

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium subpopulací imunitních buněk
v bronchoalveolární lavážní tekutině
a plicních biopsiích u pacientů po transplantaci
plic**

Diplomová práce

Bc. Martin Dihel

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Eva Kriegová

Prohlá-uji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatn pod vedením doc. Dr. Ing. Evy Kriegové a použil jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

V Olomouci dne 26. ervence 2018

Martin Dihel

Souhrn

Transplantace plic je často poslední možností léčby pro pacienty v terminální fázi respiračního selhání u onemocnění plicního parenchymu i kardiálního selhání u primární a sekundární plicní hypertenze. Hlavním limitujícím faktorem dlouhodobé funkce transplantovaného recipienta po transplantaci plic je chronická rejekce plic. V pátém roce po transplantaci je diagnostikována plicní rejekce u poloviny příjemce, medián přežití od diagnózy se pohybuje mezi 1 a 3 lety dle fenotypu rejekce. Jejím nástup je spojen s rychlejší progresí a horším přežitím plicního recipienta. V současné době se stále hledají spolehlivé prognostické markery, díky kterým by bylo možné určit skupinu rizikových pacientů s vysokou pravděpodobností rejekce recipienta.

V této diplomové práci byl ve vzorcích bronchoalveolární lavážní tekutiny, získaných od pacientů po transplantaci plic, stanoven absolutní počet buněk imunitního systému pomocí protokové cytometrie a imunocytochemického barvení cytospinem. Dále byly hodnoceny hlavní populace (lymfocyty, monocyt/makrofágová linie a neutrofil) s bližším pohledem na subpopulace T-lymfocytů ($CD8^+$ T-lymfocyty, $CD4^+$ T-lymfocyty a Treg buňky). Zastoupení základních imunitních buněk bylo hodnoceno také u vybraných pacientů, u kterých byly k dispozici vzorky bronchoalveolární lavážní tekutiny odebrané v různém časovém období. Tato analýza byla provedena rovněž u pacientů po transplantaci plic s odlišnou primární diagnózou.

Práce se dále v nově analýze celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích získaných od pacientů po transplantaci plic pomocí automatické zobrazovací a analyzární technologie TissueFAXS. Byla zjištěna výrazná snížená celková buněčnost a počet alveolárních makrofágů plicních biopsií u podskupiny pacientů s chronickou rejekcí plic v porovnání s pacienty, u kterých k rejekci plicního transplantátu nedošlo.

Pozorované rozdíly v celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů transplantované plicní tkáně by mohly být využitelné jako vhodný prognostický marker u pacientů po transplantaci plic. Diplomová práce rovněž potvrzuje využitelnost automatické analýzy oblastí biopsované tkáně pomocí automatického zobrazovacího a analyzárního systému TissueFAXS.

Summary

Lung transplantation is often the last treatment option for patients in the terminal phase of respiratory failure in pulmonary parenchyma or cardiac failure in primary and secondary pulmonary hypertension. The main restrictive factor of a long-term function of the transplanted graft and for the survival of patients after lung transplantation is a chronic lung rejection. It is diagnosed in approximately half of the recipients five years after the transplantation. Median survival since diagnosis varies between 1 and 3 years according to the phenotype of rejection. Its earlier onset is associated with a faster progression and a worse survival of the pulmonary graft. Currently, reliable prognostic markers are still being sought to identify groups of patients with a high risk of graft rejection.

In this diploma thesis, the absolute number of cells of the immune system was determined by flow cytometry and immunocytochemical staining of cytopins in samples of bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients after lung transplantation. Major populations (lymphocytes, monocyte/macrophage lineage and neutrophils) were evaluated with special emphasis to T-cell subpopulations ($CD8^+$ T-lymphocytes, $CD4^+$ T-lymphocytes and regulatory T-cells).

Main immune cells were also evaluated in selected patients from whom samples of bronchoalveolar lavage fluid were collected at different time points. This analysis was also performed in patients after lung transplantation with a different primary diagnosis.

The study was also focused on the analysis of a total cellularity and the number of alveolar macrophages and other immune cells in pulmonary biopsies obtained from patients after lung transplantation using automatic imaging and analysis technology TissueFAXS.

A considerably higher total cellularity and the number of alveolar macrophages was found in lung biopsies obtained in a subgroup of patients with chronic lung rejection in comparison to patients with no pulmonary transplant rejection.

Observed differences in total cellularity and the number of alveolar macrophages of transplanted lung tissue could be useful as a suitable prognostic marker in lung transplant patients. The diploma thesis also confirms the applicability of the automatic analysis of bioptical tissue areas using the automatic imaging and analysis system TissueFAXS.

Touto cestou bych chtěl poděkovat zejména své vedoucí diplomové práce doc. Dr. Ing. Evě Kriegové za odborné a ochotné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při vypracování této práce. Rovněž bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie LF UP (přednostka prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.), především Mgr. Gabriele Gabové, Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D. a Mgr. Tereze Dýkové, Ph.D., za spolupráci v laboratořích a za mnoho podnětných rad. Dále děkuji MUDr. Janu Havlínovi, Ph.D. z III. chirurgické kliniky, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole (přednostka prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.) a MUDr. Monice Fiurkové, Ph.D. a MUDr. Petru Jakubkovi, Ph.D. z kliniky plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a Fakultní nemocnice v Olomouci (přednostka prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.) za poskytnutí klinického materiálu a dat a MUDr. Janu Balkovi z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za poskytnutí vzorků biopsovaných plicních tkání.

Chci také vyjádřit nesmírnou vděčnost rodině, zvláště pak mé matce a sestře, za trvalou podporu a povzbuzení ve chvílích, kdy jsem to potřeboval nejvíce.

Práce vznikla za finanční podpory grantu LF UP_2018_016.

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	viii
Seznam obrázk	x
Seznam tabulek	xiii
1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Transplantace plic	3
3.1.1 Transplantace plic v ČR	4
3.1.2 Indikace a kontraindikace transplantace plic	4
3.1.3 Předtransplantační vyšetření příjemce	6
3.1.4 Dárce a odběr plic	6
3.1.5 Transplantační výkon	6
3.1.6 Komplikace po transplantaci plic	7
3.1.6.1 Infekce	7
3.1.6.2 Časná dysfunkce –t pu	7
3.1.6.3 Rejekce	7
3.1.7 Prognóza transplantace plic	8
3.2 Imunitní systém po transplantaci plic	9
3.2.1 Tkáňové reziduální makrofágy (TRM)	9
3.3 Bronchoalveolární laváž (BAL)	10
3.4 Průtoková cytometrie	12
3.5 Automatický zobrazovací a analyzáční systém TissueFAXS	16
4 Materiál a metody	18
4.1 Biologický materiál	18
4.2 Schéma postupu práce	20
4.3 Laboratorní zpracování vzorků bronchoalveolární lavážní tekutiny	22

4.4	Imunofenotypizace bronchoalveolární laváční tekutiny	23
4.5	Příprava cytospin	24
4.6	Imunocytochemické barvení cytospin	24
4.7	Skenování a analýza pomocí systému TissueFAXS	26
4.8	Statistická analýza	26
4.9	Poufity chemikálie, soupravy a roztoky	27
4.9.1	Poufity chemikálie	27
4.9.2	Poufity soupravy	27
4.9.3	Poufity roztoky	27
4.10	Poufity přístroje	28
5	Výsledky	29
5.1	Fyzické vlastnosti vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny.....	29
5.2	Výsledky měření pomocí průtokové cytometrie	29
5.2.1	Identifikace a zastoupení základních buněk imunitního systému.....	29
5.2.2	Analýza populací lymfocytárního gatů	31
5.2.3	Srovnání zastoupení základních imunitních populací přítomných v bronchoalveolární laváční tekutině u vybraných pacientů po transplantaci plic	32
5.2.4	Srovnání zastoupení základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině u pacientů po transplantaci plic s odlišnými primárními diagnózami.....	34
5.3	Cytospiny a mikroskopie	35
5.4	Vyhodnocení celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích získaných od pacientů po transplantaci plic	37
5.4.1	Vyhodnocení celkové buněčnosti	37
5.4.2	Vyhodnocení počtu alveolárních makrofágů	39
5.4.3	Vyhodnocení dalších imunitních buněk	41

6	Diskuse.....	42
7	Záv r	46
8	Seznam poufíté literatury.....	47

Seznam symbolů a zkratk

- AM ó Alveolární makrofág
- APC ó Allofykocyanin
- APC-Cy7 ó Allofykocyanin-cyanin 7
- AUC ó Area under curve, plocha pod křivkou
- BAL ó Bronchoalveolární laváž
- BALT ó Bronchoalveolární lavážní tekutina
- BOS ó Bronchiolitis obliterans syndrom, syndrom obliterující bronchiolitidy
- BSA ó Bovinní sérový albumin
- CD ó Cluster of Differentiation, diferenciální skupina
- CF ó Cystická fibróza
- CLAD ó Chronic lung allograft dysfunction, chronická dysfunkce plicního trupu
- DSA ó Donor-specific antibody, donor-specifické protilátky
- EVLP ó *Ex vivo* lung perfusion, *ex vivo* perfúze plic
- FITC ó Isothiokyanát
- FRET ó Förster resonance energy transfer, Försterův rezonanční přenos energie
- FSC ó Forward scatter, přímý rozptyl
- HIV ó Human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
- HLA ó Human leukocyte antigen, lidský leukocytární systém
- HLTx ó Heart-lung transplantation, transplantace bloku srdce a plic
- HRP ó Horseradish peroxidase, křenoá peroxidáza
- CHOPN ó Chronická obstrukční plicní nemoc
- IL-10 ó Interleukin 10
- IM ó Intersticiální makrofág
- IPF ó Idiopatická plicní fibróza
- ISHLT ó International Society for Heart and Lung transplantation, Mezinárodní společnost pro transplantaci srdce a plic
- KI ó Konfidenční interval
- LYM ó Lymfocyty
- MHC ó Major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
- MON/MAKRO ó Monocyto/makrofágová linie
- NEU ó Neutrofily

- NHBD ó Non-heart-beating donor, dárce s nebijícím srdcem
- NK buňky ó Natural Killer cells, pirození zabíječi
- NR ó Non-rejektory
- OB ó Obliterující bronchiolitida
- PBS ó Phosphate buffer saline, fosfátový pufr
- PE ó Fykoerythryn
- PE-Cy7 ó Fykoerythryn-cyanin 7
- PerCP-Cy5.5 ó Peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5
- R ó Rejektory
- RAS ó Restrictive allograft syndrome, restriční syndrom plicního řetězce
- ROC ó Receiver operating characteristic,
- ROI ó Region of interest, oblast zájmu
- SD ó Standardní odchylka
- SLTx ó Single-lung transplantation, jednostranná transplantace plic
- SSC ó Side scatter, boční rozptyl
- TNF- α ó Tumor Necrosis Factor α , tumor nekrotizující faktor
- Treg ó Regulační T-lymfocyty
- TRM ó Tkaněv reziduální makrofág
- UCHL ó Ubiquitin C-terminal hydrolase L

Seznam obrázk

- **Obrázek 1:** Po et ro n provedených transplantací plic dle typu (p evzato a upraveno z Chambers et al., 2017).
- **Obrázek 2:** ty i typy plicní transplantace: jednostranná, oboustranná, transplantace srdce a plic a transplantace plicních lalok zahrnující i flivé dárce (p evzato a upraveno ze Sugarbaker et al., 2015).
- **Obrázek 3:** Lokalizace provedení bronchoalveolární laváfle (BAL) (p evzato z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842>).
- **Obrázek 4:** Graf excita ních (árkovan) a emisních (plné linie) spekter vybraných fluorofor excitovatelných p i vlnové délce 488 nm (p evzato a upraveno z <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>).
- **Obrázek 5:** Impulz nap tí p i detekci jednotlivé události a p i p ekryvu dvou událostí. P evzato a upraveno z <https://expertcytometry.com/3-flow-cytometry-gates-that-will-improve-the-accuracy-of-your-facs-data-analysis/>.
- **Obrázek 6:** Scattergram FSC-A/FSC-H znázor ující gate singlet .
- **Obrázek 7:** Ur ení pozitivní exprese znaku dle pozice píku izotypové kontroly v histogramu vybraného fluorescen ního kanálu.
- **Obrázek 8:** Automatický zobrazovací a analyza ní systém TissueFAXS (p evzato a upraveno z <https://crrd.kmu.edu.tw/images/I17.jpg>, nav-tívno dne 11. 7. 2018).
- **Obrázek 9:** Schéma postupu práce p i charakterizaci základních imunitních populací v bronchoalveolární laváfní tekutin . P evzato a upraveno z <http://www.globalnasco.com/product/SB45966M>, <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/sc008.pdf>, <https://www.nemji.cz/kooperujici-onkologicka-skupina-kraje-vysocina/ms-6907/p1=6907>, https://smart.servier.com/smart_image/erythrocyte-11/, https://www.qualitybiological.com/product/cell_strainer__40um__blue__bulk__packed__sterile/, <http://research.hsr.it/en/core-facilities/fractal/bd-facscanto-ii.html>, <https://www.selectscience.net/acea-biosciences,-inc/novocyte/203654>, <https://www.journeymexico.com/data-analysis-of>, <https://www.americanmastertech.com/store/Main.aspx?p=ItemDetailStyles&item=CYS14C&cat=CY>, <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology>

/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html, <https://www.accela.eu/tissuegnostics/tissuefaxs-confocal-plus-sl>, <https://www.accela.eu/files/products/28/histoquest.pdf>.

- **Obrázek 10:** Schématické znázornění získání vzorků biopsovaných plic pro závěrečnou analýzu tkáňových preparátů. Pevzato a upraveno z <https://www.news.com.au/lifestyle/health/health-problems/hospital-staff-suspended-after-doctors-operate-on-wrong-patient/news-story/87ef302054427bfa01526b8453c2cac2>, <https://www.mikroskop-shop.cz/preparaty-mikroskopicke-25-anatomie-p1519>, <https://www.accela.eu/tissuegnostics/tissuefaxs-confocal-plus-sl>, <https://www.accela.eu/files/products/28/histoquest.pdf>.
- **Obrázek 11:** Znázornění hlavních imunitních populací vzorku bronchoalveolární lavážní tekutiny (A) ve srovnání se vzorkem periferní krve (B) na scattergramu FSC/SSC. Legenda: LYM ó lymfocyty, MON/MAKRO ó monocyty/makrofágová linie, NEU ó neutrofilové.
- **Obrázek 12:** Zastoupení základních studovaných populací imunitního systému ve vzorcích bronchoalveolární lavážní tekutiny. Středová čára představuje medián, krabicová část grafu pak 25. a 75. percentil a vousy grafu vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu. Legenda: LYM ó lymfocyty, MON/MACRO ó monocyty/makrofágová linie, NEU ó neutrofilové.
- **Obrázek 13:** Zastoupení subpopulací lymfocytárních buněk ve vzorcích bronchoalveolární lavážní tekutiny získaných od pacientů po transplantaci plic.
- **Obrázek 14:** Srovnání zastoupení základních imunitních populací přítomných v bronchoalveolární lavážní tekutině u vybraných pacientů po transplantaci plic.
- **Obrázek 15:** Srovnání zastoupení základních imunitních populací v bronchoalveolární lavážní tekutině u pacientů po transplantaci plic s odlišnými primárními diagnózami. Legenda: CHOPN ó chronická obstrukční plicní nemoc, IPF ó idiopatická plicní fibróza.
- **Obrázek 16:** Snímek cytopsinu s detekovanými makrofágy (pomocí markeru CD68, hnědé zbarvení). Modrá barva představuje buněčná jádra barvená pomocí hematoxylinu.
- **Obrázek 17:** Snímek cytopsinu nabarveného fluorescenčním barvivem pro vizualizaci markeru CD68, a to pomocí sekundární protilátky nesoucí fluorofor Alexa Fluor® 488 (zelená barva). Modrá barva představuje buněčná jádra barvená DAPI.
- **Obrázek 18:** Počet buněk na 1 mm² u jednotlivých skupin pacientů po transplantaci plic (NR ó pacienti bez rejekce, R ó pacienti s chronickou rejekcí plic).

- **Obrázek 19:** ROC křivka testu pro srovnání celkové buněčnosti u studovaných podskupin pacientů.
- **Obrázek 20:** Alveolární makrofágy pozitivní na studovaný marker CD68 (hned).
- **Obrázek 21:** Počet alveolárních makrofágů na 1 mm² u jednotlivých skupin pacientů po transplantaci plic (NR – pacienti bez rejekce, R – pacienti s chronickou rejekcí plic).
- **Obrázek 22:** ROC křivka testu pro srovnání počtu alveolárních makrofágů u studovaných podskupin pacientů.

Seznam tabulek

- **Tabulka 1:** Soubor pacientů pro charakteristiku základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině .
- **Tabulka 2:** Soubor pacientů pro analýzu celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích.
- **Tabulka 3:** Celkový objem buněčné suspenze a počet zkumavek pro průtokovou cytometrii v závislosti na objemu povodního vzorku.
- **Tabulka 4:** Kombinace protilátek proti příslušným markerům vyutilité pro charakterizaci imunitních buněk v bronchoalveolární laváční tekutině u pacientů po transplantaci plic.
- **Tabulka 5:** Objem studovaných vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny.
- **Tabulka 6:** Vyhodnocení počtu a hustoty buněk u jednotlivých podskupin pacientů .
- **Tabulka 7:** Atributy testu srovnání celkové buněčnosti u studovaných podskupin pacientů .
- **Tabulka 8:** Atributy testu srovnání počtu alveolárních makrofágů u studovaných podskupin pacientů .

1 Úvod

Transplantace plic je možností léčit pro vybrané pacienty v terminální fázi svého plicního onemocnění. Pokud je transplantace úspěšná, a jejich tělo nový orgán přijme, mohou opět žít téměř plnohodnotný život. Existují však nemalá rizika vzniku infekce a dalších závažných komplikací, kdy tělo nakonec transplantovaný orgán odmítne. Ani dnes stále nejsou známy spolehlivé prediktivní markery, díky kterým by bylo možné určit skupinu rizikových pacientů s vysokou pravděpodobností odmítnutí těpu.

Experimentální část diplomové práce se zabývá charakterizací základních imunitních populací v bronchoalveolární lavážní tekutině získané od pacientů po transplantaci plic s využitím metody protokové cytometrie a imunocytochemického barvení připravených cytospinů. U dvou pacientů po transplantaci plic byla navíc sledována změna v zastoupení základních imunitních populací v krevni a zastoupení základních imunitních populací bylo rovněž stanoveno u pacientů po transplantaci plic s rozdílnými primárními diagnózami. Dále se práce zaměřuje na vyhodnocení celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích získaných od pacientů po transplantaci plic, u kterých byl transplantovaný plicní těpu úspěšně přijat, nebo se u nich projevila chronická rejekce plicního transplantátu, pomocí automatického zobrazovacího a analyzáčního systému TissueFAXS.

