

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení viability štěpu
krvetočných buněk metodami
průtokové cytometrie**

Bakalářská práce

Eliška Fialová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Martina Nováka, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 22. dubna 2017

SOUHRN

Tato práce se zabývá toxickými účinky dimethylsulfoxidu na počet viabilních CD34+ buněk ve štěpu. CD34+ buňky obnovují hematopoezu po transplantaci krvetvorných buněk při léčbě hematologických malignit typu leukemie, lymfomů a nádorů z plazmatických buněk. K měření množství CD34+ buněk ve štěpu je využívána technika průtokové cytometrie.

V teoretické části jsou shrnuty základní poznatky o dané problematice. V praktické části je popsána metodika zpracování štěpu, kryoprezervace a měření jeho kvality. Dále jsou zde uvedeny výsledky experimentu, při kterém se měřil počet viabilních CD34+ buněk před a po aplikaci dimethylsulfoxidu jako kryoprotektiva ke štěpu krvetvorných buněk. Podařilo se prokázat, že po aplikaci dimethylsulfoxidu dochází ke statisticky signifikantnímu snížení počtu viabilních CD34+ buněk.

SUMMARY

This thesis deals with toxic effects of dimethyl sulfoxide on amount of viable CD34+ cells in the graft. CD34+ cells are important for successful engraftment of the graft after transplantation of hematopoietic stem cells during the therapy of hematologic malignancies (such as leukemia, lymphoma or plasma cell tumors). Flow cytometry analysis are used for measurement of the amount of CD34+ cells in the graft.

The theoretical part contains basic information about the given problem. In the practical part there is described the methodology of graft processing, cryopreservation and measurement of its quality. There are also presented the results of the experiment in which was measured the number of viable CD34+ cells before and after application of dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent in the graft. It has been demonstrated that the application of dimethyl sulfoxide statistically significant decreases the viability of CD34+ cells.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Martinu Novákovi, Ph.D. za vstřícný přístup, odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Princip průtokové cytometrie	2
2.1.1 Obecný úvod.....	2
2.1.2 Konstrukce průtokového cytometru	2
2.1.2.1 Optický systém	3
2.1.2.2 Kapalinový systém	3
2.1.2.3 Výpočetní systém	4
2.2 Imunofenotypizace	5
2.3 Transplantace krvetvorných buněk.....	6
2.3.1 Kostní dřevň	6
2.3.2 Hematopoéza	6
2.3.3 CD klasifikační systém.....	7
2.3.4 Úvod do transplantační imunologie.....	9
2.3.5 Indikace k transplantaci u hematologických malignit	10
2.3.6 Typy transplantace v hematookologii	10
2.3.6.1 Autologní transplantace	10
2.3.6.2 Alogenní transplantace	11
2.3.6.3 Syngenní transplantace	11
2.3.7 Postup při transplantaci krvetvorných buněk	11
2.3.7.1 Přípravná fáze	11
2.3.7.2 Fáze odběru a podání krvetvorných buněk.....	12
2.3.7.3 Kryokonzervace.....	13
2.3.7.4 Fáze posttransplantační.....	13
2.4 Malignity, v jejichž terapii je užívána transplantace krvetvorných buněk	15
2.4.1 Akutní leukemie	15
2.4.1.1 Akutní myeloidní leukemie (AML).....	15
2.4.1.2 Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)	16
2.4.2 Chronické leukemie	16
2.4.2.1 Chronická myeloidní leukemie (CML)	16
2.4.2.2 Chronická lymfocytární leukemie (CLL)	17

2.4.2.3 Myelodysplastický syndrom (MDS)	17
2.4.3 Lymfomy	18
2.4.3.1 Hodgkinův lymfom (HL)	18
2.4.3.2 Non-Hodgkinův lymfom (NHL)	18
2.4.4 Nádory z plazmatických buněk	19
2.4.4.1 Mnohočetný myelom (MM)	19
3. CÍL PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODIKA	22
4.1. Testovaná kohorta	22
4.2. Postup při odběru a kryokonzervaci krvetvorných buněk	22
4.2.1 Odběr vzorku a manipulace	22
4.2.1.1 Příprava produktu ke kryokonzervaci	22
4.2.1.2 Příprava kryoprotektivního roztoku	22
4.2.1.3 Míchání štěpu krvetvorných buněk s kryoprotektivním roztokem	23
4.2.1.4 Odběr vzorků z kryovaků	23
4.2.1.5 Programované zamražení kryovaků	23
4.3 Analýza krevního obrazu a kvality štěpu	24
4.3.1 Stanovení CD34+ kmenových buněk	24
4.4 Statistická analýza	25
5. VÝSLEDKY	26
6. DISKUSE	32
7. ZÁVĚR	35
8. POUŽITÁ LITERATURA	36
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	42

1. ÚVOD

Hematologické malignity, jako jsou leukemie, lymfomy či nádory z plazmatických buněk, patří mezi velmi agresivní onemocnění a často končí smrtí. Transplantace krvetvorných buněk je pro některé pacienty jediným možným léčebným postupem. Před transplantací krvetvorných buněk je nutné zamrazit štěp do doby podání pacientovi. Buňky štěpu jsou však náchylné k nízkým teplotám, a proto se před zamražením přidává vhodné kryoprotektivum. Pro účely transplantace krvetvorných buněk se využívá dimethylsulfoxid (DMSO), u kterého však byly zaznamenány toxické účinky, které způsobují odumírání buněk. Pro úspěšné přihojení štěpu je velmi důležitá kvalita štěpu, tedy co nejvyšší obsah viabilních CD34+ buněk. Z toho důvodu je toxicita DMSO nežádoucí.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Princip průtokové cytometrie

2.1.1 Obecný úvod

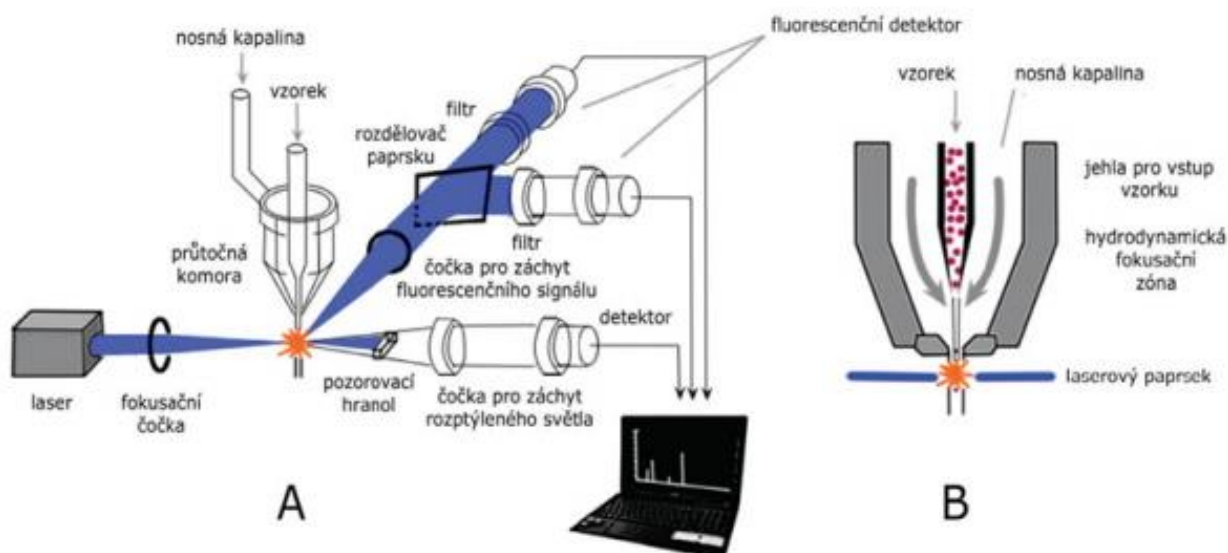
Průtoková cytometrie je bioanalytická laboratorní metoda, která umožňuje současné měření řady parametrů na velkém množství částic (Eckschlager *et al.*, 1999). Je založena na imunochemickém principu a na interakcích mezi světlem a částicemi, které jsou značeny fluorochromy. Metoda kombinuje jevy rozptylu a odrazu světla s detekcí fotonů emitovaných excitovaným fluorochromem.

Při měření jsou analyzované částice (nejčastěji jde o buňky o velikosti 0,5 - 40 μm) unášeny nosnou kapalinou (tzv. sheath fluid) tak, aby procházely měřícím bodem jednotlivě v okamžiku analýzy. Zde protnou laserový paprsek a v tomto okamžiku dojde k odrazu a rozptylu světla a zároveň k excitaci fluorochromu. Pomocí systému polopropustných zrcadel a filtrů jsou odděleny jednotlivé vlnové délky světla a tyto jsou analyzovány zvlášť na příslušných detektorech. Výsledkem je syntéza údajů o velikosti analyzovaných částic, jejich vnitřní členitosti a intenzitě fluorescence značených protilátek, navázaných na cílových strukturách na povrchu nebo uvnitř částic (Novák, 2014).

2.1.2 Konstrukce průtokového cytometru

Průtokový cytometr se skládá ze tří až čtyř technických celků:

- optický systém
- kapalinový systém
- výpočetní systém
- sortovací modul (součást specializovaných cytometrů)



Obr 1: Schéma průtokového cytometru (A) a měřicí komory (B) (Převzato z: Novák, 2014)

2.1.2.1 Optický systém

Optika zajišťuje interakci mezi analyzovanou částicí obarvenou fluorochromem a elektromagnetickým vlněním emitovaným zdrojem tohoto záření. Částice procházející měřicí komůrkou je ozářena monochromatickým zářením. Optický systém je složen z excitační optiky a sběrných optických cest. Zdrojem monochromatického záření jsou nejčastěji lasery. Mezi nejběžněji používané v komerčních analyzátoch patří vzduchem chlazený argonový laser, který emituje záření o vlnové délce 488 nm. Výhodou tohoto laseru je možnost excitace několika fluorochromů současně. Sběrná optika je tvořena soustavou čoček, polopropustných zrcadel a filtrů. Čočky usměrňují fotony emitovaného záření. Polopropustná zrcadla a filtry rozdělují světelné paprsky podle vlnových délek a tyto jsou následně směřovány na příslušné detektory (Roubalová, 2012).

2.1.2.2 Kapalinový systém

Tento systém je důležitý pro oddělení analyzovaných částic tak, aby při měření procházely jednotlivě za sebou. K tomu je využit princip hydrodynamické fokusace, kterého dosáhneme zavedením „korového“ (tzv. obalujícího) proudu nosné kapaliny do měřicí komory. Tento „obal“ má vyšší rychlost proudění než vzorek, čímž vzorek stlačuje a uzavře ho v samotném centru proudu nosné kapaliny. Kombinovaný proud tekutiny se vzorkem a nosné kapaliny pak prochází kónicky zúženou sekci, která zvýší rychlost proudění před samotným měřením vzorku (Novák, 2014). Typická rychlost proudění částic je 10 m/s. Čím nižší je rychlost průtoku vzorku, tím přesnější je analýza (Dean *et Hoffman*, 1997).

2.1.2.3 Výpočetní systém

Výsledkem interakce částice se zářením je signál, který je detekován v závislosti na jeho intenzitě. Výpočetní systém slouží k detekci a zpracování signálu (Roubalová, 2012). Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla v malém úhlu, který je přímo úměrný velikosti buněk. Jedná se o tzv. forward scatter (FSC). Má vysokou intenzitu a není třeba ji dále zesilovat. FSC tedy určuje velikost částic. Čím větší je rozptyl světla, tím větší je částice. Dále je měřen odraz světla v úhlu 90° , který je ovlivněn granularitou částic. Tento parametr je analyzován na tzv. side scatteru (SSC). Intenzita tohoto záření je nižší a je nutné zesílit ji fotonásobičem. Posledním měřeným parametrem je fluorescence o různé vlnové délce (Eckschlager *et al.*, 1999; Roubalová, 2012). Sloučením hodnot FSC a SSC do prostoru definovaného osami x (FSC) a y (SSC) získáme dvojrozměrné uspořádání analyzovaných částic dle jejich velikosti a denzity vnitřního obsahu. Fotony, které dopadají na fotodiodu či fotonásobič, jsou převedeny na tok elektronů. Signál je následně proporčně zesílen na měřitelné hodnoty elektrického proudu, který je poté převeden v derivátoru na napěťový pulz. Amplituda tohoto pulzu pak odpovídá počtu detekovaných fotonů. Následně je napěťovému pulzu v ADC převodníku přidělena digitální proměnná. Pulzu o napětí 0-1000 mV je přidělen digitální kanál 0-1000. Číslo kanálu je převedeno do počítače, graficky zobrazeno a uloženo do paměti (Novák, 2014).

