

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Imunofenotypy buněk bronchoalveolární lavážní tekutiny u pacientů po transplantaci plic a jejich vztah k rejekci**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Eliška Vroblová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.</b>
Rok:	2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Zuzany Mikulkové, Ph.D., s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

## Poděkování

V první řadě bych chtěla moc poděkovat své vedoucí Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D. za vedení při zpracování diplomové práce, cenné rady, vysvětlení dané problematiky, věnovaný čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat doc. Dr. Evě Kriegové a celému kolektivu Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie (přednosta prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci za jejich pozitivní přístup a ochotu. Zvláštní poděkování patří Mgr. Martinu Dihelovi a Mgr. Gabriele Gabčové za všestrannou pomoc a seznámení s metodikami v laboratoři. Poděkování patří MUDr. Janu Havlínovi, Ph.D. z III. Chirurgické kliniky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole (přednosta prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.) a také MUDr. Petru Jakubcovi, Ph.D. a MUDr. Monice Žurkové, Ph.D. z Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci (přednosta prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.) za poskytnutí biologického materiálu a klinická data.

Tato práce vznikla za podpory grantu Interní grantové agentury LF UP (LF UP\_2019\_014).

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Vrobová
Název práce	Imunofenotypy buněk bronchoalveolární lavážní tekutiny u pacientů po transplantaci plic a jejich vztah k rejekci
Typ práce	Magisterská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Transplantace plic je významnou léčebnou možností pro vybranou skupinu pacientů v terminálním stádiu plicních onemocnění. Následné komplikace, kam patří různé typy rejekcí a infekcí u pacientů po transplantaci plic komplikují dlouhodobé přežívání pacientů a jsou hlavními příčinami úmrtí. Stav transplantovaného štěpu u pacientů po transplantaci plic se posuzuje na základě transbronchiální biopsie štěpu. V současné době jsou vyhledávány nové neinvazivní diagnostické metody, které by určovaly rizikové pacienty s velkým rizikem výskytu rejekcí. Jednou z možností využití je imunofenotypizace buněk bronchoalveolární lavážní tekutiny od pacientů po transplantaci plic pomocí průtokové cytometrie.

V experimentální části práce byla provedena imunofenotypizace hlavních imunitních populací v bronchoalveolární lavážní tekutině odebrané pacientům po transplantaci plic neinvazivní metodou bronchoalveolární laváže. Pomocí průtokového cytometru bylo detekováno, že nejvíce zastoupenou hlavní populací imunitních buněk byly makrofágy, populace lymfocytů a neutrofilů tvořily minoritní zastoupení. Dále bylo analyzováno procentuální zastoupení populace T-lymfocytů, NK buněk, B-lymfocytů a subpopulace T-lymfocytů ( $CD4^+$  T-lymfocyty,  $CD8^+$  T-lymfocyty a  $CD4^+$  regulační T-lymfocyty) v bronchoalveolární lavážní tekutině.

V diplomové práci bylo dále porovnáváno procentuální zastoupení populací imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině u podskupin pacientů po transplantaci plic s odběrem v době akutní rejekce a bez akutní rejekce. Byly porovnány procentuální zastoupení populací imunitních buněk

v bronchoalveolární lavážní tekutině a v periferní krvi. Imunocytochemickým barvením buněk byly vizualizovány vybrané znaky na populaci makrofágů na cytopspinech.

Klíčová slova	Transplantace plic, imunofenotypizace, imunitní buňky, bronchoalveolární laváž, bronchoalveolární lavážní tekutina, cytopspiny
Počet stran	80
Počet příloh	-
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Bc. Eliška Vrobová
Title	Immunophenotype of cells in bronchoalveolar lavage fluid from lung transplant patients and the relationship with rejection
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.
The year of presentation	2019

### **Abstract**

Lung transplantation is a significant treatment option for a select group of patients having terminal lung diseases. Subsequent complications involving different types of rejections and infections in lung transplant patients prevent from long-term survival of those lung transplant patients and are the major causes of death. Status of transplant graft in lung transplant patients is assessed by transbronchial graft biopsy. New non-invasive diagnostic methods which would identify high-risk patients with a high risk of rejection are currently being sought. One of the options of the application is immunophenotyping of bronchoalveolar lavage fluid from lung transplant patients using flow cytometry.

The experimental part of the thesis performs the immunophenotyping of the major immune populations in bronchoalveolar lavage fluid that was taken from lung transplant patients by a noninvasive bronchoalveolar lavage method. Using a flow cytometer, it was detected that the most abundant major population of immune cells were macrophages, lymphocyte and neutrophil populations were minor. Furthermore, the percentage of T-lymphocytes, NK cells, B-lymphocytes and T-lymphocyte subpopulations ( $CD4^+$  T-lymphocytes,  $CD8^+$  T-lymphocytes and  $CD4^+$  regulatory T-lymphocytes) was analyzed in bronchoalveolar lavage fluid.

Furthermore, the percentage of immune cell populations in bronchoalveolar lavage fluid was compared in subgroups of lung transplant patients with acute rejection and no acute rejection. The percentages of immune cell populations in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood were compared.

Keywords	Lung transplantation, immunophenotyping, immune cells, bronchoalveolar lavage bronchoalveolar lavage fluid, cytopins
Number of pages	80
Number of appendices	-
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1	Historie transplantace plic .....	2
2.2	Transplantace plic v České republice .....	3
2.3	Indikace, kontraindikace a výběr příjemců .....	3
2.4	Čekací listina .....	4
2.5	Dárce a odběr plic .....	5
2.6	Operace .....	6
2.7	Komplikace po transplantaci plic .....	6
2.7.1	Primární dysfunkce štěpu.....	6
2.7.2	Rejekce.....	6
2.7.2.1	Hyperakutní rejekce .....	7
2.7.2.2	Akutní rejekce .....	7
2.7.2.3	Chronická rejekce .....	11
2.7.3	Infekce .....	12
2.8	Bronchoalveolární laváž.....	13
2.9	Imunofenotypy buněk .....	14
2.9.1	Buňky přirozené (vrozené) imunity.....	15
2.9.2	Buňky specifické (adaptivní) imunity .....	19
2.10	Imunocytochemie .....	20
2.11	Průtoková cytometrie .....	22
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
3.1	Materiál .....	23
3.1.1	Chemikálie .....	23
3.1.2	Soupravy .....	24
3.1.3	Roztoky a média .....	24
3.1.4	Biologický materiál .....	25
3.1.5	Programy a software .....	25
3.1.6	Přístroje .....	25
3.1.7	Statistická analýza .....	25



3.2	Metody .....	26
3.2.1	Zpracování bronchoalveolární lavážní tekutiny .....	26
3.2.2	Imunofenotypizace bronchoalveolární lavážní tekutiny .....	27
3.2.3	Imunofenotypizace periferní krve .....	28
3.2.4	Příprava cytospinů .....	28
3.2.5	Imunocytochemické barvení cytospinů .....	29
3.2.5.1	Chromogenní barvení cytospinů .....	29
3.2.5.2	Fluorescenční barvení cytospinů .....	30
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
4.1	Zastoupení populací hlavních imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině .....	34
4.2	Zastoupení imunitních buněk v lymfocytární populaci v bronchoalveolární lavážní tekutině .....	35
4.3	Zastoupení populací imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině ve vztahu k akutní rejekci .....	38
4.4	Sledování pacientů po transplantaci plic v čase .....	42
4.4.1	Výskyt akutních rejekcí u pacientů 1 měsíc po transplantaci .....	42
4.4.2	Výskyt akutních rejekcí a korelace s imunitními populacemi v bronchoalveolární lavážní tekutině .....	43
4.5	Zastoupení populací imunitních buněk v periferní krvi a bronchoalveolární lavážní tekutině .....	46
4.6	Imunocytochemické barvení cytospinů .....	53
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>

## **Cíle práce**

- Vypracování literární rešerše na téma transplantace plic, komplikace po transplantaci plic a imunofenotypizace buněk bronchoalveolární lavážní tekutiny.
- Imunofenotypizace buněk bronchoalveolární lavážní tekutiny u pacientů metodou průtokové cytometrie.
- Porovnání procentuálního zastoupení populací imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině u podskupin pacientů po transplantaci plic s akutní rejekcí a bez akutní rejekce.
- Srovnání procentuálního zastoupení populací imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině a v periferní krvi.
- Imunocytochemické barvení buněk proti znaku CD68 a CD14 na cytopsech z bronchoalveolární lavážní tekutiny od pacientů po transplantaci plic.
- Analýza výsledků a porovnání s klinickými daty.

# 1 ÚVOD

Transplantace plic je v současnosti zavedenou léčebnou metodou pacientů se závažným plicním onemocněním, u nichž byly vyčerpány všechny konzervativní metody léčby. Došlo k významnému pokroku v oblasti prezervace orgánu, chirurgických technik, imunosupresivních terapeutických látek a monitorování funkce aloštěpů u příjemců po transplantaci plic (Whitson *et al.*, 2014).

V současné době jsou vyhledávány nové neinvazivní diagnostické metody, které by určovaly rizikové pacienty s velkým rizikem výskytu rejekcí. Jednou z možností využití je cytometrie s detekcí imunofenotypizace bronchoalveolární lavážní tekutiny (BALT) u pacientů po transplantaci plic. Analýza BALT získané neinvazivní metodou bronchoalveolární laváže (BAL), by mohla být užitečná při zjištění pravděpodobnosti výskytu rejekcí.