2 Cíle práce

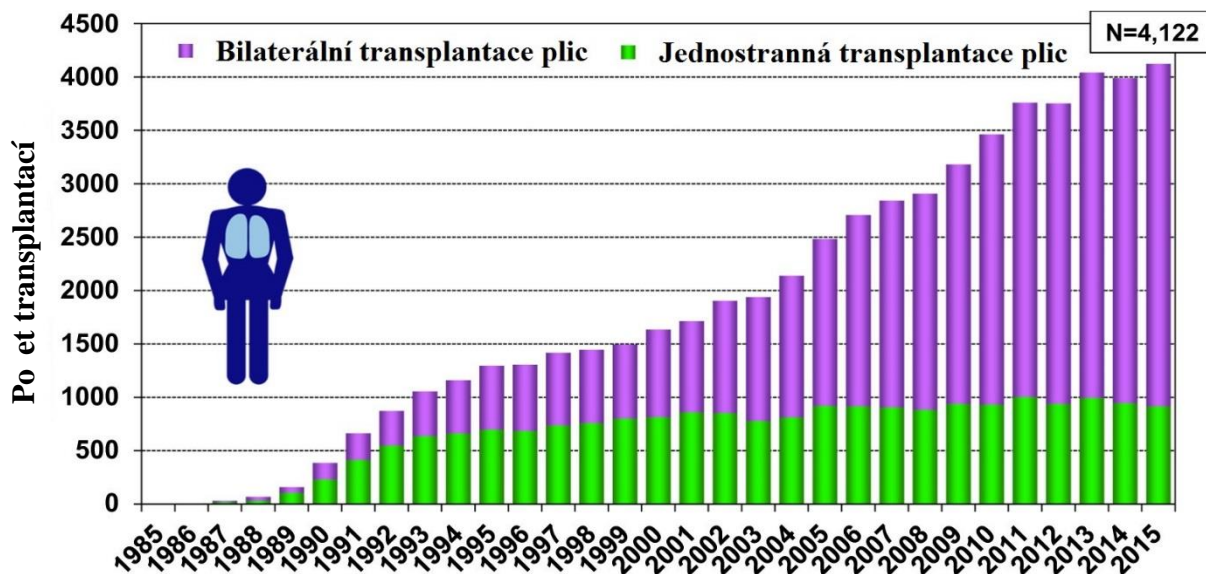
- Vypracování literární re-er-e na téma transplantace plic a role imunitního systému u pacient po transplantaci plic.
- Charakterizace základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutin získané od pacient po transplantaci plic s využitím metody pr tokové cytometrie.
- Analýza celkové bun nosti a po tu alveolárních makrofág a dal-ích imunitních bun k v plicních biopsiích získaných od pacient po transplantaci plic. Subanalýza provedena u podskupin pacient s chronickou rejekcí a bez rejekce plicního transplantátu za pomocí automatického zobrazovacího a analyza ního systému TissueFAXS.

3 Literární přehled

3.1 Transplantace plic

Transplantace plic je dnes dobře přijatou a rutinní léčbou pro pevně vybrané pacienty v terminální fázi respiračního selhání u onemocnění plicního parenchymu i kardiálního selhání u primární a sekundární plicní hypertenze. Bylo však zapotřebí mnoha experimentálních studií a klinických pokusů trvajících několik desetiletí k dosažení tohoto úspěchu. Věc první transplantace plic byla provedena 11. října roku 1963 v USA Jamesem Hardym a jeho týmem. Pacient zemřel již po 18 dnech, avšak Hardy tímto zákrokem dokázal možnost provedení úspěšné transplantace plic a vyvolal tak ve světě zájem o tuto metodu. Teprve po objevení cyklosporinu A Jeanem Borelem, jakožto nového imunosupresivního inidla, byly hlášený dlouhodobé úspěchy na poli transplantace plic vedoucí až k zahájení éry orgánových transplantací. V roce 1981 byla ve Stanfordu zdárně provedena transplantace bloku srdce a plic (HLT_x ó heart-lung transplantation), následována první jednostrannou transplantací plic (SLT_x ó single-lung transplantation) pro idiopatickou plicní fibrózu v roce 1983 a první oboustrannou transplantaci *en bloc* v roce 1986 pro sekundární emfyzém v Torontu. Vývoj transplantace plic v souvislosti pokračuje s použitím plicních štěpů pocházejících od žijících dárců, od dárců s šnebijícím srdcem (NHBD ó non-heart-beating donor) a od tzv. marginálních dárců. Nově se také vyvíjí rekondice štěpu b hem *ex vivo* perfúze plic (EVL_P ó *ex vivo* lung perfusion) ve snaze překonat kritický nedostatek vhodných dárců. Právě nedostatek vhodných dárců a funkcí štěpů brání v těmto po tu vykonaných transplantacích plic (Lischke, 2006; Venuta *et van* Raemdonck, 2017).

Podle registru Mezinárodní společnosti pro transplantaci srdce a plic (ISHLT ó International Society for Heart and Lung Transplantation) dochází k neustálému zvyšování po tu celosvětově prováděných transplantací plic, přičemž ročně se uvádí více než 3800 zákroků (viz Obrázek 1). Toto zvýšení je způsobeno pokračujícím nárůstem oboustranných transplantací plic, zatímco počet jednostranných transplantací plic vykazuje ustálený stav. Stejně tak jako počet kombinovaných transplantací srdce a plic (Aigner *et* Klepetko, 2017; Chambers *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Počet ročně provedených transplantací plic dle typu (převzato a upraveno z Chambers *et al.*, 2017).

3.1.1 Transplantace plic v ČR

Program transplantace plic byl v České republice zahájen týmem pod vedením prof. MUDr. Pavla Pařka, DrSc. na III. chirurgické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole v Praze 22. prosince 1997. Samotnému zákroku předcházela intenzivní dvouletá příprava ve spolupráci se svétov uznávaným odborníkem v oblasti transplantace plic prof. Walterem Klepetkem z Vídn (Pozniak *et al.*, 2015).

Ve Fakultní nemocnici v Motole, jež je jediné pracovišt v České republice s programem transplantace plic, bylo do listopadu 2017 úspěšně provedeno celkem 369 těchto zákroků (<http://www.kst.cz/plice-se-v-cesku-transplantuji-20-let-novou-sancidostalo-369-lidi/>, navštívěno dne 10. 1. 2018). Program transplantace plic v ČR je tímto považován za nejlepší ze všech programů východní Evropy. Od roku 2016 se u nás provádí přes 40 transplantací plic ročně, přičemž výsledky jsou srovnatelné s jinými vyspělými transplantačními centry (Lischke, 2017).

3.1.2 Indikace a kontraindikace transplantace plic

Do programu transplantace plic jsou zařazeni pacienti v terminálním stádiu plicního onemocnění, u kterých je riziko blízké smrti vyšší než riziko samotné transplantace. Zároveň však musí platit, že aktuální zdravotní stav pacient neohrozí dlouhodobý úspěch a přežití po náročné operaci. Pacienti indikovaní k transplantaci plic musí splovat následující kritéria:

- Terminální stádium chronického onemocnění plic (monoorgánové selhání) s vyčerpanými možnostmi konzervativní léčby
- Rychlý progres onemocnění
- Očekávaná doba přežití je vyšší než předpokládaná doba strávená na čekací listině pro vhodný orgán (12-18 měsíců)
- Snížující se kvalita života v důsledku progredující imobility a závislosti na kyslíku (Lischke, 2006).

Nejčastěji nemocí, pro kterou je u pacientů indikována transplantace plic, je chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), následována idiopatickou plicní fibrózou (IPF), cystickou fibrózou (CF), primární a sekundární plicní hypertenzí a primárním emfyzémem plic (α₁-antitrypsin deficiencí). Další parenchymální a vaskulární onemocnění plic představují pouze malé procento transplantací plic prováděných po celém světě (Aigner *et* Klepetko, 2017).

Absolutních kontraindikací pro transplantaci plic existuje pro ekvapivně jen velmi málo:

- Nedávné maligní onemocnění (výjimku tvoří koflní skvamózní karcinomy a bazaliomy). Do programu transplantace plic však mohou být přijati pacienti bez známek relapsu maligního onemocnění po pěti letech léčby
- Hepatitida B nebo C spojená s histologickým důkazem významného poškození jater a infekce virem HIV. Tuto bariéru nicméně mohou brzy odstranit nedávné úspěšné transplantace jater, ledvin a srdce u HIV pozitivních příjemců
- Aktivní či nedávné kouření, drogová závislost nebo zneužívání alkoholu
- Těžké psychiatrické onemocnění
- Opakované nedodržení lékařské péče
- Absence důsledné a spolehlivé sociální podpory
- Znamé deformity páteře i hrudi (Kotloff *et* Thabut, 2011; Lischke, 2006).

Existují rovněž kontraindikace relativní, k jejich posuzování dochází v transplantacích centrech individuálně:

- Osteoporóza a jiné kostní nebo svalové onemocnění
- Extrémní kachexie nebo obezita
- Infekce mykobakteriemi

- Koronární choroba nebo dysfunkce levé komory a významné onemocnění periferních cév
- Renální insuficience s clearance kreatininu <50 mg/ml za minutu
- Psychosociální nestabilita
- Potřeba invazivní mechanické ventilace (Aigner *et* Klepetko, 2017; Lischke, 2006).

3.1.3 Předtransplantační vyšetření příjemce

U pacienta indikovaného k transplantaci plic jsou v první řadě provedena vyšetření, jež slouží k určení celkové funkce orgánů a vyloučení systémových nemocí a infekcí. Později pacient podstoupí specifická vyšetření sloužící pro výběr nejvhodnějšího dátece. Pro vyhodnocení optimální shody dátece a hostitele je nezbytné stanovit shodu krevních skupin a co nejpřesněji změřit velikost hrudníku a pleurální dutiny příjemce. V případě dětí i drobných lidí jakožto příjemce se ne vždy transplantuje celá dárcovská plíce, ale například jen jeden lalok. Pacient, který úspěšně projde všemi hodnotícími vyšetřeními, je poté zařazen na čekací listinu (Kolek *et al.*, 2014).

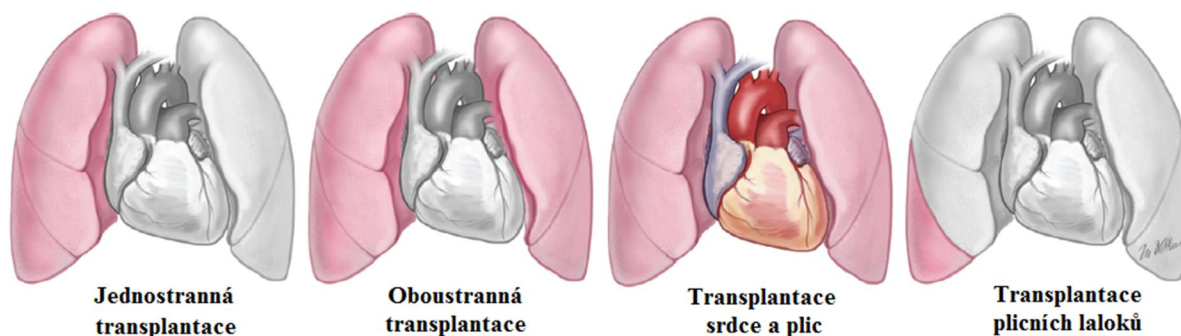
3.1.4 Dárce a odběr plic

Z obecného pojetí je vhodným dárce pacient, u kterého byla prokázána mozková smrt, a jeho rentgenový snímek hrudníku nevykazuje patologický nálezn na plicích. Dárce navíc musí splňovat obecné požadavky pro multiorgánový odběr a další specifická kritéria pro odběr plic. Plicé vhodného dárce tedy mají zachovanou funkci a jsou kompatibilní s příjemcem ve velikosti a také v systému ABO. Odběr a následná prezervace plic jsou prováděny s cílem uchovat jejich morfoloickou, a především funkční integritu. Tolerovaná doba studené ischemie, tedy doba od podchlazení orgánu do zahájení reperfúze, se u plic pohybuje v rozmezí 6-8 hodin (Kolek *et al.*, 2014; Lischke, 2006).

3.1.5 Transplantační výkon

Po technické stránce je transplantace plic dnes již zcela zvládnutou metodou a rutinně se provádí dva typy výkonů: jednostranná transplantace plic a bilaterální sekvenční transplantace plic (viz Obrázek 2). S přibývajícím zkušenostmi na poli transplantace plic přibývají také nové operační postupy s cílem minimalizovat trauma po operaci a maximalizovat využití orgánu. Jedním z nových postupů operace je například transplantace pouze plicních laloků, kdy jsou malému příjemci implantovány pouze laloky pocházející od většího dárce. Dalším postupem je metoda transplantace plicních laloků od

flivých dárce. Ta se vyufflívá zejména u d t í s mukoviscidózou, p í emfl jejich p íbuzní poskytnou dva plicní laloky (Kolek *et al.*, 2014; Lischke, 2006).



Obrázek 2: ty i typy plicní transplantace: jednostranná, oboustranná, transplantace srdce a plic a transplantace plicních laloků zahrnující i flivé dárce (p evzato a upraveno ze Sugarbaker *et al.*, 2015).

3.1.6 Komplikace po transplantaci plic

Mezi t i nej ast j-í p í iny úmrtí pacienta po transplantaci plic pat í: infekce, asná dysfunkce -t pu a obliterující bronchiolitida, která je morfologickým vyjád ením chronické rejekce plic, jefl je limitujícím faktorem dlouhodobé funkce -t pu. Tyto komplikace odráflí neodpovídající imunosupresivní terapii, která je v p ípad plic, jakofto vysoce imunogenního orgánu, velmi agresivní, cofl vede ke zvý-ené morbidit a mortalit .

3.1.6.1 Infekce

Infekce p edstavuje nej ast j-í p í inu morbidity a mortality a je zpravidla lokalizována v transplantované plíci. Patogeny infekce jsou viry, bakterie, mykózy a také protozoa. Bakteriální pneumonie je nej ast j-í infek ní komplikací vyskytující se u 10 % v-ech p íjemc , a to hned v prvním týdnu po transplantaci.

3.1.6.2 asná dysfunkce -t pu

asná dysfunkce -t pu je b hem prvních dn po transplantaci relativn b flná a zp sobuje úmrtí v 16 % p ípad v prvních t ech m sících po transplantaci.

3.1.6.3 Rejekce

Rejekce p edstavuje specifickou imunitní odpov na p ítomnost -t pu, jedná se o obrannou reakci hostitele na p ítomnost cizích antigen . Práv rejekce je hlavní komplikací omezující dlouhodobé p effití. Rozli-ujeme ji na hyperakutní, akutní a chronickou.

Hyperakutní rejekce vzniká p sobením cytotoxických protilátek, které se velmi rychle váflou na endotel cév dárcovského orgánu a zp sobují tak cévní trombózu. Díky

screeningu těchto protilátek je hyperakutní rejekce téměř zcela eliminována (Kolek *et al.*, 2014; Lischke, 2006; Sato *et al.*, 2011).

Akutní rejekce může nastat kdykoli po transplantaci, vyskytuje se však zpravidla již v prvním roce po transplantaci a její incidence je i přes užívání silných moderních imunosupresiv stále vysoká. Zpočátku může probíhat zcela bez příznaků, případně jsou symptomy nespecifické (např.: kašel, dušnost). Diagnóza je založena na přítomnosti perivaskulárních zánětlivých infiltrátů, případně pomocí zánětlivých infiltrátů dýchacích cest, které jsou složeny převážně z aktivovaných lymfocytů, eozinofilů, neutrofilů a plazmatických buněk. Mortalita akutní rejekce je velmi nízká, avšak její přítomnost je považována za rizikový faktor pro rozvoj rejekce chronické (Reams *et al.*, 2003).

Chronická rejekce je hlavním limitem dlouhodobého přežití u pacientů po transplantaci plic. V pátém roce po transplantaci je přítomna u poloviny pacientů. Histologicky je chronická rejekce definována jako obliterující bronchiolitida (OB), která je ovšem biopsií velmi obtížně zachytitelná. Proto byl do praxe zaveden termín bronchiolitis obliterans syndrom (BOS), klinicky koreluje OB, hodnotící obstrukční ventilární poruchu, a termín restrictive allograft syndrome (RAS) jako další klinicko-histopatologický obraz chronické rejekce, lišící se od BOS především přítomností restriktivní ventilární poruchy a horší prognózou. Oba základní fenotypy BOS a RAS zastřešuje pojem chronická dysfunkce plicního trupu (CLAD – chronic lung allograft syndrome), jež je v současnosti ekvivalentem chronické rejekce (Kolek *et al.*, 2014; Lischke, 2006; Sato *et al.*, 2011).

Patogenní mechanismus chronické rejekce není stále znám. Předpokládá se však účast monocytů/makrofágové linie s epitelem dýchacích cest, zvýšené regulace antigen hlavního histokompatibilního komplexu (MHC – major histocompatibility complex), kostimulačních molekul a adhezních molekul vedoucích k uvolnění zánětlivých a fibroproliferativních mediátorů (Reams *et al.*, 2003).

3.1.7 Prognóza transplantace plic

Zhruba 80 % pacientů po transplantaci plic má výhled na dožití jednoho roku, polovina pacientů přežívá 5 let a až třetina pacientů se dožívá 10 let (Valentová Bartáková *et al.*, 2014). Pohlaví a věk nemají vliv na dobu přežití pacienta po transplantaci plic, lepší prognózu však mají pacienti s diagnózou primárního emfyzému plic, chronické plicní obstrukční nemoci a cystické fibrózy (Valentová Bartáková *et al.*, 2014).

3.2 Imunitní systém po transplantaci plic

Plíce představují unikátní mikroprostředí, v němž je respirační povrch b hemovým plynem vystaven potenciálním infekcím a znečištěním látkami přenášených vzduchem. Právě imunitní systém před těmito látkami chrání. Neškodlivé látky a těpy určené k transplantaci obsahují proteiny nazývané antigeny, které pokrývají jejich povrch. Jakmile tyto antigeny vstoupí do těla, imunitní systém je rozpozná, vyhodnotí jako cizí a okamžitě je napadá. Čím více jsou antigeny (u lidí se jedná o tzv. HLA – human leukocyte antigen), mezi dárce a příjemcem podobné, tím menší je pravděpodobnost napadení darovaného těpu buňkami imunitního systému, které mohou vést až k rejekci transplantovaného těpu. S cílem zabránit imunitnímu systému v napadení nově transplantovaného orgánu se vyvíjejí imunosupresiva, která imunitní systém příjemce potlačí. I při použití imunosupresiv však může transplantace orgánu kvůli jejímu odmítnutí selhat (Farrar *et al.*, 2013; Villard, 2006).

Mechanismus rejekce plicního transplantátu není do současnosti zcela objasněn, ovšem v souvislosti s ním se nejčastěji hovoří o donor-specifických protilátkách (DSA) (Hachem *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016; Nayak *et al.*, 2016) a také o reziduálních makrofágích, i obecně o monocyto/makrofágové liniích (Nayak *et al.*, 2016; Reams *et al.*, 2003).

3.2.1 Tkáňové reziduální makrofágy (TRM)

TRM představují populaci imunitních buněk vyskytujících se téměř ve všech tkáních těla. Tvorbí extrémně heterogenní skupinu, jejíž je důsledkem mikroanatomických a také o specifických funkcí v průběhu vývoje i dospělosti, zajišťujících tkáňovou homeostázu a reakci na infekci a vznik zánětlivých procesů. Tyto jedinečné fenotypy s největší pravděpodobností reflektují heterogenitu pvodu makrofágů a vliv tkáňového prostředí, v němž se nachází. TRM jsou známé především svou úlohou v první linii imunitní tkáňové obrany pro setkání s patogeny, jinými environmentálními problémy nebo transplantovaným těpem (Davies *et al.*, 2013). V plicích jsou známy dva typy TRM, jejichž v imunitním systému nesmírně důležitou roli: intersticiální makrofágy (IM) a alveolární makrofágy (AM) (Nayak *et al.*, 2016).

