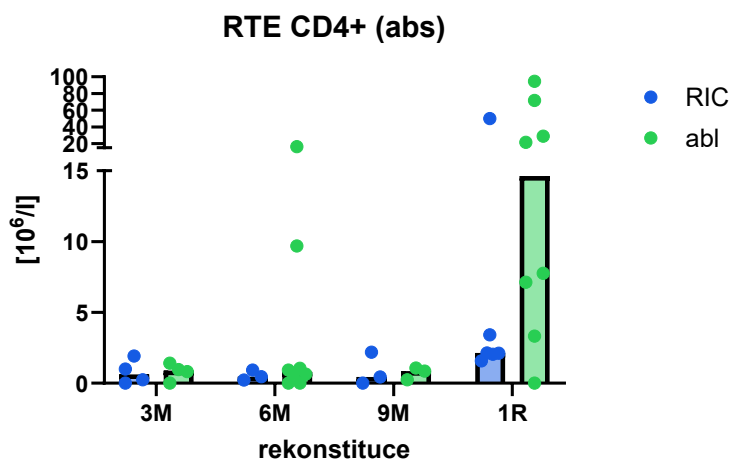


**medián RTE CD4+ T lymf (rel) [%]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
0,09	0,07	0,08	0,42	0,29	0,11	0,30	2,72
p = 0,54							

**Tabulka 55 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**

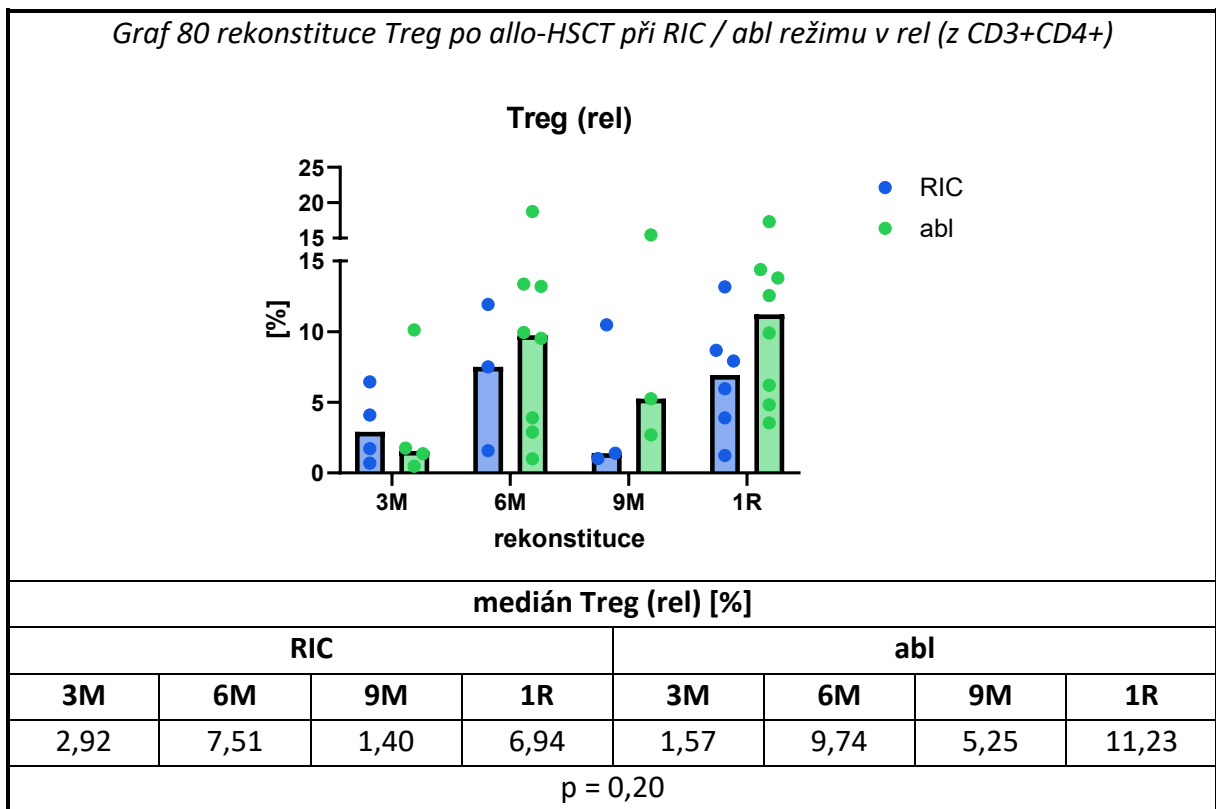
*Graf 79 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+)*



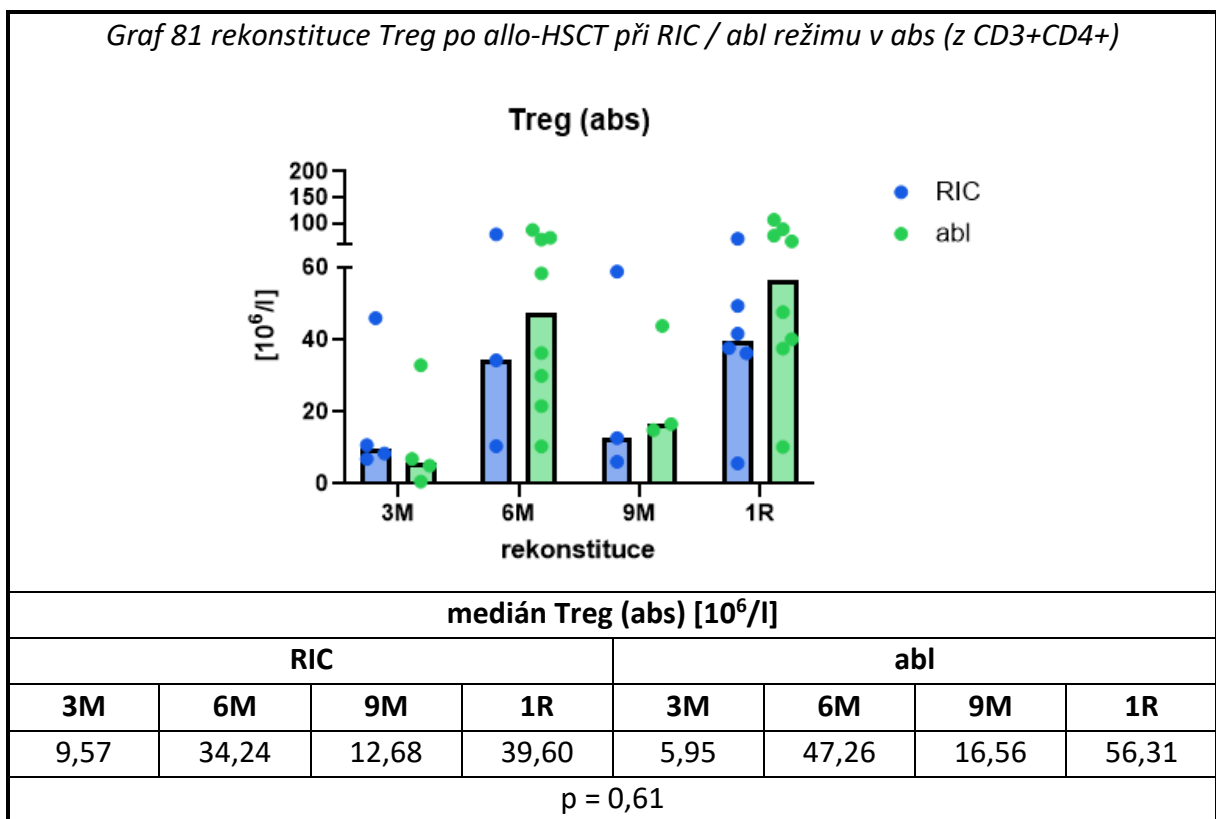
**medián RTE CD4+ T lymf (abs) [10<sup>6</sup>/l]**

RIC				abl			
3M	6M	9M	1R	3M	6M	9M	1R
0,62	0,46	0,45	2,13	0,90	0,63	0,85	14,63
p = 0,40							

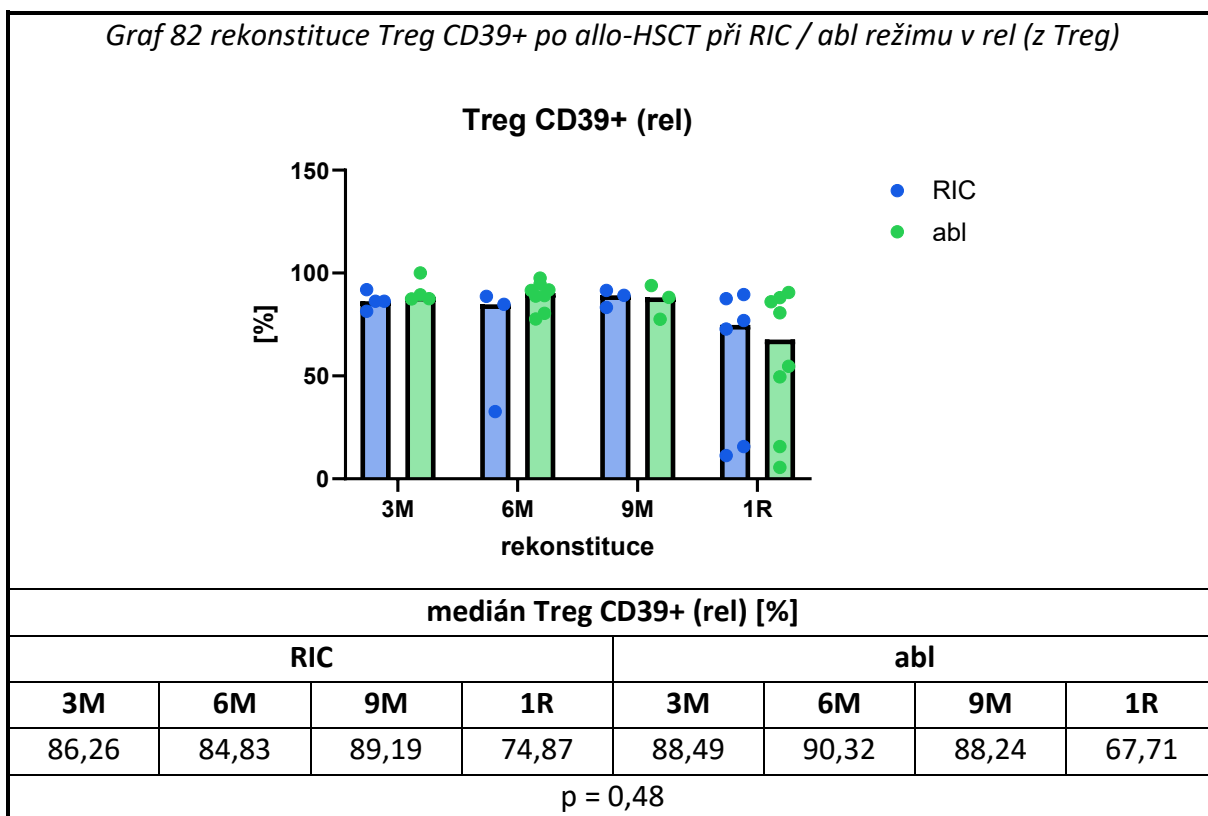
**Tabulka 56 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**