2.2 Imunofenotypizace

Průtoková cytometrie je v hematologii využívána především pro tzv. imunofenotypizaci buněk. Tedy pro vyšetření kvalitativní i kvantitativní přítomnosti specifických markerů jak na povrchu buněk, tak v jejich cytoplasmě či v jádře. Tyto markery jsou poté využity k identifikaci vyšetřovaných buněčných populací. Pro vyšetřování hematologických malignit se využívá analýza leukocytárních antigenů HCDM (Human Cell Differentiation Molecules). Ty jsou definovány pomocí monoklonálních protilátek a seřazeny do klasifikačního systému, kde je každému antigenu přiřazeno označení CD (Cluster of Differentiation) a pořadové číslo. Cílem imunofenotypizace je buď nález kombinace pozitivita a negativita běžně se vyskytujících znaků, které tvoří tzv. pattern typický pro konkrétní onemocnění, nebo jde o detekci nádorově specifických markerů. Těmito technikami lze také sledovat kvalitu štěpu krvetvorných buněk (Novák, 2014).

Princip imunofenotypizace je založen na specifické vazbě monoklonální protilátky na cílový antigen exprimovaný na povrchu buněk. Specifická monoklonální protilátka je kovalentně konjugována s fluorochromem excitovatelným vhodným zdrojem záření (laserový paprsek) z průtokového cytometru. Následující emise záření fluorochromu je detekována a analyzována průtokovým cytometrem v odpovídajícím fluorescenčním detektoru. Rozdíly v intenzitě fluorescence buněk umožňují separaci buněčných subpopulací na základě exprese analyzovaného antigenu. Značení buněk exprimujících cílový antigen je provedeno inkubací suspenze buněk s monoklonální protilátkou a následnou lyzí červených krvinek. Značené buňky jsou poté analyzovány pomocí průtokového cytometru (Eckschlager *et al.*, 1999).

2.3 Transplantace krvetvorných buněk

Objevení a definování histokompatibilního systému (HLA; Human Leukocyte Antigens) v 60. letech 20. století umožnilo provedení prvních úspěšných transplantací v roce 1968. Nejprve byli k transplantaci indikováni pacienti se selháním funkce kostní dřeně či těžkou vrozenou poruchou imunity. První úspěchy vedly k využití této metody i v léčbě maligních onemocnění krvetvorby (Sedláček *et* Říha, 2014).

2.3.1 Kostní dřeň

Kostní dřeň představuje optimální prostředí pro dlouhodobé přežívání HSCs (Hematopoetic Stem Cells), jejich sebeobnovu, řízenou diferenciaci, uvolňování zralých krevních elementů do periferní krve a také pro vychytávání HSCs z periferního oběhu a jejich uhnízdění v dřeni (tzv. homing) (Pavlová *et al.*, 2013). Krvetvorná kostní dřeň je u dospělého člověka přítomna ve spongiózní části krátkých a plochých kostí. Základem krvetvorné kostní dřeně (tzv. stroma) je retikulární vazivo vytvářející síť se zabudovanými ostrůvky krvetvorné tkáně a sítí sinusoidních kapilár. Do dřeně jsou zanořeny výběžky kostní tkáně s osteoblasty (případně osteoklasty). Dále se zde nachází adipocyty a makrofágy. Období krvetvorby v kostní dřeni začíná asi v 10. týdnu intrauterinního života. Postupně zde hematopoéza nabývá na intenzitě - a po narození během fyziologického vývoje zcela nahradí krvetvornou činnost jiných orgánů kromě lymfatických orgánů (brzlík, slezina atd.) a lymfatické tkáně, kde lymfopoéza pokračuje nadále. V kostní dřeni tedy probíhá erytropoéza, granulopoéza, tvorba monocytů, lymfopoéza, megakaryopoéza a trombopoéza. Denní produkce krevních buněk kostní dřeni u dospělého člověka je více než 215 miliard buněk (Slováček *et al.*, 2005).

2.3.2 Hematopoéza

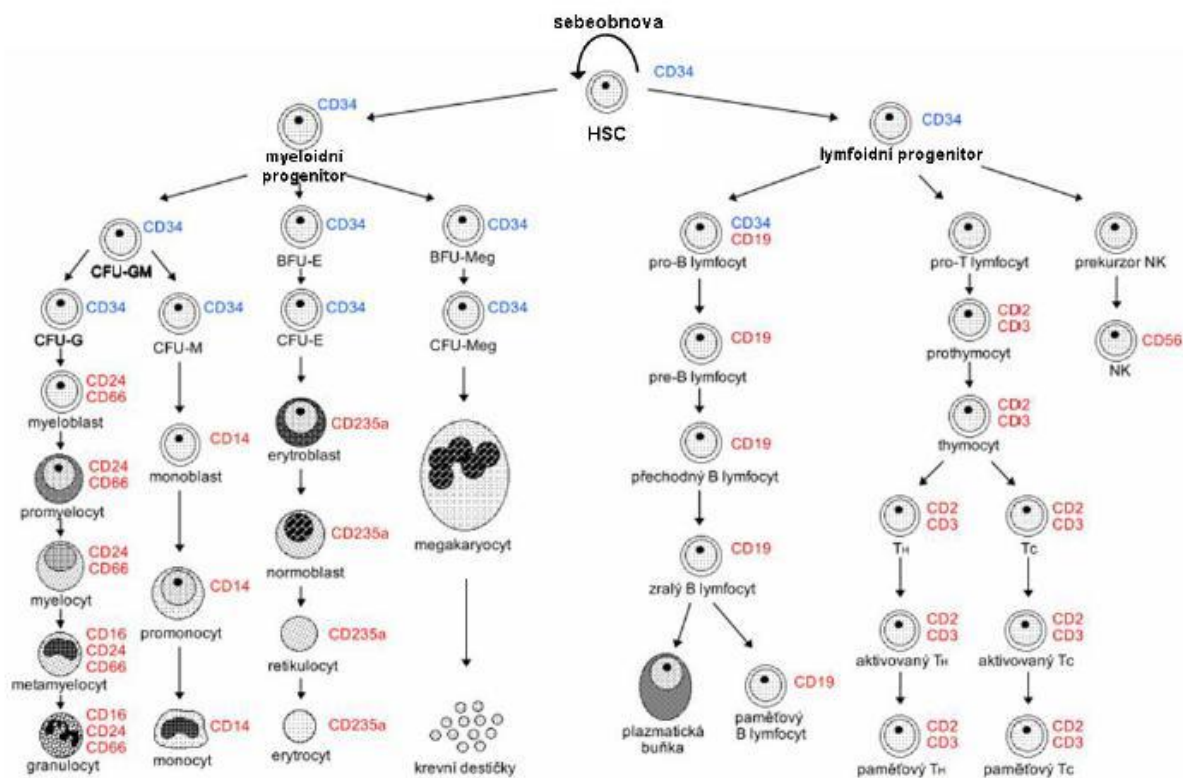
Jelikož zralé krevní buňky mají krátkou životnost, musí být průběžně nahrazovány buňkami novými. HSCs se nachází v kostní dřeni všech dospělých savců a dávají vzniknout progenitorovým buňkám, ze kterých se vyvíjí další typy buněk. Tento proces se nazývá hematopoéza (Orkin, 2008). Studie na myších prokázaly, že existují dvě podskupiny HSCs. První zahrnuje dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky (LT-HSCs; Long-Term Hematopoetic Stem Cells), které jsou schopné trvalé sebeobnovy. Druhá podskupina zahrnuje krátkodobé hematopoetické kmenové buňky (ST-HSCs; Short-Term Hematopoetic Stem Cells). Ty jsou schopny sebeobnovy přibližně po dobu osmi týdnů. ST-HSCs dávají vzniknout multipotentním progenitorovým buňkám, které se diferencují do dvou buněčných linií: myeloidní progenitorové buňky (CMP; Common Myeloid Progenitor) a lymfoidní

progenitorové buňky (CLP; Common Lymphoid Progenitor). CLP dává vzniku T-lymfocytům, B-lymfocytům a NK buňkám (Natural Killer cells). CMP je progenitor pro myelomonocytní progenitorové buňky a progenitorové buňky MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor cell). Ty se dále diferencují ve zralé buňky jako monocyty/makrofágy, granulocyty, megakaryocyty/trombocyty, erytrocyty a mastocyty (Passegué *et al.*, 2003).

Regulace dřevné krvetvorby je multifaktoriální (Slováček *et al.*, 2005). Vlastnosti a chování HSCs jsou dány jejich expresním profilem (exprese transkripčních faktorů, inhibitory buněčného cyklu, receptory pro hematopoetické růstové faktory) a vnějším prostředím (růstové faktory a jiné cytokiny, přímá interakce s mezibuněčnou matrix) (Pavlová *et al.*, 2013).

2.3.3 CD klasifikační systém

V roce 1982 byl v Paříži založen CD klasifikační systém. CD molekuly představují buněčné diferenační molekuly (HCDM). Jde tedy o identifikační membránové antigeny, které se vyskytují na normálních i patologických krevních buňkách a k jejich detekci jsou využívány monoklonální protilátky. Tyto molekuly plní mnoho funkcí. Jsou součástí APC (Antigen Presenting Cell), slouží jako receptory, adhezivní molekuly, kostimulační molekuly atd. Dosud bylo definováno přes 350 CD membránových molekul, ale jejich počet stále roste (Koubek, 2008; Vokurka, 2012). Studium a klasifikací CD molekul se zabývá organizace Human Cell Differentiation Molecules neboli HCDM.



Obr 2: Schéma lidské hematopoézy (Převzato z: Tesařová, 2007)

Pro účely této práce byly stanovovány antigeny:

CD45 antigen (LCA; Leukocyte Common Antigen) je transmembránový glykoprotein exprimovaný téměř na všech hematopoetických buňkách kromě zralých erytrocytů (Nakano, 1990).

CD34 antigen je transmembránový fosfoglykoprotein exprimovaný na hematopoetických progenitorových buňkách a téměř na všech pluripotentních kmenových buňkách (Sidney, 2014). Vysoká proliferační aktivita CD34⁺ buněk je spojována s úspěšným engraftmentem a menšími komplikacemi po transplantaci kostní dřeně (Goodell, 1999). Zda bude transplantace úspěšná a dojde k obnově krvevotvorby, závisí hlavně na dostatečném počtu HSCs ve štěpu. Je tedy velmi důležité určit co nejpřesněji jejich počet, a tak zjistit kvalitu štěpu. Z toho důvodu se CD34 antigen využíván jako hlavní molekulární marker HSCs (Klabusay *et al.*, 2007). Molekuly CD34⁺ se nachází asi na 1-4 % jaderných buněk v kostní dřeni, jak je znázorněno na Obrázku 2. Ty však představují nestejnorodou skupinu a obsahují různá stadia a druhy buněk, jako jsou LT-HSCs, oligopotentní lymfoidní a myeloidní progenitorové buňky. Neobsahují však terminálně diferencované buňky (Potěšilová, 2008). Procentuální zastoupení CD34⁺ buněk lze provést pomocí průtokové cytometrie. Získané hodnoty jsou pak přepočítány na kilogram hmotnosti příjemce (Klabusay *et al.*, 2007).

2.3.4 Úvod do transplantační imunologie

Obratlovci mají schopnost odmítnout transplantovanou cizí tkáň (buněčný typ imunitní obrany) a odpovídat na cizí rozpustné či korpuskulární antigeny syntézou specifických protilátek (humorální typ imunitní obrany). Tyto imunitní odpovědi jsou řízeny lymfatickými buňkami, které mají schopnost imunologické paměti a jsou tedy schopny reagovat na nový kontakt se stejným antigenem rychlou a intenzivní imunitní odpovědí (Eckstein, 1994). Rozpoznat cizí látky od těla vlastních umožňuje organismu hlavní histokompatibilní systém (MHC; Major Histocompatibility Complex). MHC je tvořen glykoproteiny vážící peptidy, které jsou prezentovány T-lymfocytům. U lidí je MHC synonymum pro HLA (Vaňásek *et al.*, 1996). HLA je klíčová skupina bílkovin, které jsou lokalizovány jako antigeny na povrchu buněk. HLA systém je polygenní a velmi polymorfní a HLA lokusy jsou geneticky nejvariabilnějšími kódujícími lokusy. Celý komplex HLA genů je umístěn na krátkém raménku chromozomu 6. Z hlediska dědičnosti jsou všechny alely kódující HLA molekuly kodominantní, řídí se mendelovským typem dědičnosti a dědí se vcelku jako blok – tzv. haplotyp. Každý HLA genotyp je složen ze dvou HLA haplotypů – jeden od otce a jeden od matky. Společně jsou exprimovány na buňkách, kde představují HLA fenotyp. Z toho plyne, že sourozenci mají 25% pravděpodobnost, že budou haploidentičtí, 50% pravděpodobnost, že budou sdílet stejný haplotyp a 25% pravděpodobnost, že budou zcela inkompatibilní. Geny HLA vykazují poměrně těsnou vazbu genů, takže mezi nimi výjimečně probíhá crossing-over. Tento fakt má velký význam v transplantační hematologii při hledání HLA shodného nepříbuzného dárce krvetvorných buněk. V současnosti je konsensus hledat dárce se shodou v 5 HLA genech, které označujeme jako „transplantační geny“. Patří sem HLA antigeny I. třídy (-A, -B, -C) a HLA antigeny II. třídy (-DRB1, -DQB1). Při kompletní (alelické) shodě v těchto lokusech hovoříme o shodě na úrovni 10/10, která je pro výsledek nepříbuzenské transplantace optimální. Nicméně dle klinické situace pacienta a dostupnosti dárce lze akceptovat i shodu 9/10, výjimečně 8/10. Obecně se dá říci, že každá neshoda v transplantačních genech zhoršuje výsledky (celkové přežití) přibližně o 5-10 % (Jindra, 2013). Z předchozích informací lze usoudit, že HLA typizace před transplantací krvetvorných buněk (dále jen KB) má obzvlášť důležitý význam. Jelikož se při transplantaci KB přenesou dárceho imunitní systém na příjemce, musí se počítat při existujících genetických diferencích v HLA systému s reakcí štěpu proti hostiteli (GvHD; Graft versus Host Disease) (Eckstein, 1994).