Intersticiální makrofágy vyplní úzký prostor mezi alveolárním epitelem a vaskulárním endotelem a podle Nayaka *et al.* (2016) tvoří přibližně 20 % všech plicních TRM. Tyto buňky se nacházejí v relativně sterilním a čistém mikroprostředí obklopeným extracelulárním matrixem. Vzhledem k obtížnosti izolace IM existuje o nich jen málo

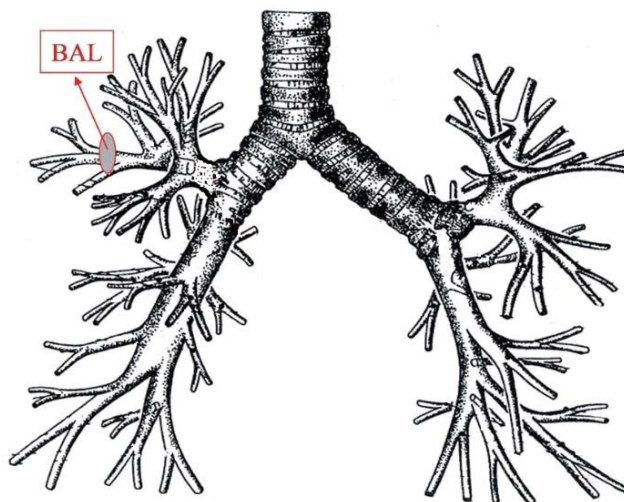
poznatk ohledn vlivu na biologii plic ve srovnání s AM (Schneberger *et al.*, 2011). Nedávné studie v-ak ukazují, že IM mohou modulovat funkce dendritických bun k k potla ení alergií vzniklých vzdu-nou cestou (Bedoret *et al.*, 2009). Pravd podobn se také výraznou m rou podílejí na zán tlivé odpov di po transplantaci plic produkcí cytokinu IL-10, regulací fibrózy tkání a na prezentování antigenu (Bedoret *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2014). Steinmüller *et al.* tvrdí (2000), že v tomto p ípad jsou vhodn j-í jako antigen prezentující bu ky nefl AM.

Alveolární makrofágy, jeří jsou odvozeny z prekurzor v periferní krvi a lokální proliferace (Schneberger *et al.*, 2011), v alveolách slouří jako první linie obrany proti inhalovaným patogen m a také jako rezervoár chronických patogen , nap . HIV (Murphy *et al.*, 2008). AM tvo í 80 % plicních TMR a fungují tedy jako profesionální fagocyty zapojující se do ady imunitních a zán tlivých proces udrflujících respira ní povrch v homeostáze. AM jsou stacionární bu ky, které jsou stabiln p ípevn ny k alveolárnímu epitelu i b hem zán tlivé reakce. Selektivní ztráta AM vede k selhání plic, smrtelné hypoxii, vářlné morbidit a mortalit v d sledku virových infekcí. Funk ní po-kození AM bývá také spojeno se vznikem plicní alveolární proteinózy (Nayak *et al.*, 2016). Zajímavostí je, že AM produkcí TNF- zvy-ují sekreci prozán tlivých cytokin a chemokin alveolárními epitelovými bu kami. Vzhledem k tomu, že alveolární makrofágy exprimují adu rozpoznávajících receptor , hrají rozhodující roli p í utvá ení imunitní odpov di na transplantovaný t p (Sharma *et al.*, 2007). Jejich bun ný p vod a perzistence je v-ak po transplantaci plic stále nejasná. Nayak *et al.* (2016) ve své práci studoval p vod AM pomocí shody v HLA systému u pacient po transplantaci plic, a zjistil, že 94-100 % AM p ítomných v bronchoalveolární lavářlní tekutin bylo odvozeno od dárce a AM od p íjemce nebyly detekovány v bec. Navíc p í analýze bun k bronchoalveolární lavářlní tekutiny po 3,5 letech po transplantaci plic zjistil, že v t-ina AM (>87 %) byla p vodem od dárce. AM od dárce odpovídaly na neshodu v HLA systému sekrecí zán tlivých cytokin , ímfl se spustila kaskáda zán tlivých reakcí vedoucí ke vzniku komplikací transplantovaných plic. Práv *de novo* tvorba donor specifických protilátek (DSA ó donor specific antibody) je hlavní komplikací po transplantaci plic a rizikovým faktorem pro rozvoj chronické rejekce (Hachem *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016).

3.3 Bronchoalveolární lavářl (BAL)

Bronchoalveolární lavářl (BAL) je diagnostická bronchoskopická technika vyufflvaná k získávání bun ných i nebun ných slořfek, inhalovaných ástic, roztok í infek ních

organism z dolních cest dýchacích a alveol (viz Obrázek 3). Získaná tekutina je cenná při stanovení etiologie a aktivity mnoha plicních onemocnění, případně při posouzení reakce na léčbu (Meyer *et al.*, 2012). Vyšetření se provádí v rámci diferenciální diagnostiky nejasného plicního postižení, dále při zánětlivých plicních onemocněních i nádorovém onemocnění plic (Skřívková *et Kolaříková*, 2004; Tomíková *et Skřívková*, 2010).



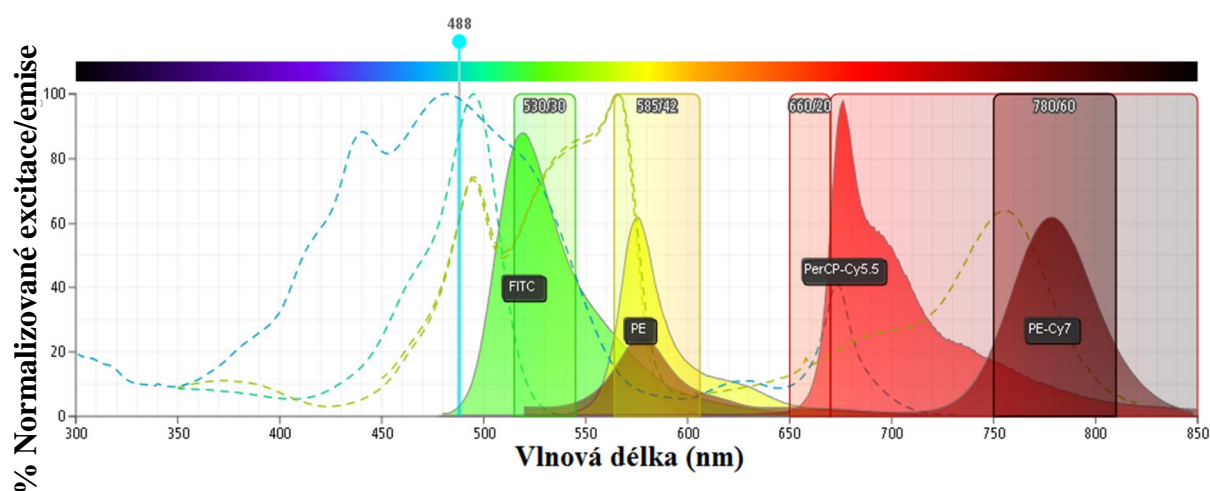
Obrázek 3: Lokalizace provedení bronchoalveolární laváže (BAL) (převzato z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842>).

Odběr bronchoalveolární lavážní tekutiny (BALT) provádí broncholog v lokální, případně celkové anestezii pacienta. K výkonu se využívá flexibilní bronchoskop s pracovním kanálem, skrz který je možno pomocí injekční stříkačky aplikovat lavážní tekutinu do dýchacích cest. Jako lavážní tekutina se používá fyziologický roztok o objemu 100-300 ml a teplotě 37 °C. Samotný výplach je prováděn z části bronchiálního stromu, kde je plicní parenchym nejvíce postižen. V případě, že je postiženo více laloků i segmentů plic, je vhodný výplach nejméně ze dvou postižených oblastí. Vstřík fyziologického roztoku je rozdělen na několik menších částí o objemu 20-50 ml a rychlostí cca 5 ml za sekundu tak, aby nedocházelo ke dráždění pacienta. Návratnost roztoku by neměla klesnout pod 50 %, proto je potřeba brát v úvahu její snížení u starších osob, kuřáků i pacientů s obstrukčními chorobami. Nejastěji aplikace je 4x 50 ml roztoku. Po provedení výkonu je pacient vyzván, aby několikrát zakašlal, přičemž jsou odsáty zbytky výplachové tekutiny v etnálních i nebunálních sloftek. Bfň BAL obsahuje $(4-10) \times 10^6$ buněk, kde více než 80 % tvoří

makrofágy, mén neřl 15 % lymfocyty, mén neřl 3 % neutrořily a mén neřl 0,5 % eozinofily (Sk i ková *et* Kola íková, 2004; Tomí-ková *et* Sk i ková, 2010).

3.4 Pr toková cytometrie

Pr toková cytometrie je moderní molekulárn biologická metoda umořl ující identifikaci bun k prost ednictvím detekce jejich specifických znak . Tato metoda spo ívá v m ení a analýze vybraných vlastností jednotlivých ástic (nap . bun k), které jsou uná-eny proudem kapaliny a ozá eny laserem. Zaznamenává se relativní velikost, relativní granularita (vnit ní komplexita) a relativní intenzita fluorescence. Relativní velikost a granularitu lze ur ít dle míry rozptylu paprsku, který na ástici dopadá (Carter *et* Ormerod, 2000). Intenzita fluorescence odpovídá mí e exprese zkoumaného znaku, který byl ozna en specifickou monoklonální protilátkou konjugovanou s daným fluoroforem. Ozá ením fluorofor poté dojde k jejich excitaci a tím také k fluorescenci. V této metod se vyuřlívá detekce kombinace n kolika specifických znak sou asn , av-ak zna ených r znými fluorofory. Je ov-em pot eba, aby docházelo k minimalizaci p ekrytí emisních spekter pouřlitych fluorofor (Brown *et* Wittwer, 2000; Nolla, 2013; viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Graf excita ních (árkovan) a emisních (plné linie) spekter vybraných fluorofor excitovatelných p í vlnové délce 488 nm (p evzato a upraveno z <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>, nav-tívno dne 19. 7. 2018).

Mezi nej ást ji pouřlíváné fluorofory pat í (Nolla, 2013):

- **FITC (fluorescein isothiokyanát)** ó jedná se o fluorofor emitující fluorescen ní zá ení v zelené ásti spektra, nebo jeho excita ní/emisní spektrum dosahuje

nejvyšších hodnot p i vlnových délkách 495 nm/575 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce 488 nm.

- **PE (fykoerythryn)** o jedná se o fluorofor emitující fluorescenční záření ve fluté části spektra, nebo jeho excitační/emisní spektrum má nejvyšší hodnoty p i vlnových délkách 565 nm/575 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce 488 nm.
- **PerCP-Cy5.5 (peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5)** o jedná se o tandemový fluorofor, který je složen z peridin-chlorofyl-proteinu a derivátu cyaninu Cy5.5. Excitační a emisní spektra PerCP dosahují nejvyšších hodnot p i vlnových délkách 482 nm/675 nm. Pokud se v-ak PerCP dostane do kontaktu s Cy5.5, dojde k Fösterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET). Energie se tedy přenesou z excitovaného PerCP na Cy5.5, tudíž fluorescenci bude emitovat pouze Cy5.5. Nejvyšší hodnota excitačních/emisních spekter celého komplexu pak dosáhne 690 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce 488nm.
- **PE-Cy7 (fykoerythryn-cyanin 7)** o je složen z komplexu fykoerythrinu a derivátu cyaninu Cy7. Op t zde dochází k FRET a nejvyšší hodnota excitačních/emisních spekter celého komplexu dosahuje vlnových délek 565 nm/774 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce 488 nm.
- **APC (allofykocyanin)** o nejvyšší hodnoty jeho excitačních/emisních spekter dosahují vlnových délek 650 nm/660 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce okolo 635 nm.
- **APC-Cy7 (allofykocyanin-cyanin 7)** o jedná se o komplex APC (allofykocyaninu) a cyaninu Cy7. Op t dochází k FRET a nejvyšší hodnota excitačních/emisních spekter celého komplexu dosahuje vlnových délek 650 nm/774 nm. K excitaci je využíván laser o vlnové délce okolo 635 nm.

Pr tokový cytometr je přístroj složený ze 3 systém : fluidního, optického a elektronického.

- **Fluidní systém** je zodpovědný za přenos částic do detekčního místa. Využívá se zde hydrodynamické fokusace, která zajistí, že každá částice projde vředy právě jedna částice
- **Optický systém** se využívá pro generování paprsků excitací laser a k přenosu excitací světla do místa detekce. Do detektor vede také rozptýlené excitací

světlo a emitované světlo, a to pomocí sady dichroických zrcadel, která rozdělí záření dle jeho vlnové délky.

- **Elektronický systém** je složen z detektorů převádějící světlo na elektrické napětí, a počítače, sloužícího k zápisu a analýze dat.

V místě detekce dochází k ozáření částice excitacím paprskem, při němž vznikají dva jevy. Nejprve se tento paprsek na částici rozptýlí a poté excituje fluorofory navázané na částici. Tyto fluorofory pak vyzařují emisní světlo. Rozptýlené excitací světlo a produkované emisní světlo je pak zachyceno pomocí optického systému a přivedeno k detektorům. Projde-li částice místem detekce, projeví se jako pulz napětí na detektoru. Počítač poté zaznamenává detekované částice jako tzv. události, při níž každá událost obsahuje několik hodnot, které ji charakterizují:

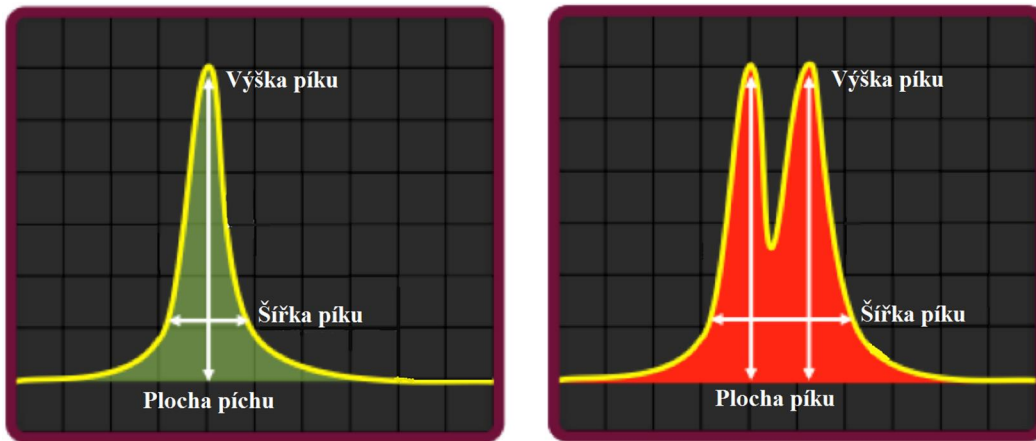
- čas detekce
- FSC (forward scatter) světlo, rozptýlené v malém úhlu od primární dráhy paprsku, s intenzitou přímo úměrnou velikosti částice
- SSC (side scatter) světlo, rozptýlené ve velkém úhlu od primární dráhy paprsku, s intenzitou přímo úměrnou vnitřní složitosti částice
- Relativní intenzita fluorescence v jednotlivých detekčních kanálech

Události se detekují jako pulz napětí na fotonásobiči. Sledované hodnoty je možné popsat výškou píku, šířkou píku a velikostí plochy pod křivkou (Givan, 2013; Nolla, 2013).

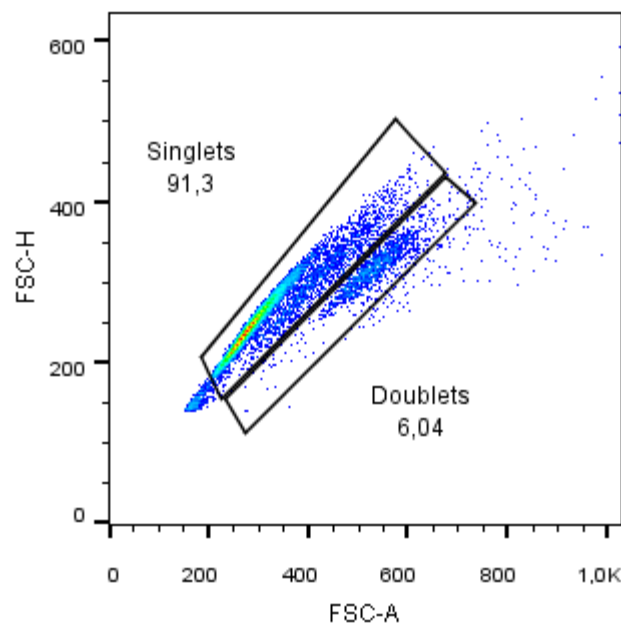
Z Obrázku 4 lze vidět, že emisní spektra fluoroforů se překrývají. Pro správné výsledky při vícebarevných experimentech je tedy potřeba provést tzv. kompenzaci, při níž jsou naměřena referenční data prostřednictvím jednobarevných značených kontrolních vzorků (kuličky s fluorofory) s předem danými vlastnostmi. Software přístroje následně stanoví míru překrytí v jednotlivých kanálech. Při měření vzorků poté naměřené hodnoty přepočítává, čímž odstraní vliv překrytí. Data jsou zobrazována v podobě histogramu a scattergramu. Histogramem je znázorněno počet událostí s jednotlivými hodnotami relativní intenzity fluorescence v jediném kanálu. Scattergramem lze vizualizovat dva parametry v kartézské soustavě souřadnic, což vizualizuje tedy hodnoty relativní intenzity fluorescence dvou kanálů zároveň (Adan *et al.*, 2017).

Při měření jsou data vizualizována v reálném měřítku. Pro vymezení jednotlivých populací či skupin populací se používá tzv. gating. Gate je konkrétní místo v grafu, vymežující soubor dat (událostí) se stejnými či podobnými vlastnostmi. Pro vyselektování shlukujících se buněk či překrývajících se událostí se využívá tzv. singletový gate, díky

n mufl se na základ výky (FSC-H) a v t-í plochy píku (FSC-A) od sebe šzdojeněó události odli-í (viz Obrázek 5). Zdvojené události na scattergramu FSC-A/FSC-H jsou oproti jednotlivým událostem posunuty vpravo z d-vo du del-ího pr- chodu detektorem. Proto je singletový gate lokalizován na levé stran- grafu (viz Obrázek 6).

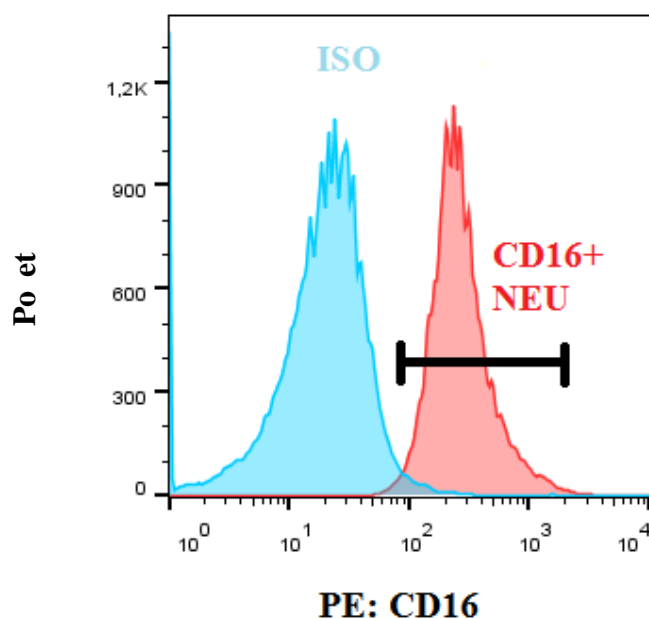


Obrázek 5: Impulz nap- tí p- i detekci jednotlivé události a p- i p- ekryvu dvou událostí. P- evzato a upraveno z <https://expertcytometry.com/3-flow-cytometry-gates-that-will-improve-the-accuracy-of-your-facs-data-analysis/>.