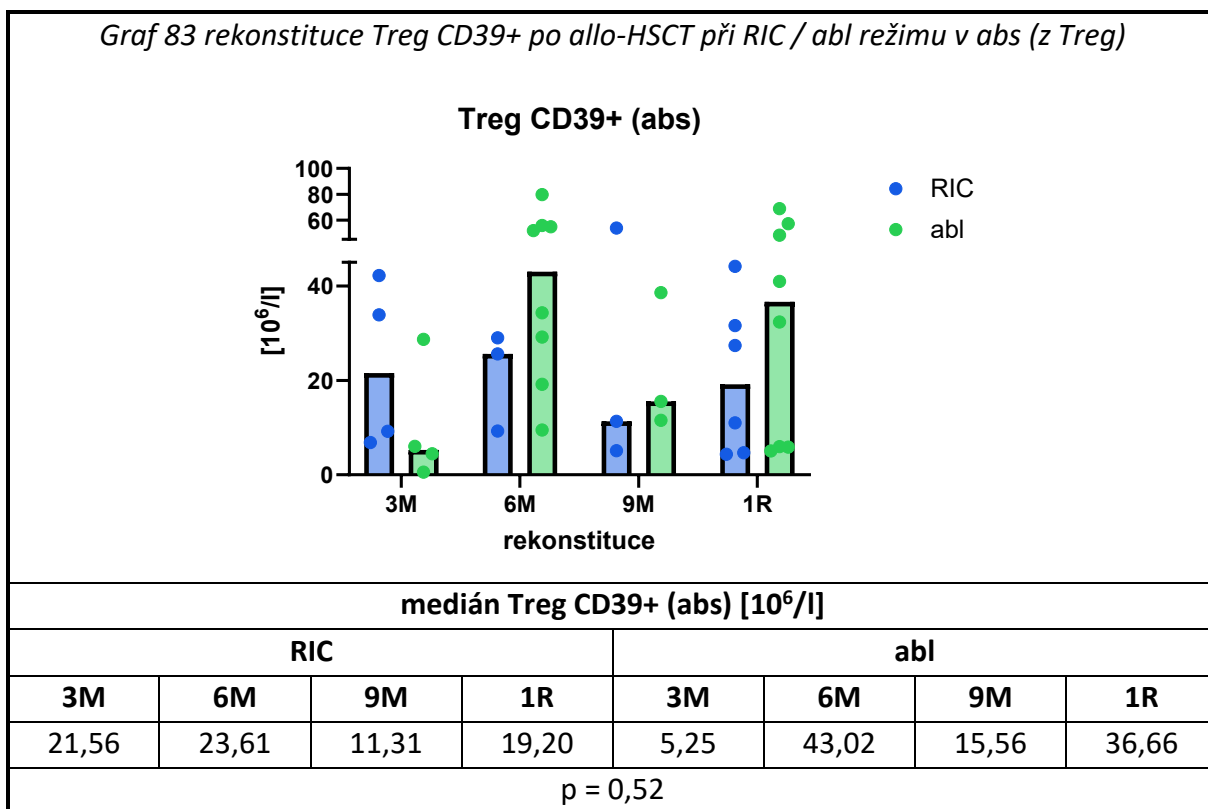
**Tabulka 57 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**



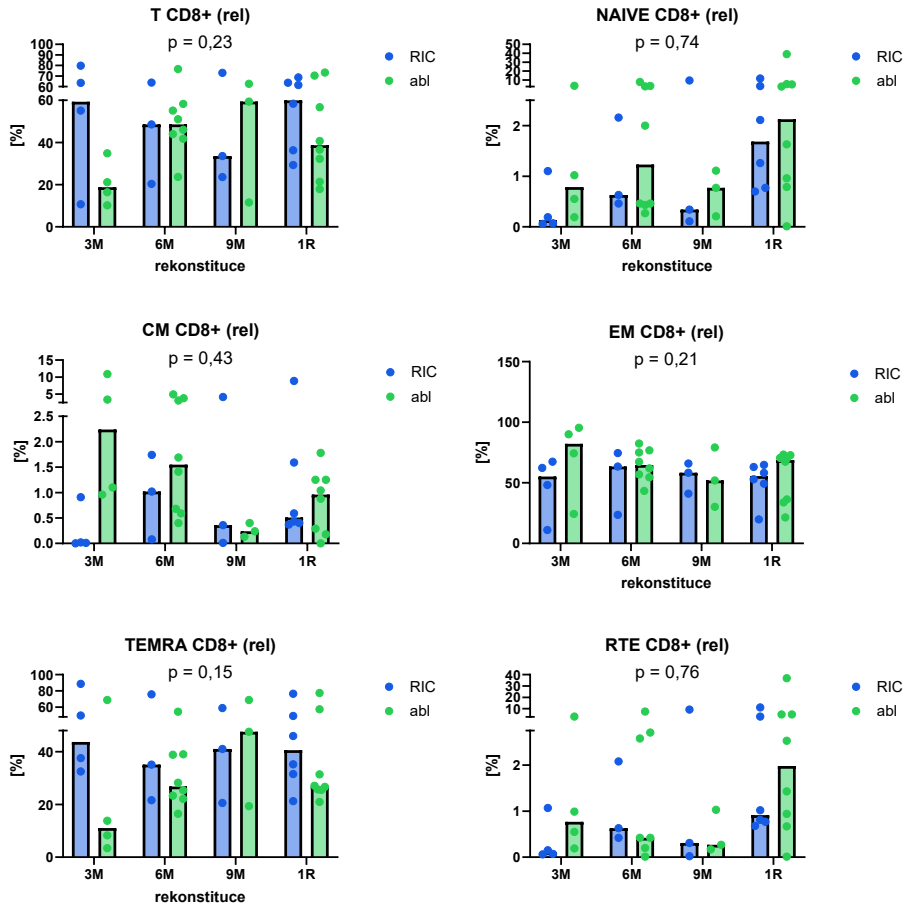
**Tabulka 58 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel**



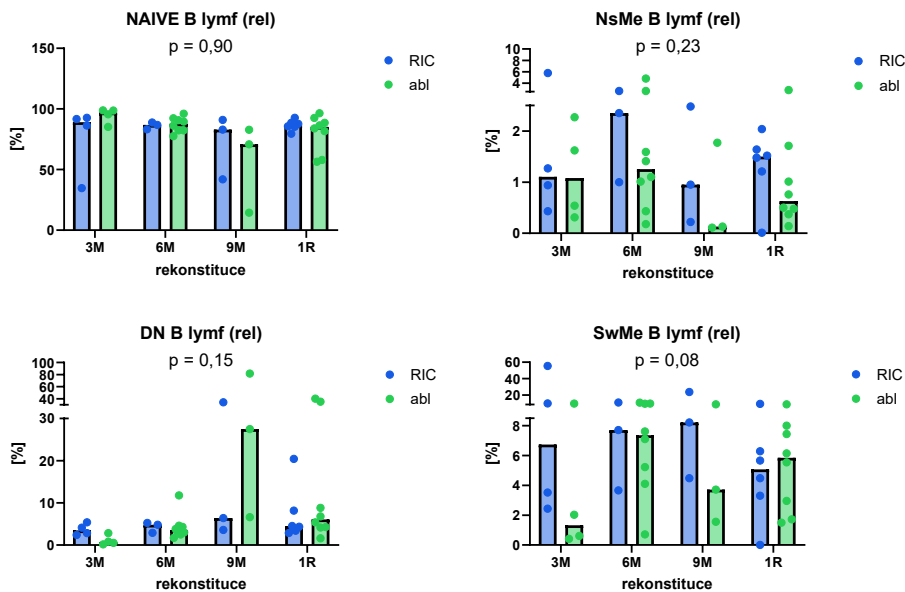
**Tabulka 59 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs**



**Graf 84 rekonstrukce subpopulací T lymf CD8+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD8+)**



**Graf 85 rekonstrukce subpopulací B lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z B lymf)**



### 8.3.1 Zhodnocení výsledků

**Tabulka 60 mediány rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT při RIC / abl režimu**

mediány CD4+ T lymfocytárních subpopulací									
název	RIC				abl				jedn.
	3M	6R	9M	1R	3M	6R	9M	1R	
<b>z WBC</b>									
CD3+ T lymf	72,70	63,76	46,48	70,19	29,55	62,27	71,82	55,33	%
	5,27	2,76	2,40	4,72	1,20	3,48	1,95	2,84	10 <sup>9</sup> /l
CD4+ T lymf	11,92	13,04	10,40	10,79	11,44	10,28	9,47	10,25	%
	0,83	0,66	0,61	0,60	0,30	0,68	0,28	0,56	10 <sup>9</sup> /l
<b>z CD3+CD4+</b>									
NAIVE CD4+	0,10	0,16	0,08	0,58	0,33	0,29	0,38	4,19	%
	0,65	1,06	0,45	4,64	1,24	1,83	1,08	25,12	10 <sup>6</sup> /l
CM CD4+	2,72	3,01	3,05	12,90	16,10	16,92	6,32	14,53	%
	18,49	20,01	27,63	94,93	60,25	129,06	34,41	72,11	10 <sup>6</sup> /l
EM CD4+	89,66	83,28	85,95	80,72	83,31	81,02	82,61	79,55	%
	729,91	538,06	581,96	476,64	211,21	491,59	262,98	398,63	10 <sup>6</sup> /l
TEMRA CD4+	1,69	1,09	1,74	1,20	0,42	1,17	7,67	1,95	%
	15,61	7,24	10,56	9,08	0,90	7,16	21,74	12,40	10 <sup>6</sup> /l
RTE CD4+	0,09	0,07	0,08	0,42	0,29	0,11	0,30	2,72	%
	0,62	0,46	0,45	2,13	0,90	0,63	0,85	14,63	10 <sup>6</sup> /l
Treg	2,92	7,51	1,40	6,94	1,57	9,74	5,25	11,23	%
	9,57	34,24	12,68	39,60	5,95	47,26	16,56	56,31	10 <sup>6</sup> /l
<b>z Treg</b>									
CD39+ Treg	86,26	84,83	89,19	74,87	88,49	90,32	88,24	67,71	%
	21,56	23,61	11,31	19,20	5,25	43,02	15,56	36,66	10 <sup>6</sup> /l