2.3.5 Indikace k transplantaci u hematologických malignit

Indikace k transplantacím KB se s progresivním poznáním onkologických onemocnění a s vývojem nových protinádorových léků mění. Alogenní transplantace KB jsou v současnosti indikovány u pacientů s akutními leukemiemi a u některých pacientů s velmi pokročilými chronickými myeloidními leukemiemi (CML). Dále pak u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) nebo lymfomy. U CML a MDS je to zatím jediný dostupný kurativní přístup. Autologní transplantace se používají v léčbě mnohočetného myelomu, lymfomů nebo akutní leukemie. Dále se používají při léčbě některých solidních tumorů (Doubek 2007; Sedláček *et Říha*, 2014; Slováček *et al.*, 2005)

2.3.6 Typy transplantace v hematoonkologii

Transplantace se dělí:

- Podle zdroje krvevorných buněk:
 - BMT (Bone Marrow Transplantation) – transplantace kostní dřeně
 - PBSCT (Peripheral Blood Stem Cell Transplantation) – transplantace periferních kmenových krvevorných buněk
 - CBT (Cord Blood Transplantation) – transplantace pupečnickové krve
- Podle dárce:
 - Autologní transplantace
 - Alogenní transplantace
 - Syngenní transplantace

2.3.6.1 Autologní transplantace

Dárce krvevorných buněk je sám pacient (Slováček *et al.*, 2005). Krvevorná tkáň je nemocnému odebrána v době remise, je konzervována a zamražena do doby vlastní transplantace, která následuje po podání vysokodávkové chemoterapie nebo celotělové radiace (Slováček, 2008). Tyto léčebné procesy jsou velmi účinné v léčbě mnoha zhoubných nemocí, avšak nenávratně poškozují kostní dřeň. Jelikož se jedná o krvevorné buňky přímo od nemocného, nemusí pacient po transplantaci užívat žádná imunosupresiva (Doubek, 2007). Autologní transplantace sebou však nese riziko kontaminace transplantátu přítomnými nádorovými buňkami, neboť protinádorový účinek je zajištěn pouze předtransplantační vysokodávkovou chemoterapií (Slováček *et al.*, 2005).

2.3.6.2 Alogenní transplantace

Jedná se o převod krvetvorných buněk od jiného člověka. Dárce bývá HLA kompatibilní sourozenec (alogenní příbuzná transplantace) nebo HLA kompatibilní nepříbuzný dárce (alogenní nepříbuzná transplantace). Vyhledávání kompatibilního dárce se provádí pomocí českého a/nebo mezinárodního registru pro transplantaci kostní dřeně (Slováček *et al.*, 2005). U tohoto typu transplantace spočívá léčebný efekt kromě chemoterapie a radioterapie v tzv. reakci štěpu proti leukémii (GvL; Graft versus Leukemia effect). Nemocní před transplantací dostávají chemoterapii a radioterapii, která však nemusí být vysokodávková. Tyto typy terapie dělají pouze místo a podmínky v kostní dřeni pro přijetí štěpu. Chemoterapie tedy nemusí odstranit všechny nádorové buňky (Doubek, 2007). Alogenní transplantace sebou nese riziko kontaminace transplantátu nádorovými buňkami a navíc obsahuje lymfocyty schopné identifikovat přežívající nádorové buňky příjemce (Slováček *et al.*, 2005). U tohoto typu transplantace je pacientovi vždy podávána imunosupresivní léčba, aby organismus pacienta přijal štěp a nedošlo k odhojení transplantátu (Vorlíček *et al.*, 2006).

2.3.6.3 Syngenní transplantace

Dárce je zdravé jednovaječné dvojče. Genetická identita musí být prokázána analýzou DNA obou sourozenců. Tato identita nevyvolává odhojovací reakci, tudíž pacient nemusí po transplantaci brát dlouhodobě imunosupresivní léky. Na druhou stranu však nedochází k reakci štěpu proti leukémii (Doubek, 2007; Slováček *et al.*, 2005).

2.3.7 Postup při transplantaci krvetvorných buněk

Samotná transplantace krvetvorných buněk je realizována v několika etapách: přípravná fáze, fáze odběru a podání krvetvorných buněk, fáze posttransplantační (Slováček *et al.*, 2005).

2.3.7.1 Přípravná fáze

Před každou transplantací KB je prováděna předtransplantační příprava (přípravný režim), která zahrnuje ve většině případů vysokodávkovou chemoterapii, jejíž význam spočívá v eliminaci zbytkové nádorové populace v kostní dřeni a tím zabrání rozvoji relapsu onemocnění. Má trojí efekt, a to masivní imunosupresi, výrazný protinádorový efekt a podílí se na vytvoření místa pro přijetí nové kostní dřeně.

Přípravný režim se dá rozdělit na myeloablativní a nemyeloablativní:

Myeloablativní předtransplantační režim zahrnuje vysokodávkovou chemoterapii (cytostatika) s/bez celotělové radioterapie a celkovou dávkou 10-15 Gy. Název je odvozen od vedlejšího účinku této terapie, jímž je silné potlačení až úplné zničení krvetvorby nemocného (tzv. myeloablace).

Nemyeloablativní režim neboli režim s redukovanou toxicitou zahrnuje užívání střední dávky cytostatik imunosuprese, jejíž navození je nezbytným předpokladem příhojení štěpu a zamezení jeho odhojení. V posledních letech se tento druh přípravného režimu užívá stále častěji (Indrák *et al.*, 2006; Slováček *et al.*, 2005).

Z těchto poznatků plyne, že pro účely autologní transplantace je odběr krvetvorných buněk nutno provést před podáním cytostatik.

2.3.7.2 Fáze odběru a podání krvetvorných buněk

Odběr krvetvorných buněk může být proveden klasickým odběrem kostní dřeně nebo odběrem krvetvorných kmenových buněk z periferní krve (Švojkrová, 2006).

Odběr kostní dřeně je prováděn v celkové anestezii z lopat kyčelních kostí. Odebírá se více než 1 litr dřeňové krve (Doubek, 2007). Odebraná krev je dále zpracována, jelikož obsahuje směs buněk kostní dřeně a větší či menší příměs periferní krve. Centrifugací se z krve odstraní červené krvinky (Mayer *et Starý*, 2002). Celkové množství jaderných buněk by mělo být $2-6 \cdot 10^8$ jaderných buněk na 1 kg hmotnosti příjemce (Adam *et al.*, 2004). Důležité je zmínit, že tento postup se v ČR již prakticky neužívá, jelikož je to invazivní a bolestivá metoda.

Odběr krvetvorných buněk z periferní krve je prováděn pomocí separátoru ze žíly, takže je to méně invazivní metoda. Předpokladem pro získání krvetvorných kmenových buněk z krve je jejich vyplavení z kostní dřeně do periferní krve (mobilizace). To se provádí pomocí růstových faktorů, které jsou podány dárci či pacientovi několik dní před odběrem. Jedná se o specifické bílkoviny, které za fyziologických podmínek regulují růst a množení krvetvorných buněk (Doubek, 2007; Mayer *et al.*, 1999). Objem získaného transplantátu je cca 200 – 300 ml. Vlastní načasování odběru periferních krvetvorných buněk je prováděno sledováním zastoupení CD34+ buněk pomocí průtokové cytometrie ve vzorku dárce. Kvalitní transplantát by měl obsahovat $2,5 \cdot 10^6$ CD34+ buněk na 1 kg hmotnosti příjemce (Slováček *et al.*, 2005).

2.3.7.3 Kryokonzervace

V některých případech se transplantace neprovádí ihned a štěp je třeba uchovat do doby transplantace delší dobu. Při zmražení samotných buněk by se v nich však vytvořily intracelulární krystalky ledu, které způsobují mechanické poškození buněčných struktur. Nejběžnějším způsobem ochrany buněk je přidání tzv. kryoprotektiva, což je chemikálie, která interferuje s přechodem vody do pevného skupenství a tím zabraňuje tvorbě intracelulárních krystalků ledu. Dělí se na intracelulární (glycerol, DMSO, ethylenglykol atd.) a extracelulární (sacharóza, propandiol atd.) (Zámečnicková *et al.*, 2010). V případě uchování krvetvorných buněk je k suspenzi buněk přidán dimethylsulfoxid (DMSO) (Mayer *et Starý*, 2002). Krvetvorné buňky s DMSO jsou následně uschovány ve speciálních kontejnerech ve zmraženém stavu v tekutém dusíku při teplotě -196 °C (Mayer *et al.*, 1999).

DMSO je neelektrolyt s nízkou molekulární hmotností, který má již v 1,0M koncentraci toxické účinky (Wowk, 2007). Toxicita DMSO je závislá na teplotě. Dlouhodobá expozice DMSO o nízké koncentraci při pokojové teplotě může být pro buňky letální. Z tohoto důvodu byly vyvinuty protokoly pro práci s DMSO při teplotách 2-4 °C. Dále byl minimalizován čas mezi aplikací DMSO a počátkem zamrazovacího programu na 15 minut. Také je nutné, aby při rozmrazování vaku s krvetvornými buňkami před samotnou transplantací (ve vodní lázni při teplotě 37-40 °C) byl vak vyjmut z vody ihned po roztání a krvetvorné buňky ihned podány příjemci (Hubel, 1997; Vaňásek *et al.*, 1996).

2.3.7.4 Fáze posttransplantační

Tato fáze je označována za nejnáročnější a nejrizikovější z celého procesu transplantace krvetvorných buněk. Začínají se projevovat toxické účinky vysokodávkové chemoterapie, mezi které patří pancytopenie, mukozitida, gastroenteritida, průjmy, dermatitida, projevy neurotoxicity a kardiotoxicity, venookluzivní choroba s projevy těžké jaterní dysfunkce a další. Z tohoto důvodu je zahajována komplexní podpurná léčba, zejména protiinfekční opatření a aplikace hemopoetických růstových faktorů.

K vlastnímu přihojení štěpu dochází obvykle mezi 7. až 14. dnem po jeho převodu. Zde se může vyskytnout rejekce štěpu a GvHD. Rejekce neboli odhojení štěpu je způsobeno tím, že imunitní systém příjemce rozpozná neidentické struktury v HLA a non-HLA antigenech. GvHD je způsobena lymfocyty ve štěpu dárce, které rozpoznají HLA-antigeny příjemce a vyvolají imunitní reakci. GvHD se z časového hlediska dělí na formu hyperakutní (rozvíjí se v průběhu několika hodin), akutní (rozvíjí se v průběhu prvních tří měsíců po

transplantaci) a na formu chronickou. Za rozvoj akutní GvHD je zodpovědná tzv. cytokinový bouře, což je kaskáda reakcí a interakcí tzv. zánětlivých cytokinů (TGF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ). Mezi klinické projevy akutní GvHD patří makulopapulární kožní vyrážka, nevolnost, krvavé průjmy, cholestatická hyperbilirubinémie a další. Profylaxe a léčba GvHD je založena na principu navození imunologické tolerance (Ferrara *et al.*, 2009; Slováček *et al.*, 2005).

2.4 Malignity, v jejichž terapii je užívána transplantace krvetvorných buněk

Základní dělení hematologických malignit:

- leukemie
- lymfomy
- nádory z plazmatických buněk

2.4.1 Akutní leukemie

Nádorová onemocnění krvetvorby, jež mají klonální původ na úrovni hematopoetických kmenových buněk. Jsou charakteristické nekontrolovatelnou proliferací leukemických blastů v kostní dřeni. Dle příslušnosti blastů k myeloidní či lymfoidní linii se dělí na akutní myeloidní leukemii (AML) a akutní lymfoblastickou leukemii (ALL) (Šálek, 2012). Vyznačují se velmi rychlým průběhem a neléčeny vedou k rychlé smrti nemocného (Adam *et* Doubek, 2001).