Obrázek 6: Scattergram FSC-A/FSC-H znázor- ující gate singlet .

Rovn- fl se vyuffívá gatingu dle izotypové kontroly (p- ítomnost protilátek vytvá- ejících nespecifické fluorescen- ní pozadí vzorku), díky které lze ur- ít hranici pozitivní exprese ve vzorku- i na jednotlivých subpopulacích. (viz Obrázek 7).



Obrázek 7: Určení pozitivní exprese znaku dle pozice píku izotypové kontroly v histogramu vybraného fluorescenčního kanálu.

3.5 Automatický zobrazovací a analyzární systém TissueFAXS

Automatický zobrazovací a analyzární systém TissueFAXS (TissueGnostics GmbH, Rakousko; viz Obrázek 8) je technika kombinující základní principy mikroskopování s automatickým skenováním. Systém umožňuje po záznamu i velmi vysokém rozlišení, a to jak ve viditelném světle, tak ve fluorescenčním módu s několika různými kanály. Je vhodný především pro analýzu buněčných preparátů a bioptovaných tkáňových vzorků a tkáňových microarrays. Mikroskop je schopen automaticky skenovat až osm podlofních sklíček najednou, přičemž získané snímky předebraných ploch studovaného vzorku složí v jeden celistvý obraz. Výsledné obrazy preparátů jsou poté analyzovány pomocí softwarů HistoQuest a TissueQuest, kdy dochází k detekci zájmových prvků a získání statistických dat.

HistoQuest je software, který slouží k analýze obrazů získaných mikroskopováním ve viditelném světle. S využitím patentovaného algoritmu pro nukleární segmentaci je schopen detekovat a rozlišovat jednotlivé buňky, přičemž analýza může být zaměřena na oblast jádra, cytoplazmy a také membrán. HistoQuest detekuje barvené oblasti a hodnotí jejich intenzitu, a rovněž detekuje malé útvary až na úrovni cytoskeletu. Výsledkem analýz

jsou numerické hodnoty odpovídající jednotlivým buněným populacím, které lze dále statisticky vyhodnocovat, vizualizované pomocí scattergram a histogram .

TissueQuest je software, který slouží k analýze obrazů získaných pomocí mikroskopování ve fluorescenčním módu. Jeho předností je možnost zobrazení buněných struktur pomocí skládání obrazů různých fluorescenčních kanálů do jednoho výsledného komplexního obrazu (<http://www.bga.su/info/TissueFAXS.pdf>, navštíveno 11. 7. 2018).



Obrázek 8: Automatický zobrazovací a analyzační systém TissueFAXS (převzato a upraveno z <https://crrd.kmu.edu.tw/images/I17.jpg>, navštíveno dne 11. 7. 2018).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- **Charakterizace základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině získané od pacientů po transplantaci plic**

Pro analýzu byly použity vzorky bronchoalveolární laváční tekutiny odebraných 28 pacientů po transplantaci plic. Část vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny byla odebrána a následující den odeslána do naší laboratoře z III. chirurgické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. Další část vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny pocházela z bronchologického pracoviště Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice v Olomouci. Přehled souboru pacientů je znázorněn v Tabulce 1.

Pacientovým podpisem informovaného souhlasu bylo umožněno odebrat a nadále pracovat se vzorky bronchoalveolární laváční tekutiny.

Tabulka 1: Soubor pacientů pro charakteristiku základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině.

	Celkem
Počet pacientů	28
Muži/ženy	17/11

- **Analýza celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích u pacientů po transplantaci plic**

Pro analýzu celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích byla použita sklíčková s tkáňovými řezy plic od 18 pacientů po transplantaci plic. Tkáňové preparáty byly poskytnuty Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kde došlo k odběru plicní tkáně, její parafinaci, krájení a následnému imunohistochemickému barvení, a sloužily k rutinní diagnostice. U každého pacienta byly k dispozici preparáty pozitivní na znak CD4 pro identifikaci pomocných T-lymfocytů, CD8 pro identifikaci cytotoxických T-lymfocytů, CD20 pro identifikaci B-lymfocytů, UCHL1 pro identifikaci naivních a paměťových T-lymfocytů a preparáty pozitivní na znak CD68 pro identifikaci makrofágů. Preparáty byly zároveň barveny hematoxylinem pro vizualizaci jaderného obsahu všech buněk.

Pacienti byli rozděleni do dvou podskupin, první podskupinu (R) tvořili pacienti s chronickou rejekcí plic a druhou podskupinu (NR) představují pacienti bez rejekce plicního transplantátu (viz Tabulka 2). Vzorke biptovaných transplantovaných plic byly zkoumány retrospektivně.

Tabulka 2: Soubor pacientů pro analýzu celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích.

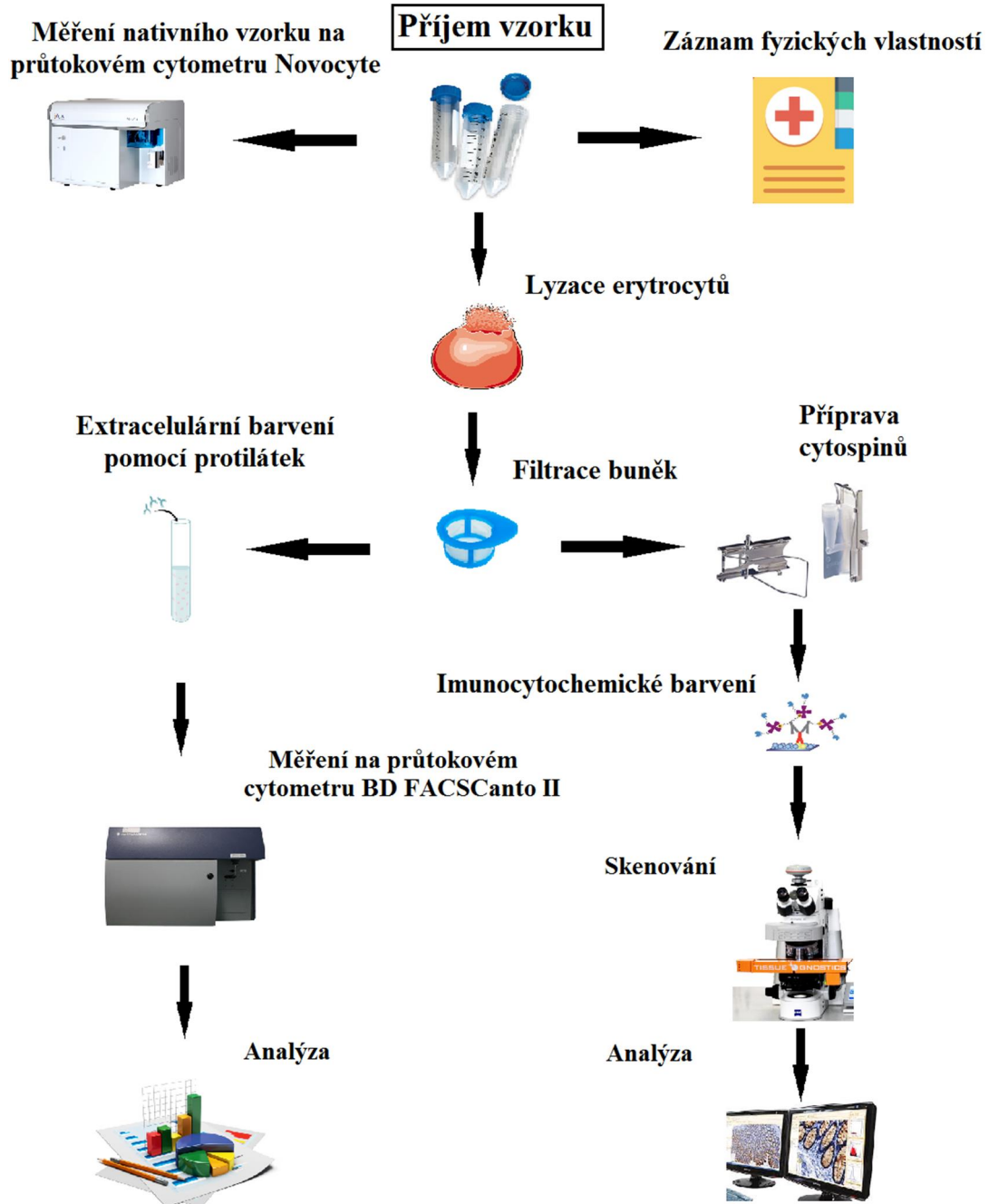
	R	NR	Celkem
Počet pacientů	10	8	18
Muži/ženy	7/3	6/2	13/5

R – pacienti s chronickou rejekcí plic

NR – pacienti bez rejekce plicního transplantátu

4.2 Schéma postupu práce

- Charakterizace základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině získané od pacienta po transplantaci plic



Obrázek 9: Schéma postupu práce při charakterizaci základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině. Převzato a upraveno viz Seznam obrázků.

- **Analýza celkové bun nosti a po tu alveolárních makrofág a dal-ích imunitních bun k v plicních biopsiích u pacient po transplantaci plic**

Vlastní práce spo ívala ve využití automatického zobrazovacího a analyza ního systému TissueFAXS (skenování a analýza). Odb r vzork bioptovaných plic byl proveden na III. chirurgické klinice 1. léka ské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole a p íprava tká ových preparát prob hla na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. léka ské fakulty Univerzity Karlovy.

Odběr vzorku



Zhotovení tkáňových preparátů



Skenování



Analýza



Obrázek 10: Schématické znázornění získání vzork bioptovaných plic po záv re nou analýzu tká ových preparát . P evzato a upraveno viz Seznam obrázk .

4.3 Laboratorní zpracování vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny

Vzorky bronchoalveolární laváční tekutiny byly odebrány do jedné i více 25ml zkumavek. Nejprve byly zaznamenány fyzické vlastnosti vzorku, jako je objem, přítomnost částic a celkový vzhled, a poté bylo ze vzorku odebráno do 5ml zkumavky pro protokovou cytometrii (BD Falcon) 150 μ l. Do tohoto objemu vzorku bylo přidáno 1,5 μ l protilátky proti lidskému znaku CD45 značené fluoroforem. Po 20 minutách inkubace v temném prostředí a při laboratorní teplotě byl vzorek změněn na protokovém cytometru NovoCyte® (ACEA Biosciences) za účelem stanovení absolutního počtu buněk v počátečním vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny, který byl nezbytný pro pozdější přípravu cytospin (viz kapitola 4.5 Příprava cytospin). Zbýlý objem vodního vzorku byl centrifugován 10 minut při 10 °C a 1700 RCF. Supernatant byl odstraněn a pokud byl vzorek bez přítomnosti krve, pelet byl resuspendován ve 2 ml PBS. Pokud byl vzorek krvavý, proběhla 5minutová lyzace erytrocytů přidáním 5 ml lyzačního pufru. Následně došlo k efiltrování pomocí 70 μ m nylonový filtr do 12ml zkumavky. Vodní zkumavka byla opláchnuta 2 ml PBS a tento objem byl opět filtrován a spojen s předchozí frakcí. Zkumavka s efiltrovaným vzorkem byla centrifugována 10 minut při 10 °C a 600 RCF, supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno množství PBS v závislosti na vodním objemu vzorku (viz Tabulka 3).

Z vhodných vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny byly vytvořeny cytospiny za účelem mikroskopické analýzy (viz kapitola 4.5 Příprava cytospin).

Tabulka 3: Celkový objem buněčné suspenze a počet zkumavek pro protokovou cytometrii v závislosti na objemu vodního vzorku.

Objem vodního vzorku (ml)	Celkový objem buněčné suspenze (μ l)	Počet BD zkumavek
<10	300	2
10-20	450	3
20>	600	4

4.4 Imunofenotypizace bronchoalveolární laváční tekutiny

Imunofenotypizace je identifikace bun k pomocí povrchových i intracelulárních znak (marker , nej ast ji CD znak), jeřl jsou pro ur ité bun né populace specifické (viz Tabulka 4).

Bun ná suspenze získaná zpracováním vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny byla rozd lena po 150 l do 5ml zkumavek pro pr tokovou cytometrii (BD Falcon; viz Tabulka 3), do kterých byl p idán 1 l protilátky proti znak m CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD25, CD45, CD45RO, CD127 a HLA-DR konjugované s fluorofory FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC a APC-Cy7. Výjimku tvo il pouze koktejl protilátek CD3 FITC/(CD16+CD56) PE, který byl p idáván po 4 l do kařdé zkumavky. Protilátky byly smíchány do –estibarevných kombinací. Krom specifických protilátek byly pouřlity pro kařdý vzorek nespecifické protilátky izotypové kontroly. Po 20 minutách inkubace v temném prost edí a p i laboratorní teplot byl vzorek zm en na pr tokovém cytometru BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). Pouřltí jednotlivých panel ů bylo dáno objemem p vodního vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny (viz Tabulka 3). Panely byly sestavené nejen pro na-i analýzu imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutin u pacient ů po transplantaci plic (viz Tabulka 4), ale také pro dal-í výzkum probíhající na Ústavu imunologie léka ské fakulty Univerzity Palackého společ n s 1. a 2. léka skou fakultou Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnicí v Motole. Proto n které znaky, které byly m eny, nebyly hodnoceny.

Tabulka 4: Kombinace protilátek proti p íslu-ným marker m vyufflté pro charakterizaci imunitních bun k v bronchoalveolární laváční tekutin u pacient ů po transplantaci plic.

Bu ky imunitního systému	Kombinace marker
Leukocyty	CD45⁺
T-lymfocyty	CD3 ⁺
CD4 ⁺ T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8 ⁺ T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Regula ní T-lymfocyty (Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻
NK bu ky	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺
Aktivované T-lymfocyty	CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺
B-lymfocyty	CD3 ⁻ CD19 ⁺
Monocyty/makrofágy	CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD14 ⁺
Neutrofilý	CD15 ⁺

4.5 Příprava cytospin

Cytospinová metoda slouží k vizualizaci studovaných buněk a jejich částí pomocí imunocytochemického barvení. Principem je fixace buněk v suspenzi na podložní sklo, které je poté barveno pomocí imunocytochemických metod.

Při zpracování vzorku bronchoalveolární lavážní tekutiny (viz kapitola 4.3 Laboratorní zpracování vzorku bronchoalveolární lavážní tekutiny) byla odebrána část buněčné suspenze, která se dále naedila na koncentraci 1000 buněk/l. Z takto připravené buněčné suspenze bylo odebráno 200 μ l (200 000 buněk) a přeneseno do nástavce přídavně připraveného cytospinového aparátu s podložním sklem a filtračním papírem. Cytospinový aparát se vzorkem byl zajistěn víkem a vložen do centrifugy pro přípravu cytospin (Centrifuga Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 Cytocentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Proběhla centrifugace po dobu 3 minut při 72 RCF, během které se buňky separovaly od suspenze a adherovaly na podložní sklo. Přebytková tekutina byla vsáknutá filtračním papírem. Cytospiny byly vyjmuty z cytospinového aparátu a nechaly se schnout přes noc při laboratorní teplotě. Po uschnutí byly buňky fixovány metanolem chlazeným na 4 °C po dobu 1 min v digestoři. Preparáty byly dále sušeny v digestoři po dobu cca 30 min, zabaleny do nylonového sáčku, popsány a uskladněny při -20 °C. Takto připravené cytospiny byly imunocytochemicky barveny (viz kapitola 4.6 Imunocytochemické barvení cytospin).

4.6 Imunocytochemické barvení cytospin

Pro barvení cytospin bylo použito nejprve imunocytochemické barvení pomocí soupravy EnVision™+ Dual Link System-HRP (Dako). Postup barvení probíhal dle protokolu k soupravě daného výrobcem: po vytažení cytospin z mrazáku a následném rozmrazení byl na preparáty aplikován permeabilizační roztok (0,1% saponin-0,5% BSA-PBS). Inkubace probíhala 15 min ve vlhké komoře ve tmě a za laboratorní teploty. Dále byl aplikován roztok pro blokování endogenní peroxidázy (peroxidase block solution, Dako) a roztok pro blokování dalších proteinů (protein block serum-free, Dako). Mezi těmito kroky a po blokaci proteinů byl proveden promývací krok (0,1% saponin-0,5% BSA-PBS). Poté byla přidána primární myší monoklonální protilátka proti lidskému znaku CD68 (klon Y1/82A; BioLegend), následně inkubace probíhala ve vlhké komoře a za laboratorní teploty přes noc.

Druhý den byla na cytospiny po promytí aplikována sekundární protilátka proti protilátce primárního značení k novou peroxidázou (EnVision™+ Dual Link System-HRP

(Dako), inkubace probíhala 60 min při laboratorní teplotě. Dále byl po promytí aplikován roztok substrát-chromogen (inkubace 10 min) a hematoxylin (inkubace 5 min). Takto nabarvený cytospin byl nakonec promyt destilovanou vodou, osušen a po aplikaci montovacího média Glycergel Mounting Medium (Dako) zakryt krycím sklíčkem.

Dále bylo také pro barvení cytospinu využito fluorescenční barvení. Po vytažení cytospinu z mrazáku a následném rozmrazení byla pomocí olejového pera vytvořena hranice okolo fixovaných buněk. Poté bylo na preparáty aplikováno 100 μ l roztoku 0,5% BSA-PBS, je-li byl inkubován po dobu 5 min. Roztok byl odsát pomocí buničiny a poté bylo na cytospin aplikováno 100 μ l permeabilizačního roztoku (0,1% saponin-0,5% BSA-PBS). Inkubace probíhala po dobu 15 min ve vlhké komoře ve tmě při laboratorní teplotě. Roztok byl odsát pomocí buničiny. Dále bylo aplikováno 100 μ l roztoku blokujícího endogenní peroxidázu (peroxidase block solution, Dako), který byl inkubován po dobu 7 min. Poté došlo k promytí cytospinu přidáním 100 μ l roztoku 0,1% saponin-0,5% BSA-PBS a k inkubaci po dobu 7 min. Dále bylo aplikováno 100 μ l roztoku pro blokování proteinů (protein block serum-free, Dako). Inkubace probíhala po dobu 25 min. Roztok byl odsát pomocí buničiny a poté byl cytospinový preparát dvakrát promyt přidáním 100 μ l roztoku 0,1% saponin-0,5% BSA-PBS po dobu 7 min. Roztok byl odsát pomocí buničiny a poté byla na cytospin aplikována primární myšičí monoklonální protilátka proti lidskému znaku CD68 (klon Y1/82A; BioLegend) o koncentraci 1:150 v roztoku 0,1% saponin-0,5% BSA-PBS a objemu 100 μ l. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc ve vlhké komoře při laboratorní teplotě.