**Tabulka 61 výsledky statistické analýzy rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT při RIC / abl režimu**

CD3+ T lymf	rel	<b>p = 0,0349</b>
CD4+ T lymf	abs	<b>p = 0,0078</b>
CM CD4+	rel	<b>p = 0,0366</b>
EM CD4+	abs	<b>p = 0,0015</b>

Mediány rekonstituce CD3+ T lymfocytů v rel hodnotách převyšují ref. meze (s výjimkou 3M u abl režimu) a po RIC režimu dosahují vyšších hodnot než po abl režimu. Tato skutečnost je zároveň potvrzena statistickou významností  $p = 0,0349$ . V abs hodnotách jsou medián normální nebo vyšší, než udávají referenční meze. Po RIC režimu dosahují mediány vyšších hodnot než u abl režimu. U rekonstituce CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách jsou mediány dat nižší než ref. meze, výjimku tvoří medián 3M v abs hodnotách u RIC režimu. Mediány rekonstituce jsou mírně vyšší po RIC režimu a tento trend potvrzuje statistická významnost u abs hodnot  $p = 0,0078$ . Rekonstituce NAIVE CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách obsahuje mediány nižší, než udávají ref. meze. U rekonstituce po abl režimu mediány dosahují výrazně vyšších hodnot. U rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách jsou mediány nižší, než ref. meze. V rel hodnotách rekonstituce jsou mediány výrazně vyšší u transplantace po abl režimu, tato skutečnost je potvrzena statistickou významností  $p = 0,0366$ . Mediány rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách výrazně převyšují ref. meze. Mediány dat jsou mírně vyšší po RIC režimu než po abl režimu. V rel hodnotách je tento trend potvrzen statistickou významností  $p = 0,0015$ . Mediány rekonstituce TEMRA CD4+ T lymfocytů v rel i abs hodnotách jsou v ref. mezích, výjimku tvoří medián 9M v rel hodnotách u abl režimu. Po RIC režimu dosahují mediány dat vyšších hodnot v první polovině rekonstituce, v druhé polovině roku jsou mediány vyšší po abl režimu. U rekonstituce RTE CD4+ T lymfocytů jsou v rel i abs hodnotách přítomny mediány nižší, než udávají ref. meze. Rekonstituce po abl režimu poskytuje vyšší hodnoty mediánů. Rekonstituce Treg obsahuje v rel i abs hodnotách normální nebo snížené mediány dat. Mediány hodnot ve 3M a 9M jsou nižší než ref. meze. U transplantace po abl režimu jsou mediány mírně vyšší než u transplantace po RIC režimu. Ačkoliv pro porovnání rekonstituce Treg CD39+ nejsou k dispozici ref. meze, v rel hodnotách je viditelné podobné procentuální zastoupení mediánů dat v rozmezí 85–90 %, které v 1R výrazně klesá k 70 %. V abs hodnotách se tento trend nevyskytuje a mediány kolísají.

Hodnoty mediánů rekonstituce CD8+ T lymfocytárních subpopulací a B lymfocytárních subpopulací nebyly zhodnoceny, protože nevykazovaly dostatečnou průkaznost vlivu přípravného režimu na rekonstituci.

## 9. DISKUSE

Allo-HSCT je nejefektivnějším a někdy též i posledním řešením pro pacienty nejen s hematologickými malignitami, ale i s dalšími závažnými onemocněními. Tato léčebná technika je náročná na provedení, a to jak ve výběru dárce v rámci shody v HLA systému s příjemcem, tak i do přípravy pacienta před podáním štěpu nebo v péči v následném období od provedené transplantace. Na průběhu i na úspěchu allo-HSCT se podílí nespočet faktorů, které mohou léčbu ovlivnit. Ačkoliv se allo-HSCT může zdát jako riskantní léčebná technika, její benefity rizika mnohonásobně převyšují. Selhání nebo úspěch allo-HSCT je významně ovlivněn stavem imunity pacienta (Kuball, 2019).

Po úspěšně provedené allo-HSCT dochází k obnovení buněk imunitního systému. Tato diplomová práce byla zaměřena na rekonstituci lymfocytárních populací, které byly sledovány v období jednoho roku u pacientů s diagnostikovanými hematologickými onemocněními po úspěšné allo-HSCT. Diagnóza pacientů neměla vliv na průběh allo-HSCT, ale z naměřených dat lymfocytárních populací v takzvaném nultém měsíci (před allo-HSCT) je zřejmá heterogenita pacientů, kterým byla allo-HSCT indikována. Následná obnova imunitního systému pacientů probíhala obdobně u všech sledovaných v následujících měsících.

Hodnota WBC u pacientů po provedené allo-HSCT v průběhu jednoho roku se postupně zvyšovala a taktéž i různorodé buněčné linie bílé řady. Jediné sledované buňky reprezentující rekonstituci vrozené imunity byly NK buňky, jejichž mediány hodnot byly poměrně vysoké, což potvrzuje skutečnost, že se jako první obnovují buňky vrozené imunitní odpovědi (Van den Brink, 2015) a tvrzení, že NK Buňky jsou první lymfoidní populací, která se rekonstruuje po allo-HSCT (Lysák, 2021).

Rekonstituce celkové populace lymfocytů v průběhu jednoho roku vykazovala postupně zvyšující se trend mediánů dat. Pokud jsou však lymfocyty rozděleny na T a B, je viditelný úspěšný průběh rekonstituce ve prospěch B lymfocytů, což potvrzují Ogonek a kol. v tvrzení, že obnova celkových B lymfocytů dosahuje normálních hodnot do 12 měsíců. (Ogonek, 2016) Převážná většina obnovených B lymfocytů však tvoří buňky naivního fenotypu, které převládají nad paměťovými subtypy i po prvním roce rekonstituce. Von Niederhäusern a kol. ve své studii došli k obdobným závěrům a tento

stav vysvětlují velmi pomalou rekonstitucí paměťových B lymfocytárních subtypů a varují před zvýšenou náchylností k infekcím. (Von Niederhäusern, 2022)

Velmi markantní rozdíl je viditelný při porovnání rekonstituce T lymfocytů CD4+ a CD8+. Převážnou část T lymfocytů u pacientů v prvním roce po podstoupené allo-HSCT tvoří CD8+ T lymfocyty. Většinu sledovaných CD4+ a CD8+ T lymfocytů zastupují zvýšené EM a TEMRA buňky, subtypy NAIVE, CM a RTE jsou nízké. Fukunaga a kol. vysvětlují tento stav rozdělením rekonstituce T lymfocytů jako thymus dependentní a thymus independentní. V raném období od provedené transplantace tak dochází k periferní expanzi T lymfocytárních paměťových subtypů, která je nezávislá na thymu. Protože rekonstituce CD4+ T lymfocytů je zároveň více závislá na funkci thymu, CD8+ T lymfocyty převažují nad CD4+ T lymfocyty až několik měsíců od transplantace. (Fukunaga, 2007) Van den Broek a kol. potvrzují převahu paměťových subtypů v prvních měsících po allo-HSCT a popisují jejich postupné snižování se začínající pomalou rekonstitucí NAIVE a RTE T lymfocytů, která nastává v následujících měsících až letech. (Van den Broek, 2018) Toubert a kol. uvádějí, že pro vznik RTE T lymfocytů, je nutná diferenciace dárcovských progenitorů v thymu příjemce, tento proces je velmi pomalý, ale následně tak tyto buňky představují trvalou rekonstituci T lymfocytů. (Toubert, 2012)

Vysoké hodnoty CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT mohou být způsobeny reaktivací cytomegaloviru (CMV). (Król, 2011) Hartjen a kol. ve své studii popisují významně vyšší CD8+ T lymfocyty po infekci CMV (Hartjen, 2017), Von Niederhäusern a kol. došli ke stejnému závěru a poukazují také na současnou reaktivaci viru Epsteina Barrové (EBV). (Von Niederhäusern, 2022) Van den Brink a kol. naopak poukazují i na riziko vzniku infekcí spojené s nízkým počtem CD4+ T lymfocytů a připodobňují stav po allo-HSCT s infekcí HIV. (Van den Brink, 2015)

Rekonstituce Treg lymfocytů nabídla značné kolísání mediánů hodnot mezi sníženými a normálními počty, ale po prvním roce se stav ustálil ve fyziologických mezích. Treg lymfocyty jsou velice důležitou populací rekonstituce, zejména díky schopnosti navození imunologické tolerance, což může mít ve výsledku protektivní účinky proti vzniku GvH (Lysák, 2021) nebo ke snížení výskytu CMV. (Van den Brink, 2015) Zároveň ale schopnost Treg lymfocytů tlumit funkci protinádorových imunitních buněk



může zapříčinit podporu leukemických reziduí a vzniku relapsu. (Sander, 2017) Nejméně 80 % sledovaných Treg lymfocytů exprimuje molekulu CD39. Nagate a kol. popisují ve své studii expresi této ektonukleotidázy na fyziologických Treg lymfocytech, ale i na buňkách nádorů při AML. (Nagate, 2021) Aroua a kol. popisují CD39 jako marker nepříznivé prognózy u AML a také jako nový marker reziduální nemoci. (Aroua, 2020) Mediány Treg lymfocytů byly v abs hodnotách násobně vyšší před provedenou transplantací než po prvním roce rekonstituce. Tento stav může být zapříčiněn jejich zvýšenou aktivitou při nádorové chorobě před provedenou allo-HSCT a nebo nedokonalou rekonstitucí po allo-HSCT v prvním roce. Mediány CD39+ Treg lymfocytů se postupně zvyšovaly od proběhlé allo-HSCT a v rel hodnotách i značně převyšovaly předtransplantační hodnotu. Stav rekonstituce CD39+ Treg lymfocytů je pravděpodobně spojen s vyšší aktivitou po allo-HSCT.

Výběrový soubor pacientů, kteří podstoupili allo-HSCT nečítal pouze jedince s odlišnými hematologickými diagnózami, ale byl složen z mužů a žen rozdílného věkového zastoupení. Tito pacienti byli rozděleni na základě věku na skupiny mladší a starší generace a byl zhodnocen průběh jejich rekonstituce lymfocytů. Hlavní sledovanou populací se staly CD4+ T lymfocyty a jejich subpopulace, jejichž hodnoty dosahovaly v celkovém posouzení rekonstituce nízkých hodnot. Při dosazení faktoru věku a porovnání dat mezi generacemi byly zjištěny převážně zvýšené hodnoty NAIVE, CM a RTE buněk u mladší generace a spíše zvýšené hodnoty EM, Treg a Treg CD39+ u generace starší. Jiménez a kol. ve své studii pojednávají o možném snížení počtu NAIVE a RTE subtypů způsobeného postupnou atrofií thymu, který se od jednoho roku života zmenšuje o 3 % ročně až do středního věku a následně o méně než 1 % ročně po zbytek života. Zároveň uvádějí, že na predikci rychlé obnovy NAIVE T lymfocytů není závislý věk, ale přípravný režim. (Jiménez, 2007) Palatella a kol. potvrzují ve své studii snížení thymopoézy a periferní diferenciaci Treg lymfocytů během stárnutí a zároveň vysvětlují vyšší hodnoty Treg jejich nahromaděním v sekundárních lymfoidních orgánech ve stáří. (Palatella, 2022) Xhaard a kol. ve své studii uvádějí protichůdné závěry rekonstituce Treg lymfocytů po allo-HSCT a udávají že věk pacientů <25 let byl spojen s lepší obnovou Treg lymfocytů. (Xhaard, 2014) Wang a kol. hodnotili ve své studii rekonstituci lymfocytů po allo-HSCT u dětí a jejich závěry jsou srovnatelné

se zjištěnými výsledky v této práci. (Wang, 2022) Ačkoliv byly prokázány rozdíly v rekonstituci u několika lymfocytárních subtypů, převážná většina výsledků rekonstituce všech sledovaných buněk dosahuje podobných závěrů a věk pacientů na průběh rekonstituce lymfocytů se neprokázal. Tato skutečnost může být silně ovlivněna poměrně malým výběrovým souborem pacientů.