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na transplantaci plic, komplikace po transplantaci plic (hyperakutní, akutní, chronickou rejekci a infekci) a metodu BAL. V další části byly popsány populace imunitních buněk. V poslední kapitole teoretické části byly shrnuty metody průtoková cytometrie a imunocytochemie.

V rámci experimentální části byla provedena imunofenotypizace buněk v BALT od pacientů po transplantaci plic pomocí průtokové cytometrie. Výsledky byly porovnávány s procentuálním zastoupením populací imunitních buněk v BALT u podskupin pacientů po transplantaci plic s akutní rejekcí a bez akutní rejekce. Dále bylo provedeno imunocytochemické barvení buněk proti znaku CD68 a CD14 na cytospinech z BALT od pacientů po transplantaci plic.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Historie transplantace plic

Transplantace plic dospěla počátkem 80. let 20. století k úspěšné léčbě vybraných pacientů v konečném stádiu plicního onemocnění (Christie *et al.*, 2012). Trvalo několik desetiletí, než se dosáhlo těchto úspěchů experimentálními studii a klinickými pokusy. Vývoj na rutinní proceduru byl časově delší než u jiných typů transplantací v důsledku hojení bronchiální anastomózy (propojení cév transplantátu a příjemce), vysoké imunogenicity plic (schopností vyvolat imunitní odpověď) s nutností imunosuprese a podstatným rizikem výskytu plicní infekce (Venuta a Van Raemdonck, 2017).

První pokusy transplantace plic byly zaznamenány na psech. V roce 1946 se Vladimír Petrovič Děmichov pokusil o jednostrannou transplantaci plic psa, nicméně došlo k selhání transplantátu (Langer, 2011).

První úspěšná transplantace u člověka byla provedena Jamesem Hardym a jeho týmem v roce 1963 na univerzitě v Mississippi. Nicméně pacient zemřel po osmnácti dnech na selhání ledvin (Hardy *et al.*, 1963). James Hardy prokázal možnost technicky úspěšné transplantace plic a vyvolal tak celosvětově zájem o tuto metodu (Lischke, 2006).

Mezi lety 1963-1983 bylo provedeno přibližně 40 transplantací plic, avšak bez dlouhodobého přežití pacientů (Grover *et al.*, 1997). V 80. letech byl zvýšený zájem o transplantaci hrudníku s objevem nové imunosupresivní látky cyklosporinu A vedoucí k dramatickému pokroku v oblasti transplantace plic (Lima *et al.*, 1981; Goldberg *et al.*, 1983). Cyklosporin A se stal od svého zavedení základním kamenem imunosupresivních režimů a přispěl ke zlepšení výsledků pro přežití pacientů po transplantaci plic (Lloveras, 2004).

V roce 1981 byla ve Stanfordu hlášena první úspěšná kombinovaná transplantace srdce a plic (Reitz *et al.*, 1982). V roce 1983 byla provedena úspěšná jednostranná transplantace plic u pacientů s plicní fibrózou na univerzitě v Torontu (Toronto Lung Transplant Group, 1986), následovaná oboustrannou transplantační technikou. V dnešní době je bilaterální sekvenční transplantační technika (postupná implantace jedné a poté druhé plíce) běžně užívaná, protože zlepšuje hojení

dýchacích cest a také předchází kardiopulmonálnímu bypassu (mimotělnímu krevnímu oběhu) (Reitz *et al.*, 1982).

## 2.2 Transplantace plic v České republice

Program plicních transplantací byl v České republice zahájen týmem profesora Pavla Pafka na III. chirurgické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnici Motol v Praze první transplantací plic provedenou 22. 12. 1997. Této operaci předcházela dvouletá příprava ve spolupráci s profesorem Walterem Klepetkem ve Vídni (Pozniak *et al.*, 2015). Ve Fakultní nemocnici Motol se provádí od roku 2016 přes 40 transplantací ročně, přičemž v roce 2018 byly transplantovány plíce 42 pacientům (Koordinační středisko transplantací (KST): <https://www.kst.cz/> (5. 3. 2019)).

## 2.3 Indikace, kontraindikace a výběr příjemců

Transplantace plic je indikována u vybraných pacientů s chronickým onemocněním plic v konečném stádiu, u kterých selhává nebo není k dispozici účinná léčebná terapie (Orens *et al.*, 2006). U těchto pacientů jsou vyčerpány všechny konzervativní léčebné možnosti a jejich očekávaná doba přežití se pohybuje pod 12-18 měsíců (Lischke, 2006). Primárním cílem transplantace plic je zlepšení kvality života příjemců a prodloužit délku jejich života (Trulock *et al.*, 2005). Mezi typy plicních onemocnění indikovaných k transplantaci plic řadíme: obstrukční, septické, fibrotické a cévní onemocnění. Nejčastějšími onemocněními vedoucí k indikaci transplantaci plic jsou: chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), idiopatická plicní fibróza (IPF), cystická fibróza (CF), emfyzém plic ( $\alpha_1$ -antitrypsin deficience) a primární plicní arteriální hypertenze (Christie *et al.*, 2012). Rostoucí počet programů transplantace plic vedl k zvyšujícímu se počtu pacientů uvedených na čekací listině, a to v důsledku nedostatku vhodných orgánů a vývoji přísnějších kritérií pro kandidaturu. Proto hraje zásadní roli výběr příjemců, kteří by splňovali tato kritéria pro transplantaci plic a vykazovali by příznivé vyhlídky do budoucna (Orens *et al.*, 2006).

Mezi relativní kontraindikace pro transplantaci plic řadíme:

- Osoby ve věku starší než 65 let (Trulock *et al.*, 2005)
- Kritický nebo nestabilní klinický stav

- Velmi omezený funkční stav se špatným rehabilitačním potenciálem
- Kolonizace vysoce rezistentními nebo vysoce virulentními bakteriemi, houbami nebo mykobakteriemi (Orens *et al.*, 2006)
- Závažná obezita s indexem tělesné hmotnosti vyšší než 30 kg·m<sup>2</sup> (Kanasky *et al.*, 2002)
- Závažná nebo symptomatická osteoporóza
- Mechanická ventilace (vybraní pacienti bez dalších akutních nebo chronických orgánových dysfunkcí) (Orens *et al.*, 2006)
- Jiné zdravotní stavy, které nezpůsobují poškození orgánů v konečném stádiu (diabetes mellitus, systémová hypertenze, onemocnění peptického vředu (žaludečního vředu), gastroezofageální reflux (jícnový reflux) nebo ischemická choroba srdeční) (Parekh *et al.*, 2005).

Absolutní kontraindikace pro transplantaci plic:

- Výskyt maligního onemocnění v posledních dvou letech (s výjimkou kožní skvamózní malignity a malignity bazálních buněk)
- Pokročilá dysfunkce hlavních orgánů (např. srdce, jater nebo ledvin), významné poškození funkce levé komory, pacienti s koronárním onemocněním tepen
- Chronická extrapulmonární infekce včetně chronické aktivní virové hepatitidy B, C a virus lidské imunodeficience (HIV)
- Významná deformita hrudní stěny/páteře
- Neudržitelný psychiatrický nebo psychologický stav spojený s neschopností spolupracovat nebo dodržovat lékařskou léčbu
- Absence důsledné nebo spolehlivé sociální podpory
- Závislost na látce (např. alkohol, tabák nebo narkotika), buď aktivní nebo během posledních 6 měsíců (Orens *et al.*, 2006).

## 2.4 Čekací listina

Nejdříve bylo přidělení plic založeno ve Spojených státech pouze na čekací listině, kde nebyl kladen důraz na závažnost onemocnění nebo potenciální přínos po transplantaci plic. Mnoho pacientů bylo umístěno na čekací listinu nezávisle na závažnosti onemocnění. V případě, že byl dostupný dárcovský orgán a pacienti se nacházeli na pořadníku v čekací listině, byla provedena transplantace.

Zatímco pacienti se závažnějším onemocněním, kteří vyžadovali transplantaci plic často nepřežili v důsledku dlouhé čekací doby (Egan *et al.*, 2006).

V roce 2005 byla zavedena nová strategie pro alokaci plic na základě výpočtu plicního alokačního skóre (LAS) (Egan *et al.*, 2006). Výpočet LAS je založen na míře naléhavosti (předpokládaný počet dní přežití bez transplantace během následujícího roku na čekací listině) a měřítku pravděpodobnosti (očekávaný počet dní přežití během prvního roku po transplantaci) (Iribarne *et al.*, 2009).

Cílem rozvoje alokačního systému bylo snížit úmrtnost pacientů na čekací listině, upřednostnit kandidáty na základě lékařské naléhavosti a snížit dobu na čekací listině vzhledem k prioritě získání dárcovského orgánu (Egan a Edwards, 2016). Během čekací doby jsou pacienti v péči ošetřujících lékařů. Nejdříve je pacientům poskytnuta rehabilitační péče, aby byli co nejlépe připraveni k plánované operaci. Cílem rehabilitační péče je posílit svalstvo a zlepšit nutriční stav pacienta (Lischke, 2006).

V České republice dochází pacienti každé tři měsíce na pravidelné kontroly do transplantačního centra Fakultní nemocnice Motol v Praze. Pacientům se hodnotí rychlost progresu základního onemocnění a následně je aktualizováno předtransplantační vyšetření (Lischke, 2006).