Druhý den byla primární protilátka odsáta pomocí buničiny a cytospinový preparát byl třikrát promyt přidáním 100 μ l promývacího roztoku (0,5% BSA-PBS) po dobu 7 min. Následně byla na cytospin aplikována sekundární polyklonální ošlí protilátka proti myšičí protilátce typu IgG konjugovaná fluoroforem AlexaFluor® 488 (ABCAM) o koncentraci 1:500 v roztoku 0,1% saponin-0,5% BSA-PBS a objemu 100 μ l. Inkubace probíhala ve vlhké komoře v temnu a při laboratorní teplotě po dobu 60 min. Cytospinový preparát byl dále třikrát promyt přidáním 100 μ l promývacího roztoku (0,5% BSA-PBS) po dobu 5 min, lehce propláchnut mírným proudem destilované vody a osušen při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Následně bylo aplikováno 100 μ l montovacího média DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech) pro vizualizaci jaderného obsahu buněk. Cytospinový preparát byl dokončen přiložením krycího sklíčka.

4.7 Skenování a analýza pomocí systému TissueFAXS

Tká ové preparáty bioptovaných plic a cytospinové preparáty ze vzork bronchoalveolární laváží pacient po transplantaci plic byly vyhodnoceny pomocí automatického zobrazovacího a analyza ního systému TissueFAXS (TissueGnostics GmbH, Rakousko; viz kapitola 3.5 Automatický zobrazovací a analyza ní systém TissueFAXS). Po vložení a flosmi podlofních sklí ek s preparáty do drfláku vzork byl proveden výb r vhodné kamery v závislosti na mikroskopování ve sv tlém poli (kamera PixeLINK M-4) i ve fluorescen ním módu (kamera PCO Pixelfly USB monochrome). Poté byly objektivem o zv t-ení 0,5x automaticky vytvo eny náhledy studovaných tkání, díky kterým bylo možné specifikovat výb r zájmových oblastí (ROI ó region of interest), jeff byly ur eny ke skenování v maximálním rozli-ení p i pouffití objektivu o zv t-ení 20x. P i skenování ve fluorescen ním módu byly navíc vybrány filtry pro fluorescen ní kanály DAPI a FITC. Mikroskop automaticky nasnímal obrazy zájmových oblastí v definovaných kanálech v maximálním rozli-ení a poskládal je do jednoho celistvého výsledného obrazu. Ten byl poté analyzován pomocí softwar HistoQuest a TissueQuest.

Po naskenování preparát byl prvním krokem analýzy výb r ROI ur ených k vlastní analýze. Oblasti nevhodné pro vyhodnocení (potrhaná tká , fibrotická tká , artefakty a ne istoty) nebyly do analýzy zahrnuty. U n kolika zájmových oblastí pak byly nastaveny parametry samotné analýzy, a to sice výb r barevného odstínu studovaného markeru, velikost objektu obsahující studovaný marker a nastavení bun ného pozadí. Nakonec prob hla vlastní analýza, jejímff výsledkem byla numerická hodnota, udávající po et bun k pozitivních na studovaný marker.

4.8 Statistická analýza

Numerické hodnoty získané pomocí automatického zobrazovacího a analyza ního systému TissueFAXS a pr tokové cytometrie byly vyhodnoceny pomocí statistického softwaru GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Ke srovnání statistických dat byly pouffity ROC (Receiver Operating Characteristic) k ivky a také neparametrický Mann-Whitney U test. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Obrázky byly upraveny i vytvo eny ve FlowJo® X (FlowJo, LLC) a MS PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation).

4.9 Poufítě chemikálie, soupravy a roztoky

4.9.1 Poufítě chemikálie

- Metanol (4 °C; mikroCHEM)
- Bovinní sérový albumin (BSA; SIGMA, kat. . A2153-10G)
- Saponin (SERVA, kat. . 34655.01)
- DAPI Fluoromount-G[®] (SouthernBiotech, kat. . 0100-20)
- Glycergel Mounting Medium (Dako, kat. . C0563)
- Monoklonální my-í protilátka proti lidskému znaku CD68 (klon Y1/82A) (BioLegend, kat. . 333801)
- Polyklonální oslí protilátka proti my-í protilátce IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (ABCAM, kat. . ab150105)
- Monoklonální my-í protilátky pro lidským znak m konjugované s fluorochromy (BioLegend): **FITC** ó CD3 (klon OKT3), CD4 (klon SK3), CD14 (klon M5E2), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21); **PE** ó mix protilátek CD3 FITC/(CD16+CD56) PE (klon UCHT1/3G8+MEM-188), CD25 (klon M-A251), CD274 (PD-L1) (klon 29E.2A3), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21); **PerCP-Cy5.5** ó CD4 (klon SK3), CD45 (klon 2D1), CD127 (klon A019D5), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21); **PE-Cy7** ó CD8 (klon SK1), CD15 (klon W6D3), CD279 (PD-1) (klon EH12 2H), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21); **APC** ó HLA-DR (klon L243), CD11b (klon CBRM1/5), CD45RO (klon UCHL1), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21), IgG2 izotypová kontrola (klon MOPC-173); **APC-Cy7** ó CD11c (klon Bu15), CD19 (klon SJ25C1), CD45 (klon 2D1), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)

4.9.2 Poufítě soupravy

- EnVision[™]+ Dual Link System-HRP (DAKO, kat. . K4063)

4.9.3 Poufítě roztoky

- 1x PBS pufr (8 g NaCl, 200 mg KCl, 240 mg KH₂PO₄, 1,44 g Na₂PO₄, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,4) (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
- Lyza ní pufr (8,3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 40 mg EDTA, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,29) (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
- Promývací pufr (0,5% BSA-PBS)

- Permeabilizační roztok (0,1% saponin-0,5% BSA-PBS)

4.10 Použitá přístroje

- Flowbox MSC 1.2 (Thermo Scientific GmbH)
- Centrifuga 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH)
- Centrifuga Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 Cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Průtokový cytometr NovoCyte® (ACEA Biosciences)
- Průtokový cytometr BD FACSCanto™ II (BD Biosciences)
- Laboratorní digestoř N/900 M2 (MERCY, s.r.o.)
- Automatický zobrazovací a analyzační systém TissueFAXS (TissueGnostics GmbH)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Minicentrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)

5 Výsledky

5.1 Fyzické vlastnosti vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny

Pro vhodné laboratorní zpracování studovaných vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny (n=28) bylo nutné nejprve změřit jejich objem (viz Tabulka 5). Při rutinních vyšetřeních vyufflávající technikou BAL se rovněž hodnotí celkový vzhled této tekutiny. Pro analýzu základních imunitních populací pomocí průtokové cytometrie však nebyla tato fyzická vlastnost relevantní, a proto nebyla hodnocena.

Tabulka 5: Objem studovaných vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny.

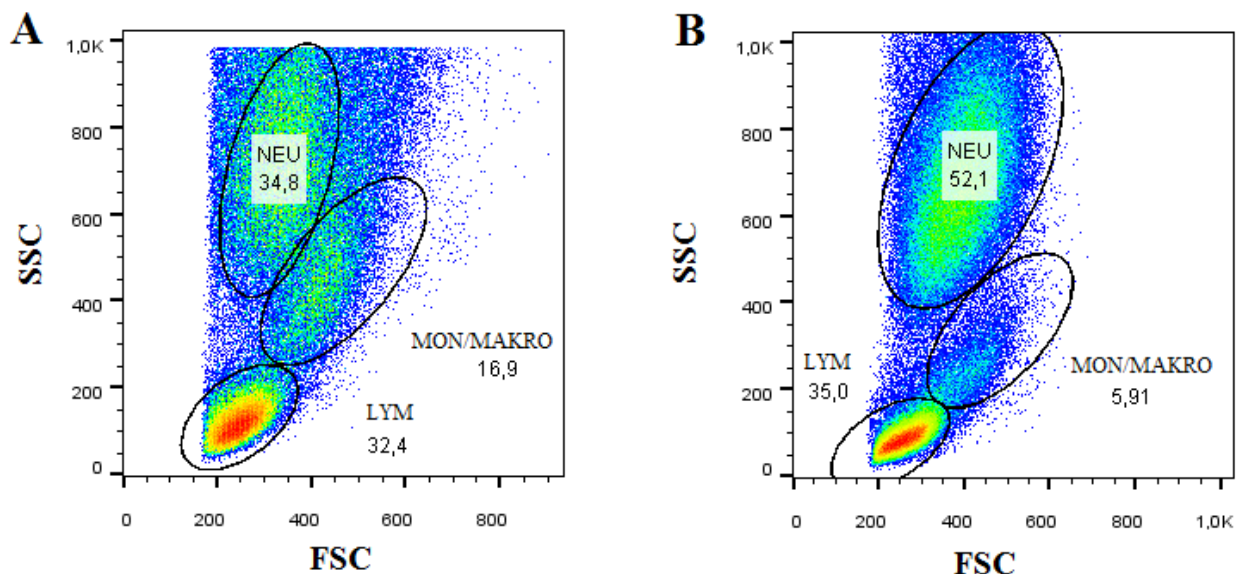
Objem vzork (ml)	Počet vzork
<10	2
10-20	11
20>	15

5.2 Výsledky měření pomocí průtokové cytometrie

5.2.1 Identifikace a zastoupení základních buněk imunitního systému

S využitím průtokové cytometrie byl pomocí exprese znaku CD45 stanoven absolutní počet buněk imunitního systému v jednotlivých vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny získaných od pacientů po transplantaci plic. Jeho průměrná hodnota činila $173 \times 10^6/L$ (95% konfidenční interval [KI] $121,2-225,2 \times 10^6/L$), což odpovídalo 30,1 % ze všech zaznamenaných buněk. Zbylé buňky byly pravděpodobně neimunitního původu, případně se jednalo o buněčné zbytky a další částice, jež se běžně v bronchoalveolární laváční tekutině vyskytují.

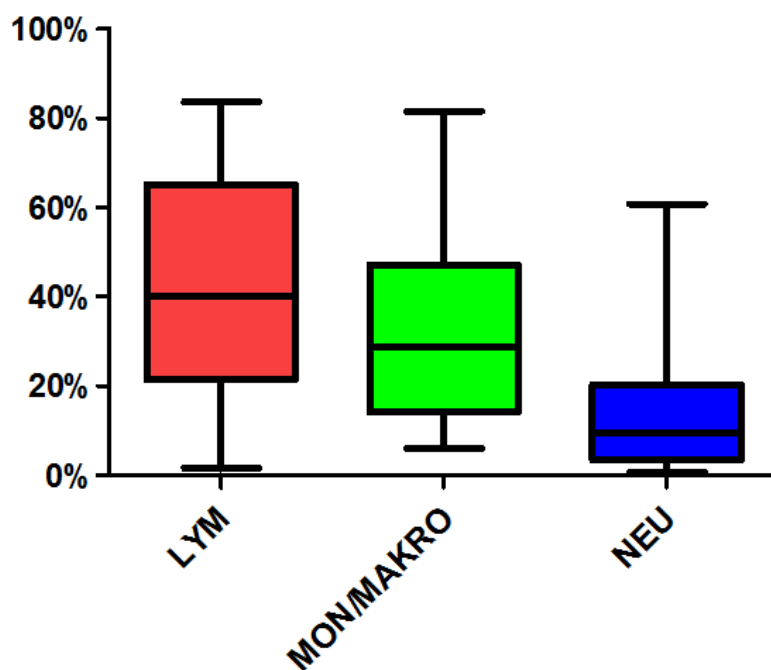
V této diplomové práci byly hodnoceny především hlavní populace imunitních buněk v bronchoalveolární laváční tekutině (lymfocyty, monocyto/makrofágová linie a neutrofily) s bližším pohledem na T-lymfocyty (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Znáznorn ní hlavních imunitních populací vzorku bronchoalveolární laváfní tekutiny (A) ve srovnání se vzorkem periferní krve (B) na scattergramu FSC/SSC.

Legenda: LYM ó lymfocyty, MON/MAKRO ó monocyto/makrofágová linie, NEU ó neutrofil.

Lymfocyty p edstavovaly p evafující ást bun k imunitního systému se zastoupením 41,9 % (KI 31,9-51,9 %). Bu ky **monocyto/makrofágové linie** se vyskytovaly v zastoupení 33,5 % (KI 24,2-42,9 %). **Neutrofil** bylo ze v-ech hlavních populací imunitního systému nejmén , a to sice 15,1 % (KI 8,7-21,5 %). Zastoupení základních studovaných populací imunitního systému ve vzorcích bronchoalveolární laváfní tekutiny je znázorn no na Obrázku 12.



Obrázek 12: Zastoupení základních studovaných populací imunitního systému ve vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny. Středová čára představuje medián, krabicová část grafu pak 25. a 75. percentil a vousy grafu vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu.

Legenda: LYM – lymfocyty, MON/MAKRO – monocyto/makrofágová linie, NEU – neutrofily.

5.2.2 Analýza populací lymfocytárního genu

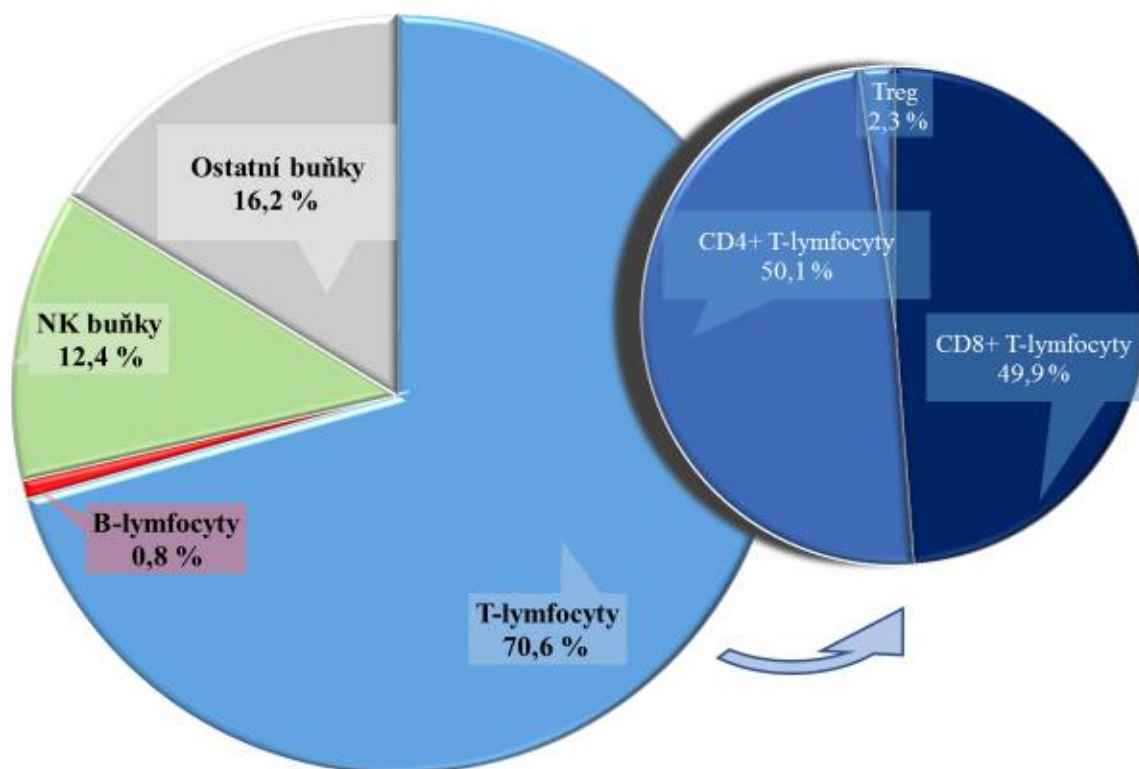
Lymfocytární buňky vzorků bronchoalveolární laváční tekutiny získaných od pacientů po transplantaci plic byly dále vybrány pro detailnější analýzu jejich subpopulací, a to T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk.

Populace **T-lymfocytů** byla zastoupena v nejvyšším podílu: 70,6 % (KI 64,4-76,7 %). **NK buňky** se vyskytovaly v zastoupení 12,4 % (KI 7,7-17,1 %) a **B-lymfocyty** se vyskytovaly v nejmenším zastoupení 0,8 % (KI 0,3-1,3 %). V lymfocytárním genu (viz Obrázek 11) se průměrně vyskytuje 16,2 % ostatních neimunitních buněk, které nebyly hodnoceny.

Dále bylo v rámci T-lymfocytární populace určeno následující průměrné zastoupení subpopulací: **CD8⁺ T-lymfocyty** 49,9 % (KI 42,8-55 %) a **CD4⁺ T-lymfocyty** 50,1 % (KI 44,1-56 %), ze kterých byla stanovena přítomnost minoritní populace **Treg** buněk 2,3 % (KI 1-3,7 %). Poměr zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů byl roven 1, což značí průměrně shodný výskyt těchto populací v rámci T-lymfocytů. Zastoupení subpopulací

lymfocytárních bun k ve vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny získaných od pacient po transplantaci plic je znázorn ěno na Obrázku 13.

V populacích CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyt byla dále stanovena exprese aktiva ního znaku **CD45RO**. V rámci CD4⁺ byla detekována pozitivita v 83,1 % (KI 78,5-87,7 %) a u CD8⁺ T-lymfocyt byla zaznamenána pozitivní exprese CD45RO znaku v 73 % (KI 66,8-79,2 %).



Obrázek 13: Zastoupení subpopulací lymfocytárních bun k ve vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny získaných od pacient po transplantaci plic.

5.2.3 Srovnání zastoupení základních imunitních populací přítomných v bronchoalveolární laváční tekutině v srovnání u vybraných pacient po transplantaci plic

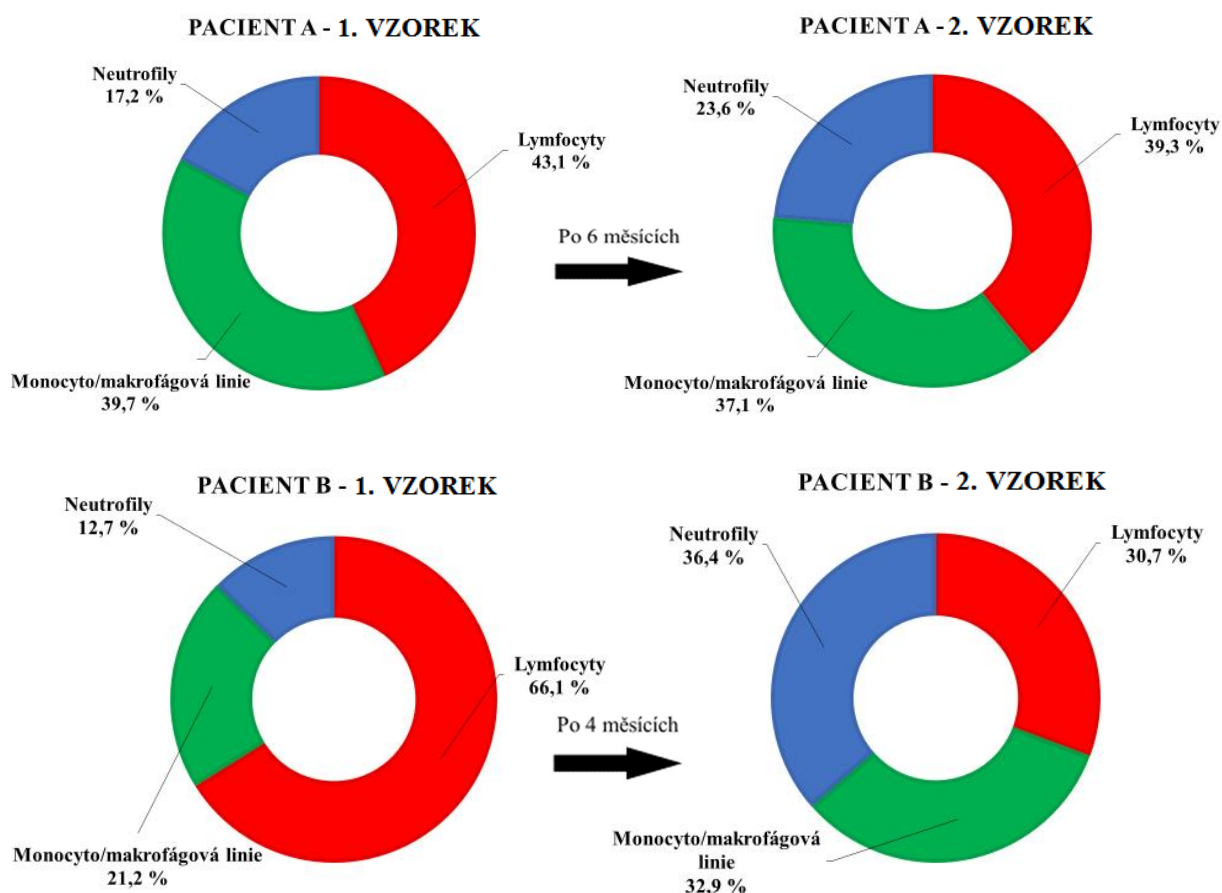
U dvou vybraných pacient po transplantaci plic (pacient A a pacient B) byla hodnocena změna v zastoupení základních bun k imunitního systému (lymfocyty, monocyto/makrofágová linie, neutrofil) ve vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny odebraných v r ťném asovém období.