Dříve než pacienti podstoupí allo-HSCT je nutné, aby absolvovali přípravu před transplantací, která pomůže „uvolnit“ prostor pro přihojení buněk v kostní dřeni (Hořejší, 2017). K tomu jsou určeny takzvané přípravné režimy. V rámci výběrového souboru pacientů byly sledovány dva z těchto režimů: RIC a abl. Přípravné režimy je nutné správně zvolit, aby byly co nejefektivnější, ale zároveň neohrožovaly daného jedince. Při výběru přípravného režimu pro pacienty staršího věku je vhodnou variantou RIC režim. Vydra a kol. ve své studii doporučují použití abl režimu u pacientů do 59. roku a RIC režim u pacientů starších 60 let. (Vydra, 2021) Jethava a kol. ve své studii udávají, že pravděpodobně nejlepší možností je použití RIC režim u pacientů ještě starších, a to 65 let. (Jethava, 2017) Ve sledovaném výběrovém souboru však byli přítomni i jedinci staršího věku, kteří abl režim podstoupili, což poukazuje na individuální přístup ve zvolené terapii pacientů. Pozorovanou buněčnou populací rekonstituce se znovu staly převážně CD4+ T lymfocyty a jejich jednotlivé subtypy, jejichž hodnoty rekonstituce byly sledovány u pacientů po RIC režimu a po abl režimu. Po provedeném abl režimu byly zjištěny přijatelnější hodnoty rekonstituce u NAIVE, CM a RTE CD4+ T lymfocytů, což koreluje s výsledky porovnání věkových generací, kde zároveň mladším pacientům byl indikován právě abl režim a hodnoty NAIVE a RTE buněk mohou odrážet vyšší aktivitu méně atrofovaného thymu. Vyšší mediány hodnot u rekonstituce lymfocytárních subpopulací po RIC režimu byly prokázány u CD3+ T lymfocytů a EM CD4+ T lymfocytů. Rekonstituce CD4+ T lymfocytů po RIC režimu dosahovala vyšších hodnot než po abl režimu, ale mediány dat byly stále velmi nízké. Jiménez a kol. potvrzují, že u rekonstituce těchto T lymfocytárních populací (CD3+ T lymf, CD4+ T lymf a EM CD4+ T lymf) dochází k úspěšnější rekonstituci v prvních měsících po RIC režimu zejména z důvodu zvýšeného přežívání hostitelských imunokompetentních T lymfocytů po mírnějším RIC režimu. (Jiménez, 2007) Shahraki a kol. ve své studii udávají, že rekonstituce T lymfocytů po RIC režimu závisí

na počáteční periferní expanzi dárcovských paměťových T lymfocytů následovanou thymus dependentní diferenciací z kmenových buněk. Mohu potvrdit jejich studii zvýšenými počty CD3+ T lymfocytů a EM CD4+ T lymfocytů a nižšími CD4+ T lymfocyty oproti rekonstrukci CD8+ T lymfocytů. Zároveň ve studii popisují, že snížené CD4+ T lymfocyty nezpůsobily zvýšení post-transplantačních infekcí během sledování. (Shahraki, 2024) Rychlejší nebo úspěšnější rekonstrukce ostatních T lymfocytárních subtypů po RIC režimu nebyla prokázána. Při klinickém porovnání RIC a abl režimu Ústavem hematologie a krevní transfúze, Praha nebyl prokázán žádný znatelný vliv faktoru přípravného režimu na celkové přežití pacientů po allo-HSCT, kteří jeden z těchto režimů úspěšně podstoupili (Šťastná Marková, 2021).

Průběh rekonstrukce lymfocytů po allo-HSCT sledovaný pomocí průtokové cytometrie přináší možnost sledovat obnovu imunitního systému na úrovni jednotlivých buněčných populací. Ačkoliv data zjištěná z pozorování pacientů výběrového souboru jsou rozsáhlá a přináší spoustu pozitivních informací o úspěšně probíhající rekonstrukci, je nutné konstatovat, že lymfocytární populace po roce od provedené transplantace nedosahují zdaleka hodnot udávající fyziologická rozmezí. Van den Brink a kol. udávají ve svém článku, že adekvátní doba k obnovení lymfocytárních populací je 1-2 roky (Van den Brink, 2015). Na základě naměřených dat hodnocených v této práci bych se přikláněl spíše k horní hranici tohoto tvrzení a očekával bych slibné výsledky až ve druhém roce lymfocytární rekonstrukce.

Pro zhodnocení rekonstrukce lymfocytů po allo-HSCT je v klinické praxi nutná multioborová spolupráce k docílení co nejefektivnější léčby. Například o sledování prediktivních faktorů ovlivňujících celkové přežití pacientů po allo-HSCT podrobně pojednávají Bělohlávková a kol. ve statistickém hodnocení dat IV. Interní hematologické kliniky LF UK a FN Hradce Králové. Mezi tyto faktory, jejichž vliv byl prokázán, je možné zařadit předtransplantační hodnotu blastů ve dřeni, cytogenetický nálezu a/nebo hodnotu sérové LDH. Pokud tento biologický marker dosahuje vysokých hodnot před provedenou transplantací, byl u sledovaných pacientů prokázán vliv na budoucí vznik relapsu onemocnění. U pacientů po allo-HSCT s elevací hodnot sérového C-reaktivního proteinu, bylo prokázáno riziko vyššího výskytu akutní i chronické GvH a závažných infekcí. (Bělohlávková, 2021)

Ze stanovených dat rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT, které byly hodnoceny v mé diplomové práci vyplývá, že po dobu jednoho roku nedochází k plné obnově všech lymfocytárních populací. Ačkoliv rekonstituci B lymfocytů je možné zhodnotit jako úspěšnou, populace T lymfocytů nepřinesla tak slibné výsledky. CD8+ a především CD4+ T lymfocyty teoreticky mohou dosáhnout přijatelných hodnot nejdříve v průběhu druhého roku rekonstituce, a proto bych doporučil prodloužit dobu sledování pacientů. Z pozorování přidaného faktoru věku a jeho potenciálního vlivu na průběh rekonstituce nebyla i přes zjištěné výsledky prokázána závislost na lepší obnově lymfocytárních populací. Výsledné stanovené hodnoty mediánů dosahovaly podobných hodnot a jejich výpovědní hodnota mohla být zkreslena nízkým počtem pacientů výběrového souboru. Ačkoliv sledování faktoru přípravného režimu RIC nebo abl na rekonstituci nepřineslo jednoznačné závěry, mediány dat CD3+ T lymfocytů, CD4+ T lymfocytů a EM CD4+ T lymfocytů u pacientů s podstoupeným RIC režimem dosahovaly lepších výsledků. Pro komplexnější zhodnocení bych doporučil sledování průběhu rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT v rozsáhlejší časovém období ve zvýšeném počtu sledovaných pacientů, aby se lépe předešlo zkreslení výsledných dat. Rozšíření pozorování o biochemická markery nebo kvantifikaci imunoglobulinů by bylo též velice přínosné.

## 10. ZÁVĚR

Veškeré naměřené výsledky rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT z časového období jednoho roku byly zpracovány do grafů a patřičně zhodnoceny. Dosažené výsledky odhalily úspěšnou rekonstituci B lymfocytů a NK buněk. Byl sledován vliv faktoru věku na průběh rekonstituce, který i přes zjištěné výsledky nebyl u mladší nebo starší generace pacientů prokázán. Vliv faktoru přípravného režimu RIC nebo abl byl nejvíce markantní u populací CD3+ T lymfocytů, CD4+ T lymfocytů a EM CD4+ T lymfocytů. Závěrem mé práce je nedostatečná obnova T lymfocytárních populací v prvním roce rekonstituce.

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

Tabulka 62 použité zkratky

zkratka	význam zkratky	český překlad
<b>Ab</b>	antibody	protilátka
<b>abl</b>	myeloablative conditioning	myeloablativní režim
<b>abs</b>	-	absolutní hodnoty
<b>ADP</b>	adenosine diphosphate	adenozindifosfát
<b>Ag</b>	antigen	antigen
<b>allo-HSCT</b>	allogeneic hematopoetic stem-cell transplatation	alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk
<b>ALL</b>	acute lymphoblastic leukemia	akutní lymfoblastová leukémie
<b>AML</b>	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukémie
<b>AMP</b>	adenosine monophosphate	adenozinmonofosfát
<b>APL</b>	acute promyelocytic leukemia	akutní promyelocytární leukémie
<b>APC</b>	allophycocyanin	-
<b>APC_A750</b>	allophycocyanin alexa fluor 750	-
<b>ATG</b>	anti-thymocyte globulin	antitymocytární globulin
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate	adenozintrifosfát
<b>Ba</b>	basophil	bazofil
<b>bb/<math>\mu</math>l</b>	-	počet buněk na mikrolitr
<b>BCR</b>	B-cell receptor	B buněčný receptor
<b>CCR7</b>	CC-chemokine receptor type 7	CC-chemokinový receptor 7
<b>CD</b>	cluster of differentiation	-
<b>CFU</b>	colony forming unit	jednotka tvořící kolonie
<b>CGD</b>	chronic granulomatous disease	chronická granulomatózní choroba
<b>CM</b>	central memory T cells	centrální paměťové T lymfocyty
<b>CMV</b>	cytomegalovirus	-
<b>ConA</b>	conavalin A	konkavalin A
<b>CSA</b>	cyklosporin A	cyklosporin A
<b>CSF</b>	colony-stimulating factor	kolonie stimulující faktory
<b>DN</b>	double negative B cells	dvojitě negativní B lymfocyty