## **2.5 Dárce a odběr plic**

Přidělení dárcovského orgánu potenciálnímu příjemci je ovlivněno několika kritérii na základě, kterých je posuzována kvalita dárcovského orgánu. Nicméně transplantace plic zůstává stále omezena počtem dostupných orgánů, které by splňovaly kritéria, na rozdíl od jiných transplantovaných orgánů (Yeung a Keshavjee, 2014).

Při hodnocení dárcovského orgánu je posuzována shoda s krevní skupinou systému AB0 příjemce, velikost orgánů a schopnost výměny plynů (Boasquevisque *et al.*, 2009). Provádí se rentgenové vyšetření hrudníku a bronchoskopie, které slouží k vyloučení hrubé infekce nebo anatomické abnormality. Rovněž se vykonává konečné makroskopické pozorování plic (Yeung a Keshavjee, 2014).

V případě, že je orgán odebrán z lidského těla je vystaven ischemickému a reperfučnímu poškození, což může mít za následek dočasnou nebo trvalou dysfunkci orgánu po transplantaci. Úlohou prezervace plic je minimalizovat

ischemické účinky zachováním funkční a morfologické integrity plic, čímž dochází ke zlepšení funkce plic (de Perrot *et al.*, 2003).

## **2.6 Operace**

Mezi nejznámější transplantační postupy se řadí jednostranná a bilaterální transplantace plic. Výběr příslušného postupu se odvíjí na základě indikací transplantace a příjemce, stejně jako na dostupnosti orgánů od dárce (Thabut *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2009). Dále jsou zaváděny nové transplantační postupy např. transplantace plicních laloků a transplantace laloků od živých dárců, za účelem minimalizace traumat po operaci a maximálního využití orgánů. V případě transplantace plicních laloků je umožněno malému příjemci implantovat pouze laloky většího dárce. Zatímco transplantace laloků od živých dárců poskytuje dva plicní laloky od dvou příbuzných osob (Lischke, 2006).

## **2.7 Komplikace po transplantaci plic**

Mezi nejběžnější komplikace po transplantaci plic, které jsou rovněž hlavními příčinami úmrtí, řadíme primární dysfunkci štěpu (PGD), rejekce a infekce.

### **2.7.1 Primární dysfunkce štěpu**

V časném pooperačním období se PGD vyskytuje u 10 až 25 % příjemců po transplantaci plic. Jedná se o hlavní příčinu morbidity a mortality a je způsobena ischemickým poškozením transplantované plíce během její manipulace (Christie *et al.*, 2005). Navíc pacienti po PGD mají dlouhodobě zhoršenou plicní funkci a předpoklad k zvýšenému výskytu bronchiolitis obliterans syndromu (BOS), který je projevem chronické rejekce štěpu (Daud *et al.*, 2007). PGD je akutním stavem projevujícím se během několika hodin po transplantaci plic, kdy vzniká plicní edém (Christie *et al.*, 1998).

### **2.7.2 Rejekce**

Rozeznáváme několik typů rejekcí plicního štěpu jako je hyperakutní, akutní (celulární a humorální) a chronickou rejekci. V roce 1996 byla aktualizována klasifikace rejekce plicního štěpu dle Mezinárodní společnosti pro transplantaci srdce a plic (ISHLT) (Yousem *et al.*, 1996) a přezkoumána v roce 2007 (Stewart *et al.*, 2007a) (Tab. 1).



Tab. 1 Rejekční stupně dle ISHLT

1996	2007
A. Akutní rejekce	A. Akutní rejekce
A0- normální	Stupeň 0- žádná
A1- minimální	Stupeň 1- minimální
A2- mírná	Stupeň 2- mírná
A3- střední	Stupeň 3- střední
A4- těžká	Stupeň 4- těžká
B. Zánět dýchacích cest	B. Zánět dýchacích cest
BX- nehodnotitelný vzorek	
B0- žádná	Stupeň 0- žádná
B1- minimální	Stupeň 1R- nízká
B2- mírná	Stupeň 2R- vyšší
B3- střední	Stupeň X- nedostupná
B4- těžká	
C. Chronická rejekce dýchacích cest	C. Chronická rejekce dýchacích cest
Bronchiolitis obliterans	Obliterující bronchiolitida
a- aktivní	0- nepřítomná
b- neaktivní	1- přítomná
D. Chronická vaskulární rejekce	D. Chronická vaskulární rejekce
zrychlená ateroskleróza plicních cév štěpu	zrychlená ateroskleróza plicních cév štěpu

### 2.7.2.1 Hyperakutní rejekce

Objevuje se během prvních minut až hodin po transplantaci plic. Je způsobena přítomností donor-specifických protilátek proti lidským leukocytárním antigenům (HLA) dárce, které se nacházejí v příjemci již před transplantací. Tyto protilátky indukují aktivaci komplementu a stimulaci endotelových buněk. Následně způsobují cévní trombózu a poškozují štěp. V současné době se hyperakutní rejekce vyskytuje zřídka z důvodu předtransplantační kontroly kompatibility s krevní skupinou systému AB0 a vyloučení přítomnosti HLA protilátek v příjemci (Moreau *et al.*, 2013).

### 2.7.2.2 Akutní rejekce

Vyskytuje se v rozmezí prvního týdne až několika měsíců po transplantaci plic a je způsobena imunitní odpovědí řízenou proti štěpu (Mengel *et al.*, 2012). Nejčastější formou akutní rejekce je akutní celulární rejekce (ACR), která je s největší pravděpodobností diagnostikována během prvních 6 měsíců po transplantaci plic (Hopkins *et al.*, 2002). Aloreaktivní T-lymfocyty příjemce

reagují přímo nebo nepřímo na HLA dárce a iniciují odmítnutí aloštěpu plic (Martinu *et al.*, 2009). Mezi rizikové faktory pro ACR řadíme nesoulad s HLA dárce a příjemce (Quantz *et al.*, 2000) a geneticky determinované rozdíly ve vrozené a adaptivní imunologické odpovědi příjemce na aloštěp (Girnita *et al.*, 2008; Colobran *et al.*, 2009). Mechanismy vedoucí k akutní rejekci nejsou zcela objasněny a předpokládá se, že odpověď příjemce na aloštěp je modulována nesouladem HLA mezi dárce a příjemcem, faktory prostředí, rovněž povahou i intenzitou imunosuprese a infekcí (Martinu *et al.*, 2009).

Diagnóza ACR je založena na přítomnosti zánětlivých perivaskulárních infiltrátů nebo zánětlivých infiltrátů dýchacích cest, které jsou složeny převážně z aktivovaných lymfocytů, ale také eozinofilů, neutrofilů a plazmatických buněk (Husain *et al.*, 2013). Histopatologické vyšetření plicní tkáně odráží závažnost perivaskulárního nebo peribronchiálního zánětu v plicním aloštěpu a na základě kritérií dle ISHLT je hodnocen rejekční stupeň ACR (Stewart *et al.*, 2007a).

### **ACR, stupeň A**

Zánětlivá perivaskulární infiltrace tvoří základ ACR stupně A. Dle distribuce a intenzity infiltrace rozlišujeme následující stupně ACR.