U prvního vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny vybraného **pacienta A** jsme stanovili následující zastoupení základních bun k imunitního systému: 43,1 % **lymfocyt** , 39,7 % bun k **monocyto/makrofágové** linie a 17,2 % **neutrofil** . U druhého vzorku

bronchoalveolární laváční tekutiny, který byl od vzorku prvního odebraný po 6 m sících, bylo zastoupení základních bun k imunitního systému podobné: 39,3 % **lymfocyt** , 37,1 % bun k **monocyto/makrofágové** linie a 23,6 % **neutrofil** . Došlo v-ak k poklesu $CD4^+/CD8^+$ pom ru z 1,1 na 0,8.

U prvního vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny vybraného **pacienta B** bylo stanoveno následující zastoupení základních bun k imunitního systému: 66,1 % **lymfocyt** , 21,2 % bun k **monocyto/makrofágové** linie a 12,7 % **neutrofil** . U druhého vzorku bronchoalveolární laváční tekutiny, který byl od vzorku prvního odebraný po 4 m sících, se zastoupení základních bun k imunitního systému li-ilo výrazným nár stem bun k monocyto/makrofágové linie a neutrofil a poklesem lymfocyt : 30,7 % **lymfocyt** , 32,9 % bun k **monocyto/makrofágové** linie a 36,4 % **neutrofil** . U pacienta B rovn fl do-lo k poklesu $CD4^+/CD8^+$ pom ru z 1,5 na 1,0.

Srovnání základních imunitních populací p ítomných v bronchoalveolární laváční tekutin v ase u vybraných pacient po transplantaci plic je znázorn no na Obrázku 14.



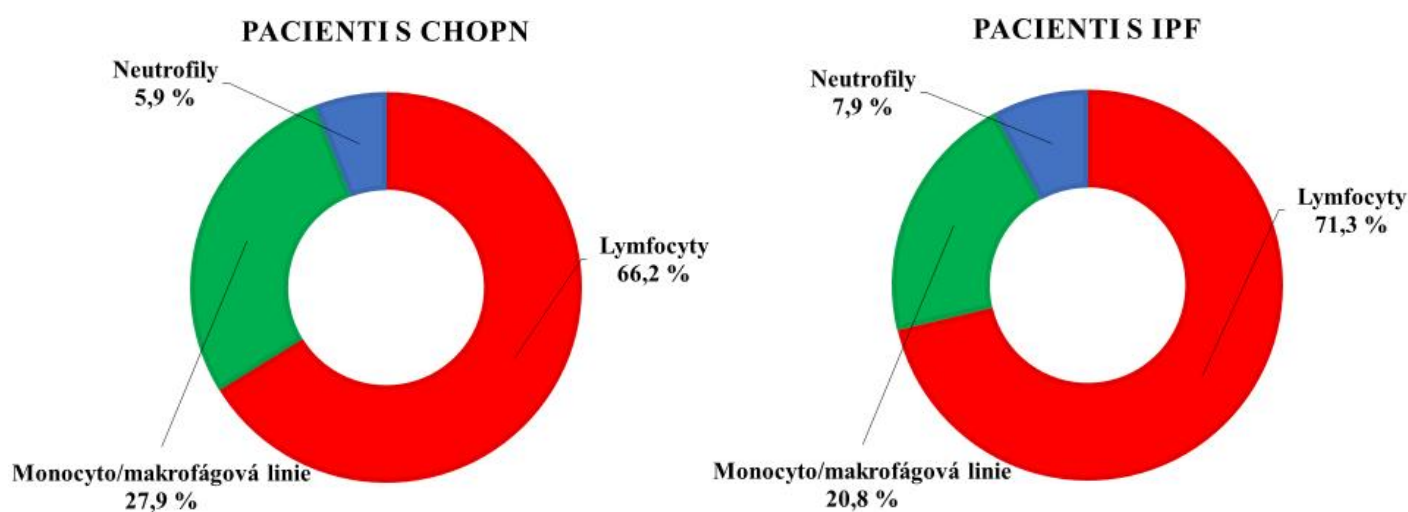
Obrázek 14: Srovnání zastoupení základních imunitních populací p ítomných v bronchoalveolární laváční tekutin v ase u vybraných pacient po transplantaci plic.

5.2.4 Srovnání zastoupení základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině u pacientů po transplantaci plic s odlišnými primárními diagnózami

Dále jsme zkoumali zastoupení základních imunitních populací u dvou nejastji primárních diagnóz, pro kterou podstoupili transplantaci plic, a to chronickou plicní obstrukční nemoc (CHOPN) a idiopatickou plicní fibrózu (IPF). U zkoumaných pacientů s primární diagnózou CHOPN bylo procentuální zastoupení základních buněk imunitního systému (lymfocyty, monocyto/makrofágová linie, neutrofil) v jejich vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny bylo 66,2 % **lymfocyt**, 27,9 % buněk **monocyto/makrofágové linie** a 5,9 % **neutrofil**.

U pacientů s primární diagnózou IPF bylo procentuální zastoupení základních buněk imunitního systému: 71,3 % **lymfocyt**, 20,8 % buněk **monocyto/makrofágové linie** a 7,9 % **neutrofil**.

Je patrné, že mezi pacienty po transplantaci plic s primární diagnózou CHOPN a pacienty po transplantaci plic s primární diagnózou IPF nebyl statisticky významný rozdíl (viz Obrázek 15).

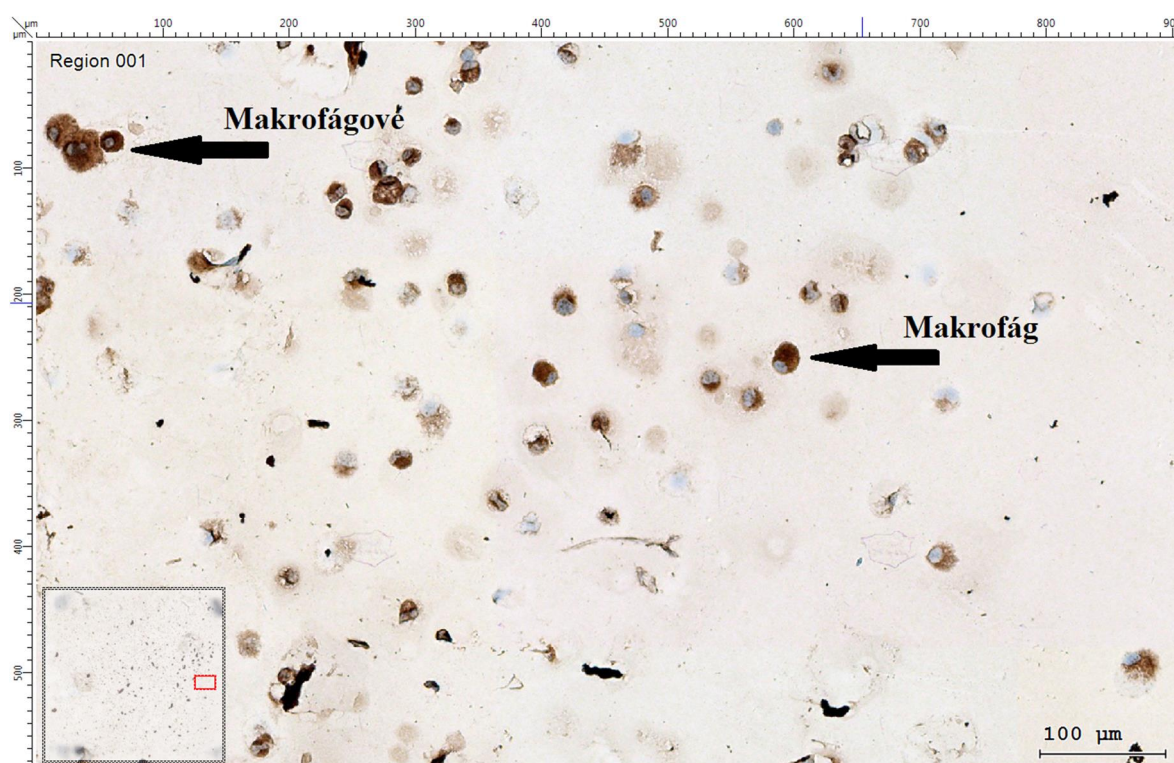


Obrázek 15: Srovnání zastoupení základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině u pacientů po transplantaci plic s odlišnými primárními diagnózami. Legenda: CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc, IPF – idiopatická plicní fibróza.

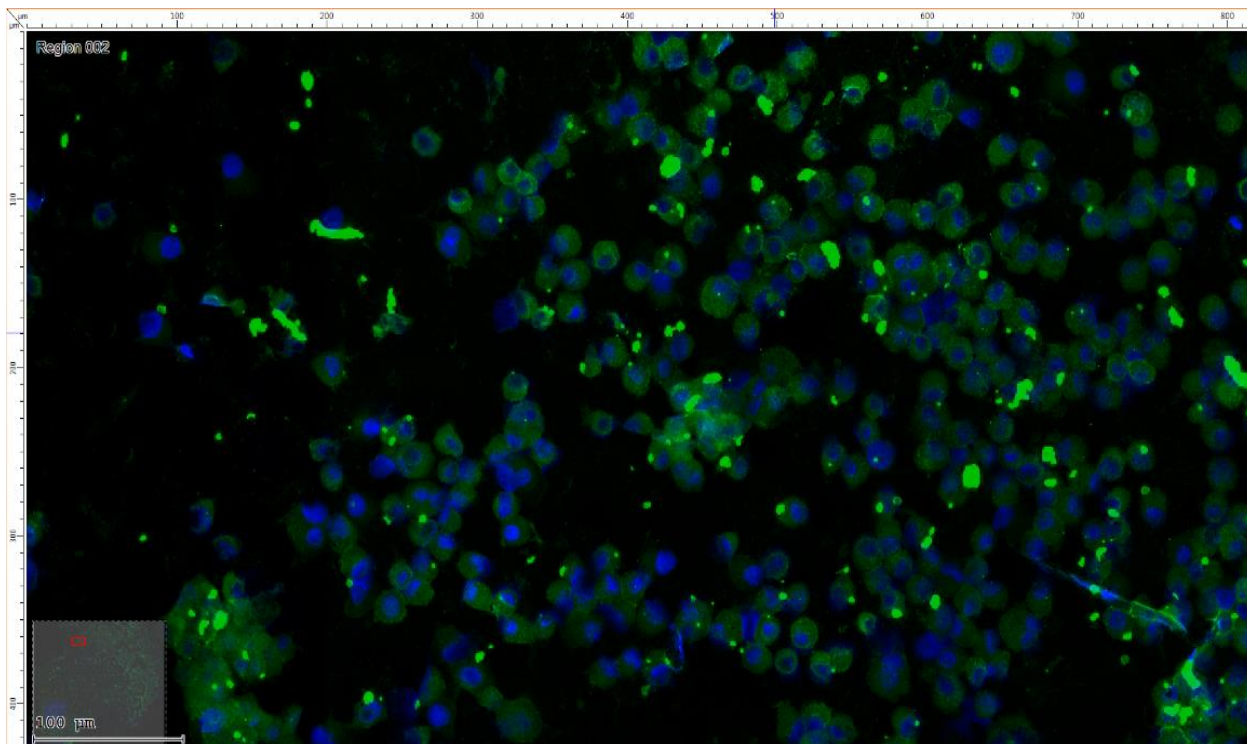
5.3 Cytospiny a mikroskopie

Cytospinové preparáty byly připraveny z vybraných studovaných vzorků bronchoalveolární lavážní tekutiny získané od pacientů po transplantaci plic. S využitím imunocytochemického barvení pomocí systému EnVision™+ Dual Link System-HRP (DAKO) byl pozorován marker CD68 značící přítomnost makrofágů a pomocí barvení hematoxylinem byla pozorována buněčná jádra (viz Obrázek 16).

CD68 marker byl také detekován pomocí fluorescenčního barvení s využitím primární monoklonální protilátky proti lidskému znaku CD68 a fluoroforem (Alexa Fluor® 488) značené sekundární polyklonální protilátky. Jádra buněk byla v tomto případě nabarvena s využitím DAPI (viz Obrázek 17).



Obrázek 16: Snímek cytospinu s detekovanými makrofágy (pomocí markeru CD68, hnědé zbarvení). Modrá barva představuje buněčná jádra barvená pomocí hematoxylinu.



Obrázek 17: Snímek cytospinu nabarveného fluorescenčním barvivem pro vizualizaci markeru CD68, a to pomocí sekundární protilátky nesoucí fluorofor Alexa Fluor® 488 (zelená barva). Modrá barva představuje buněčná jádra barvená DAPI.

5.4 Vyhodnocení celkové bun nosti a po tu alveolárních makrofág a dal-ích imunitních bun k v plicních biopsiích získaných od pacient po transplantaci plic

Tká ové preparáty bioptovaných plic získaných od pacient po transplantaci plic byly barvené hematoxylinem, díky kterému bylo možné stanovit celkový počet bun k u všech studovaných podskupin pacient . Dále byly díky imunohistochemickému barvení cílenému na markery CD68 a CD20 hodnoceny po ty alveolárních makrofág (CD68⁺) a B-lymfocyt (CD20⁺). Pomocí rozměrů analyzované plochy tká ových preparátů a zjištěního počet bun k byla určena hustota bun k. Hodnoty výše uvedených analýz jsou znázorněny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Vyhodnocení početů a hustot bun k u jednotlivých podskupin pacientů .

	R	NR
Průměrná analyzovaná plocha (± SD)	6,18 mm² (± 4,14)	5,45 mm² (± 3,76)
Průměrný počet všech bun k (± SD)	47 781 (± 46 628)	23 698 (± 18 286)
Průměrná hustota bun k/mm² (± SD)	7 328 (± 2 860)	4 696 (± 1 365)
Průměrná hustota CD68⁺ bun k/mm² (± SD)	52 (± 24)	21 (± 25)

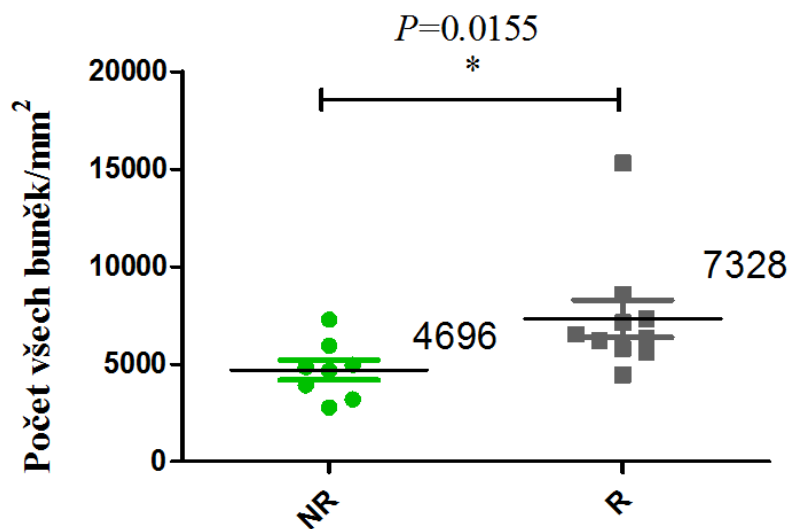
Pozn.: R – skupina pacientů s chronickou rejekcí

NR – skupina pacientů bez rejekce plicního transplantátu

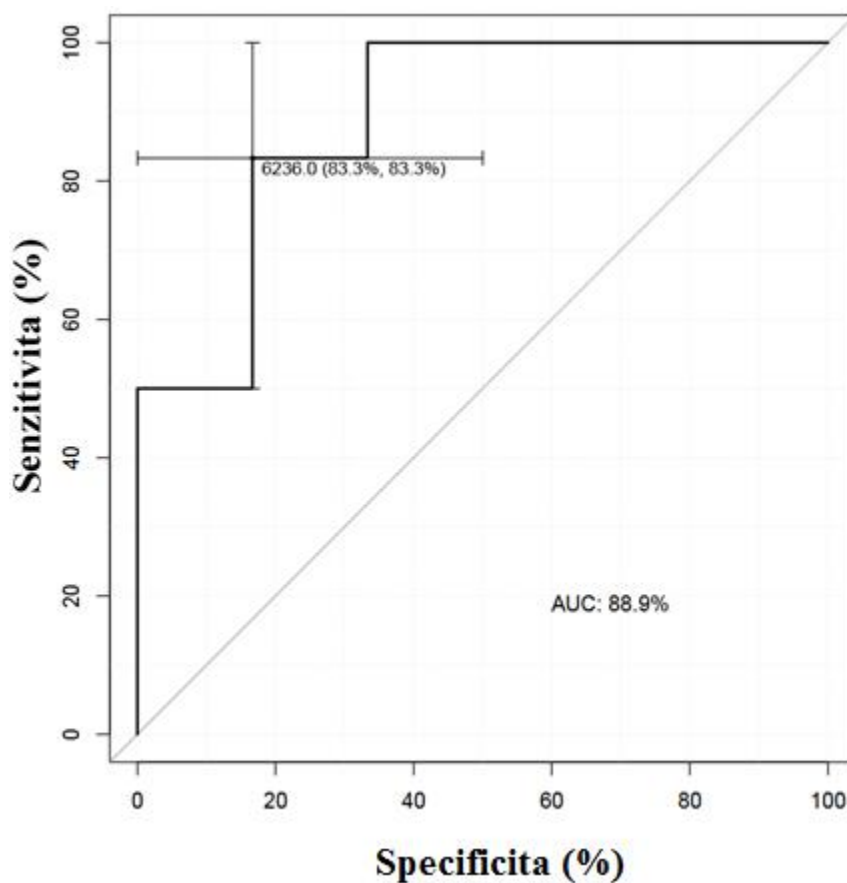
SD – směrodatná odchylka

5.4.1 Vyhodnocení celkové bun nosti

Při vyhodnocování celkové bun nosti v tká ových preparátech u studovaných podskupin pacientů po transplantaci plic (viz Tabulka 6) bylo zjištěno, že skupina pacientů s chronickou rejekcí plic vykazovala signifikantně vyšší počet všech bun k na 1 mm² ($P=0,0155$) než skupina pacientů bez rejekce plicního transplantátu (viz Obrázek 18). Významné rozdíly celkové bun nosti v tká ových preparátech u studovaných podskupin pacientů po transplantaci plic rovněž potvrzuje vypočítaná ROC křivka (viz Obrázek 19 a Tabulka 7). Hodnota testu podle plochy pod křivkou (88,9 %) ROC křivky značí vysokou senzitivitu a selektivitu testu.