<b>EBV</b>	Epstein Barr virus	virus Epsteina Barrové
<b>ELN</b>	European LeukemiaNet	-
<b>EM</b>	effector memory T cells	efektorové paměťové T lymfocyty
<b>EMA</b>	eosin-5-maleimide acid	eozin-5-aleimidová kyselina
<b>Eo</b>	eosinophil	eozinofil
<b>EPO</b>	erythropoetin	erythropoetin
<b>FAB</b>	French-American-British classification	francouzsko-americko-britská klasifikace
<b>FC</b>	flow cytometry	průtoková cytometrie
<b>FISH</b>	fluorescence in situ hybridization	fluorescenční in situ hybridizaci
<b>FITC</b>	fluorescein Isothiocyanate	fluoroizothiokyanát
<b>FL</b>	fluorescein	fluorescein
<b>FLAER</b>	fluorescein-labeled proaerolysin	proaerolysin označený fluoresceinem
<b>FS</b>	forward scatter	rozptyl paprsku laseru v malém úhlu
<b>G-SCF</b>	granulocyte colony-stimulating factor	granulocytární kolonie stimulující faktory
<b>GC</b>	germinal center	germinální centrum
<b>GM-SCF</b>	granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor	granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktory
<b>GP</b>	grandparent	„prarodič“
<b>GvH</b>	graft versus host	reakce štěpu proti hostiteli
<b>GvL</b>	graft versus leukemia	reakce štěpu proti leukemickým buňkám
<b>HIM</b>	-	hemopoetické induktivní mikroprostředí
<b>HIV</b>	human immunodeficiency virus	lidský virus imunologické nedostatečnosti
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen	hlavní histokompatibilní systém člověka
<b>HMA</b>	hypomethylating agents	hypomethylační látky
<b>HSCT</b>	hematopoetic stem-cell transplatation	transplantace hematopoetických kmenových buněk
<b>IFN-γ</b>	interferon gamma	interferon gama
<b>Ig</b>	immunoglobulin	imunoglobulin

<b>IL</b>	interleukin	interleukin
<b>IPSS</b>	international prognostic scoring system	mezinárodní prognostický–skórovací systém
<b>ITP</b>	immune thrombocytopenic purpura	imunitní trombocytopenická purpura
<b>kDa</b>	kilodalton	kilodalton
<b>KO</b>	krome orange	-
<b>LBL</b>	lymphoblastic lymphoma	lymfoblastový lymfom
<b>LDH</b>	lactate dehydrogenase	laktátdehydrogenáza
<b>LYMF</b>	lymphocytes	lymfocyty
<b>MAC</b>	membrane attack comple	komplex atakující membránu
<b>MALT</b>	mucosa-asociated-lymphoid tissue	lymfoidní tkáň spojené se sliznicí
<b>mast</b>	mastocyte	mastocyt
<b>MBL</b>	manose binding lectin	lektin vázající manózu
<b>MDS</b>	myelodysplastic syndrome	myelodysplastický syndrom
<b>MMF</b>	mycophenolat mofetil	mycophenolát mofetil
<b>MRD</b>	minimal residual disiese	minimální zbytková nemoc
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid	informační (mediátorová) jednovláknová nukleová kyselina
<b>MSHP</b>	microspherical hydrophilic particles	mikrosférické hydrofilní partikule
<b>NADPH</b>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<b>NK</b>	natural killers	přirození zabijedci
<b>NSMe</b>	non-switched memory cells	nezralé paměťové buňky (bez přepnutí)
<b>PB</b>	pacific blue	-
<b>PC</b>	phycocyanin	-
<b>PE</b>	phycoerythrin	fykoerytrin
<b>PE-Cy5</b>	phycoerythrin and cyanin 5	fykoerytrin a cyanin 5
<b>PHA</b>	phytohemagglutinin	fytohemagglutinin
<b>PMA</b>	phorbol-myristoyl acetate	phorbol-myristoyl acetát
<b>PNH</b>	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	paroxysmální noční hemoglobinurie
<b>rel</b>	relative units	relativní hodnoty



<b>RIC</b>	reduced-intensity conditioning	režimy s redukovanou intenzitou
<b>RT-PCR</b>	reverse transcription polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
<b>RTE</b>	recent thymic emigrants	buňky, které časně opustili brzlík
<b>SASP</b>	senescence-associated secretory phenotype	senescenčně asociovaný sekreční fenotyp
<b>SCF</b>	stem cell factor	
<b>SCID</b>	severe combined immunodeficiency	těžký kombinovaný imunodeficit
<b>SS</b>	side scatter	boční rozptyl paprsku
<b>SwMe</b>	switched memory cells	paměťové buňky s přepnutím
<b>TA-GvH</b>	transfusion associated graft versus host	reakce štěpu proti hostiteli po krevní transfúzi
<b>Tc</b>	cytotoxic T cell	cytotoxický T lymfocyt
<b>TCR</b>	T-cell receptor	T buněčný receptor
<b>TEC</b>	thymic epithelial cell	buňky thymického epitelu
<b>TEMRA</b>	terminally differentiated effector memory T cells	terminálně diferencované efektorové paměťové T lymfocyty
<b>TGF-β</b>	transforming growth factor-beta	transformující růstový faktor beta
<b>Th</b>	helper T cell	pomocný T lymfocyt
<b>TPO</b>	thrombopoietin	trombopoetin
<b>Treg</b>	regulatory T cell	regulační T lymfocyt
<b>ÚKIA FN HK</b>	-	Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové
<b>WHO</b>	World Health Organization	světová zdravotnická organizace

## 12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam základních charakteristických povrchových molekul .....	18
Tabulka 2 referenční meze leukocytů a lymfocytárních populací z gejtů WBC .....	57
Tabulka 3 referenční meze gejtovaných lymfocytárních subpopulací.....	57
Tabulka 4 rekonstituce leukocytů po allo-HSCT.....	58
Tabulka 5 rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT .....	59
Tabulka 6 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT .....	59
Tabulka 7 rekonstituce B lymfocytů po allo-HSCT .....	60
Tabulka 8 rekonstituce NK buněk po allo-HSCT.....	60
Tabulka 9 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT .....	61
Tabulka 10 rekonstituce T lymfocytů CD8+ po allo-HSCT .....	61
Tabulka 11 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	62
Tabulka 12 rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT.....	62
Tabulka 13 rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT.....	63
Tabulka 14 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	63
Tabulka 15 rekonstituce RTE CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	64
Tabulka 16 rekonstituce NAIVE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	64
Tabulka 17 rekonstituce CD CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	65
Tabulka 18 rekonstituce EM CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT.....	65
Tabulka 19 rekonstituce TEMRA CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	66
Tabulka 20 rekonstituce RTE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT .....	66
Tabulka 21 rekonstituce Treg po allo-HSCT .....	67
Tabulka 22 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT.....	67
Tabulka 23 rekonstituce NAIVE B lymfocytů po allo-HSCT .....	68
Tabulka 24 rekonstituce NSMe B lymfocytů po allo-HSCT .....	68
Tabulka 25 rekonstituce DN B lymfocytů po allo-HSCT .....	69
Tabulka 26 rekonstituce SwMe B lymfocytů po allo-HSCT .....	69
Tabulka 27 mediány rekonstituce leukocytů a lymfocytárních populací z WBC .....	70
Tabulka 28 mediány CD4+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD4+.....	71
Tabulka 29 mediány CD8+ T lymfocytárních subpopulací z CD3+CD8+.....	72
Tabulka 30 mediány B lymfocytárních subpopulací z CD19+ B lymfocytů .....	73
Tabulka 31 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	74
Tabulka 32 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	75
Tabulka 33 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	75
Tabulka 34 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	76
Tabulka 35 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	76
Tabulka 36 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace.....	77
Tabulka 37 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	77
Tabulka 38 rekonstituce Treg po allo-HSCT u mladší a starší generace.....	78
Tabulka 39 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT u mladší a starší generace .....	78
Tabulka 40 mediány rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT u ml. a st. gen.....	80

Tabulka 41 výsledky statistické analýzy rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT u ml. a st. gen.....	80
Tabulka 42 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	83
Tabulka 43 rekonstituce T lymfocytů CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	83
Tabulka 44 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	84
Tabulka 45 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	84
Tabulka 46 rekonstituce NAIVET CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	85
Tabulka 47 rekonstituce NAIVET CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	85
Tabulka 48 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel.....	86
Tabulka 49 rekonstituce CM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs.....	86
Tabulka 50 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	87
Tabulka 51 rekonstituce EM CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs.....	87
Tabulka 52 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel.....	88
Tabulka 53 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	88
Tabulka 54 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	89
Tabulka 55 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	89
Tabulka 56 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel.....	90
Tabulka 57 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs .....	90
Tabulka 58 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel .....	91
Tabulka 59 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs.....	91
Tabulka 60 mediány rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT při RIC / abl režimu .....	93
Tabulka 61 výsledky statistické analýzy rekonstituce CD4+ T lymfocytárních subpopulací po allo-HSCT při RIC / abl režimu .....	93
Tabulka 62 použité zkratky .....	102

## 13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 grafické zobrazení naměřených hodnot průtokovou cytometrií.....	29
Obrázek 2 gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací I. část.....	50
Obrázek 3 gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací II. část.....	51
Obrázek 4 gejtovací strategie T lymfocytů a jejich subpopulací III. část.....	52
Obrázek 5 gejtovací strategie regulačních T lymfocytů I. část.....	53
Obrázek 6 gejtovací strategie regulačních T lymfocytů II. část.....	54
Obrázek 7 gejtovací strategie B lymfocytů a jejich subpopulací I. část .....	55
Obrázek 8 gejtovací strategie B lymfocytů a jejich subpopulací II. část .....	56

## 14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 rekonstituce leukocytů po allo-HSCT .....	58
Graf 2 rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT v relativních hodnotách (z WBC) .....	59
Graf 3 rekonstituce lymfocytů po allo-HSCT v absolutních hodnotách (z WBC) .....	59
Graf 4 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT v rel (z WBC) .....	59
Graf 5 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT v abs (z WBC).....	59
Graf 6 rekonstituce B lymfocytů po allo-HSCT v rel (z WBC) .....	60
Graf 7 rekonstituce B lymfocytů po allo-HSCT v abs (z WBC) .....	60
Graf 8 rekonstituce NK buněk po allo-HSCT v rel (z WBC) .....	60
Graf 9 rekonstituce NK buněk po allo-HSCT v abs (z WBC).....	60
Graf 10 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT v rel (z WBC) .....	61
Graf 11 rekonstituce T lymfocytů CD4+ po allo-HSCT v abs (z WBC).....	61
Graf 12 rekonstituce T lymfocytů CD8+ po allo-HSCT v rel (z WBC) .....	61
Graf 13 rekonstituce T lymfocytů CD8+ po allo-HSCT v abs (z WBC).....	61
Graf 14 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymf po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+).....	62
Graf 15 rekonstituce NAIVE CD4+ T lymf po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+).....	62
Graf 16 rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+) .....	62
Graf 17 rekonstituce CM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+) .....	62
Graf 19 rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+).....	63
Graf 20 rekonstituce EM CD4+ T lymfocytů po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+) .....	63
Graf 21 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+) .....	63
Graf 22 rekonstituce TEMRA CD4+ T lymf po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+).....	63
Graf 23 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+).....	64
Graf 24 rekonstituce RTE CD4+ T lymf po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+).....	64
Graf 26 rekonstituce NAIVE CD8+ T lymf po allo-HSCT v rel (z CD3+CD8+).....	64
Graf 27 rekonstituce NAIVE CD8+ T lymf po allo-HSCT v abs (z CD3+CD8+).....	64
Graf 28 rekonstituce CD CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v rel (z CD3+CD8+) .....	65
Graf 29 rekonstituce CD CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v abs (z CD3+CD8+) .....	65
Graf 30 rekonstituce EM CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v rel (z CD3+CD8+).....	65
Graf 31 rekonstituce ED CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v abs (z CD3+CD8+) .....	65
Graf 32 rekonstituce TEMRA CD8+ T lymf po allo-HSCT v rel (z CD3+CD8+) .....	66
Graf 33 rekonstituce TEMRA CD8+ T lymf po allo-HSCT v abs (z CD3+CD8+).....	66