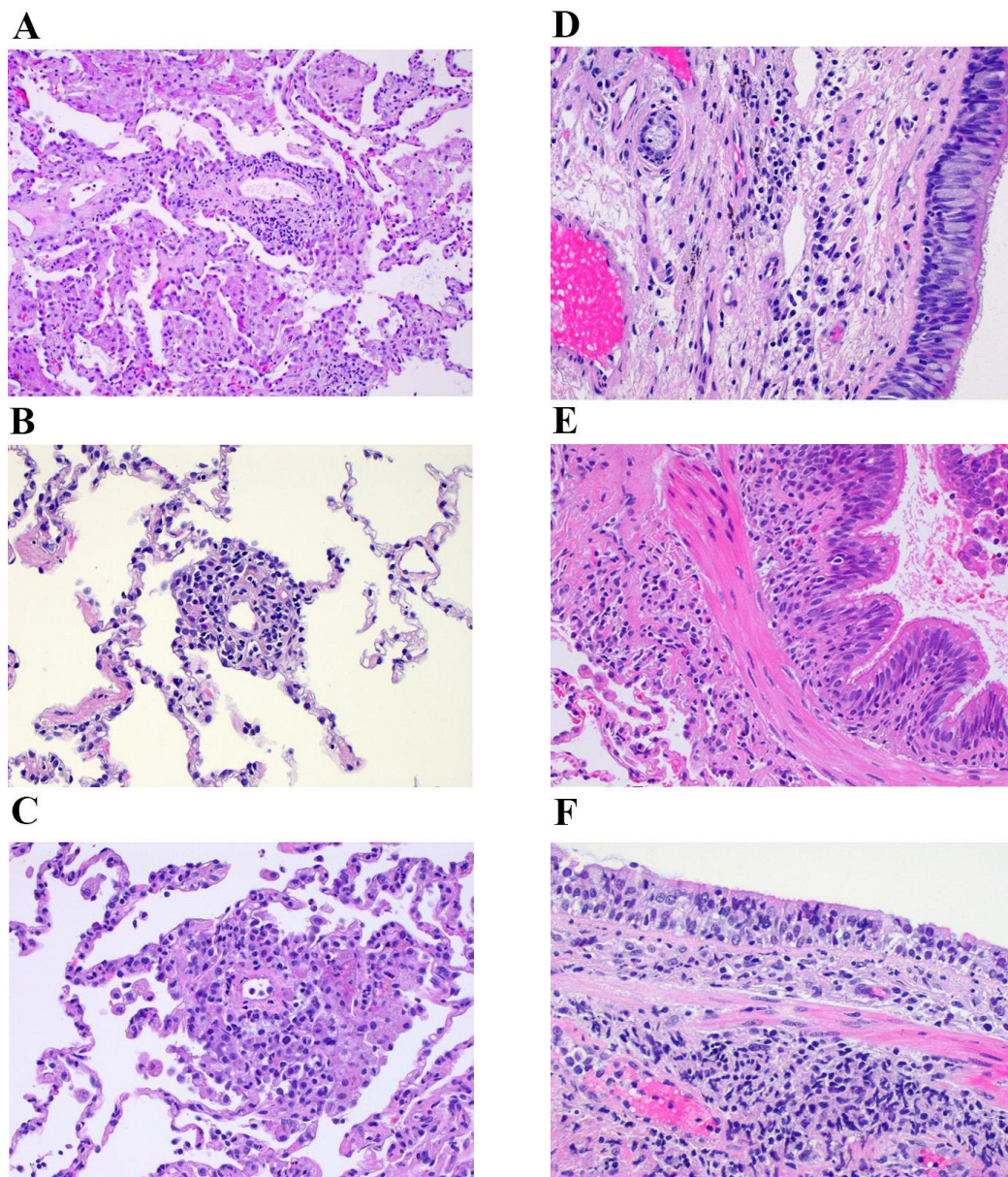
- Stupeň AX: nehodnotitelný vzorek, neporušena plicní tkáň nebo tepénka a žilka, což vylučuje stanovení přítomnosti/nepřítomnosti perivaskulárních infiltrátů
- Stupeň A0: (bez akutní rejekce) normální plicní parenchym bez perivaskulárních infiltrátů
- Stupeň A1: (minimální akutní rejekce) roztroušené perivaskulární infiltráty, vzácné eozinofily, bez endotelitidy (poškození cév)
- Stupeň A2: (mírná akutní rejekce) časté perivaskulární infiltráty z aktivovaných lymfocytů, plazmacytoidních lymfocytů a makrofágů, eozinofilů, přítomná endotelitida
- Stupeň A3: (střední akutní rejekce) husté perivaskulární infiltráty mononukleárních buněk a endotelitidou rozšířeny do alveolárních stěn, přítomné eozinofily a neutrofilů
- Stupeň A4: (těžká akutní rejekce) difúzní perivaskulární, intersticiální a alveolární infiltráty mononukleárních zánětlivých buněk, poškození

plicních buněk, endotelitidy, nekróza epiteliálních buněk, hyalinních membrán, krvácení, přítomné neutrofilů (Husain *et al.*, 2013) (Obr. 1).

### **Zánět dýchacích cest, stupeň B**

Zánět dýchacích cest může být přítomen v nepřítomnosti perivaskulárních infiltrátů. Infiltráty stupně B představují klinicky významný typ akutní rejekce. Bylo prokázáno, že jsou velmi silným rizikovým faktorem pro vývoj chronické rejekce.

- Stupeň BX: nehodnotitelný vzorek
- Stupeň B0: bez důkazů zánětů dýchacích cest
- Stupeň B1 (B1R): (minimální zánět dýchacích cest) několik aktivovaných lymfocytů a plazmatických buněk v podslizniční vrstvě průdušinek, vzácné eozinofily, není pozorována přítomnost lymfocytů uvnitř epitelů a poškození epitelů
- Stupeň B2 (B1R): (mírný zánět dýchacích cest) větší mononukleární buňky v podslizniční vrstvě průdušinek, více eozinofilů, málo neutrofilů a plazmatických buněk
- Stupeň B3 (B2R): infiltrace se rozšiřuje od podslizniční vrstvy průdušinek do epitelu, bez epiteliálního poškození
- Stupeň B4 (B2R): poškození epitelů (nekróza a změna tkáně v jinou), četné lymfocyty uvnitř epitelů (Husain *et al.*, 2013) (Obr. 1).



Obr. 1 Rejekční stupně akutní rejekce dle ISHLT; A minimální ACR, stupeň A; B mírná ACR, stupeň A2; C střední ACR, stupeň A3; D minimální zánět dýchacích cest, stupeň B1; E mírný zánět dýchacích cest, stupeň B2; F střední zánět dýchacích cest, stupeň B3; barvení hematoxylinem a eosinem, zvětšení 200x (Husain *et al.*, 2013).

Průběh ACR může být asymptomatický nebo s výskytem nespecifických příznaků, jako je kašel, dušnost a zvýšená teplota (de Vito Dabbs *et al.*, 2004). U pacientů s asymptomatickým průběhem je provedena transbronchiální biopsie, která nadále zůstává zlatým standardem, jelikož nebyly prokázány biomarkery k identifikaci pacientů s ACR (Trulock *et al.*, 1992; Guilinger *et al.*, 1995). Vzhledem k nespecifické povaze klinických příznaků a špatné specifičnosti plicních funkčních testů je kladen důraz zejména na histopatologické vyšetření plicní tkáně (Martinu *et al.*, 2009).

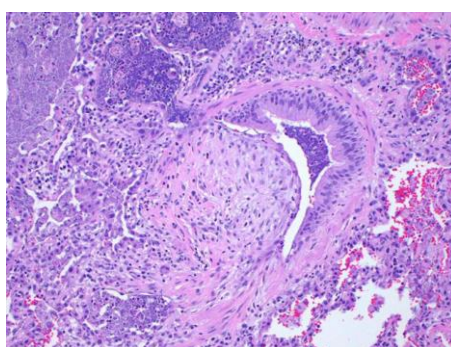
### 2.7.2.3 Chronická rejekce

Dlouhodobé přežití po transplantaci plic je omezeno hlavně v důsledku BOS (Estenne *et al.*, 2002), který je projevem chronické rejekce štěpu. Chronická rejekce postihuje 50 % pacientů po 5 letech a 75 % pacientů po 10 letech (Christie *et al.*, 2010). Chronická rejekce se obvykle vyskytuje po 1 roce po transplantaci plic, ale může se objevit již během několika týdnů (Husain *et al.*, 2013). Z hlediska patologického je chronická rejekce označována jako obliterující bronchiolitida (OB) (Burke *et al.*, 1984; Glanville *et al.*, 1987). Nicméně je obtížně prokazatelná transbronchiální biopsií, a proto se užívá pro chronickou rejekci termín klinicko-patologický BOS, který definuje funkční poruchy plic (Estenne *et al.*, 2002).

#### Chronická rejekce dýchacích cest, OB, stupeň C

Ačkoli je často obtížné diagnostikovat OB transbronchiální biopsií, i přesto zůstává charakteristickým histologickým rysem chronické rejekce stupně C.

- Stupeň C0: bez OB
- Stupeň Ca (C1R): asymetrické nebo soustředné, podslizniční zmnožení vaziva, které způsobuje částečnou nebo úplnou obstrukci dýchacích cest se zánětem
- Stupeň Cb (C1R): asymetrické nebo soustředné, podslizniční zmnožení vaziva, které způsobuje částečnou nebo úplnou obstrukci dýchacích cest bez zánětu (Husain *et al.*, 2013) (Obr. 2).



Obr. 2 Chronická rejekce dýchacích cest, OB; barvení hematoxylinem a eosinem, zvětšení 100x (Husain *et al.*, 2013).

## **Chronická vaskulární rejekce, stupeň D**

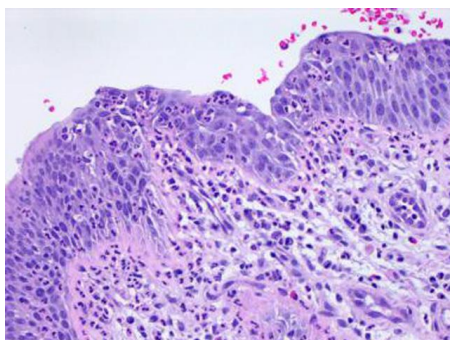
Chronická vaskulární rejekce stupně D není diagnostikována transbronchiální biopsií.

- Stupeň D: zesílení tepének a žilek s/bez zánětlivých infiltrátů (Husain *et al.*, 2013).

Hlavním rizikovým faktorem pro vývoj BOS je výskyt opakovaných akutních rejekcí. BOS je nejdůležitějším determinantem dlouhodobého přežití po transplantaci plic (Sharples *et al.*, 2002). U příjemců transplantovaných plic se rozvíjí v různé míře progresivní obstrukce dýchacích cest, která posléze vede ke snížení funkce plic až k úplnému selhání dýchání (Estenne *et al.*, 2002). Předpokládalo se, chronická dysfunkce aloštěpu plic (CLAD) je přítomna pouze jako BOS, jejímž projevem je OB, která vede k poklesu vitální kapacity plic (FEV1) a nakonec ke ztrátě štěpu. Nicméně, autoři ve studii poukázali na novou formu CLAD, zvanou restriktivní syndrom aloštěpu plic (RAS) se závažnějšími funkčními změnami než u BOS (Sato *et al.*, 2011).

### **2.7.3 Infekce**

Infekce se může kdykoliv vyskytnout u příjemců po transplantaci plic a je hlavní příčinou morbidit a mortalit (Fishman a Rubin, 1998). Bakteriální infekce se obvykle vyskytují v prvním měsíci po transplantaci plic, přičemž virové a houbové infekce během prvních 3 až 6 měsíců (Husain *et al.*, 2013). Mezi bakterie způsobující infekci patří zejména gram-negativní bakterie, např. *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella* (Collins *et al.*, 2000). Infekce plicního aloštěpu je obvykle diagnostikována na základě klinických příznaků, mikrobiologických kultur a sérových virových testů. Příležitostně se využívá diagnóza transbronchiální biopsií (Husain *et al.*, 2013) (Obr. 3).