Obrázek 18: Počet buněk na 1 mm² u jednotlivých skupin pacientů po transplantaci plic (NR – pacienti bez rejekce, R – pacienti s chronickou rejekcí plic).



Obrázek 19: ROC křivka testu pro srovnání celkové buněčnosti u studovaných podskupin pacientů.

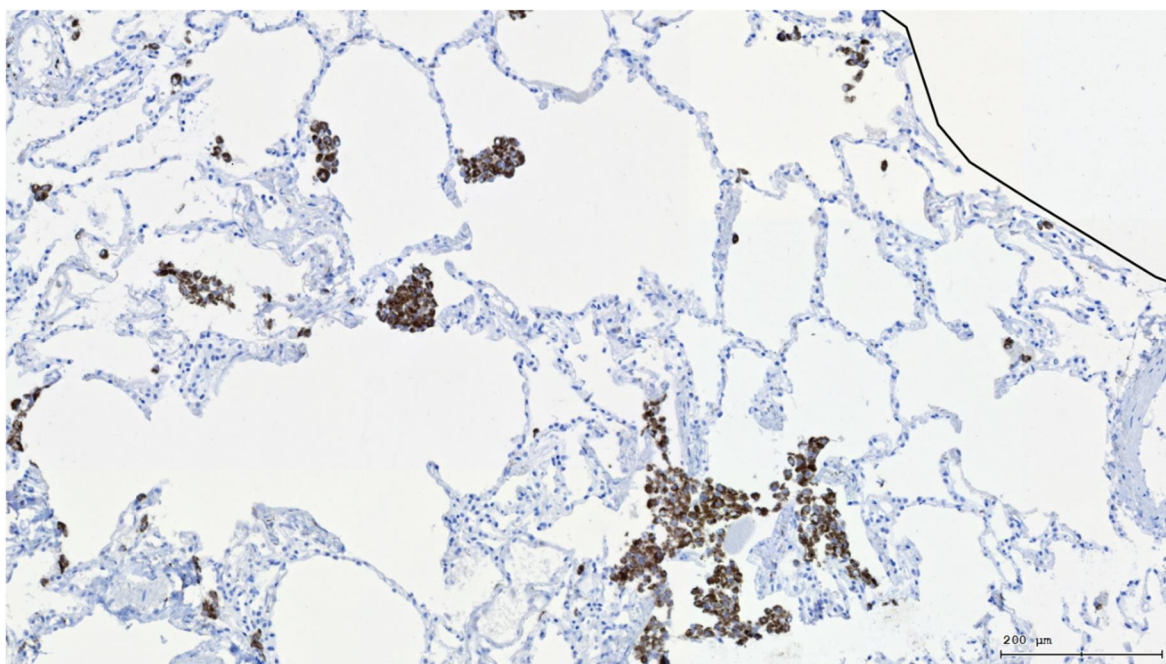
Tabulka 7: Atributy testu srovnání celkové buněčnosti u studovaných podskupin pacientů.

	Hodnota	Konfidenční interval
Senzitivita	0,83	0,36-0,99
Specifita	0,83	0,36-0,99
AUC (%)	88,89	69,41-100
Přesnost	0,83	0,52-0,98
Pozitivní prediktivní hodnota	0,83	0,36-0,99
Negativní prediktivní hodnota	0,83	0,36-0,99
Poměr skutečné pozitivity	5	0,81-31,01
Poměr falešné pozitivity	0,2	0,03-1,24
Cutpoint	6236	

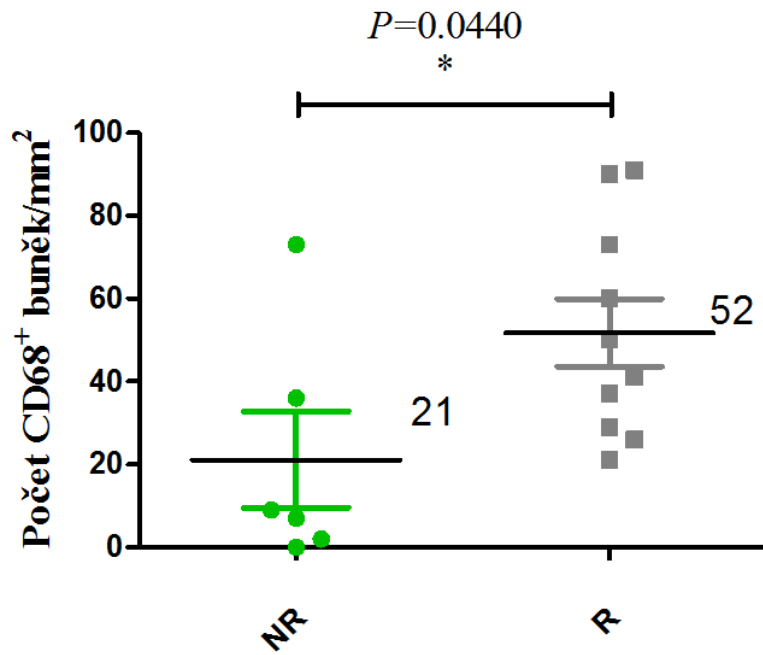
Pozn.: AUC – plocha pod křivkou

5.4.2 Vyhodnocení počtu alveolárních makrofágů

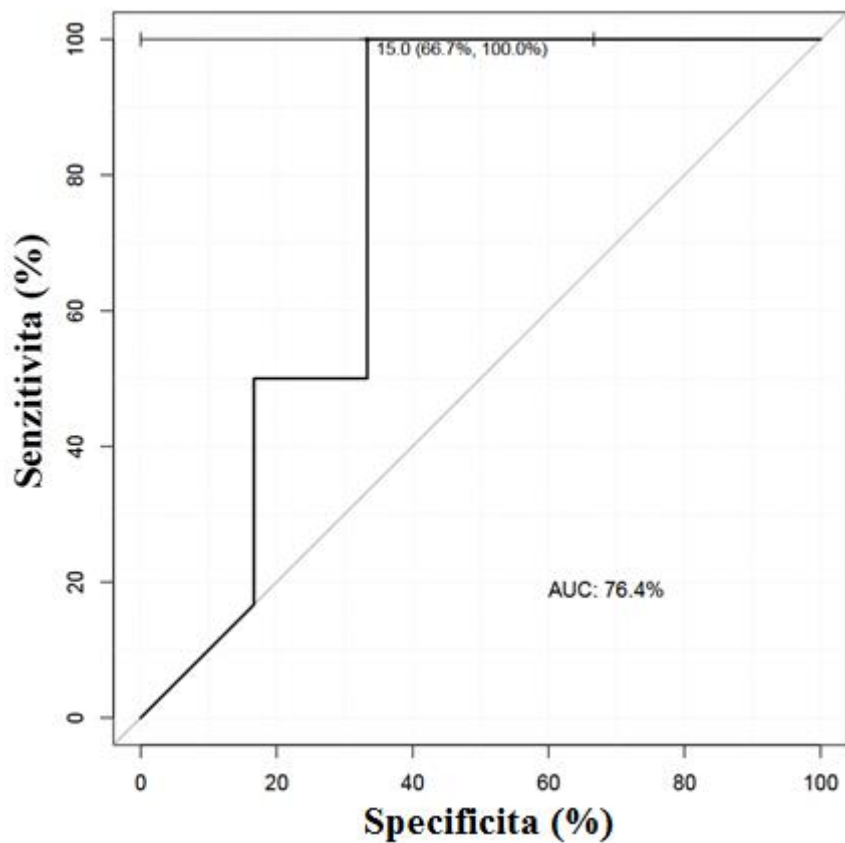
Na základě počtu alveolárních makrofágů (CD68⁺; viz Obrázek 20) a analyzované plochy tkáňových preparátů byla zjištěna hustota alveolárních makrofágů v tkáních na 1 mm² (viz Tabulka 6). Skupina pacientů s chronickou rejekcí plic vykazovala signifikantně vyšší počet alveolárních makrofágů na 1 mm² než skupina pacientů bez rejekce plicního transplantátu ($P=0,0440$; viz Obrázek 21). Hodnoty ROC křivky ukazují na dobrou kvalitu testu podle AUC, značící vysokou senzitivitu a selektivitu testu (76,4 %) (viz Obrázek 22 a Tabulka 8).



Obrázek 20: Alveolární makrofágy pozitivní na studovaný marker CD68 (hnědá).



Obrázek 21: Počet alveolárních makrofágů na 1 mm² u jednotlivých skupin pacientů po transplantaci plic (NR – pacienti bez rejekce, R – pacienti s chronickou rejekcí plic).



Obrázek 22: ROC křivka testu pro srovnání počtu alveolárních makrofágů u studovaných podskupin pacientů.

Tabulka 8: Atributy testu srovnání po tu alveolárních makrofág u studovaných podskupin pacient .

	Hodnota	Konfiden ní interval
Senzitivita	1,00	0,54-1,00
Specifcita	0,67	0,22-0,96
AUC (%)	76,39	44,04-100,00
P esnost	0,83	0,52-0,98
Pozitivní prediktivní hodnota	0,75	0,35-0,97
Negativní prediktivní hodnota	1,00	0,40-1,00
Pom r skute né pozitivivity	3,00	0,97-9,3
Pom r fale-né pozitivivity	0,00	0,00
Cutpoint	15	

Pozn.: AUC ó plocha pod k ivkou

5.4.3 Vyhodnocení dal-ích imunitních bun k

P í vyhodnocování po tu B-lymfocyt v tká ových preparátech bylo zji-t no, fle z celého souboru pacient po transplantaci plic byli na tento studovaný znak pozitivní pouze dva pacienti z každé podskupiny pacient . Podobného výsledku bylo dosaeno p í hodnocení dal-ích klinicky b fln pouflíváných znak CD4, CD8 a znaku UCHL. Z tohoto d vodu nebylo moflné provést statistické vyhodnocení získaných dat, a tedy relevantní analýzu t chto znak .

6 Diskuse

Transplantace plic je možností léčit by pro peliv vybrané pacienty v terminální fázi respiračního selhání u onemocnění plicního parenchymu i kardiálního selhání u primární a sekundární plicní hypertenze. Z dlouhodobého hlediska funkce transplantovaného \rightarrow pu je jejím limitujícím faktorem chronická rejekce plic (van Herck *et al.*, 2017; Lischke, 2006; Verleden *et al.*, 2015). V současné době stále neexistují spolehlivé prognostické markery, díky kterým by bylo možné určit skupinu rizikových pacientů s vysokou pravděpodobností rejekce \rightarrow pu. Ukazuje se, že analýza buněčného profilu bronchoalveolární lavážní tekutiny a plicních biopsií by mohly významně přispět k určení pacientů s rizikem této závažné komplikace (Nayak *et al.*, 2016; Verleden, 2007). Tato práce se proto zaměřila na studium buněčnosti a zastoupení imunitních populací v bronchoalveolární lavážní tekutině a plicních biopsiích získaných během protokolárních odběrů u pacientů po transplantaci plic.

V první části této diplomové práce byl ve vzorcích bronchoalveolární lavážní tekutiny získaných od pacientů po transplantaci plic stanoven absolutní počet buněk imunitního systému. U našeho souboru pacientů se počet buněk pohyboval v rozmezí $79-368 \times 10^6/L$. V předchozích studiích byly zjištěny podobné, i mírně zvýšené počty leukocytů v bronchoalveolární lavážní tekutině u transplantovaných pacientů, a to $98-274 \times 10^6/L$ (Vanaudenaerde *et al.*, 2008) a $100-1700 \times 10^6/L$ (Ward *et al.*, 1998). Absolutní počty leukocytů v bronchoalveolární lavážní tekutině byly také hodnoceny u zdravých jedinců, kteří byli dále rozděleni na skupinu nekuřáckou ($48-180 \times 10^6/L$) a skupinu kuřáckou ($81-455 \times 10^6/L$), mezi nimiž byl zjištěn signifikantní rozdíl (Heron *et al.*, 2012). Z uvedených hodnot vyplývá, že i našimi transplantovanými pacienty mají zvýšené absolutní počty leukocytů oproti zdravým kontrolám. Zda-li počet buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině souvisí s vyšším rizikem rejekce bude určeno dále tímto studiem.

Dále byly hodnoceny základní populace imunitního systému: lymfocyty, monocyty/makrofágová linie a neutrofilů v bronchoalveolární lavážní tekutině. V naší studii představovaly lymfocyty představující populaci buněk imunitního systému s průměrným zastoupením 41,9 %. Buňky monocyty/makrofágové linie se vyskytovaly v zastoupení 33,5 % a neutrofilů bylo ze všech hlavních populací imunitního systému nejméně, a to 15,1 %. V dřívejších studiích bylo popsáno zastoupení jednotlivých imunitních populací u dlouhodobě stabilních pacientů po transplantaci plic, které se pohybovalo okolo 5-19 % lymfocytů, 71-94 % makrofágů a 4-12 % neutrofilů (Slebos *et al.*, 2002; Tiroke *et al.*, 1999). Během akutní rejekce \rightarrow pu však byla zjištěna zvýšená variabilita v relativním počtu

lymfocyt (10-60 %), makrofág (30-70 %) a také zvýšení podílu neutrofilních granulocyt (15-30 %) (Greenland *et al.*, 2014; Tiroke *et al.*, 1999). Naměřené hodnoty u našich pacientů byly velmi variabilní: lymfocyty (3,3-84,8%), makrofágy (5,4-81,8 %) a neutrofilních granulocytů (1,5-60,8 %). Důvodem této heterogenity může být rozdílná primární diagnóza, klinický stav pacienta, rozdílná léčba a další parametry, které budou vyhodnoceny po získání dat u většího souboru pacientů.

Hlavní populací, která je v bronchoalveolární lavážní tekutině zastoupena, je monocyto/makrofágová linie. Z našich výsledků vyplývá, že část studovaných pacientů, u kterých bylo zjištěno zastoupení této populace nad 70 %, vykazuje fenotyp dlouhodobě stabilních pacientů bez rizika rejekce transplantovaného orgánu (Slebos *et al.*, 2002; Tiroke *et al.*, 1999). Zatímco pacienti s nízkým procentuálním zastoupením buněk monocyto/makrofágové linie mohou patřit do skupiny s vyšším rizikem rejekce (Greenland *et al.*, 2014; Tiroke *et al.*, 1999). Tuto hypotézu bude nutno ověřit v asociaci s klinickými parametry u jednotlivých pacientů.

Dále jsme provedli detailnější analýzu subpopulací lymfocytů, kdy bylo zjištěno majoritní zastoupení CD3⁺ T-lymfocytů (70,6 %). V rámci T-lymfocytů byl v naší skupině pacientů zaznamenán poměr průměrného zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů $1,0 \pm 0,1$. Již dříve publikované poměry CD4⁺ a CD8⁺ populací se liší mezi jednotlivými studii a nachází se v rozmezí mezi $0,8 \pm 0,5$ (Griffith *et al.*, 1988) a $3,0 \pm 1,1$ (Tiroke *et al.*, 1999). V literatuře se uvádí, že CD4⁺ T-lymfocyty hrají důležitou roli v patogenezi rejekčních komplikací, a to díky prezentaci alloantigenů pomocí HLA antigenů II. třídy. Jejich vyšší podíl se nachází především u pacientů s rejekcí (Duncan *et al.*, 2002). Stejně autoři uvádí, že nenalezli rozdíly mezi CD8⁺ T-lymfocyty mezi pacienty bez komplikací a s chronickou obliterující bronchiolitidou (Duncan *et al.*, 2002).

Důležitou populací CD4⁺ T-lymfocytů u transplantovaných plic jsou regulační T-lymfocyty zajišťující transplantaci toleranci a jejich snížené množství (<3,2 %) bylo asociováno s rozvojem chronické rejekce (Bhorade *et al.*, 2010). Další studie poukázala na spojitost mezi přítomností specifické populace regulačních T-lymfocytů (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CCR7⁺) a dlouhodobé stability plicního orgánu (Gregson *et al.*, 2010). U našich pacientů jsme našli nízké zastoupení regulačních T-lymfocytů 2,3 %.

Další významnou populací v bronchoalveolární lavážní tekutině, kterou jsme sledovali v rámci lymfocytů, byly NK buňky s průměrným zastoupením 12,4 %. Greenland *et al.* (2014) ve své studii popsal asociaci mezi podílem NK buněk

v bronchoalveolární laváční tekutině a akutní rejekcí t pu a infekcí po transplantaci plic. Pacienti s infekcí po transplantaci plic vykazovali procentuální zastoupení NK buněk nad 5 %, zatímco pacienti s rejekcí t pu hodnoty pod 5 %. Stejně nálezy byly také popsány u myších modelů popisujících významnou roli NK buněk v toleranci v i transplantovanému t pu a zároveň ochraně proti chronické rejekci plic (Jungraithmayr *et al.*, 2013). Dále jsme se zaměřili na B-lymfocyty, které jsme u našich pacientů detekovali s průměrným zastoupením 0,8 %. Je všeobecně známo, že B-lymfocyty jsou v bronchoalveolární laváční tekutině zdravých kontrol zastoupeny pouze minoritně. Jejich zastoupení obvykle nepřesahuje 5 % (Harbeck, 1998). V bronchoalveolární laváční tekutině transplantovaných plic je počet B-lymfocytů podobný, nicméně jejich procentuální nárůst po transplantaci plic byl asociován s akutní rejekcí t pu (Greenland *et al.*, 2014).

Dále jsme sledovali dva pacienty po transplantaci plic v ase . U jednoho z nich nedošlo ke změně v zastoupení hlavních imunitních populací, ovšem druhý pacient vykazoval nárůst v počtu buněk monocyto/makrofágové linie a neutrofilů. Slebos *et al.* (2002) ve své studii analyzoval skupinu pacientů po transplantaci plic z hlediska změn v imunitních populacích v době 75, 76-400 a 401-800 dní po transplantaci, při němž zaznamenal pouze mírný pokles lymfocytární populace. Nárůst počtu neutrofilů v ase pozorovaný u námi studovaného pacienta může svědčit o infekčních komplikacích nebo progresivnímu zánětlivému procesu (Benigni *et al.*, 2014; Bonnet *et al.*, 2004) a předpokládat infekční komplikace nebo možnost rejekce. Zároveň byl u obou pacientů zaznamenán snižující se poměr CD4^+ a CD8^+ T-lymfocytárních populací. Tento výsledek byl popsán i v dřívější studii, kdy se při bývajícími ase po transplantaci plic klesal poměr $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ lymfocytů z důvodu snižujícího se počtu CD4^+ buněk v bronchoalveolární laváční tekutině (Crim *et al.*, 1996). Studium změn v zastoupení buněk v různých obdobích po transplantaci může významně přispět k pochopení časové osy imunitních mechanismů u transplantovaných jedinců.