Graf 34 rekonstituce RTE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v rel (z CD3+CD8+).....	66
Graf 35 rekonstituce RTE CD8+ T lymfocytů po allo-HSCT v abs (z CD3+CD8+).....	66
Graf 36 rekonstituce Treg po allo-HSCT v rel (z CD3+CD4+) .....	67
Graf 37 rekonstituce Treg po allo-HSCT v abs (z CD3+CD4+).....	67
Graf 38 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT v rel (z Treg) .....	67
Graf 39 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT v abs (z Treg) .....	67
Graf 40 rekonstituce NAIVE B lymfocytů po allo-HSCT v rel (z B lymf) .....	68
Graf 41 rekonstituce NAIVE B lymfocytů po allo-HSCT v abs (z B lymf).....	68
Graf 42 rekonstituce NSMe B lymfocytů po allo-HSCT v rel (z B lymf) .....	68
Graf 43 rekonstituce NSMe B lymfocytů po allo-HSCT v abs (z B lymf) .....	68
Graf 44 rekonstituce DN B lymfocytů po allo-HSCT v rel (z B lymf) .....	69
Graf 45 rekonstituce DN B lymfocytů po allo-HSCT v abs (z B lymf).....	69
Graf 46 rekonstituce SwMe B lymfocytů po allo-HSCT v rel (z B lymf) .....	69
Graf 47 rekonstituce SwMe B lymfocytů po allo-HSCT v abs (z B lymf).....	69
Graf 48 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT u mladší a starší generace v rel (z WBC) .....	74
Graf 49 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT u mladší a starší generace v abs (z WBC) .....	74
Graf 50 rekonstituce T lymf CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z WBC).....	75
Graf 51 rekonstituce T lymf CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z WBC) .....	75
Graf 52 rekonstituce NAIVE CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD4+) .....	75
Graf 53 rekonstituce NAIVE CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+).....	75
Graf 54 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD4+).....	76
Graf 55 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+) .....	76
Graf 56 rekonstituce EM CD4+po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD4+).....	76
Graf 57 rekonstituce EM CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+).....	76
Graf 58 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD4+) .....	77
Graf 59 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+) .....	77
Graf 60 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD4+) .....	77
Graf 61 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+).....	77
Graf 62 rekonstituce Treg po allo-HSCT u ml. a st. gen v rel (z CD3+CD4+).....	78
Graf 63 rekonstituce Treg po allo-HSCT u ml. a st. gen. v abs (z CD3+CD4+) .....	78
Graf 64 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT u ml. a st. gen v rel (z Treg) .....	78
Graf 65 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT u ml. a st. gen v abs (z Treg).....	78
Graf 66 rekonstituce subpopulací T lymf CD8+ po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z CD3+CD8+)	
.....	79
Graf 67 rekonstituce subpopulací B lymf po allo-HSCT u ml. a st. gen. v rel (z B lymf) .....	79
Graf 68 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z WBC) .....	83
Graf 69 rekonstituce T lymf CD3+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z WBC) .....	83
Graf 70 rekonstituce T lymf CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+).....	84
Graf 71 rekonstituce T lymf CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+) .....	84
Graf 72 rekonstituce NAIVE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+).....	85
Graf 73 rekonstituce NAIVE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+).....	85
Graf 74 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+) .....	86
Graf 75 rekonstituce CM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+) .....	86
Graf 76 rekonstituce EM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+).....	87
Graf 77 rekonstituce EM CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+) .....	87

Graf 78 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+) .....	88
Graf 79 rekonstituce TEMRA CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+).....	88
Graf 80 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+).....	89
Graf 81 rekonstituce RTE CD4+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+).....	89
Graf 82 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD4+) .....	90
Graf 83 rekonstituce Treg po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z CD3+CD4+).....	90
Graf 84 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z Treg).....	91
Graf 85 rekonstituce Treg CD39+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v abs (z Treg) .....	91
Graf 86 rekonstituce subpopulací T lymf CD8+ po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z CD3+CD8+).....	92
Graf 87 rekonstituce subpopulací B lymf po allo-HSCT při RIC / abl režimu v rel (z B lymf).....	92

## 15. POUŽITÁ LETERATURA

1. JÍLEK, Petr, 2019. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 2.*, doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0595-3.
2. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie. 6.*, aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.
3. ŠTERZL, Ivan, 2007. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0972-0.
4. HAMPLOVÁ, Lidmila, 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol. 2.*, aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. ISBN 978-80-7553-729-4.
5. MAKRIS, Spyridon, Charlotte M. DE WINDE, Harry L. HORSNELL, Jesús A. CANTORAL-REBORDINOS, Rachel E. FINLAY a Sophie E. ACTON, 2022. *Immune function and dysfunction are determined by lymphoid tissue efficacy* [online]. 2022-01-01, **15**(1) [cit. 2024-03-25]. ISSN 1754-8403. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.049256
6. BACON, C. M., M.-Q. DU a A. DOGAN, 2006. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2006-07-05, **60**(4), 361-372 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.2005.031146
7. LUCAS, Daniel, 2021. Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology* [online]. **28**(1), 36-42 [cit. 2024-03-11]. ISSN 1065-6251. Dostupné z: doi:10.1097/MOH.0000000000000621
8. ZHANG, Hengwei, Jane L. LIESVELD, Laura M. CALVI, Brea C. LIPE, Lianping XING, Michael W. BECKER, Edward M. SCHWARZ a Shu-Chi A. YEH, 2023. *The roles of bone remodeling in normal hematopoiesis and age-related hematological malignancies*. *Bone Research* [online]. **11**(1) [cit. 2024-03-27]. ISSN 2095-6231. Dostupné z: doi:10.1038/s41413-023-00249-w

9. SEITA, Jun a Irving L. WEISSMAN, 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *WIREs Systems Biology and Medicine* [online]. **2**(6), 640-653 [cit. 2024-03-11]. ISSN 1939-5094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.86
10. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
11. KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ, 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.
12. KHENINE, Hana, Louis WAECKEL, Fouad SEGHROUCHNI, Anne-Emmanuelle BERGER a Claude LAMBERT, 2021. Fluorescent energy transfer causing misleading signal in multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A* [online]. **99**(11), 1102-1106 [cit. 2024-03-11]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.24342
13. FLORES-MONTERO, Juan, Tomas KALINA, Alba CORRAL-MATEOS, et al., 2019. Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* [online]. **475** [cit. 2024-03-11]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2019.06.009
14. DELVES, Peter J., Seamus J. MARTIN, Dennis R. BURTON a Ivan M. ROITT, 2017. *Roitt's essential immunology*. Thirteenth edition. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-111-8415-771.
15. VAN DEN BROEK, Theo, José A. M. BORGHANS a Femke VAN WIJK, 2018. The full spectrum of human naive T cells. *Nature Reviews Immunology* [online]. **18**(6), 363-373 [cit. 2023-10-08]. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/s41577-018-0001-y
16. APPAY, Victor, Rene A. W. VAN LIER, Federica SALLUSTO a Mario ROEDERER, 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A* [online]. **73A**(11), 975-983 [cit. 2023-12-03]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20643



17. BOLDT, Andreas, Stephan BORTE, Stephan FRICKE, Karim KENTOUICHE, Frank EMMRICH, Michael BORTE, Franka KAHLENBERG a Ulrich SACK, 2014. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. **86**(3), 191-206 [cit. 2023-10-08]. ISSN 15524949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.21162
18. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3533-7.
19. YU, Ning, Xiaomei LI, Weiya SONG, et al., 2012. CD4 CD25 CD127low/- T Cells: A More Specific Treg Population in Human Peripheral Blood. *Inflammation* [online]. **35**(6), 1773-1780 [cit. 2024-04-05]. ISSN 0360-3997. Dostupné z: doi:10.1007/s10753-012-9496-8
20. ZHAO, Hai, Cong BO, Yan KANG a Hong LI, 2017. What Else Can CD39 Tell Us? *Frontiers in Immunology* [online]. 2017-06-22, **8** [cit. 2024-04-05]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00727
21. SEDDIKI, Nabila, Laura COOK, Denise C. HSU, et al., 2014. Human antigen-specific CD4 CD25 CD134 CD39 T cells are enriched for regulatory T cells and comprise a substantial proportion of recall responses. *European Journal of Immunology* [online]. **44**(6), 1644-1661 [cit. 2024-04-05]. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201344102
22. STRICKLAND, Marie, Salanne LEE, Shi Yong NEO, et al., 2023. Mitochondrial Dysfunction in CD4 T Effector Memory RA Cells. *Biology* [online]. **12**(4) [cit. 2024-03-31]. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology12040597
23. MATOS, Tiago R., Ahmed GEHAD, Jessica E. TEAGUE, et al., 2022. Central memory T cells are the most effective precursors of resident memory T cells in human skin. *Science Immunology* [online]. 2022-04-15, **7**(70) [cit. 2024-03-31]. ISSN 2470-9468. Dostupné z: doi:10.1126/sciimmunol.abn1889