2.4.1.1 Akutní myeloidní leukemie (AML)

AML představuje heterogenní skupinu neoplastických onemocnění charakterizovaných proliferací a akumulací nezralých hematopoetických buněk v kostní dřeni a jejich následným vyplavením do periferní krve. Je definována jako klonální expanze myeloblastů a předpokládá se, že vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky. Ta se dále diferencuje v myeloidní nebo myelomonocytární blasty. Za fyziologických podmínek podléhá proliferace blastů autoregulačním mechanismům, avšak v případě AML se jejich proliferace zcela vymyká kontrole (Doubek *et* Mayer, 2013). Akumulací leukemických blastů je následně potlačena fyziologická krvetvorba, což vede k anémii, neutropenii a trombocytopenii (Löwenberg, 2001).

AML je typická chromozomálními změnami jako je delece chromosomu 5 a 7 nebo anomálie dlouhého raménka chromosomu 11. Ke klinicky nejvýznamnějším molekulárně genetickým změnám u AML patří přítomnost fúzních genů PML/RAR α , AML1/ETO, CBF β /MYH11 a mnoho dalších. Tyto změny však nejsou detekovatelné u všech pacientů s AML (Doubek *et* Mayer, 2013).

AML je nejčastějším typem akutní leukemie u dospělých pacientů. Představuje 2-4 % ze všech maligních tumorů a její incidence narůstá s věkem (Adam *et* Doubek, 2001) Zatímco

v padesáti letech čítá 3,5 případů na 100 000 obyvatel, v sedmdesáti letech dosahuje již 15 případů na 100 000 obyvatel a v osmdesáti letech je to dokonce 22 případů na 100 000 obyvatel za 1 rok (Šálek, 2012). Neléčená AML má fatální důsledky. Většina pacientů umírá do 11-12 týdnů z důvodu selhání kostní dřeně (infekce, krvácení) (Deschler *et al.*, 2006).

2.4.1.2 Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)

Jedná se o maligní onemocnění B-lymfoidních (85 % všech ALL) či T-lymfoidních (15 % všech ALL) progenitorových buněk a je to nejčastější malignita u dětí. Méně než 5 % ALL je spojeno s dědičnými predispozicemi (neurofibromatóza, Bloomův syndrom, Downův syndrom, atd.). Ostatní ALL jsou dány specifickými fúzními geny, hyperdiploidii či klonálním přeskupením imunoglobulinů (Pui *et al.*, 2008).

Nejčastějším fúzním genem, který se vyskytuje u dětí, je TEL/AML1. Naopak u dospělých se tento chimérický gen vyskytuje velmi vzácně. Jen asi u 4 % dětských případů ALL se vyskytuje fúzní gen BCR/ABL1. Jeho zastoupení však roste u starších pacientů a tvoří až čtvrtinu všech ALL. Derivovaný chromozom 22, který nese tento fúzní gen, se nazývá Filadelfský chromozom a je spojován s chronickou myeloidní leukémií (CML). Dále se u pacientů s ALL může vyskytovat fúzní gen E2A/PBX1 (Zuna *et al.*, 2013).

Incidence ALL v dospělé populaci je relativně nízká a činí 1-2 případy na 100 000 obyvatel. Nejčastěji se nachází u dětí ve věku 2-5 let. Druhý vrchol incidence je u nemocných starších 50 let. S poměrem 1,4 : 1 lehce převažuje u mužů (Folber *et al.*, 2015).

2.4.2 Chronické leukemie

Nádorová onemocnění krvetvorby, která se vyznačují pomalým a postupným průběhem, kdy pacient nevyžaduje léčbu měsíce až roky. Dochází ke klonální expanzi morfologicky zralejších buněk se zachovalou schopností diferenciací, které však nemají normální funkci a přirozeně neodumírají. Z hlediska buněčného typu, ze kterého vznikají, je dělíme na chronickou myeloidní leukemii (CML) a chronickou lymfocytární leukemii (CLL) (Mayer *et al.*, 2002).

2.4.2.1 Chronická myeloidní leukemie (CML)

CML je nádorové proliferativní onemocnění vznikající transformací pluripotentní kmenové buňky. Typickým cytogenetickým nálezem asi v 95 % všech CML je Filadelfský chromozom (Ph), který vzniká reciprokovou translokací mezi chromozomy 9 a 22. Vzniká fúzní gen BCR/ABL1. Jeho transkripceí vzniká *Bcr/Abi1* onkoprotein, což je konstitutivně

aktivovaná tyrozinkinasa (TK). Ta aktivuje mitogenní signální dráhy, zasahuje do proliferace buněk a snižuje jejich schopnost apoptózy. Existují i pacienti, kteří nemají Ph chromozom, ale pouze fúzní gen BCR/ABL1 (asi 5 % všech CML).

U CML rozlišujeme 3 fáze: chronická (diagnóza u 90 % pacientů, dobrá reakce na léčbu), akcelerovaná (postupné zhoršení stavu a odpovědi na terapii) a blastická (terminální, podobná akutní leukemii) (Rohoň *et Faber*, 2013).

Incidence CML je 1-2 případy na 100 000 obyvatel a představuje asi 15 % nově diagnostikovaných leukemií v dospělém věku (Žáčková, 2015).

2.4.2.2 Chronická lymfocytární leukemie (CLL)

CLL je nízce maligní lymfoproliferativní onemocnění postihující starší populace. Je charakterizována progresivní akumulací periferních monoklonálních zralých B-lymfocytů v lymfoidní tkáni, kostní dřeni a periferní krvi. Hlavním patofyziologickým defektem je rezistence patologických buněk k apoptóze (Hadrabová, 2015).

Patří mezi nejčastější leukemie dospělého věku s incidencí cca 6 případů na 100 000 obyvatel, kdy muži převažují nad ženami v poměru 2,5 : 1 a CLL má u mužů horší prognózu. Medián věku nemocných s CLL se pohybuje kolem 70 roku. Toto onemocnění má extrémně variabilní průběh. Může to být naprosto indolentní choroba, která nekrátí život a nevyžaduje terapii nebo agresivní maligní onemocnění s poměrně krátkou dobou přežití i přes intenzivní terapii (Kozák, 2008; Trbušek *et al.*, 2013).

2.4.2.3 Myelodysplastický syndrom (MDS)

MDS je definován jako klonální porucha krvetvorby. Důležitou roli hraje iniciální poškození kmenové hemopoetické buňky, což vede k tvorbě patologického klonu s určitou růstovou výhodou. Stimulace proliferace časných prekurzorů krvetvorby a zvýšená apoptóza zralejších, na které se podílí abnormální imunitní odpověď zvýšenou sekrecí některých cytokinů, vede ke vzniku dysplastické kostní dřeni a cytopenii v periferní krvi. Postupně narůstá množství blastů, což vede ke vzniku AML (Čermák, 2005, 2016).

Poškození kmenové buňky může nastat buď působením toxické látky či mutacemi. Chromozomální abnormality lze nalézt u 50-60 % pacientů s MDS. Nejčastější jsou delece 5q, monozomie chromozomu 7, delece 7q či trisomie chromozomu 8 a další.

MDS je převážně onemocněním starších lidí. Medián věku pacientů je okolo 72 let,

může však postihnout i mladší nemocné. Incidence onemocnění se pohybuje okolo 5 případů na 100 000 obyvatel. Avšak v populaci nad 70 let věku stoupá na 26 případů na 100 000 obyvatel a u pacientů nad 80 let je to až 48 případů na 100 000 obyvatel (Červinek, 2015).

2.4.3 Lymfomy

Představují skupinu lymfoproliferativních onemocnění, která postihují především sekundární lymfatickou tkáň a jsou charakteristické nekontrolovatelnou proliferací lymfatické tkáně. V pozdějších stádiích se může nádorové bujení šířit do dalších tkání včetně kostní dřeně. Nemají však tendenci uvolňovat maligní buňky do cirkulace. Nejčastějším typem lymfomu je Hodgkinův lymfom, který představuje asi 35 % všech lymfomů. Dále se sem řadí lymfomy Non-Hodgkinova typu (Neuwirt *et al.*, 1983).

2.4.3.1 Hodgkinův lymfom (HL)

Jedná se o monoklonální nádorové onemocnění, které vychází z lymfocytárních buněk. Vlastní nádorové buňky představují mononukleární Hodgkinovy a polynukleární Reedové-Sternbergovy buňky (HRS), které vznikají z postgerminálních B-lymfocytů. Ty se staly nezávislé na regulaci buněk B-řady a unikly apoptóze. Nádorový infiltrát obsahuje maximálně 1 % HRS buněk, zbytek tvoří reaktivní tkáň z malých lymfocytů, eozinofilů, neutrofilů, histiocytů a plazmatických buněk (Král, 2013, 2014).

HRS buňky nejsou schopny produkovat funkční molekuly imunoglobulinů. Je to způsobeno poruchou transkripce imunoglobulinového genu, jež je zapříčiněna inaktivací promotoru kvůli nedostatku OCT-2 proteinu (octamer dependent transcription factor) nebo jeho koaktivátoru BOB1 (B-cell-specific coactivator protein). Z cytogenetického hlediska se u HRS buněk nachází chromozomální translokace, inverze, duplikace a delece. Často převládá hyperploidní karyotyp (Král, 2013).

Onemocnění postihuje nejčastěji mladé dospělé ve věku 20-30 let. Druhý vrchol výskytu HL je u starších nemocných nad 60 let věku (Král *et al.*, 2006). Incidence se pohybuje kolem 3-4 případů na 100 000 obyvatel, kdy je zastoupení mužů větší v poměru 1,5 : 1. Rozdíly v incidenci byly zaznamenány též mezi etnikami, rasami a komunitami s různou socioekonomickou úrovní (Indrák *et al.*, 2006).

2.4.3.2 Non-Hodgkinův lymfom (NHL)

NHL představuje různorodou skupinu lymfoproliferativních onemocnění, vznikajících maligní transformací lymfocytů na různé úrovni jejich vyžívání. Transformovaná buňka si

zachovává funkční i migrační schopnost normálních lymfocytů a může se tedy vyskytovat i mimo lymfatickou tkáň (Kabičková., 2011).

Vznik NHL bývá spojován jak s chronickými zánětlivými procesy (*Helicobacter pylori*, chlamydie), s imunosupresí (vrozené či získané poruchy imunity) s virovou infekcí (HIV, EBV, HHV-8), tak s dědičnou zátěží (riziko vzniku lymfomu je u příbuzných první linie 2-3x vyšší) (Sýkorová *et al.*, 2010).

Mezi NHL se řadí mnoho druhů lymfomů. Většina z nich vzniká z B-lymfocytů (téměř 80 %) a zbylé NHL jsou z T-lymfocytů. Mezi B-lymfomy patří difúzní velkobuněčný lymfom B řady (40 % všech lymfomů), folikulární lymfom (20 %), lymfomy z buněk marginální zóny (8-10 %), lymfom z plášťových buněk (5 %) a další. T-lymfomy zahrnují periferní T-lymfomy (10-15 %) (Trněný *et Haber*, 2006).

Incidence roste s věkem. Ve věkové skupině mezi 40-49 rokem je průměrně 8 případů na 100 000 obyvatel. V populaci nad 70 let dosahuje incidence až na 50-70 případů na 100 000 obyvatel (Papajík *et al.*, 2009). NHL je pátým nejčastějším zhoubným nádorem v naší populaci a s každým rokem jeho výskyt narůstá o 4-5 % (Belada, 2010).

2.4.4 Nádory z plazmatických buněk

Pro tuto skupinu neoplazií je charakteristická nádorová expanze klonů zralých, terminálně diferencovaných B-lymfocytů produkujících patologický imunoglobulin. Bývá zde typická přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči (Krejčí, 2013). Z tohoto důvodu jsou tyto typy onemocnění pojmenovány monoklonální gamapatie. Do této skupiny se řadí mnohočetný myelom, Waldenströмова makroglobulinémie, nemoc těžkých řetězců a další (Neuwirt *et al.*, 1983).

2.4.4.1 Mnohočetný myelom (MM)

Pro tuto nemoc je typická infiltrace kostní dřeně patologickými plazmatickými buňkami s postupným útlakem fyziologické krvetvorby, přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu v krvi, moči a osteolytická ložiska (Adam *et al.*, 2008). MM tvoří 10 % všech hematologických malignit (Krejčí, 2013).