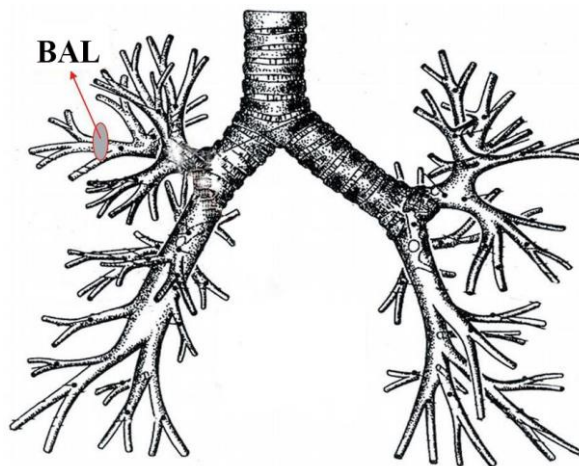
Obr. 3 Příklad bakteriální infekce; barvení hematoxylinem a eosinem, zvětšení 200x (Husain *et al.*, 2013).

## 2.8 Bronchoalveolární laváž

Jedná se o metodu, která umožňuje získat sekrety s leukocyty z dýchacích cest, buněčné složky (invazivní bakterie) a nebuněčné komponenty (cytokiny, virové částice atd.). Analýzou BALT můžeme zjistit např. diferenciální počet leukocytů nebo další informace, které mohou pomoci při diagnostice a léčbě různých plicních onemocnění (Meyer, 2007).

Získání BALT probíhá následujícím způsobem: Po lokální anestezii je do horních dýchacích cest zaveden flexibilní fiberoptický bronchoskop (Whitehead *et al.*, 1995). Poté je postupně aplikován fyziologický roztok (37 °C) pomocí injekční stříkačky fiberoptického bronchoskopu s celkovým objemem v rozmezí 100 až 250 ml a rozdělen na tři až pět alikvotů. Následně je nasávána BALT po 20 až 60 ml alikvotních podílech (Martin *et al.*, 1985). Minimální získaný objem BALT by měl být větší nebo rovný 5 % aplikovaného objemu fyziologického roztoku. Pro buněčnou analýzu je zapotřebí minimálně 5 ml BALT (Meyer *et al.*, 2012). První alikvotní podíl BALT reprezentuje buňky a sekrety dýchacích cest (Martin *et al.*, 1985) a slouží tedy pro mikrobiologickou analýzu. Další alikvotní podíly představují buňky z plicních sklípků a jsou určeny k buněčné analýze (Baughman *et al.*, 2000) (Obr. 4).

BALT je zpracována a analyzována za účelem detekce infekčních činitelů a buněčných komponent. Buněčný profil BALT u většiny zdravých nekouřících osob by měl obsahovat 80-90 % alveolárních makrofágů (AM), 5-15 % lymfocytů a velmi nízké procentuální zastoupení neutrofilů (3 %) a eozinofilů (méně než 1 %) (Costabel a Guzman, 1992).



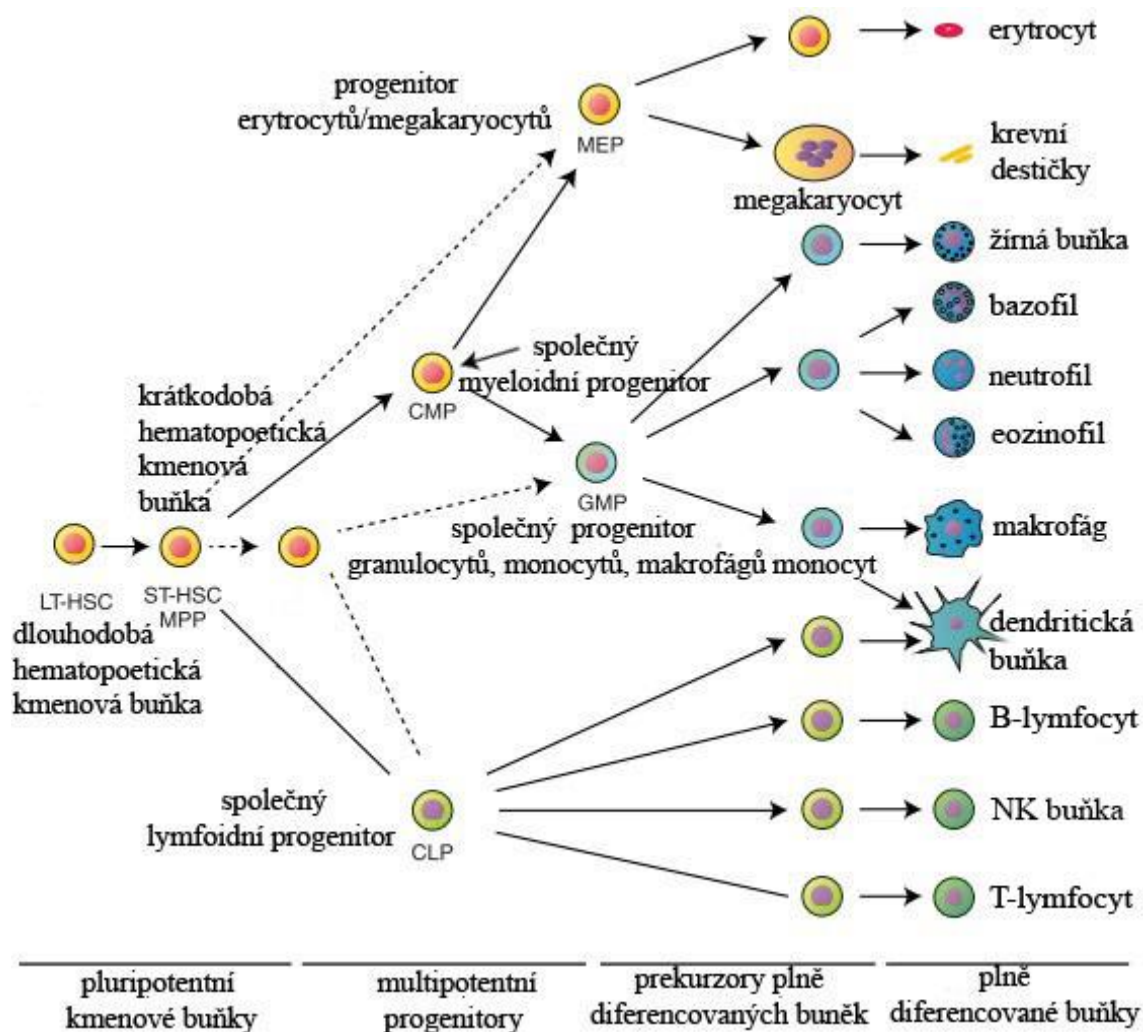
Obr. 4 Oblast provedení BAL (Bronchoalveolární laváž- možnosti a rizika provedení, interpretace některých výsledků: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842> (23. 11. 2018)).

## 2.9 Imunofenotypy buněk

Hematopoetický systém je rozdělen do dvou samostatných linií, tj. lymfoidní linie, která je zodpovědná za adaptivní imunitu a myeloidní linie zahrnující morfologicky, fenotypicky a funkčně odlišné typy buněk vrozené imunity, rovněž sem patří erythrocyty a krevní destičky. Tvorba buněčných komponent se nazývá hematopoéza a probíhá primárně v kostní dřeni, kde několik hematopoetických kmenových buněk (HSC) vede k diferencovanému potomstvu. Hematopoetické buňky ztrácejí svůj proliferativní potenciál a diferenciační kapacitu. Posléze jsou postupně získávány charakteristické terminálně diferencované zralé buňky, které mají, s výjimkou některých typů lymfoidních buněk, poměrně krátkodobou životnost, která se pohybuje od několika hodin (granulocyty) až týdnů (erythrocyty) a je nezbytná k doplňování funkčních buněk (Fiedler a Brunner, 2012).

V hematopoetickém systému je původ všech krevních buněk odvozen od HSC, která je schopna regenerace a dává vznik multipotentním progenitorům (MPP) (Chotinantakul a Leeanansaksiri, 2012). MPP ztrácejí vlastní potenciál regenerace a vedou ke vzniku společných lymfoidních (CLP) a myeloidních progenitorů (CMP). CMP přechází k progenitoru erythrocytů/megakaryocytů (MEP) nebo společnému progenitoru granulocytů, monocytů a makrofágů (GMP). CLP vytvářejí prekurzory T-lymfocytů, B-lymfocytů, NK buněk a dendritických buněk (DC). Prekurzory DC mohou pocházet jak z CMP tak z CLP (Kanji *et al.*, 2011; Chotinantakul a Leeanansaksiri, 2012) (Obr. 5).





Obr. 5 Hematopoéza, převzato a upraveno z: (Dzierzak a Philipsen, 2013).

Imunitní systém se skládá ze série efektorových mechanismů, které jsou schopny ničit patogenní organismy, jako jsou bakterie, houby, viry, a parazité (Carrillo *et al.*, 2017). Imunitní systém je tvořen dvěma typy imunitních odpovědí, zahrnující antigen-specifickou (adaptivní) imunitní odpověď a vrozenou (přirozenou), která rozpoznává molekulární struktury na povrchu asociované s patogenem (PAMP) (Koenderman *et al.*, 2014).