Při srovnání základních imunitních populací v bronchoalveolární laváční tekutině získané od pacientů po transplantaci plic s rozdílnými primárními diagnózami CHOPN a IPF nebyl zjištěn významný rozdíl. Tato data bude nutno ověřit na větším souboru pacientů.

V další části naší studie jsme se zaměřili na analýzu celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích získaných od pacientů po transplantaci plic pomocí inovativní automatické zobrazovací a analyzáční

technologie TissueFAXS. Významná v t-í celková bun nost plicních biopsií byla prokázána u podskupiny pacient s chronickou rejekcí plic v porovnání s pacienty, u kterých k rejekci plicního transplantátu nedošlo. Dle našich znalostí nebyl tento parametr zatím u plicních tkání pacient po transplantaci plic studován. Výhodou systému TissueFAXS je možnost automatické analýzy nadstandardních ploch bioptované tkán (desítky mm²), což klasickou mikroskopickou technikou není možné. Naše studie naznačuje využitelnost automatické analýzy oblastí bioptované tkán pomocí automatického zobrazovacího a analyzáčního systému TissueFAXS.

Naše studie tak poukazuje na souvislost nízké celkové bun nosti plicní tkán u pacient bez rejekce plicního transplantátu s možnou dobrou prognózou po transplantaci plic. Při porovnání počtu plicních makrofágů byl také pozorován rozdíl u studovaných podskupin pacient po transplantaci plic, kdy vyšší výskyt makrofágů byl u pacient s rejekcí. Tyto nálezy jsou ve shodě se současnou teorií vzniku chronické rejekce, kdy se předpokládá důležitá role donor-specifických protilátek (DSA) (Hachem *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016; Nayak *et al.*, 2016). Ukazuje se, že klíčovou úlohu v tvorbě DSA hrají donor-specifické makrofágy (Liu *et al.*, 2016; Nayak *et al.*, 2016). Důležitým je i nález, že 94-100 % AM přítomných v bronchoalveolární lavážní tekutině bylo odvozeno od dárce a AM od příjemce nebyly detekovány vůbec (Nayak *et al.*, 2016). Nayak *et al.* (2016) navíc prokázal, že i po 3,5 letech po transplantaci je většina AM (>87 %) v bronchoalveolární lavážní tekutině plicí původem od dárce. Především je potřeba naše výsledky potvrdit na větším souboru pacientů, ukazuje se, že vyhodnocení celkové bun nosti a počtu makrofágů plicní tkáně by mohlo být vhodným prognostickým markerem u pacientů po transplantaci plic.

Naše studie prokázala, že charakterizace komplexního bun ěného profilu bronchoalveolární lavážní tekutiny a plicních biopsií, včetně markerů aktivity, může přispět k identifikaci rizikových pacientů, u kterých hrozí časný nástup chronické rejekce a kteří by profitovali z individualizace imunosupresivního režimu. Naše pilotní nálezy musí být ověřeny na větším souboru pacientů a podskupinách dle klinických a laboratorních parametrů.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byly ve vzorcích bronchoalveolární laváční tekutiny získaných od pacientů po transplantaci plic stanoveny absolutní počty buněk a základní populace buněk imunitního systému. Lymfocyty představovaly největší populaci buněk imunitního systému, poté byly monocyty/makrofágové linie a nejméně bylo ze všech hlavních populací imunitního systému neutrofilů. Detailnější analýzou subpopulací lymfocytů bylo zjištěno majoritní zastoupení CD3⁺ T-lymfocytů, u kterých bylo zaznamenáno shodně přibližné zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů. Minoritními populacemi lymfocytů obsaženými v bronchoalveolární laváční tekutině byly NK buňky a B-lymfocyty. U dvou pacientů po transplantaci plic byla sledována změna v zastoupení základních imunitních populací v čase. Zastoupení základních imunitních populací bylo rovněž stanoveno u pacientů po transplantaci plic s rozdílnými primárními diagnózami.

Další část diplomové práce se zaměřila na analýzu celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů a dalších imunitních buněk v plicních biopsiích získaných od pacientů po transplantaci plic. U těchto pacientů bylo známo, zda-li došlo k rozvoji chronické rejekce plic, nebo se jednalo o pacienty, u kterých k rejekci nedošlo. Inovativní technikou automatického zobrazovacího a analyzačního systému TissueFAXS byla zjištěna signifikantní změna v celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů plicních biopsií u podskupiny pacientů s chronickou rejekcí plic v porovnání s pacienty, u kterých k rejekci plicního transplantátu nedošlo.

Akoli je potřeba naše nálezy potvrdit na větší skupině pacientů, ukazuje se, že vyhodnocení celkové buněčnosti a počtu alveolárních makrofágů plicní tkáně by mohlo být vhodným prognostickým markerem u pacientů po transplantaci plic. Naše nálezy také dokazují využitelnost automatické analýzy oblastí biopsované tkáně pomocí automatického zobrazovacího a analyzačního systému TissueFAXS.

8 Seznam poufíté literatury

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017): Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2): 163-176.
- Aigner, C., Klepetko, W. (2017): Lung transplantation. In *Cardiac Surgery*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1061-1077.
- BD FACSCanto II. In: HSR Research [online] Milano: Ospedale San Raffaele, c2018 [nav-tíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z: <http://research.hsr.it/en/core-facilities/fractal/bd-facscanto-ii.html>.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., Leval, L.D., Van Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P.V., Moser, M., Lekeux, P., Bureau, F. (2009): Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *Journal of clinical investigation*, 119(12): 3723-3738.
- Benigni, G., Dimitrova, P., Antonangeli, F., Sanseviero, E., Milanova, V., Blom, A., Van Lent, P., Morrone, S., Santoni, A., Bernardini, G. (2017): CXCR3/CXCL10 axis regulates neutrophil-NK cell cross-talk determining the severity of experimental osteoarthritis. *The Journal of Immunology*, 160:1359.
- Bhorade, S.M., Chen, H., Molinero, L., Liao, C., Garrity, E.R., Vigneswaran, W.T., Shilling, R., Sperling, A., Chong, A., Alegre, M.L. (2010): Decreased percentage of CD4+ FoxP3+ cells in bronchoalveolar lavage from lung transplant recipients correlates with development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*, 90(5): 540.
- Bonnet C.S., Walsh D.A. (2004): Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44(1): 76-86.
- Brown, M., Wittwer, C. (2000): Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*, 46(8): 1221-1229.
- Bushnell, T. (2016): 3 Flow Cytometry Gates That Will Improve The Accuracy Of Your FACS Data Analysis. In: *Expert Cytometry* [online] United States: Expert Cytometry, [nav-tíveno dne 3. 7. 2018]. Dostupné z <https://expertcytometry.com/3-flow-cytometry-gates-that-will-improve-the-accuracy-of-your-facs-data-analysis/>.
- Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez, X., Didier, E.S., Kuroda, M.J. (2014): In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages

- in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *The Journal of Immunology*, 192(6): 2821-2829.
- Carter, N.P., Ormerod, M.G. (2000): Introduction to the principles of flow cytometry. *Flow cytometry: a practical approach*, 229: 1.
- Conical Bottom Centrifuge Tubes. In: Global Nasco. Catalogs for Education, Health, Agriculture, Industry [online] Global Nasco [nav-tívno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <http://www.globalnasco.com/product/SB45966M>.
- Crim, C., Keller, C.A., Dunphy, C.H., Maluf, H.M., Ohar, J.A. (1996): Flow cytometric analysis of lung lymphocytes in lung transplant recipients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(3): 1041-1046.
- CytoclipĀ . In: American MasterTech [online] AMTS, c2018 [nav-tívno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.americanmastertech.com/store/Main.aspx?p=ItemDetailStyles&item=CYS14C&cat=CY>.
- Data analysis. In: Journey Mexico [online] [nav-tívno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.journeymexico.com/data-analysis-of>.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R. (2013): Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, 14(10): 986-995.
- Duncan, S.R., Leonard, C., Theodore, J., Lega, M., Girgis, R.E., Rosen, G.D., Theofilopoulos, A. (2002): Oligoclonal CD4+ T cell expansions in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(10): 1439-1444.
- Erythrocyte ó Very hypotonic. In: SMART ó Servier Medical ART - 3000 free medical images [online] Servier Medical Art [nav-tívno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z https://smart.servier.com/smart_image/erythrocyte-11/.
- Farrar, C.A., Kupiec-Weglinski, J.W., Sacks, S.H. (2013): The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(10): a015479.
- Givan, A.L. (2013): *Flow cytometry: first principles*. John Wiley & Sons.
- Greenland, J.R., Jewell, N.P., Gottschall, M., Trivedi, N.N., Kukreja, J., Hays, S.R., Singer, J.P., Golden, J.A., Caughey, G.H. (2014): Bronchoalveolar lavage cell immunophenotyping facilitates diagnosis of lung allograft rejection. *American Journal of Transplantation*, 14(4): 831-840.
- Gregson, A.L., Hoji, A., Palchevskiy, V., Hu, S., Weigt, S.S., Liao, E., Derhovanessian, A., Sagar, R., Song, S., Elashoff, R., Belperio, J.A., Yang, O.O. (2010): Protection

- against bronchiolitis obliterans syndrome is associated with allograft CCR7+ CD45RA⁺ T regulatory cells. *PLoS One*, 5(6): e11354.
- Griffith, B.P., Paradis, I.L., Zeevi, A., Rabinowich, H., Yousem, S.A., Duquesnoy, R.J., Dauber, J.H., Hardesty, R.L. (1988): Immunologically mediated disease of the airways after pulmonary transplantation. *Annals of surgery*, 208(3): 371.
- Hachem, R.R., Yusen, R.D., Meyers, B.F., Aloush, A.A., Mohanakumar, T., Patterson, G.A., Trulock, E.P. (2010): Anti-human leukocyte antigen antibodies and preemptive antibody-directed therapy after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 29(9): 973-980.
- Harbeck, R.J. (1998): Immunophenotyping of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(3): 271-277.
- Heron, M., Grutters, J.C., Ten Dam-Molenkamp, K.M., Hijdra, D., Van Heugten-Roeling, A., Claessen, A.M.E., Ruven, H.J.T., Van Den Bosch, J.M.M., Van Velzen-Blad, H. (2012): Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clinical & Experimental Immunology*, 167(3): 523-53.
- Human Pluripotent Stem Cell Marker Antibody Panel. In: Pluripotent Stem Cell Antibody Panel (SC008): R&D Systems [online] R&D Systems [nav-tíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/sc008.pdf>.
- Chambers, D.C., Yusen, R.D., Cherikh, W.S., Goldfarb, S.B., Kucheryavaya, A.Y., Khusch, K., Lewey, B.J., Lund, L.H., Meiser, B., Rossano, J.W., Stehlik, J. (2017): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Reportô 2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 36(10): 1047-1059.
- IHC Immunodetection. In: Thermo Fisher Scientific [online] [nav-tíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html>.
- Jungraithmayr, W., Codarri, L., Bouchaud, G., Krieg, C., Boyman, O., Gyölvézi, G., Becher, B., Weder, W., Münz, C. (2013): *American journal of respiratory and critical care medicine*. 187(12): 1349-59.
- Kolek, V., Kaák, V., Vaáková, M. (2014): *Pneumologie*, 2. vydání. Maxdorf Praha, 261-264.

- Kooperující onkologická skupina Kraje Vysočina. In: Nemocnice Jihlava [online] Nemocnice Jihlava [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.nemji.cz/kooperujici-onkologicka-skupina-kraje-vysocina/ms-6907/p1=6907>.
- Koordinace státní transplantací. [online] [navštíveno dne 10. 1. 2018] Dostupné z <http://www.kst.cz/plice-se-v-cesku-transplantuji-20-let-novou-sanci-dostalo-369-lidi/>.
- Kotloff, R.M., Thabut, G. (2011): Lung transplantation. American journal of respiratory and critical care medicine, 184(2): 159-171.
- Lischke, R. (2006): Imunosupresivní terapie u pacientů po transplantaci plic a její komplikace. Disertační práce. 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha.
- Lischke, R. Transplantace plic u dětí v České republice. [přednáška]. Olomouc: XXVI. Moravskoslezské dny pneumologie, 6. 10. 2017.
- Liu, Y., Kloc, M., Li, X.C. (2016): Macrophages as effectors of Acute and Chronic allograft injury. Current transplantation reports, 3(4): 303-312.
- Lokalizace provedení bronchoalveolární laváže a bronchiálního výplachu. In: Zdraví.Euro.cz [online] Postgraduální medicína, c2010 [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842>.
- McMahon, L. (2018): Hospital staff suspended after doctors operate on wrong patient. In: Kenyatta National Hospital: Wrong patient sent in for brain surgery [online] Australia: News, [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.news.com.au/lifestyle/health/health-problems/hospital-staff-suspended-after-doctors-operate-on-wrong-patient/news-story/87ef302054427bfa01526b8453c2cac2>.
- Meyer, K.C., Raghu, G., Baughman, R.P., Brown, K.K., Costabel, U., Du Bois, R.M., Drent, M., Haslam, P.L., Kim, D.S., Nagai, S., Rottoli, P., Saltini, C., Selman, M., Strange, C.H., Wood, B. (2012): An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. American journal of respiratory and critical care medicine, 185(9): 1004-1014.

- Mikroskopické preparáty 25 ks anatomie. In: Mikroskop, mikroskopy [online] Mikroskop-shop.cz [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.mikroskop-shop.cz/preparaty-mikroskopicke-25-anatomie-p1519>.
- Murphy, J., Summer, R., Wilson, A.A., Kotton, D.N., Fine, A. (2008): The prolonged life-span of alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 38(4): 380-385.
- Nayak, D.K., Zhou, F., Xu, M., Huang, J., Tsuji, M., Hachem, R., Mohanakumar, T. (2016): Long-Term Persistence of Donor Alveolar Macrophages in Human Lung Transplant Recipients That Influences Donor-Specific Immune Responses. *American Journal of Transplantation*, 16(8): 2300-2311.
- Nolla, H. (2013): Basic Principles in Flow Cytometry. [online] [navštíveno 23. 06. 2018] Dostupné z http://flowcytometry.berkeley.edu/Basic_Information.html.
- NovoCyte by ACEA Biosciences, Inc. In: SelectScience ó Trusted Information for Laboratory Scientists [online] SelectScience, c2018 [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.selectscience.net/acea-biosciences,-inc/novocyte/203654>.
- Pozniak, J., Kolařík, J., Myšková, D., Týmonek, J., Schützner, J., Pařko, P., Lischke, R. (2015): První retransplantace plic v české republice. *Rozhledy v chirurgii*, 94: 135-138.
- Products. In: Quality Biological [online] Quality Biological, [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z https://www.qualitybiological.com/product/cell_strainer__40um__blue__bulk_packed__sterile/.
- Reams, B.D., McAdams, H.P., Howell, D.N., Steele, M.P., Davis, R.D., Palmer, S.M. (2003): Posttransplant lymphoproliferative disorder: incidence, presentation, and response to treatment in lung transplant recipients. *Chest*, 124(4): 1242-1249.
- Sato, M., Waddell, T.K., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Hwang, D.M., Haroon, A., Keshavjee, S. (2011): Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(7): 735-742.
- Sharma, A.K., Fernandez, L.G., Awad, A.S., Kron, I.L., Laubach, V.E. (2007): Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- α during pulmonary ischemia-reperfusion injury.

- American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 293(1): L105-L113.
- Schneberger, D., Aharonson-Raz, K., Singh, B. (2011): Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell and tissue research*, 343(1): 97-106.
- Škorpíková, J., Kolaříková, R. (2004): Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT) [online] [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z http://www.pneumologie.cz/soubory/BAL_Standard_Studia_po_recenzi_8_2004.pdf.
- Slebos, D.J., Scholma, J., Boezen, H.M., Koeter, G.H., Van Der Bij, W., Postma, D.S., Kauffman, H.F. (2002): Longitudinal profile of bronchoalveolar lavage cell characteristics in patients with a good outcome after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165:5016507.
- Spectrumviewer. In: BD Biosciences USA [online] [navštíveno dne 19. 7. 2018]. Dostupné z <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>.
- Steinmüller, C., Franke-Ullmann, G., Lohmann-Matthes, M.L., Emmendorffer, A. (2000): Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon- γ : comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 22(4): 481-490.
- Sugarbaker, D.J., Bueno, R., Colson, Y.L., Jaklitsch, M.T., Krasna, M., Mentzer, S.J. (2015): *Adult chest surgery*. New York: McGraw-Hill Education.
- Tiroke, A.H., Bewig, B., Haverich, A. (1999): Bronchoalveolar lavage in lung transplantation: state of the art. *Clinical transplantation*, 13(2): 131-157.
- TissueFAXS Cell Analysis System. [online] [navštíveno dne 30. 9. 2017] Dostupné z <http://www.bga.su/info/TissueFAXS.pdf>.
- TissueFAXS Confocal PLUS SL of TissueGnostics. In: Accela to Accelerate your biomedical research [online] Accela [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.accela.eu/tissuegnostics/tissuefaxs-confocal-plus-sl>.
- TissueFAXS Plus. Center for Research Resources and Development of Kaohsiung Medical University. [online] Taiwan: K.M.U Center for Research Resources and Development, [navštíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné

z <https://crrd.kmu.edu.tw/index.php/en-GB/corelab/31-biomedical-imaging/166-tissuefaxs-plus>.

- TissueGnostics: HistoQuest ó Tissue Analysis Software. In: Accela ó Accelerate your biomedical research [online] Accela [nav-tíveno dne 11. 7. 2018]. Dostupné z <https://www.accela.eu/files/products/28/histoquest.pdf>.
- Tomí-ková, M., Sk i ková, J. (2010): Bronchoalveolární laváfl ó moflnosti a rizika provedení, interpretace n kterých výsledk . Postgraduální medicína [online] 12(5): 36-38 [nav-tíveno dne 11. 7. 2018]. ISSN 1212-4184. Dostupné z <https://zdravi.euro.cz/archiv/postgradualni-medicina-priloha/?id=3705>.
- Valentová Bartáková, L., Fila, TM, TMymonek, J., Lischke, R. (2014): Transplantace plic v eské republice. Postgraduální medicína, 2: 73-85.
- Van Herck, A., Verleden, S.E., Vanaudenaerde, B.M., Verleden, G.M., Vos, R. (2017): Prevention of chronic rejection after lung transplantation. *Journal of thoracic disease*, 9(12): 5472.
- Vanaudenaerde, B.M., Wuyts, W.A., Geudens, N., Nawrot, T.S., Vos, R., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E., Verleden, G.M. (2008): Broncho-alveolar lavage fluid recovery correlates with airway neutrophilia in lung transplant patients. *Respiratory medicine*, 102(3): 339-347.
- Venuta, F., Van Raemdonck, D. (2017): History of lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*, 9(12): 5458-5471.
- Verleden, G.M. (2007): The role of BAL in lung transplantation. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 13: S59-S62.
- Verleden, G.M., Vos, R., Vanaudenaerde, B., Dupont, L., Yserbyt, J., Van Raemdonck, D., Verleden, S. (2015): Current views on chronic rejection after lung transplantation. *Transplant International*, 28(10): 1131-1139.
- Villard, J. (2006): Immunity after organ transplantation. *Swiss medical weekly*, 136(5-6): 71-77.
- Ward, C., Snell, G.I., Zheng, L., Orsida, B., Whitford, H., Williams, T.J., Haydn Walters, E. (1998): Endobronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in stable lung transplant recipients and chronic rejection. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158(1): 84-91.