Patogeneze zahrnuje sérii genetických změn v buňce, které vedou k její nádorové transformaci. Současně se rozvíjí změny v mikroprostředí kostní dřeně, které podporují nádorový růst. Dochází také k selhání imunitního systému. U většiny pacientů jsou přítomny

translokace oblasti imunoglobulinových (Ig) genů. Až u 70 % je popisována translokace oblastí těžkých řetězců, u 20 % translokace oblastí lehkých řetězců. Je zde také typická nestabilita genomu, často se vyskytují numerické změny v počtu chromozomů (aneuploidie). Asi u 30 % pacientů se nachází monozomie či parciální delece chromozomu 13. Delece 17p13 spojená s alelickou ztrátou *p53* je přítomna u asi 25 % případů (Krejčí, 2013).

Incidence MM je 2,6 případů na 100 000 obyvatel. S věkem se její výskyt zvyšuje a v populaci ve věku 75-79 let je incidence až 16 případů na 100 000 obyvatel (Adam *et al.*, 2008).

3. CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo zvládnout techniku stanovení viability štěpu krvevorných buněk pomocí průtokové cytometrie.

Dále zhodnotit, zda po aplikaci DMSO dochází ke statisticky signifikantní změně viability štěpu krvevorných buněk.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Testovaná kohorta

Do analýzy bylo zahrnuto celkem 265 štěpů krvinečných buněk od 152 nemocných. Měření viability buněk na základě exprese CD34+ kmenových buněk se provádělo u 113 pacientů před podáním DMSO a u 152 pacientů po podání DMSO a kryokonzervaci.

4.2. Postup při odběru a kryokonzervaci krvinečných buněk

4.2.1 Odběr vzorku a manipulace

Periferní kmenové buňky (PKB) resp. kostní dřeň (KD) jsou odebírány pacientům a příbuzenským HLA shodným dárčům. Odběr KD probíhá na operačním sále za sterilních podmínek a dále je upravován na separační jednotce pomocí jednorázových sterilních souprav. Odběr PKB a dárcovských lymfocytů se provádí na separační jednotce Hemato-onkologické kliniky na separátoru krevních elementů COBE OPTIA (COBE BCT, Inc, USA) separačními sestrami pod dohledem separačního lékaře. Odebírá se 100 – 150 ml materiálu a množství odebraného produktu se kontroluje vážením. Po propuštění separačním lékařem jsou štěpy zpracovávány v laboratoři tkáňové banky (LTB).

4.2.1.1 Příprava produktu ke kryokonzervaci

Použité reagenty při kryokonzervaci:

- DMSO (dimethylsulfoxid, WAK – CHEMIE MEDICAL GMBH; 10ml ampule)
- Albumin 5% (lékárna FN Olomouc, 250ml ampule)

Při kryokonzervaci je zpracováváno 50 ml separačního produktu na jeden kryovak. Proto je prováděna redukce objemu (sedimentace, centrifugace s následnou kontrolou odebrané plasmy) či doplnění objemu (plasmou dárce nebo 5% albuminem). Nejčastěji jsou zpracovány 2 kryovaky, tzn. 100 ml produktu.

4.2.1.2 Příprava kryoprotektivního roztoku

Do vaku určeného na kryoprotektivní roztok je aplikováno 50 ml 5% albuminu. Tento vak je součástí prep-setu. Do stříkačky prep-setu je natáhnuto 30 ml 5% albuminu, vak s albuminem je odvařen a vložen do předem předchlazeného plastového obalu. Obsah 2 lahviček DMSO (2 x 10 ml) je postupně natáhnut do 20ml stříkačky, které jsou následně připojeny k prep-setu přes sterilní filtr a za stálého míchání vaku je přepuštěno 20 ml DMSO

do vaku, ve kterém je již albumin. Albumin, který byl ponechán ve stříkačce prep-setu, je použit k propláchnutí hadiček po přidání DMSO. Ve vaku se tedy nachází 100 ml 20% DMSO. Vak prep-setu musí během celé procedury zůstat v chladícím obalu.

4.2.1.3 Míchání štěpu krvevorných buněk s kryoprotektivním roztokem

Oba kryovaky jsou uloženy do předchlazených chladících obalů na třepačku. Pomocí stříkačky prep-setu je přetažen kryoprotektivní roztok do kryovaku se separačním produktem, řádně promíchán a hadičky jsou propláchnuty od kryoprotektivního roztoku. V kryovaku se nyní nachází 200 ml produktu. Následně je přesunuto 100 ml produktu do druhého kryovaku. Oba kryovaky jsou vloženy do označených sekundárních obalů a ty jsou pak svařeny.

4.2.1.4 Odběr vzorků z kryovaků

Vzorky jsou odebírány u prvního kryovaku do stříkačky dvoucestného setu a u druhého kryovaku do stříkačky prep-setu. Kryovak je vložen do plasmaextraktoru. Stříkačkou je důsledně z kryovaku odstraněn vzduch a je odebráno cca 5 ml produktu na vzorky. Kryovak a stříkačka jsou těsně odtaveny. Obsah stříkačky je rozdělen na příslušné vzorky pro zjištění krevního obrazu. Tři kryoampule jsou určeny k vyšetření po aplikaci a tři kryoampule ke kontrole mražení (viabilita, kultivace CFU-GM, BFU-E a hemokultura).

4.2.1.5 Programované zamražení kryovaků

Programovaný zamrazovač ICE-CUBE (SY-LAB, USA) je nutno zapnout v dostatečném časovém předstihu (ještě před přidáním DMSO ke štěpu krvevorných buněk). Tím je zajištěna kontrola přístroje a současně jeho vytemperování. Pracovník provádějící kryokonzervaci se přihlásí do systému a spustí program zamrazování. Dále je zahájeno vytemperování komory. Po zadání pacientova jména se spustí celý program. Kryovaky jsou ihned po zatavení vloženy do kovových kazet, je zkontrolováno umístění identifikačních údajů, kazety jsou dobře uzavřeny a umístěny do programového zamrazovače. Spolu s kryovaky jsou zamrazovány i kryoampule s odebranými vzorky pro vyšetření po aplikaci a kontrolu mražení, která je prováděna v následujících dnech. Poté je spuštěno vlastní mražení. V komoře programovaného zamrazovače je vždy umístěn pilotní vzorek se zavedeným čidlem obsahující 100 ml albuminu a DMSO v 10% koncentraci, díky němuž je možné sledovat pokles teploty v kryovacích. Na monitoru ICE-CUBE se během mražení objevuje křivka poklesu teploty jednak v komoře a také v pilotním vzorku, která musí být pozvolná a bez výkyvů. Po dosažení teploty -150 °C je program ukončen. Kryovaky v kovových kazetách jsou bezprostředně po kryokonzervaci zanořeny do tekutého dusíku.

4.3 Analýza krevního obrazu a kvality štěpu

Analýza krevního obrazu je prováděna před přidáním DMSO. Je stanoveno zastoupení CD34+ buněk (u alogenního štěpu navíc CD3+, CD4+, CD8+, NK buňky), vitalita (počet jaderných buněk), výsledek kultivace CFU-GM + BFU-E a hemokultura z nativního štěpu.

4.3.1 Stanovení CD34+ kmenových buněk

Samotné stanovení exprese CD34 antigenu je prováděno pomocí průtokového cytometru (BD FACS CANTO™ II., USA) v analytickém software BD FACS Diva v. 8.0.1. Pro identifikaci a stanovení procentuálního zastoupení všech živých CD34+ kmenových buněk ze všech živých leukocytů v krevním materiálu je použita souprava CD34 QuantiFlowEx Kit (EXBIO, Praha, Česká republika). Tato souprava obsahuje následující komponenty shrnuté v Tabulce I.

Tab. I: Obsah soupravy CD34 QuantiFlowEx Kit

Katalogové číslo	Název komponenty	Velikost balení
ED7080-1	Staining Reagent	1 ml
ED7080-2	7-AAD	1 ml
ED7080-3	Lysing Solution	15 ml

Komponenta Staining Reagent obsahuje naředěné monoklonální protilátky anti-CD45 FITC, klon MEM-28 a anti-CD34 PE, klon 4H11(APG). Značené protilátky jsou naředěné v optimální koncentraci ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) obsahujícím 15mM azid sodný. Komponenta 7-AAD obsahuje naředěný 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), vitální barvivo v optimální koncentraci ve stabilizačním fosfátovém roztoku (PBS) obsahujícím 15mM azid sodný. Lyzační roztok (komponenta Lysing Solution) obsahuje koncentrovaný roztok na bázi chloridu amonného určený k lýze červených krvinek. Roztok neobsahuje fixativum. Tato komponenta musí být před samotným použitím naředěná v poměru 1:9 s deionizovanou vodou.

Pro značení krevního vzorku je použita Dual Platform metoda. Do jedné zkumavky je napipetováno 20 µl směsi protilátek (Staining Reagent), 20 µl 7-AAD a 100 µl krevního vzorku. Zkumavka je poté jemně zvortexována a inkubována 20-30 minut při laboratorní teplotě v temnu. Dále jsou přidány 2 ml lyzačního roztoku a zkumavka je inkubována 10 minut při laboratorní teplotě v temnu.

Pomocí vhodného software jsou analyzována naměřená data. Pro enumeraci procent živých CD34+ kmenových buněk musí být použit mezinárodně uznávaný protokol společnosti International Society for Hematotherapy and Graft Engineering, tzv. ISHAGE protokol. Na základě 5 optických parametrů (2 parametry rozptylu světla a 3 fluorescenční parametry) a pomocí sekvenčního a logického ohraničení je možné na základě charakteristických vlastností identifikovat CD34+ kmenové buňky. Skutečné CD34+ kmenové buňky exprimují CD34 a CD45 antigen, kdy exprese antigenu CD45 je srovnatelná s expresí nezralých buněk. Exprese je dostatečná pro identifikaci, je však nižší než exprese např. lymfocytů. Skutečné CD34+ kmenové buňky mají také charakteristický přední (FSC) i boční rozptyl (SSC) světla podobný nezralým buňkám a lymfocytům.

Monoklonální protilátka MEM-28 reaguje se všemi formami lidského CD45 antigenu (LCA) a molekulovou hmotností 180-220 kDa. Monoklonální protilátka 4H11(APG) reaguje s Class III epitopem lidského CD34 antigenu (Mucosialin) s molekulovou hmotností 110-115 kDa.

4.4 Statistická analýza

Naměřená data byla statisticky zhodnocena pomocí softwaru STATISTICA 12. Byl proveden Two-Sample test (T-test), ve kterém byly porovnány naměřené hodnoty viability před a po aplikaci DMSO. Byla stanovena p-hodnota neboli statistická významnost.

5. VÝSLEDKY

Pomocí průtokového cytometru bylo provedeno určení počtu viabilních CD34+ kmenových buněk vyjádřených jako procento ze všech živých leukocytů. Měření se provádělo u 113 štěpů KB před podáním DMSO a u 152 štěpů KB po podání DMSO a kryokonzervaci. Jednotlivé hodnoty viability jsou uvedeny v Tabulce II a III.