## 2.9.1 Buňky přirozené (vrozené) imunity

### Monocyty

Monocyty jsou buňky, které se vyvíjejí v kostní dřeni a poté se uvolňují do krevního oběhu, kde cirkulují přibližně 72 hodin. Posléze emigrují do různých tkání a zde se dále diferencují na makrofágy nebo klasické myeloidní dendritické buňky

(mDC). Monocyty tvoří hlavní typ mononukleárních fagocytů v krvi a jsou členy rodiny myeloidních buněk (França *et al.*, 2017). Mezi hlavní funkce monocytů se řadí jejich zapojení do vrozené imunitní odpovědi proti patogenům. V případě zánětlivých procesů jsou krevní monocyty dopravovány do míst s infekcí, kde dochází k jejich dozrávání v makrofágy nebo DC a účastní se štěpení patogenu (Jakubzick *et al.*, 2017). Monocyty v plicích se vyskytují pouze v aktivované formě jako makrofágy a dělí se na tři typy: tkáňově reziduální makrofágy (TRM), intersticiální makrofágy (IM) a AM. Pokles makrofágů pod 75 % v BALT je spojován s akutní rejekcí u pacientů po transplantaci plic (Greenland *et al.*, 2014).

#### **Tkáňově reziduální makrofágy**

TRM se vyskytují ve většině tkání v těle. Představují odlišné buněčné populace z hlediska fenotypu a funkce. Jedná se o velice heterogenní populaci, která je důsledkem mikroanatomických a tkáňově specifických funkcí během vývoje a v dospělosti. Jsou rovněž nedílnou součástí tkáňové funkce a homeostázy. Tyto jedinečné fenotypy pravděpodobně odrážejí heterogenitu jejich původu a vliv prostředí tkáně v které se vyskytují. Nicméně TRM jsou nejvíce známé pro svou úlohu jako imunitní strážci, kteří jsou umístěni v přední linii tkáňové obrany pro setkání s patogeny nebo enviromentálními problémy (Davies *et al.*, 2013).

#### **Intersticiální makrofágy**

IM nebyly plně charakterizovány a jejich funkce *in vivo* zůstává neznámá. IM jsou fenotypicky a funkčně odlišné od AM. V porovnání s AM mají nižší fagocytární potenciál a jsou účinnější při stimulaci proliferace T-lymfocytů *in vitro* (Bedoret *et al.*, 2009). IM jsou schopny produkovat interleukin-10 v rovnovážném stavu. V reakci na mikrobiální produkty jsou IM součástí integrální sítě vrozených imunoregulačních mechanismů plic. IM jsou schopny působit proti rozvoji alergenu indukovaným zánětem dýchacích cest (Lehnert *et al.*, 1985; Gong *et al.*, 1994; Toussaint *et al.*, 2013).

#### **Alveolární makrofágy**

AM jsou umístěné v prostoru mezi vzdušnou a plicní tkání. Poskytují první linii fagocytární obrany proti vniknutí mikroorganismů do dolních dýchacích cest. Kromě fagocytárních a mikrobicidních funkcí rovněž po stimulaci vylučují řadu chemických mediátorů, čímž hrají roli při regulaci zánětlivých reakcí v plicích (Hauschildt a Kleine, 1995). AM jsou stacionární buňky, které mohou být nalezeny

připojené k alveolárnímu epitelu během ustáleného a zánětlivého stavu (Westphalen *et al.*, 2014). Selektivní ztráta AM vede k plicnímu selhání, těžké morbiditě a mortalitě v důsledku virových infekcí (Schneider *et al.*, 2014). Zatímco funkční poškození bylo spojeno s plicní alveolární proteinasou (Happle *et al.*, 2014). Procentuální zastoupení AM je sníženo během akutní rejekce v důsledku nárůstu neutrofilů a lymfocytů v BALT (Vanaudenaerde *et al.*, 2006). 94-100 % AM detekovaných v BALT jsou odvozené od dárce a přetrvávaly v plicním štěpu i 3,5 roku po transplantaci plic (Nayak *et al.*, 2016).

### **Dendritické buňky**

DC představují významné spojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou (Koenderman *et al.*, 2014). Jedná se o heterogenní populaci buněk prezentující antigen, které jsou rozhodující pro iniciaci imunitní odpovědi (Boltjes a van Wijk, 2014). DC jsou klasifikovány na dva podtypy: mDC a plazmocytoidní DC (pDC). Klasické mDC jsou buňky specializované na zpracování a prezentaci antigenů s vysokou fagocytickou aktivitou a produkcí cytokinů (Koenderman *et al.*, 2014). pDC jsou přítomny v kostní dřeni a ve všech periferních orgánech. Na virovou infekci reagují masivní produkcí interferonů typu I. Působí také jako buňky prezentující antigen a v řízení odpovědi T-lymfocytů (Colonna *et al.*, 2004). Zvýšený počet DC, je detekován u pacientů s OB po transplantaci plic (Leonard *et al.*, 2000).

### **Neutrofilní granulocyty**

Neutrofilny také známé jako polymorfonukleární leukocyty (PMN) jsou nejvíce zastoupeným typem buněk v krvi (Mayadas *et al.*, 2014). Představují asi 70 % všech leukocytů a více než  $10^{11}$  buněk je produkováno denně v kostní dřeni (Dancey *et al.*, 1976). Za normálních podmínek zůstávají neutrofilny v krevním oběhu jen několik hodin (poločas rozpadu se odhaduje na 6-12 h) než opustí tkáň (Summers *et al.*, 2010). Neutrofilny jsou eliminovány v tkáních makrofágy procesem fagocytózy (Mayadas *et al.*, 2014). Neutrofilny hrají hlavní roli při mikrobiálních infekcích. Po proniknutí patogenů do epitelálních bariér představují neutrofilny první buněčnou linii obrany vrozené imunitní odpovědi. Neutrofilny procházejí krevními cévami a migrují do místa infekce pomocí chemotaktických faktorů a cytokinů. Jsou produkovány jako zánětlivé signály během poškození tkáně způsobené invazními patogeny. Následně neutrofilny iniciují proces fagocytózy v místě infekce prostřednictvím rozpoznání PAMP svými receptory jako jsou TLR (Toll-like

receptory). Neutrofilie vykazují své antimikrobiální účinky uvolňováním reaktivních forem kyslíku a cytotoxických složek obsažených v jejich granulích, jako je např. AMP (Kobayashi *et al.*, 2017). Neutrofilie nad 12 % v BALT po měsíci od transplantace plic je asociována s akutní rejekcí (Shennib *et al.*, 1996; Tikkanen *et al.*, 1999; Tikkanen *et al.*, 2001).

### **Eozinofily**

Interleukin 5 (IL-5) je specifický pro eozinofilní linii a je zodpovědný za selektivní diferenciaci (Sanderson, 1992) a uvolňování eozinofilů z kostní dřeně do periferního oběhu (Collins *et al.*, 1995). Eozinofily jsou multifunkční leukocyty, které se podílejí na patogenezi četných zánětlivých procesů (Rothenberg, 2004). Vedle mnoha efektorových účinků eozinofilů mohou tyto buňky rovněž iniciovat antigen-specifické imunitní odpovědi tím, že působí jako antigen prezentující buňka (Shi *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2001). Nízké procento eozinofilů (<1 %) v BALT se vyskytuje u stabilních příjemců plic (Slebos *et al.*, 2002), zatímco zvýšené počty eozinofilů jsou detekovány při akutní rejekci nebo přítomné infekci u pacientů po transplantaci plic (Mogayzel *et al.*, 2001).

### **Bazofily**

Jedná se o buňky v kostní dřeni, které se liší od ostatních leukocytů svým fenotypem a funkcí (Carrillo *et al.*, 2017). Bazofily jsou schopny propojit vrozenou a adaptivní imunitu včetně schopnosti indukovat a šířit imunitní odpovědi založené na Th2 pomocných lymfocytech (Knol a Olszewski, 2011). Zejména jsou významné u všech alergických onemocnění, včetně alergické rýmy, astmatu, kopřivky atd. (Carrillo *et al.*, 2017). Úloha bazofilů u příjemců po transplantaci plic není dosud podrobně prozkoumána. Nicméně, mírné zvýšení bazofilů v BALT je spojeno s akutní rejekcí (Tikkanen *et al.*, 1999; Greenland *et al.*, 2014).

### **Žírné buňky**

Jedná se o granulované tkáňově rezidentní buňky (Wedemeyer *et al.*, 2000; Galli a Tsai, 2010). Žírné buňky cirkulují jako nezralé a migrují do vaskularizovaných tkání, kde dokončují svou diferenciaci. Spolu s DC představují první imunitní buňky, které interagují s enviromentálními antigeny, patogeny, toxiny, a proto mohou být považovány za „strážce“ vrozeného imunitního systému (Galli *et al.*, 1999). Žírné buňky mohou hrát roli v akutní odezvě na plicní aloštep. U pacientů po transplantaci plic s OB se počet žírných buněk zvyšuje (Yousem, 1997).