24. MERA VIGLIA, Serena, Paolo DI CARLO, Diego PAMPINELLA, et al., 2019. T-Cell Subsets ( $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{EMRA}$ ) and Poly-Functional Immune Response in Patients with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and Different T-CD4 Cell Response. *Ann Clin Lab Sci* [online]. **49**(4), 519-528 [cit. 2024-03-31]. PMID: 31471343. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31471343/>
25. CYSTER, Jason G. a Christopher D.C. ALLEN, 2019. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* [online]. **177**(3), 524-540 [cit. 2024-03-27]. ISSN 00928674. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cell.2019.03.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016)
26. PIĄTOSA, Barbara, Beata WOLSKA-KUŚNIERZ, Małgorzata PAC, Katarzyna SIEWIERA, Ewa GAŁKOWSKA a Ewa BERNATOWSKA, 2010. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. **78B**(6), 372-381 [cit. 2023-10-08]. ISSN 15524949. Dostupné z: [doi:10.1002/cyto.b.20536](https://doi.org/10.1002/cyto.b.20536)
27. KAMINSKI, Denise A., Chungwen WEI, Yu QIAN, Alexander F. ROSENBERG a Ignacio SANZ, 2012. Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Frontiers in Immunology* [online]. **3** [cit. 2023-10-08]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2012.00302](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302)
28. ABEL, Alex M., Chao YANG, Monica S. THAKAR a Subramaniam MALARKANNAN, 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018-8-13, **9** [cit. 2024-03-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2018.01869](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869)
29. ROBINSON, J. Paul, Raluca OSTAFE, Sharath Narayana IYENGAR, Bartek RAJWA a Rainer FISCHER, 2023. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells* [online]. **12**(14) [cit. 2024-03-27]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: [doi:10.3390/cells12141875](https://doi.org/10.3390/cells12141875)
30. MCKINNON, Katherine M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. **120**(1) [cit. 2024-03-11]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: [doi:10.1002/cpim.40](https://doi.org/10.1002/cpim.40)

31. SUN, James, Jodi L. KROEGER a Joseph MARKOWITZ, 2021. Introduction to Multiparametric Flow Cytometry and Analysis of High-Dimensional Data. *Translational Bioinformatics for Therapeutic Development* [online]. New York, NY: Springer US, 239-253 [cit. 2024-03-27]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-0716-0848-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-0849-4\_13
32. COSSARIZZA, Andrea, Hyun-Dong CHANG, Andreas RADBRUCH, et al., 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology* [online]. **49**(10), 1457-1973 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201970107
33. MADKAIKAR, Manisha Rajan, Snehal SHABRISH, Manasi KULKARNI, Jahnvi ALURI, Aparna DALVI, Madhura KELKAR a Maya GUPTA, 2019. Application of Flow Cytometry in Primary Immunodeficiencies: Experience From India. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019-6-11, **10** [cit. 2024-03-25]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01248
34. SANTOS-ARGUMEDO, Leopoldo, Laura BERRÓN-RUIZ, Gabriela LÓPEZ-HERRERA a Nidia Carolina MORENO-CORONA, 2023. Flow-cytometry as an auxiliary in the diagnosis of primary humoral immunodeficiencies. *Gaceta Médica de México* [online]. 2023-03-31, **156**(3) [cit. 2024-03-25]. ISSN 0016-3813. Dostupné z: doi:10.24875/GMM.M20000386
35. LEVERING, Wilfried H.B.M., Kees SINTNICOLAAS, Henk WIND, Herbert HOOIJKAAS a Jan W. GRATAMA, 2005. Flow Cytometric Screening for the HLA – B27 Antigen on Peripheral Blood Lymphocytes. *Current Protocols in Cytometry* [online]. **33**(1) [cit. 2024-03-25]. ISSN 1934-9297. Dostupné z: doi:10.1002/0471142956.cy0622s33
36. WENDT, Emily R., Helen FERRY, David R. GREAVES, Satish KESHAV a Rajesh MOHANRAJ, 2015. Ratiometric Analysis of Fura Red by Flow Cytometry: A Technique for Monitoring Intracellular Calcium Flux in Primary Cell Subsets. *PLOS ONE* [online]. 2015-4-2, **10**(4) [cit. 2024-03-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0119532

37. DRÉNOU, B., 1996. Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematology and Cell Therapy* [online]. **38**(6), 505-512 [cit. 2024-03-25]. ISSN 1269-3286. Dostupné z: doi:10.1007/s00282-996-0505-y
38. CHEN, Yu a Wolfgang G. JUNGER, 2012. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Leucocytes* [online]. Totowa, NJ: *Humana Press*, **844**, 115-124 [cit. 2024-03-27]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-61779-526-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-527-5\_8
39. YU, Hsin-Hui, Yao-Hsu YANG a Bor-Luen CHIANG, 2021. *Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review* [online]. **61**(2), 101-113 [cit. 2024-03-25]. ISSN 1080-0549. Dostupné z: doi:10.1007/s12016-020-08800-x
40. DE NEERGAARD, Therese a Pontus NORDENFELT, 2023. *Quantification of Phagocytosis Using Flow Cytometry. Bacterial Pathogenesis* [online]. New York, NY: Springer US, 221-234 [cit. 2024-03-25]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-0716-3242-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-3243-7\_15
41. SANTOS, Alexandra F., Oral ALPAN a Hans-Jürgen HOFFMANN, 2021. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy* [online]. **76**(8), 2420-2432 [cit. 2024-03-25]. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.14747
42. EBO, D. G., C. H. BRIDTS, M. M. HAGENDORENS, N. E. AERTS, L. S. DE CLERCK a W. J. STEVENS, 2008. Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. **74B**(4), 201-210 [cit. 2024-03-25]. ISSN 1552-4949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.20419
43. MOUSSET, Charlotte M., Willemijn HOBBO, Rob WOESTENENK, Frank PREIJERS, Harry DOLSTRA a Anniek B. VAN DER WAART, 2019. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A* [online]. **95**(6), 647-654 [cit. 2024-03-25]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23724

44. AOKI, Yoichi, Ikunosuke TSUNEKI, Masaru SASAKI, Minoru WATANABE, Takaaki SATO, Hiroshi AIDA a Kenichi TANAKA, 2000. Analysis of TH1 and TH2 Cells by Intracellular Cytokine Detection with Flow Cytometry in Patients with Ovarian Cancer. *Gynecologic and Obstetric Investigation* [online]. 2000-10-1, **50**(3), 207-211 [cit. 2024-03-25]. ISSN 0378-7346. Dostupné z: doi:10.1159/000010312
45. POZAROWSKI, Piotr a Zbigniew DARZYNKIEWICZ, 2004. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Checkpoint Controls and Cancer* [online]. New Jersey: Humana Press, 2004-7-1, 301-312 [cit. 2024-03-25]. ISBN 1-59259-811-0. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-811-0:301
46. BERTUZZI, A., I. D'AGNANO, A. GANDOLFI, A. GRAZIANO, G. STARACE a P. UBEZIO, 1990. Study of propidium iodide binding to DNA in intact cells by flow cytometry. *Cell Biophysics* [online]. **17**(3), 257-267 [cit. 2024-03-25]. ISSN 0163-4992. Dostupné z: doi:10.1007/BF02990721
47. KURNICK, J. T., C. BELL a H. M. GREY, 1976. PHA-Induced Activation of Suppressor Cells in Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. **5**(6-7), 771-778 [cit. 2023-11-20]. ISSN 0300-9475. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3083.1976.tb03026.x
48. NIKŠ, M., M. OTTO, B. BUŠOVÁ a J. ŠTEFANOVIĆ, 1990. Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *Journal of Immunological Methods* [online]. **126**(2), 263-271 [cit. 2024-03-25]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(90)90159-S
49. PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA, 2010. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art. ISBN 978-80-903871-9-5.
50. DOUBEK, Michael a Jiří MAYER, ed., 2022. *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2022. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. Česká hematologická společnost ČLS JEP. ISBN 978-80-270-8240-7.

51. MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA, 2016. *Praktická imunohematologie: erythrocyty*. Praha: Mladá fronta. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3740-2.
52. BOROWITZ, Michael J., Fiona E. CRAIG, Joseph A. DIGIUSEPPE, Andrea J. ILLINGWORTH, Wendell ROSSE, D. Robert SUTHERLAND, Carl T. WITTEWER a Stephen J. RICHARDS, 2010. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. **78B**(4), 211-230 [cit. 2024-03-27]. ISSN 1552-4949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.20525
53. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ, 2009. *Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2299-3.
54. IGNATOVA, Anastasia A., Evgeniya A. PONOMARENKO, Dmitry M. POLOKHOV, et al., 2019. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* [online]. 2019-05-19, **30**(4), 428-437 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0953-7104. Dostupné z: doi:10.1080/09537104.2018.1513473
55. NURDEN, Alan T, 2006. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **1**(1) [cit. 2024-03-27]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-1-10
56. BELTRAME, Miriam P., M. MALVEZZI, J. ZANIS a R. PASQUINI, 2009. Flow cytometry as a tool in the diagnosis of Bernard-Soulier Syndrome in Brazilian patients. *Platelets* [online]. 2009-07-21, **20**(4), 229-234 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0953-7104. Dostupné z: doi:10.1080/09537100902893784
57. GOUBRAN, Hadi, Caroline HART, Ibraheem OTHMAN a Jerard SEGATCHIAN, 2018. Flow cytometry and immune thrombocytopenic purpura. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. **57**(6), 800-803 [cit. 2024-03-27]. ISSN 14730502. Dostupné z: doi:10.1016/j.transci.2018.10.018

58. SHAHRABI, Saeid, Majid GHANAVAT, Masumeh MALEKI BEHZAD, Daryush PURRAHMAN a Najmaldin SAKI, 2020. CD markers polymorphisms as prognostic biomarkers in hematological malignancies. *Oncology Reviews* [online]. 2020-07-06, **14**(2) [cit. 2024-03-11]. ISSN 1970-5565. Dostupné z: doi:10.4081/oncol.2020.466
59. PORWIT, Anna, Marie C. BÉNÉ, Carolien DUETZ, et al., 2023. Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. **104**(1), 27-50 [cit. 2024-03-27]. ISSN 1552-4949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.22108
60. FABER, Edgar, 2015. *Základy hematologické diagnostiky*. Druhé přepracované vydání. Praha: Mladá fronta. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3742-6.
61. GALTSEVA, I. V., Y. O. DAVYDOVA, N. M. KAPRANOV, H. L. JULHAKYAN a L. P. MENDELEEVA, 2018. Minimal residual disease in multiple myeloma: Benefits of flow cytometry. *International Journal of Laboratory Hematology* [online]. **40**(1), 12-20 [cit. 2024-03-27]. ISSN 1751-5521. Dostupné z: doi:10.1111/ijlh.12757
62. MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ, 2012. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3530-6.
63. VYDRA, Jan a Petr CETKOVSKÝ, 2015. *Hematologie v kostce*. Praha: Mladá fronta. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3698-6.
64. HAFERLACH, Torsten, 2014. *Kapesní atlas hematologie: překlad 6., přepracovaného vydání*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4787-3.
65. MRKVOVÁ, Zuzana, Tomáš HORŇÁK, Pavel JINDRA, et al., 2024. Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutní myeloidní leukemie (AML) (mimo APL). In: *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2024. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 17.1.2024. Česká hematologická společnost ČLS JEP, s. 1-25. ISBN 978-80-270-8240-7.