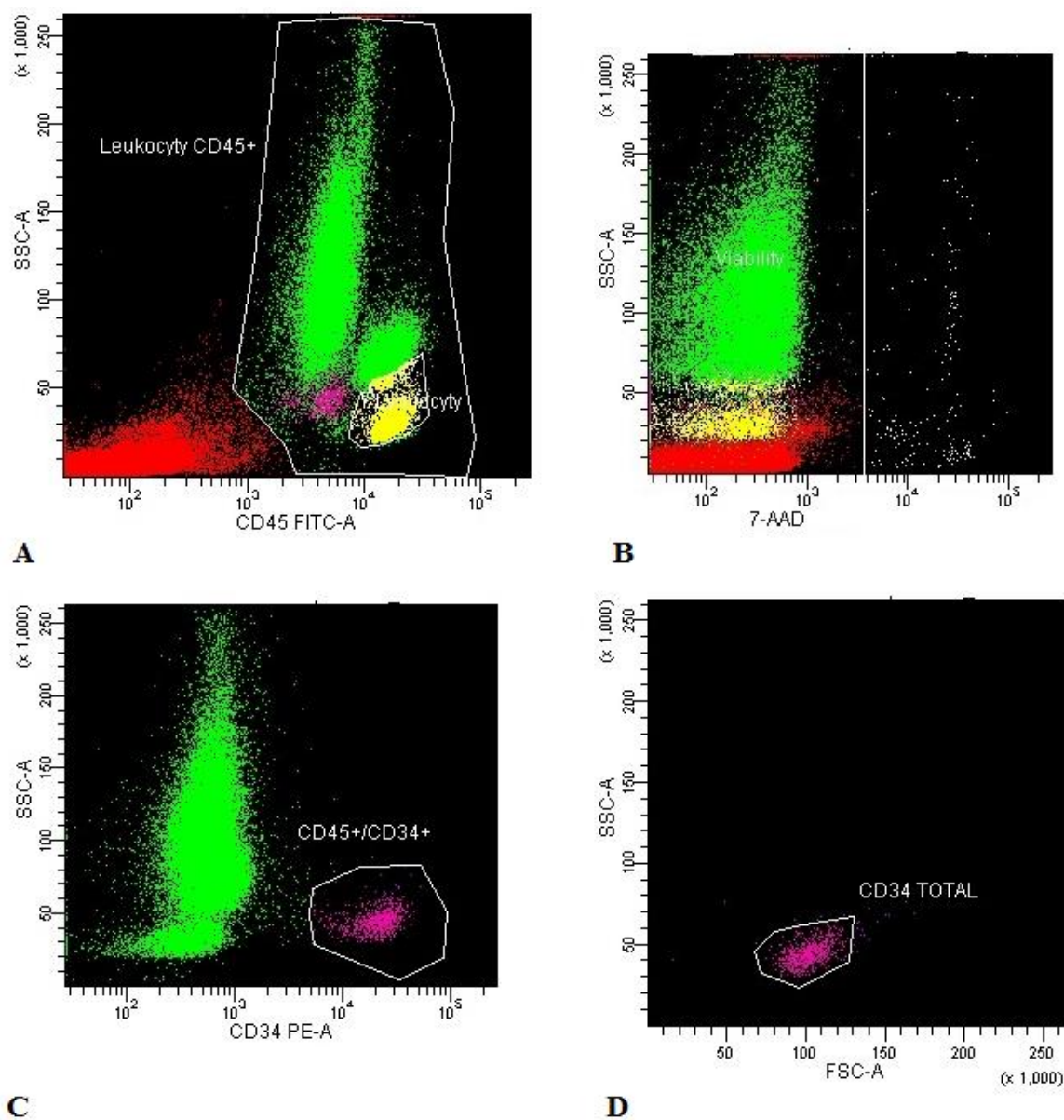
Tab. II: Viabilita CD34+ kmenových buněk ve štěpu před přidáním DMSO

Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk
1	99,1	26	99,9	51	99,9	76	99,5	101	99,8
2	99,8	27	99,6	52	99,9	77	99,2	102	99,8
3	99,9	28	99,9	53	99,8	78	99,4	103	99,9
4	99,5	29	99,9	54	99,5	79	99,9	104	99,9
5	98,7	30	99,8	55	96,9	80	99,1	105	99,8
6	99,2	31	99,7	56	99,9	81	90,8	106	99,6
7	99,7	32	89,4	57	99,7	82	99,8	107	99,9
8	99,6	33	89,9	58	99,7	83	99,6	108	99,8
9	99,9	34	88,7	59	99,4	84	99,9	109	99,9
10	99,4	35	95,5	60	99,9	85	99,8	110	96,8
11	98,9	36	99,7	61	99,9	86	99,9	111	99,5
12	99,5	37	99,3	62	99,8	87	98,1	112	99,9
13	99,6	38	99,6	63	99,8	88	99,4	113	87,4
14	98,8	39	99,2	64	99,8	89	99,6		
15	99,3	40	99,7	65	99,9	90	99,3		
16	99,7	41	98,9	66	99,4	91	97,8		
17	99,9	42	99,7	67	87,4	92	99,5		
18	99,9	43	99,4	68	96,9	93	99,4		
19	99,8	44	99,4	69	99,8	94	99,3		
20	99,5	45	99,9	70	99,9	95	99,9		
21	99,6	46	99,8	71	99,8	96	99,8		
22	99,8	47	99,6	72	99,9	97	99,9		
23	99,7	48	99,9	73	99,7	98	97,8		
24	99,5	49	99,7	74	99,8	99	99,8		
25	99,9	50	99,8	75	99,5	100	99,6		

Tab. III: Viabilita CD34+ kmenových buněk ve štěpu po přidání DMSO

Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk	Pacient č.	% viabilních buněk
1	68,1	36	70,7	71	78,6	106	83,4	141	82,6
2	70,1	37	57,8	72	77,7	107	82,3	142	80,6
3	77,0	38	62,9	73	87,4	108	70,5	143	79,5
4	55,1	39	77,4	74	93,4	109	76,1	144	77,8
5	24,2	40	65,3	75	81,9	110	82,0	145	62,8
6	67,1	41	62,0	76	75,0	111	89,6	146	67,2
7	60,9	42	71,3	77	86,2	112	88,2	147	47,5
8	76,6	43	56,2	78	74,0	113	87,9	148	80,2
9	59,0	44	81,9	79	83,0	114	73,6	149	56,9
10	79,6	45	65,5	80	87,7	115	92,2	150	57,3
11	76,2	46	58,0	81	73,0	116	95,2	151	59,5
12	77,6	47	70,6	82	73,4	117	46,0	152	52,8
13	70,6	48	78,2	83	67,4	118	88,9		
14	71,5	49	68,4	84	81,4	119	77,8		
15	73,8	50	82,6	85	76,6	120	74,6		
16	87,4	51	79,2	86	85,0	121	61,8		
17	70,1	52	68,9	87	82,4	122	49,8		
18	73,8	53	92,5	88	83,9	123	72,8		
19	77,3	54	97,2	89	84,8	124	98,1		
20	76,5	55	72,0	90	72,5	125	69,0		
21	64,8	56	55,1	91	63,1	126	85,4		
22	83,0	57	82,5	92	92,1	127	88,1		
23	47,0	58	90,6	93	85,9	128	80,1		
24	57,5	59	53,6	94	70,5	129	71,9		
25	45,1	60	75,8	95	68,4	130	52,1		
26	72,1	61	62,1	96	62,0	131	77,2		
27	64,8	62	75,4	97	78,4	132	76,6		
28	76,3	63	66,3	98	83,6	133	72,6		
29	79,2	64	78,9	99	87,7	134	72,5		
30	79,1	65	71,9	100	87,9	135	67,0		
31	68,5	66	87,6	101	84,1	136	64,1		
32	52,1	67	78,9	102	86,3	137	49,4		
33	72,0	68	70,1	103	80,1	138	77,8		
34	60,3	69	69,4	104	61,7	139	66,2		
35	65,4	70	80,1	105	62,7	140	84,5		

Na Obrázcích 3 a 4 lze porovnat množství CD34+ kmenových buněk v celém štěpu před a po aplikaci DMSO. Dle Obrázku 3-B lze jasně říci, že množství mrtvých buněk je před aplikací DMSO několikanásobně nižší než na Obrázku 4-B, který znázorňuje množství buněk po aplikaci DMSO.



Obr. 3: Cytometrická analýza štěpu: vzorek s vysokou viabilitou buněk před aplikací DMSO.

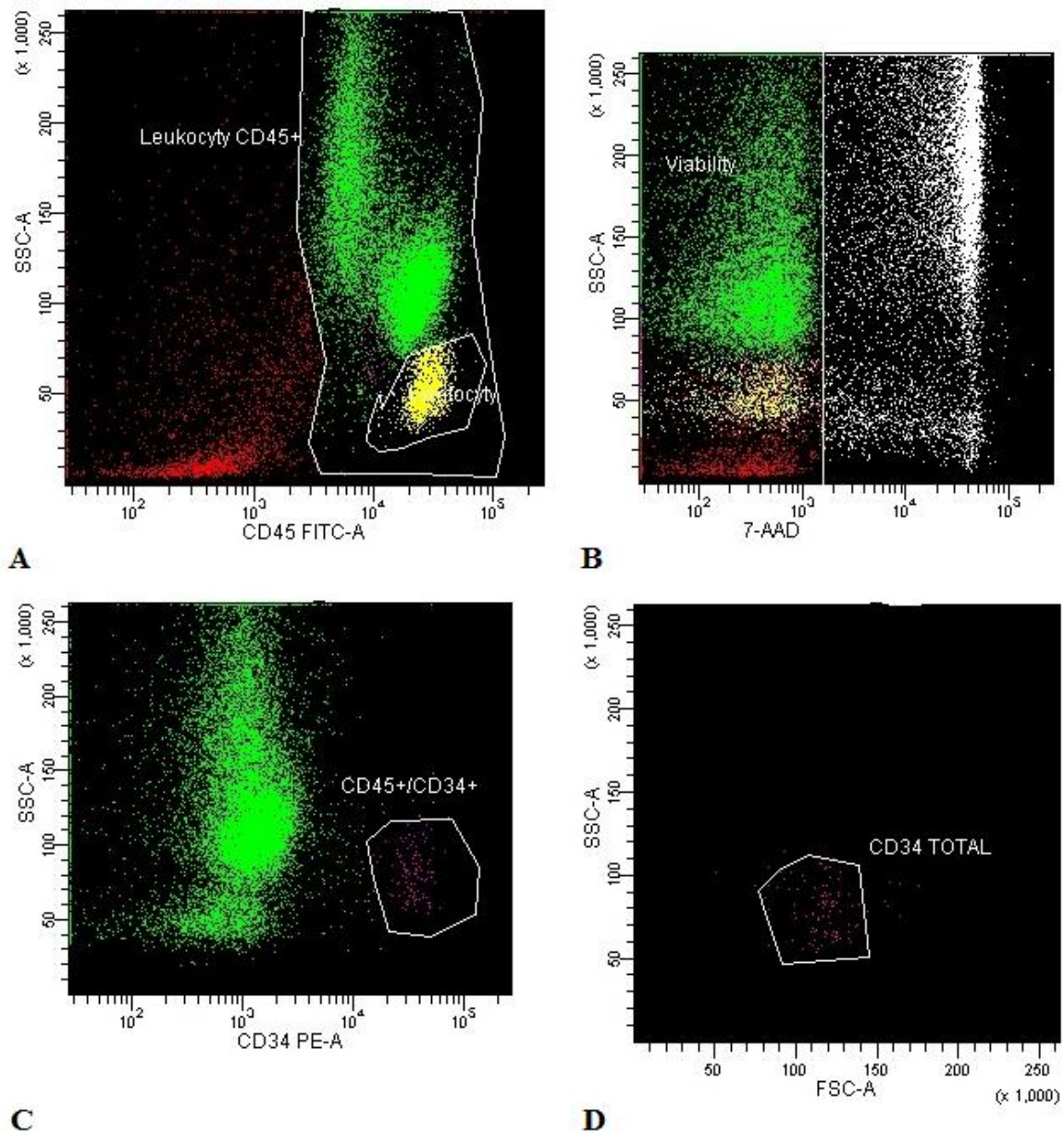
Obr. A: Vyčlenění CD45+ leukocytární populace pomocí protilátky anti-CD45 FITC-A.

Non-leukocytární populace červeně, leukocyty CD45+ zeleně, CD34+ buňky fialově.

Obr. B: Stanovení viability pomocí barvení 7-AAD. V levé části scattergramu se nachází viabilní populace 7-AAD negativní a v pravé části mrtvé buňky 7-AAD pozitivní.

Obr. C: Postup gatování CD34+ buněk. Leukocyty CD45+ zeleně, CD34+ buňky fialově.

Obr. D: Kvantifikace CD34+ kmenových buněk. CD34+ buňky fialově.



Obr. 4: Cytometrická analýza štěpu: vzorek s nízkou viabilitou buněk po aplikaci DMSO.

Obr. A: Vyčlenění CD45+ leukocytární populace pomocí protilátky anti-CD45 FITC-A.

Non-leukocytární populace červeně, leukocyty CD45+ zeleně, lymfocyty žlutě, CD34+ buňky fialově.

Obr. B: Stanovení viability pomocí barvení 7-AAD. V levé části scattergramu se nachází viabilní populace

7-AAD negativní a v pravé části mrtvé buňky 7-AAD pozitivní.

Obr. C: Postup gatování CD34+ buněk. Leukocyty CD45+ zeleně, CD34+ buňky fialově.

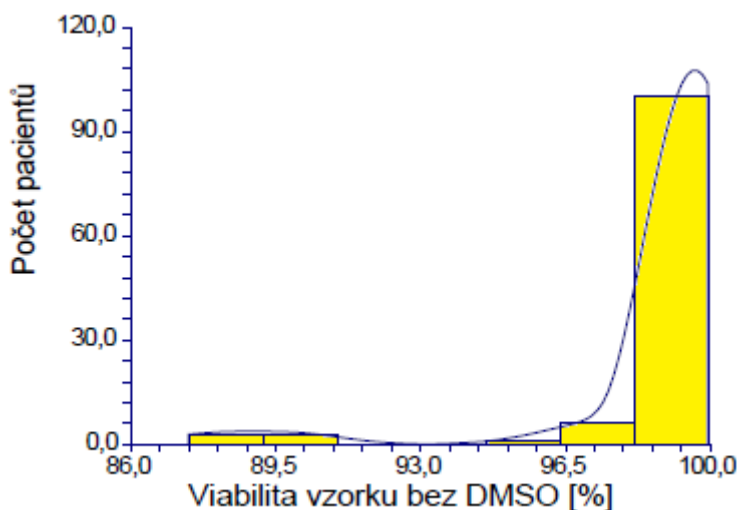
Obr. D: Kvantifikace CD34+ kmenových buněk. CD34+ buňky fialově.