## 2.9.2 Buňky specifické (adaptivní) imunity

### T-lymfocyty

T-lymfocyty vznikají v kostní dřeni a migrují do brzlíku, kde dochází k jejich zrání. Po zrání v brzlíku exprimují T-lymfocyty unikátní molekulu vázající antigen na povrchu buněk zvanou T-buněčný receptor (TCR) (Moss *et al.*, 1992). V krvi a sekundárních lymfatických orgánech je 60-70 % T-lymfocytů CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>) a 30-40 % T-lymfocytů CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>). CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty jsou obecně označovány jako „pomocné buňky“ a aktivují jak humorální imunitní odpověď, tak i buněčné odezvy (hypersenzitivní odezvy). CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty vykazují hlavní cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám a buňkám infikovaných intracelulárními mikroby. Část cirkulujících CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, známých jako přirozené regulační T-lymfocyty, hraje důležitou regulační úlohu, která působí jako modulace imunitní odpovědi. Tyto buňky jsou charakterizovány povrchovou expresí antigenů CD4, CD25 a intracelulární expresí transkripčního faktoru P3 (FoxP3) nezbytného pro jejich vývoj (Sakaguchi *et al.*, 2006). Ve studii autoři uvádějí zastoupení T-lymfocytů s průměrným zastoupením 60 % u stabilních příjemců po transplantaci plic (Whitehead *et al.*, 1995).

### NK buňky

NK buňky nemohou zprostředkovat adaptivní imunitní odpověď, protože postrádají antigen specifické receptory (Lanier, 2005). Předpokládalo se, že NK buňky se vyvíjejí v kostní dřeni, nicméně studie ukázaly, že se vyskytují výlučně v sekundárních lymfatických orgánech (Freud *et al.*, 2005). NK buňky jsou významnými efektorovými lymfoidními buňkami vrozeného imunitního systému. Slouží tedy jako klíčový prvek v rychlém rozpoznání infikovaných a tumorigenních buněk, které mohou způsobit poškození integrity hostitelských tkání (Cerwenka a Lanier, 2001). Procentuální zastoupení menší než 5 % NK buněk v BALT je spojováno s akutní rejekcí. Zatímco zvýšené procentuální zastoupení NK buněk v BALT je asociováno s větší pravděpodobností výskytu infekce po transplantaci plic (Greenland *et al.*, 2014).

### B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou definovány produkcí protilátek (Chaplin, 2010). Protilátky, také známé jako imunoglobuliny jsou glykosylované proteinové molekuly přítomné na povrchu B-lymfocytů (povrchové imunoglobuliny), které slouží jako antigenní B-

buněčné receptory (BCR). Mohou být rovněž sekretovány do extracelulárního prostoru, kde mohou vázat a neutralizovat své cílové antigeny. B-lymfocyty jsou proto spojeny s humorální imunitou, ale nyní víme, že hrají také důležitou roli v buněčné imunitě. Účastní se aktivace T-lymfocytů prostřednictvím antigenní prezentace, kostimulace (pomocné stimulace), a produkce cytokinů. Slouží také jako regulační buňky, které modulují buněčnou i humorální odezvu (Hoffman *et al.*, 2016). Zvýšené procento B-lymfocytů je spojováno s akutní rejekcí (Gregson *et al.*, 2008; Greenland *et al.*, 2014).

## 2.10 Imunocytochemie

Imunocytochemie je metoda pro vizualizaci antigenu na povrchu či uvnitř buněk za využití značených protilátek, které jsou na ně specificky vázány. Detekovatelná značka na primární či sekundární protilátce poskytuje měřitelný signál, pomocí kterého je sledována vazebná reakce a zároveň je určena kvalitativní/kvantitativní míra stupně vazby (Vázquez-Gutiérrez a Langton, 2015).

Primární protilátky se specificky váží na antigen, kterým může být protein, glykolipid, sacharid, malá molekula nebo DNA. Protilátky jsou tvořeny dvěma velkými těžkými a dvěma malými lehkými řetězci. Jsou produkovány bílými krvinkami, tzv. plazmatickými buňkami. Existuje několik různých typů těžkých řetězců, podle kterých rozlišujeme třídy protilátek. Obecná struktura všech protilátek je velmi podobná, nicméně se liší malou oblastí na konci řetězců, která je extrémně proměnná, neboli variabilní. Každá z těchto variant se pak může vázat na rozdílný cíl (antigen). Unikátní část antigenu rozpoznaná protilátkou se nazývá epitop. Protilátky se vážou na specifické epitopy antigenů, které se mohou skládat z krátkých úseků aminokyselin anebo z konformačních struktur proteinu (Nethercott *et al.*, 2011).

Rozlišujeme polyklonální a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky obsahují několik protilátek, které obvykle rozpoznávají několik různých epitopů na jediné molekule. Naproti tomu monoklonální protilátky mají unikátní definovaný typ protilátky a rozpoznávají jediný epitop na molekule (Nethercott *et al.*, 2011).

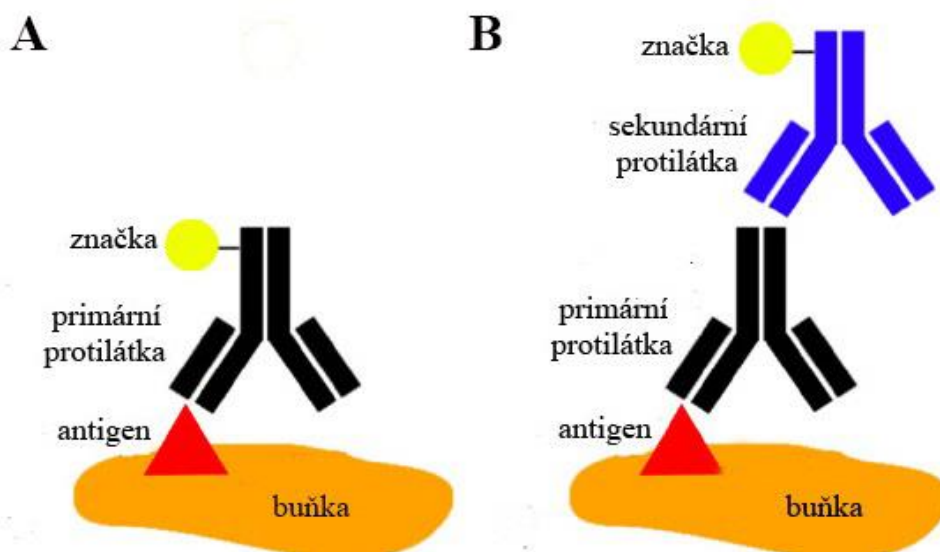
Hlavní rozdíly v metodě imunocytochemie spočívají v typu protilátek (monoklonální, polyklonální) vázajícími se na epitopy; ve způsobu, jakým je značka připojena ke komplexu protilátka-antigen (přímá, nepřímá); v typu použitého značení (např. částice koloidního zlata, fluorescenční značka a enzymy jako peroxidasa a alkalická fosfatasa) a v použitém zařízení, kterým je detekován komplex protilátka-

antigen (elektronová, světelná nebo fluorescenční mikroskopie) (Vázquez-Gutiérrez a Langton, 2015).

V imunocytochemii se používají oba typy značení protilátek jak přímé, tak i nepřímé. V případě přímého značení se používá pouze primární protilátka s navázanou detekovatelnou značkou. Výhodami přímého značení je jednoduchý postup a minimální nespecifické barvení pozadí. Nevýhodou přímého značení je, že vyžaduje velké množství purifikované protilátky a výsledný signál je slabý, jelikož se na každý antigen váže pouze jedna značená primární protilátka (Vázquez-Gutiérrez a Langton, 2015).

Nepřímé značení zahrnuje vícestupňový proces, kdy se primární protilátka váže na antigen a následně je navázána sekundární protilátka s detekovatelnou značkou např. komplex: lidský antigen-anti-lidská myší primární protilátka-kozí anti-myší sekundární protilátka. Několik značených sekundárních protilátek se může vázat na jednu primární protilátku a výsledný signál je silnější, protože je amplifikován (Vázquez-Gutiérrez a Langton, 2015) (Obr. 6).

Imunocytochemie s použitím antigen-specifických protilátek je rychlým a snadným nástrojem, jak určit, zda je populace buněk homogenní nebo heterogenní vzhledem k určitému molekulárnímu markeru. Umožňuje vizualizaci jednotlivých buněk v kolonii nebo kultuře. Poskytuje celkové hodnocení exprese určitého markeru v celé kultuře za určitých kultivačních podmínek (Nethercott *et al.*, 2011).



Obr. 6 A přímé značení, B nepřímé značení, převzato a upraveno z: (Vázquez-Gutiérrez a Langton, 2015).

## 2.11 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace. Používá se pro imunofenotypování různých vzorků, včetně celé krve, kostní dřeně, tělních výpotků, mozkomíšního moku, moči a podobně (Brown a Wittwer, 2000).

Průtoková cytometrie umožňuje multiparametrickou analýzu velkého množství buněk během krátké doby. Uvnitř průtokového cytometru se buňky v suspenzi zachycují do proudu nosné tekutiny, která vytváří laminární tok unášející buňky do detekčního místa, kudy prochází jeden nebo více laserových paprsků. Na základě rozptylu laserového paprsku v různých úhlech je možné určit rozdíly ve velikosti a vnitřní struktuře (granularitě) buňky a zároveň detekovat světlo emitované fluorescenčně značenými protilátkami. Monoklonální protilátky konjugované s fluorescenčními barvivy, tzv. fluorochromy, se váží s buněčnými složkami, díky kterým lze identifikovat širokou škálu antigenů buněčného povrchu či uvnitř buňky. Fluorochromy na specificky navázaných protilátkách jsou po průchodu laserovým paprskem excitovány do vyššího energetického stavu a po návratu do klidových stavů emitují světelnou energii při vyšších vlnových délkách. Vyzařované světlo se rozšiřuje ve všech směrech a shromažďuje se přes optiku, která směřuje světlo na řadu filtrů a dichroických zrcadel, které izolují jednotlivé pásy vlnových délek. Světelné signály jsou detekovány pomocí fotonásobičů a digitalizovány pro následné počítačové analýzy. Výsledná informace se obvykle zobrazuje v histogramu nebo ve dvourozměrném formátu dot-plot (Brown a Wittwer, 2000).