66. ŠÁLEK, Cyril, František FOLBER, Štěpán HRABOVSKÝ, Jan M. HORÁČEK, Tomáš SZOTKOWSKI a Michael DOUBEK, 2023. Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutní lymfoblastové leukémie (ALL). In: *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2024. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 15. 9. 2023. Česká hematologická společnost ČLS JEP, s. 1-41. ISBN 978-80-270-8240-7.
67. SZOTKOWSKI, Tomáš, Karel INDRÁK a Edgar FABER, 2023. Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutní promyelocytární leukémie (APL). In: *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2023. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 30. 1. 2023. Česká hematologická společnost ČLS JEP, s. 1-12. ISBN 978-80-270-8240-7.
68. KOLEKTIV AUTORŮ, 2013. *Akutní myeloidní leukémie Informace pro pacienty a jejich blízké*. Česká leukemická skupina – pro život (CELL), 76 s. ISBN 978-80-260-4154-2.
69. ČERMÁK, Jaroslav a Jan STARÝ, 2023. Myelodysplastické syndromy (MDS) a myelodysplasticko/myeloproliferativní nemoci (MPN). In: *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2023. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 28. 3. 2023. Česká hematologická společnost ČLS JEP, s. 1-25. ISBN 978-80-270-8240-7.
70. ALMOND, L. Max, Maria CHARALAMPAKIS, Samuel J. FORD, David GOUREVITCH a Anant DESAI, 2017. Myeloid Sarcoma: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* [online]. **17**(5), 263-267 [cit. 2023-11-20]. ISSN 21522650. Dostupné z: doi:10.1016/j.clml.2017.02.027
71. JINDRA, Pavel, Michal KARAS, Daniel LYSÁK, Marta KREJČÍ a Jiří MAYER, 2023. Autologní a alogenní transplantace krevetvorných buněk a přehled jejich indikací v České republice v roce 2023. In: *Léčebné postupy v hematologii – aktualizace 2023. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 27. 2. 2023. Česká hematologická společnost ČLS JEP, s. 1-22. ISBN 978-80-270-8240-7.



72. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ, 2021. *Imunodeficiencie*. 3., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-802-7112-739.
73. PARK, Meerim a Jong Jin SEO, 2012. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Research* [online]. 2012-10-02, 2012, 1-7 [cit. 2024-02-01]. ISSN 2090-2999. Dostupné z: doi:10.1155/2012/680841
74. ABRAHAMSEN, IW, S SOMME, D HELDAL, T EGELAND, D KVALE a GE TJONNFJORD, 2005. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. Pavia, Italy: Ferrata Storti Foundation, **90**(1). ISSN 1592-8721.
75. JETHAVA, Y S, S SICA, B SAVANI, F SOCOLA, M JAGASIA, M MOHTY, A NAGLER a A BACIGALUPO, 2017. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* [online]. **52**(11), 1504-1511 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2017.83
76. JIMÉNEZ, M, G ERCILLA a C MARTÍNEZ, 2007. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia* [online]. **21**(8), 1628-1637 [cit. 2023-11-20]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2404681
77. VYDRA, J, L NOVÁKOVÁ, M ŠŤASTNÁ MARKOVÁ, V VÁLKOVÁ, A VÍTEK a P CETKOVSKÝ, 2021. Alogenní transplantace krvetvorby starších pacientů – role přípravného režimu. *Transfuze a hematologie dnes*. **27**(supplementum 2), 2S47. ISSN 1213-5763.
78. VELA-OJEDA, J., M. A. García-Ruiz ESPARZA, F. TRIPP-VILLANUEVA, et al., 2004. Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Using Reduced Intensity Versus Myeloablative Conditioning Regimens for the Treatment of Leukemia. *Stem Cells and Development* [online]. **13**(5), 571-578 [cit. 2024-03-27]. ISSN 1547-3287. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2004.13.571

79. HOANG, Duc M., Phuong T. PHAM, Trung Q. BACH, et al., 2022. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **7**(1) [cit. 2024-03-27]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-022-01134-4
80. BĚLOHLÁVKOVÁ, P, F VRBACKÝ, L SMOLEJ, et al., 2021. Výsledky alogenní transplantace pacientů s myelodysplastickým syndromem – zkušenosti pracoviště. *Transfuze a hematologie dnes*. **27**(supplementum 2), 2S22-2S23. ISSN 1213-5763.
81. ŠŤASTNÁ MARKOVÁ, M, J ČERMÁK, V VÁLKOVÁ, L NOVÁKOVÁ, A VÍTEK, M KOUBA a J VYDRA, 2021. Alogenní transplantace hemopoézy u pacientů s MDS, zkušenosti ÚHKT. *Transfuze a hematologie dnes*. **27**(supplementum 2), 2S23. ISSN 1213-5763.
82. YANG, Guancui, Xiang WANG, Shiqin HUANG, Ruihao HUANG, Jin WEI, Xiaoqi WANG a Xi ZHANG, 2022. Generalist in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS or AML: Epigenetic therapy. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022-10-4, **13** [cit. 2023-11-20]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.1034438
83. SEMERÁD, L, B WEINBERGEROVÁ, Z NOVÁKOVÁ, et al., 2021. Výsledky léčby dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií pod 60 let – analýza dat z České národní databáze DATOOL-AML. *Transfuze a hematologie dnes*. **27**(supplementum 2), 2S11. ISSN 1213-5763.
84. OGONEK, Justyna, Mateja KRALJ JURIC, Sakhila GHIMIRE, Pavankumar Reddy VARANASI, Ernst HOLLER, Hildegard GREINIX a Eva WEISSINGER, 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2016-11-17, **7** [cit. 2024-03-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2016.00507
85. VAN DEN BRINK, Marcel R. M., Enrico VELARDI a Miguel-Angel PERALES, 2015. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology* [online]. 2015-12-05, **2015**(1), 215-219 [cit. 2023-11-20]. ISSN 1520-4391. Dostupné z: doi:10.1182/asheducation-2015.1.215

86. KUBALL, Jürgen a Jaap Jan BOELEN, 2019. Clinical and Biological Concepts for Mastering Immune Reconstitution After HSCT: Toward Practical Guidelines and Greater Harmonization. *The EBMT Handbook* [online]. Cham: Springer International Publishing, 69-74 [cit. 2024-03-27]. ISBN 978-3-030-02277-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_10
87. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, 2013. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4534-3.
88. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. 2012. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6.
89. ALADAĞ, Elifcan, Engin KELKITLI a Hakan GÖKER, 2020. Acute Graft-Versus-Host Disease: A Brief Review. *Turkish Journal of Hematology* [online]. 2020-1-15, **37**(1) [cit. 2024-03-27]. ISSN 13007777. Dostupné z: doi:10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0157
90. STRATTAN, Ethan a Gerhard Carl HILDEBRANDT, 2021. Mast Cell Involvement in Fibrosis in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(5) [cit. 2024-03-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22052385
91. LYSÁK, D, 2021. Přehled buněčné terapie v kontextu i mimo kontext HSCT. *Transfuze a hematologie dnes*. **27**(supplementum 1), S139-S142. ISSN 1213-5763.
92. CHIAD, Zane a Aleksander CHOJECKI, 2023. Graft versus Leukemia in 2023. *Best Pract Res Clin Haematol.* [online]. **36**(3) [cit. 2024-03-27]. ISSN 15216926. Dostupné z: doi:10.1016/j.beha.2023.101476
93. VON NIEDERHÄUSERN, Valentin, Josefine RUDER, Marie GHRAICHY, Ilijas JELCIC, Antonia Maria MÜLLER, Urs SCHANZ, Roland MARTIN a Johannes TRÜCK, 2022. B-Cell Reconstitution After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Multiple Sclerosis [online]. **9**(6) [cit. 2024-04-26]. ISSN 2332-7812. Dostupné z: doi:10.1212/NXI.000000000200027

94. FUKUNAGA, Akiko, Takayuki ISHIKAWA, Masako KISHIHATA, Takero SHINDO, Toshiyuki HORI a Takashi UCHIYAMA, 2007. Altered Homeostasis of CD4 Memory T Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Chronic Graft-versus-Host Disease Enhances T Cell Differentiation and Exhausts Central Memory T Cell Pool. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. **13**(10), 1176-1184 [cit. 2024-04-29]. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2007.06.009
95. KRÓL, L, J STUČHLÝ, P HUBÁČEK, P KESLOVÁ, P SEDLÁČEK, J STARÝ, O HRUŠÁK a T KALINA, 2011. Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* [online]. **46**(8), 1089-1098 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2010.261
96. HARTJEN, Anna Sophie, Andreas KRUMBHOLZ, Florian THIEME, et al., 2017. Immune Reconstitution after Allogeneic Stem Cell Transplantation - a Systematic Single Center Survey. *Blood* [online]. **130**(Suppl\_1: 5490) [cit. 2024-04-26]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl\_1.5490.5490
97. SANDER, Frida Ewald, Malin NILSSON, Anna RYDSTRÖM, et al., 2017. Role of regulatory T cells in acute myeloid leukemia patients undergoing relapse-preventive immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. **66**(11), 1473-1484 [cit. 2024-04-26]. ISSN 0340-7004. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-017-2040-9
98. NAGATE, Yasuhiro, Sachiko EZOE, Jiro FUJITA, et al., 2021. Ectonucleotidase CD39 is highly expressed on ATLL cells and is responsible for their immunosuppressive function. *Leukemia* [online]. **35**(1), 107-118 [cit. 2024-04-28]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0788-y
99. AROUA, Nesrine, Emeline BOET, Margherita GHISI, et al., 2020. Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discovery* [online]. 2020-10-01, **10**(10), 1544-1565 [cit. 2024-04-26]. ISSN 2159-8274. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1008

100. TOUBERT, A., S. GLAUZY, C. DOUAY a E. CLAVE, 2012. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens* [online]. **79**(2), 83-89 [cit. 2024-04-26]. ISSN 0001-2815. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0039.2011.01820.x
101. PALATELLA, Martina, Stephane M. GUILLAUME, Michelle A. LINTERMAN a Jochen HUEHN, 2022. The dark side of Tregs during aging. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022-8-9, **13** [cit. 2024-04-30]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.940705
102. XHAARD, A, H MOINS-TEISSERENC, M BUSSON, et al., 2014. Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* [online]. **49**(8), 1089-1092 [cit. 2024-04-30]. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2014.105
103. WANG, Jiayu, Meng YUAN, Guanghua ZHU, et al., 2022. Immune Reconstitution in Pediatric Aplastic Anemia after Allogeneic Hematopoietic Stem-cell Transplantation. *International Journal of Medical Sciences* [online]. **19**(5), 821-828 [cit. 2024-04-26]. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.70146
104. SHAHRAKI, Zahra, Maryam BEHFAR, Shiva MOHAMMADI, Nima PARVANEH a Amir Ali HAMIDIEH, 2024. *Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for inborn errors of immunity* [online]. Tehran University of Medical Sciences, Silesian University of Technology [cit. 2024-04-30]. Dostupné z: doi:10.21203/rs.3.rs-3824112/v1