Pomocí statistického zhodnocení naměřených hodnot viabilních CD34+ kmenových buněk byly získány deskriptivní statistické hodnoty viability štěpu bez a s DMSO. Nejnižší naměřená hodnota viability CD34+ kmenových buněk ve štěpu bez DMSO byla 87,4 % a nejvyšší hodnota byla 99,9 %. Medián hodnot byl stanoven jako 99,7 %. Po aplikaci DMSO byla naměřena nejnižší hodnota viability CD34+ kmenových buněk ve štěpu 24,2 % a nejvyšší hodnota 98,1 %. Medián hodnot byl 74,3 %. Tyto hodnoty jsou shrnuty v Tabulce IV.

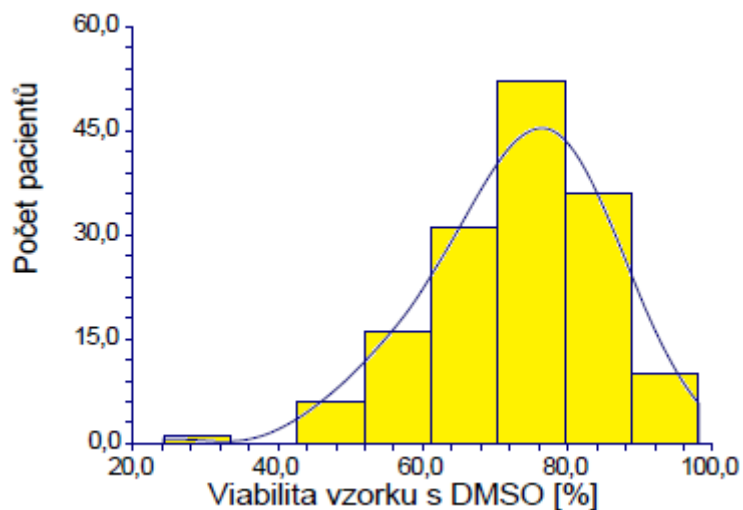
Tab. IV: Minimální a maximální hodnoty viability CD34+ kmenových buněk štěpu před a po aplikaci DMSO. Medián hodnot.

Přítomnost DMSO ve štěpu	Celkový počet naměřených viabilit	Minimální hodnota viability štěpu [%]	Maximální hodnota viability štěpu [%]	Medián [%]
-	113	87,4	99,9	99,7
+	152	24,2	98,1	74,3

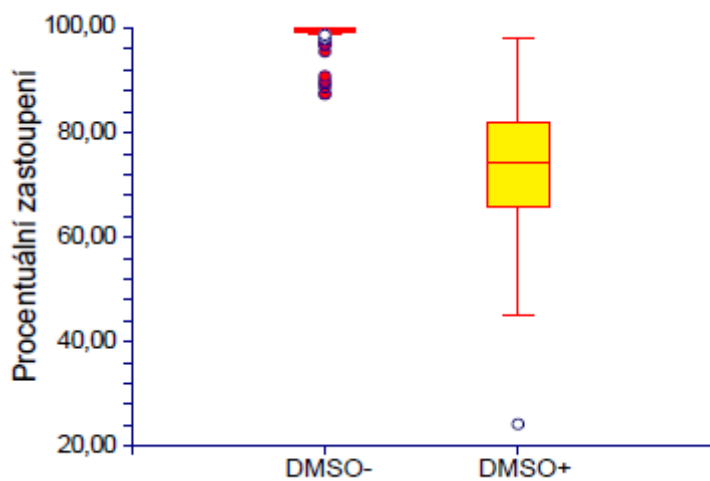
Po provedení T- testu byla získána p-hodnota, která byla rovna 0,000001, což ukazuje statisticky vysoce signifikantní rozdíl v porovnávaných hodnotách. Získané hodnoty byly zaneseny do grafů na Obrázcích 5-7.



Obr. 5: Rozložení naměřených hodnot viability štěpu bez DMSO



Obr. 6: Rozložení naměřených hodnot viability štěpu s DMSO



Obr. 7: Srovnání hodnot DMSO- a DMSO+ štěpu

Bylo tedy prokázáno, že po aplikaci DMSO ke štěpu KB se statisticky snížil počet viabilních CD34+ kmenových buněk v celém štěpu.

6. DISKUSE

Transplantace krvetvorných buněk je často jedinou kurativní metodou při léčbě hematologických malignit. Při autologní transplantaci se však setkáváme s problémem dlouhodobého uchování štěpu, ke kterému musí být přidáno kryoprotektivum, které zabrání zničení buněk při zamražení na velmi nízkou teplotu. V dnešní době se v hematologii nejčastěji využívá 10% DMSO, který má svá pozitiva, ale i negativa. DMSO vykazuje už v nízkých koncentracích toxické účinky, které mohou způsobovat odumírání buněk štěpu.

Cílem této práce bylo ověřit, zda toxické účinky DMSO signifikantně ovlivňují kvalitu štěpu. Standardně se kvalita štěpu krvetvorných buněk hodnotí na základě množství viabilních CD34+ buněk. Výsledky zahraničních studií ukazují, že počet viabilních CD34+ buněk koreluje s úspěšností příhojení. Allan a kolektiv (Allan *et al.*, 2002) analyzovali 36 vzorků periferních kmenových buněk určených k autologní transplantaci. Medián hodnot viabilních CD34+ buněk při sběru byl $3,6 \times 10^6/\text{kg}$ a po rozmražení $2 \times 10^6/\text{kg}$. Bylo zjištěno, že při mediánu hodnot viabilních CD34+ buněk po rozmražení $<2,0$ nebo $2,0-5,0$ nebo $>5,0 \times 10^6/\text{kg}$, byl medián doby příhojení u krevních destiček 17, 12 a 10 dní a u neutrofilů byl 13, 14 a 12 dní. U 92 % pacientů byla naměřena minimální hodnota viabilních CD34+ buněk (tedy $2 \times 10^6/\text{kg}$), avšak pouze u 52 % z nich bylo dosaženo této hodnoty v době reinfuze. Toto snížené množství viabilních CD34+ buněk před reinfuzí může být užitečné v identifikaci pacientů s rizikem selhání štěpu (Allan *et al.*, 2002).

Dále bylo zjištěno, že na toxicitě DMSO se podílí více faktorů. Jedním z nich je teplota. Pomocí multiparametrové single platform metody byla na průtokovém cytometru měřena viabilita CD34+ buněk a subtypů leukocytů. Vzorky byly nejdříve zamrazeny s 10% DMSO a poté ponechány 30 minut v pokojové teplotě nebo v teplotě $4\text{ }^\circ\text{C}$. Naměřená viabilita byla výrazně nižší u vzorků ponechaných při pokojové teplotě. U 10 vzorků bylo použito 5% DMSO a medián naměřených hodnot viabilních CD34+ buněk byl 89 % (u $4\text{ }^\circ\text{C}$ i u pokojové teploty) a u leukocytů byl 79 % při $4\text{ }^\circ\text{C}$ a 68 % při pokojové teplotě (Fritsch *et al.*, 2016). To poukazuje na možnou závislost toxicity DMSO na jeho koncentraci.

V další publikaci (Abrahamsen *et al.*, 2002) byly prokázány lepší výsledky viability CD34+ buněk při zamražení s 5% DMSO, než s 10% DMSO. Experiment byl prováděn u štěpů PBSC, ke kterým byl přidán 5% nebo 10% DMSO. Ty byly zamrazeny a uchovány v tekutém dusíku po dobu 3-22 měsíců. Poté v nich bylo změřeno množství viabilních CD34+ buněk, které bylo vyšší ve vzorcích s 5% DMSO. Použití nižší koncentrace by mohlo zlepšit

kvalitu štěpu a zvýšit tak pravděpodobnost přihojení HPCs (Abrahamsen *et al.*, 2002).

Bylo však otázkou, zda nižší koncentrace DMSO neohrozí kvalitu štěpu a nezpůsobí odumírání buněk při zamražení. Byla publikována práce, ve které bylo 20 vzorků PBSC (o stejné koncentraci buněk) zamraženo s 2%, 4%, 5% a 10% DMSO a uchováno v tekutém dusíku po dobu 6-8 týdnů. Zároveň bylo se stejnými koncentracemi DMSO zamraženo 11 vzorků PBSC o různé koncentraci jaderných buněk (150 a 300 x 10⁶/ml). Cílem bylo zkoumat zvyšování koncentrace buněk při snižování koncentrace DMSO. Poté byla měřena hodnota viabilních CD34+ buněk. Kryoprezervace PBSC o koncentraci buněk 150 x 10⁶/ml s 2% DMSO prokázala signifikantně nižší viabilitu ve srovnání s 4% a 5% DMSO. Nicméně při zvýšení koncentrace buněk na 300 x 10⁶/ml při kryokonzervaci s 5% DMSO bylo pozorováno snížení viability CD34+ buněk. Z toho vyplývá, že pro kryoprezervaci PBSC je optimální koncentrací 5% DMSO a koncentrace jaderných buněk ve štěpu by neměla přesáhnout 200 x 10⁶/ml (Liseth *et al.*, 2005).

Dalším kritickým faktorem v kryokonzervaci pomocí DMSO by mohlo být dlouhodobé uchování štěpu. Byla provedena obsáhlá studie zahrnující 262 pacientů, kteří podstoupili autologní transplantaci po dlouhodobém uchování štěpu (maximálně po dobu 18 let). 100 vzorků bylo uchováno po dobu <1 rok (10% DMSO), 50 vzorků uchováno 1-4,9 let (10% DMSO), 50 vzorků uchováno 5-9 let (5% DMSO) a zbytek uchován po dobu >9 let (60 vzorků s 5% DMSO, 2 vzorky s 10% DMSO). Nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl ve viabilitě buněk při kryoprezervaci s 5% či s 10% DMSO. Z toho důvodu byly skupiny s uchováním štěpu po dobu 1-4,9 a 5-9 let spojeny do jedné a byly tak získány 3 skupiny (<1 rok, 1-9 let a >9 let). Byl proveden ANOVA test (ANalysis Of VAriance), který neprokázal žádnou souvislost dlouhodobého skladování štěpu s úspěšností přihojení (Veeraputhiran *et al.*, 2010).

V současnosti se vyvíjejí nová kryoprotektiva a kryokonzervační techniky s lepšími vlastnostmi. Tradičně se HSCs zamrazují s DMSO v kombinaci s albuminem, dextrans-40 nebo s fyziologickým roztokem. Byla provedena studie zkoumající využití CryoStor™ v zamrazování HSCs z pupečnickové krve (CB, Cord Blood). Vzorky CB byly zamraženy třemi různými způsoby: v kombinaci s dextrans-40 v 10% DMSO, s CryoStor™ v 10% DMSO nebo s CryoStor™ v 5% DMSO. Před zamražením byly odebrány leukocyty a CD34+ buňky ke stanovení viability štěpu. Vlastní vzorky s kryoprotektivy byly zamraženy a uchovány v tekutém dusíku po dobu minimálně 72 hodin. Poté byly rychle rozmraženy

při 37 °C a byla stanovena viabilita CD34+ buněk a CFU (Colony-Forming Unit) test. Výsledky ukázaly, že buňky zamražené s CryoStor™ v 10% DMSO vykazovaly výrazně lepší obnovu populací leukocytů ($P < 0.001$), i CD34+ ($P < 0.001$), vyšší viabilitu i počet CFU ($P < 0.001$) v porovnání s dextranem v 10% DMSO. CryoStor™ v 5% DMSO také vykazoval zlepšení v hodnotách leukocytů a CFU. Dá se tedy říci, že využití kombinace CryoStor™ s 5% či 10% DMSO přinese zlepšení obnovy HSCs a viability CD34+ buněk (Stylianou *et al.*, 2006).

Pomocí našeho experimentu bylo prokázáno, že po aplikaci 20% DMSO dojde ke statisticky signifikantnímu snížení počtu viabilních CD34+ buněk. V další fázi výzkumu bych se ráda hlouběji věnovala vlivu kryoprotektiv na viabilitu štěpu s cílem posoudit dopad koncentrace DMSO na různě buněčné štěpy. Lze předpokládat, že individualizované stanovení poměru kryoprotektiv ku kmenovým buňkám může vést k jejich lepšímu přežívání, a tím přispět k vyšší úspěšnosti transplantací krvetvorných buněk.

7. ZÁVĚR

V teoretické části byla zpracována literární rešerše zabývající se problematikou hematologických malignit, transplantace krvetvorných buněk, kryoprezervace štěpu s využitím DMSO a stanovení viability CD34+ buněk pomocí průtokového cytometru.

V praktické části byla popsána metodika zpracování štěpu a měření jeho kvality. Dále zde byly shrnuty výsledky stanovení počtu viabilních CD34+ buněk před a po aplikaci DMSO.

Pomocí statistické analýzy bylo zjištěno, že po aplikaci DMSO dojde ke statisticky signifikantnímu snížení viabilních CD34+ krvetvorných buněk.

Problematika transplantací krvetvorných buněk je jedním z horkých témat současné hematookologie. Pokroky v laboratorní i klinické medicíně spolu s rozšiřováním vědomostí o molekulárních podkladech transplantační biologie zde přinášejí své ovoce v podobě lepší péče o nemocné, která se projevuje významným navýšením úspěšnosti terapie hematologických malignit, jíž jsou transplantace krvetvorných buněk nedílnou součástí.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Abrahamsen, J., Bakken, A., Bruserund, Ø. (2002): Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5% rather than 10% DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 42: 1573 – 1580.
2. Adam, Z., Doubek, M., Penka, M., Tomáška, M. (2001): Akutní myeloidní leukemie. In: Adam, Z., Vorlíček, J.: *Hematologie II. Přehled maligních hematologických onemocnění*, pp. 38 – 42, Grada, Praha
3. Allan, D., Keeney, M., Howson-Jan, K., Popma, J., Weir, K., Bhatia, M., Sutherland, D., Chin-Yee, I. (2002): Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 29: 967 – 972.
4. Belada, D. (2010): Udržovací léčba rituximabem u ne-Hodgkinových lymfomů - možnosti v roce 2010. *Onkologie* 4: 196 - 201.
5. Čermák, J. (2016): Myelodysplastický syndrom v roce 2016. *Onkologie* 10: 114 - 119.
6. Čermák, J., Vitek, A., Michalová, K., Březinová, J., Zemanová, Z. (2005): Myelodysplastický syndrom v novém tisíciletí: Jak klasifikovat a jak léčit nemocné?. *Vnitřní lékařství* 51: 20 - 30.
7. Červinek, L. (2015): Myelodysplastický syndrom. *Onkologie* 9: 112 - 118.
8. Dean, P., Hoffman, R. (2007): Overview of Flow Cytometry Instrumentation. *Current Protocols in Cytometry* 39: 1.1:1.1.1–1.1.8
9. Deschler, B., Lübbert, M. (2006): Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107: 2099 - 2107.
10. Doubek, M. Typy, dárci a indikace k transplantacím. In: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. Jan 5, 2007 [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/transplantace-krvetvornych-bunek/typy-darci-a-indikace-k-transplantacim/>

11. Eckschlager, T. (1999): Průtoková cytometrie v klinické praxi, Grada, Praha.
12. Eckstein, R. (1994): Imunohematologie a transfuzní lékařství, Diag Human, Praha.
13. Ferrara, J., Levine, J., Reddy, P., Holler, E. (2009): Graft versus Host Disease. *Lancet* 373: 1550 - 1561.
14. Folber, F., Hrabovský, Š., Doubek, M. (2015): Akutní lymfoblastická leukemie dospělých. *Onkologie* 9: 125 - 127.
15. Fritsch, G., Frank, N., Dmytrus, J., Frech, C., Pichler, H., Witt, V., Geyeregger, R., Scharner, D., Trbojevic, D., Zipperer, E., Printz, D., Worel, N. (2016): Relevance of flow cytometric enumeration of post-thaw leucocytes: influence of temperature during cell staining on viable cell recovery. *Vox Sanguinis* 111: 187 – 196.
16. Goodell, M. (1999): CD34+ or CD34-: does it really matter?. *Blood* 94: 2545 - 2547.
17. Hadrabová, M. (2015): Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* 9: 107 - 111.
18. Hubel, A. (1997): Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine Reviews* 11: 224 – 233.
19. Indrák, K. (2006): Hematologie, Triton, Praha.
20. Jindra, P. (2013): HLA systém a jeho význam v hematologii. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: Molekulární hematologie, pp. 76 – 84, Galén, Praha.
21. Kabičková E. (2011): Non-hodgkinské lymfomy. In: Bajčiová, V., Štěrba, J., Tomášek, J.: Nádory adolescentů a mladých dospělých, pp. 35 - 42, Grada, Praha.
22. Klabusay, M., Suková, V., Kořístek, Z., Mayer, J., Vorlíček, J. (2007): Subpopulace CD34+ buněk a jejich význam pro připojení štěpu u příbuzenských alogenních transplantací periferních kmenových buněk. *Vnitřní lékařství* 53: 646 - 651.
23. Koubek, K. (2008): Lidské leukocytární antigeny z hlediska CD klasifikace. *Vnitřní lékařství* 54: 402 - 409.

24. Kozák, T. (2008): Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* 2: 156 - 162.
25. Král, Z. (2013): Hodgkinský lymfom. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: *Molekulární hematologie*, pp. 255 – 256, Galén, Praha.
26. Král, Z. (2014): Léčba lokalizovaného stadia Hodgkinova lymfomu. *Onkologie* 8: 112 - 116.
27. Krejčí, M. (2013): Neoplazie plazmatických buněk. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: *Molekulární hematologie*, pp. 240 – 242, Galén, Praha.
28. Liseth, K., Abrahamsen, J., Bjørsvik, S., Grøtnebø, K., Bruserud, Ø. (2005): The viability of cryopreserved PBSC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cryotherapy* 7: 328 – 333.
29. Löwenberg, B. (2001): Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 65 - 75.
30. Mayer, J., Starý, J. (2002): *Leukemie*, Grada, Praha.
31. Mayer, J., Vorlíček, J., Kořístek, Z., Hoffová, V., Koutná, I., Navrátilová, D. (1997): *Vysokodávkovaná protinádorová chemoterapie s transplantací krvetvorných buněk: Informace pro nemocné, Fakultní nemocnice Brno, Brno.*
32. Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S., Kato, Y. (1990): Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathologica Japonica* 40: 107 – 115.
33. Neuwirt, J., Nečas, E., Kornalík, F., Šulc, K. (1983): *Patofyziologie krve*, Avicenum, Praha.
34. Novák, M. (2014): Průtoková cytometrie. In: Cibiček, N., Vacek, J.: *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*, pp. 131 – 139, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
35. Orkin, S., Zon, L. (2008): *Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology.*

Cell 132: 631 - 644.

36. Papajík, T., Trněný, M., Vášová, I., Belada, D., Jankovská, M., Jindra, P., Mužík, J., Pavlík, T., Dušek, L., Indrák, K. (2009): Epidemiologie ne-hodgkinových lymfomů v České republice, Evropě a Severní Americe. *Onkologie* 3: 141 - 146.
37. Pavlová, Š., Létalová, E., Doubek, M. (2013): Hematopoéza, imunitní systém, přestavby imunoglobulinů. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: *Molekulární hematologie*, pp. 65 – 75, Galén, Praha.
38. Potěšilová, M. (2008): Genomické profilování CD34+ buněk pacientů s CML. Masarykova univerzita, Brno.
39. Pui, Ch., Robinson, L., Look, T. (2008): Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 371: 1030 - 1043.
40. Rohoň, P., Faber, E. (2013): Chronická myeloidní leukémie. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: *Molekulární hematologie*, pp. 178 – 186, Galén, Praha.
41. Roubalová, L. (2012): Průtoková cytometrie [online]. *FONS Bulletin* [cit. 2016-12-10]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/22012/lab01.pdf>
42. Sedláček, P., Říha, P. (2014): Alogenní transplantace kmenových buněk v léčbě maligních onemocnění krvetvorby u dětí. *Onkologie* 8: 121 - 123.
43. Sidney, L., Branch, M., Dunphy, S., Dua, H., Hopkinson, A. (2014): Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells* 32: 1380 – 1389.
44. Slováček, L. (2008): *Transplantace krvetvorných buněk a kvalita života*, Triton, Praha.
45. Slováček, L., Jebavý, L., Blažek, M., Kmoníček, M., Žák, P. (2005): Transplantace kostní dřeně. *Vojenské zdravotnické listy* 74: 125 - 134.
46. Stylianou, Ms., Vowels, M., Hadfield, K. (2006): Novel cryoprotectant significantly improves the post-thaw recovery and quality of HSC from CB. *Cytotherapy* 8: 57 – 61.

47. Sýkorová, A., Belada, D., Smolej, L., Pytlík, R., Benešová, K., Vášová, I., Papajík, T., Šálek, D., Procházka, V., Matuška, M., Brejcha, M., Kubáčková, K., Kabíčková, E., Móciková, H., Campr, V., Trněný, M. (2010): Určování rozsahu onemocnění u non-Hodgkinových lymfomů – doporučení Kooperativní lymfomové skupiny [online]. *Klinická onkologie* 23: 146 - 154 [cit. 2017-03-17] Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/156/3633.pdf>
48. Šálek, C., (2012): Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* 14: 366 - 372.
49. Švojgrová, M., Koza, V., Hamplová, A. (2006): Transplantace kostní dřeně - průvodce vaší léčbou [online]. F. S. Publishing, Plzeň. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: http://www.kostnidren.cz/registr2014/pdf/Pruvodce_transplantaci.pdf
50. Trbušek, M., Mráz, M., Doubek, M. (2013): Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: *Molekulární hematologie*, pp. 233 – 239, Galén, Praha.
51. Trněný, M., Haber, J. Maligní lymfomy. In: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. Sep 26, 2006 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/lymfomy-c81-85/maligni-lymfomy/#typy>
52. Vaňásek, J., Starý, J., Kavan, P., Vaňásek, J. (Jr.). (1996): *Transplantace kostní dřeně*, Galén, Praha.
53. Veeraputhiran, M., Theus, J., Pesek, G., Barlogie, B., Cottler-Fox, M. (2010): Viability and engraftment of hematopoietic progenitor cells after long-term cryopreservation: effect of diagnosis and percentage dimethyl sulfoxide concentration. *Cytotherapy* 12: 764 -766.
54. Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. (2006): *Klinická onkologie pro sestry*, Grada, Praha.
55. Wowk, B. (2007): How cryoprotectants work. *Cryonics* 28: 3 – 7.

56. Zámečníková, M., Vilímová, Š., Panošová, M. Využití metod asistované reprodukce. In: Postgraduální medicína [online]. Sep 3, 2010 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vyuziti-metod-asistovane-reprodukce-454090>
57. Zuna, J., Hrušák, O., Trka, J. (2013): Prekurzorové B-buněčné a T-buněčné neoplazie. In: Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J.: Molekulární hematologie, pp. 224 – 231, Galén, Praha.
58. Žáčková, D. (2015): Chronická myeloidní leukemie v roce 2015. Onkologie 9: 119 - 122.
59. Živný, J., Vokurka, M. (2012): Poruchy imunitního systému. In: Vokurka, M., Kofránek, J., Maršálek, P., Maruna, P., Nečas, E., Šulc, K., Živný, J.: Patofyziologie pro nelékařské směry, pp. 65 - 78, Karolinum, Praha.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADC	Analog-to-Digital Converter; analogově digitální převodník
ALL	Akutní lymfoblastická leukemie
AML	Akutní myeloidní leukemie
APC	Antigen Presenting Cell
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythrocyte
BMT	Bone Marrow Transplantation
BOB1	B-cell-specific coactivator protein
CB	Cord Blood
CBT	Cord Blood Transplantation
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony-Forming Unit
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMP	Common Myeloid Progenitor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FSC	Forward scatter
GvHD	Graft versus Host Disease; reakce štěpu proti hostiteli
GvL	Graft versus Leukemia effect; reakce štěpu proti leukémii
Gy	Gray
HCDM	Human Cell Differentiation Molecules
HHV-8	Human Herpesvirus 8

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	Human Leukocyte Antigens; lidské leukocytární antigeny
HRS	Hodgkin and Reed/Sternberg cell; Reedové-Sternbergovy buňky
HSCs	Hematopoetic Stem Cells; hematopoetické kmenové buňky
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
ISHAGE	International Society for Hematotherapy and Graft Engineering
KB	Krvetvorné buňky
KD	Kostní dřev
kDa	Kilodalton
LBT	Laboratoř tkáňové banky
LCA	Leukocyte Common Antigen
LT-HSCs	Long-Term Hematopoetic Stem Cells
MDS	Myelodysplastický syndrom
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitor cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Mnohočetný myelom
NHL	Non-Hodgkinův lymfom
NK buňky	Natural Killer cells
OCT-2 protein	Octamer dependent transcription factor
p53	Tumor supresorový protein
PBSCT	Peripheral Blood Stem Cell Transplantation
PE	Phycoerythrin
Ph chromozom	Filadelfský chromozom
PKB	Periferní kmenové buňky

SSC	Side scatter
ST-HSCs	Short-Term Hematopoetic Stem Cells
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TK	Tyrozinkinasa