Použití více fluorochromů, které mají podobné vlnové délky, umožňuje měřit současně několik buněčných znaků, což se využívá k diskriminaci jednotlivých buněčných populací, například subpopulací lymfocytů. Podle klasifikace diferenciací skupiny (CD) lze lymfocyty rozdělit na B-lymfocyty (CD19<sup>+</sup>), T-lymfocyty (CD3<sup>+</sup>) se subklasifikací na CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty a CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Lymfocyty spolu s dalšími buněčnými populacemi hrají důležitou roli v rejekci transplantovaných orgánů. Fenotypická analýza buněk BALT může odhalit některé změny buněčných profilů po transplantaci plic (Tiroke *et al.*, 1999).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- 4',6-diamidin-2-fenyldol (DAPI) Fluoromount-G<sup>®</sup> (SouthernBiotech, USA)
- Destilovaná voda
- Hematoxylin (Serva, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Methanol (Mikrochem, Česká republika)
- Montovací médium Glycergel (Dako, USA)
- Primární monoklonální králičí protilátka proti lidskému znaku CD14 (klon M5E2) (BioLegend, USA)
- Primární monoklonální myší protilátka proti lidskému znaku CD68 (klon Y1/82A) (BioLegend, USA)
- Saponin (Serva, Německo)
- Sekundární polyklonální kozí protilátka proti králičí protilátce IgG HL (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ABCAM, Anglie)
- Sekundární polyklonální oslí protilátka proti myší protilátce IgG HL (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) (ABCAM, Anglie)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Česká republika)

Fluorochromy konjugované s monoklonálními myšimi protilátkami proti lidským znakům (BioLegend, USA):

- Fluorescein isothiokyanát (FITC)– CD3 (klon OKT3), CD4 (klon SK3), CD14 (klon M5E2), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)
- Fykoerythryn (PE)– směs protilátek CD3FITC/(CD16+CD56) PE (klon UCHT1/3G8+MEM-188), CD25 (klon M-A251), CD274 (PD-L1) (klon 29E.2A3), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)
- Peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5)– CD4 (klon SK3), CD45 (klon 2D1), CD127 (klon A019D5), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)

- Fykoerythryn-cyanin 7 (PE-Cy7)– CD8 (klon SK1), CD15 (klon W6D3), CD279 (PD-1) (klon EH12 2H), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)
- Allofykocyanin (APC)– HLA-DR (klon L243), CD11b (klon CBRM1/5), CD45RO (klon UCHL1), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21), IgG2 izotypová kontrola (klon MOPC-173)
- Allofykocyanin-cyanin 7 (APC-Cy7)– CD11c (klon Bu15), CD19 (klon SJ25C1), CD45 (klon 2D1), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21)

### 3.1.2 Soupravy

- EnVision™ + Dual Link System-HRP (Dako, USA)

### 3.1.3 Roztoky a média

#### Fosfátový pufr (1x PBS)

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,44 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml

pH= 7,4

#### Lyzační roztok

8,3 g NH<sub>4</sub>Cl

1,0 g KHCO<sub>3</sub>

0,04 g EDTA

Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml

pH= 7,29

#### Fetální hovězí sérum (1% FBS)

500 µl FBS

Doplnit 1x PBS pufrem (pH= 7,4) do 50 ml

#### Promývací roztok (0,5% BSA-1x PBS)

0,05 g BSA

Doplnit 1x PBS pufrem (pH= 7,4) do 10 ml

#### Permeabilizační roztok (0,1% Saponin-0,5% BSA-1x PBS)

0,01 g Saponinu

0,05 g BSA

Doplnit 1x PBS pufrem (pH= 7,4) do 10 ml

### **3.1.4 Biologický materiál**

BALT a periferní krev byly odebrány pacientům po transplantaci plic na III. Chirurgické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Fakultní nemocnice Motol v Praze a na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice v Olomouci.

### **3.1.5 Programy a software**

Flow Jo<sup>®</sup> verze 10.5.3

GraphPad Prism verze 5.03

MedCalc<sup>®</sup> verze 14.8.1

Statistica verze 13.4.0.14

### **3.1.6 Přístroje**

Automatický zobrazovací a analyzační systém TissueFAXS (TissueGnostics GmbH, Rakousko)

Centrifuga 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Německo)

Centrifuga Thermo Scientific<sup>™</sup> Cytospin<sup>™</sup> 4 Cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Flowbox MSC 1.2 (Thermo Scientific GmbH, Německo)

Laboratorní digestoř N/900 M2 (MERCİ, s.r.o., Česká republika)

Mini Centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Česká republika)

Průtokový cytometr NovoCyte<sup>®</sup> (ACEA Biosciences, USA)

Světelný mikroskop (Carl Zeiss, Česká republika)

Vortex V-1 plus (Biosan, Česká republika)

### **3.1.7 Statistická analýza**

K analýze dat byly využity programy Statistica, MedCalc a GraphPad Prism. U naměřených dat byla testována normalita pomocí Shapirova-Wilkova testu. V případě, že bylo normální rozdělení dat, byl využit parametrický t-test. Pokud bylo rozdělení dat bez normality, byla data testována neparametrickým testem Mann-Whitney. Za signifikantní statistické rozdíly mezi daty bylo považováno

$P < 0,05$ . Koláčový graf byl vytvořen v programu Statistica a krabicové grafy v programu MedCalc. V programu Flow Jo<sup>®</sup> byly upraveny získané záznamy (dot-ploty) z měření na průtokovém cytometru NovoCyte<sup>®</sup>.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Zpracování bronchoalveolární lavážní tekutiny

Nejprve byly jednotlivé vzorky BALT důkladně označeny čísly a byl zaznamenán objem, vzhled a přítomnost částic ve zkumavce. Do 5ml zkumavky, určené k měření na průtokovém cytometru NovoCyte<sup>®</sup>, označené jako nativní vzorek bylo po důkladném promíchání BALT pipetováno 150  $\mu$ l vzorku a 1,5  $\mu$ l protilátky CD45 konjugované s fluorochromem APC-Cy7. Vzorek byl inkubován 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě a poté změřen na průtokovém cytometru NovoCyte<sup>®</sup>. Nativní vzorek byl použit k určení celkového počtu všech imunitních buněk.

Zbytek BALT byl přenesen Pasteurovou pipetou do nové 50ml zkumavky. Zkumavka byla centrifugována při 1700 g, teplotě 10 °C, po dobu 10 minut. Poté byl odlit supernatant do odpadu a pelet byl resuspendován. Následně byly přidány Pasteurovou pipetou 2 ml 1x PBS pufru. Buňky byly resuspendovány pipetováním.

Podle vzhledu vzorku (bez přítomnosti krve/krvavý) byl určen následující postup. V případě, že vzhled vzorku byl bez přítomnosti krve, obsah zkumavky byl přefiltrován přes 70  $\mu$ m filtr do nové 12ml zkumavky. Do původní zkumavky byly přidány Pasteurovou pipetou 2 ml 1x PBS pufru, aby byly opláchnuty stěny zkumavky a přes filtr přidány k přefiltrovanému vzorku.

Pokud byl vzorek před zpracováním krvavý, bylo do zkumavky přidáno Pasteurovou pipetou 5 ml lyzačního roztoku, který byl použit k odstranění erytrocytů. Vzorek byl lyzován 5 minut, dokud nebyl vzorek ve zkumavce čirý. Během lyzování byla zkumavka opatrně promíchávána převrácením. Posléze byl obsah zkumavky přefiltrován přes 70  $\mu$ m filtr do nové 12ml zkumavky. Do původní zkumavky byly přidány Pasteurovou pipetou 2 ml 1x PBS pufru, aby byly opláchnuty stěny zkumavky a byly opět přefiltrovány přes 70  $\mu$ m filtr k přefiltrovanému vzorku. Dále bylo přidáno Pasteurovou pipetou 1x PBS pufr cca 1 cm pod okraj zkumavky. Zkumavka byla centrifugována při 600 g, teplotě 10 °C, 10 minut. Supernatant byl odlit do odpadu. Pelet byl resuspendován a zbylý objem ve zkumavce byl změřen

pipetou. Dle tabulky (Tab. 2) byl k resuspendovanému peletu pipetován roztok 1% FBS. FBS bylo použito k zablokování vychytávání protilátek Fc receptory na povrchu některých imunitních buněk. Pipetováním byla buněčná suspenze promíchána a rozdělena po 150  $\mu$ l do příslušného počtu 5ml zkumavek, které byly dále použity na imunofenotypizaci.

### 3.2.2 Imunofenotypizace bronchoalveolární lavážní tekutiny

Do jednotlivých označených zkumavek byly k buněčné suspenzi pipetovány protilátky konjugované s fluorochromy proti specifickým buněčným znakům imunitních buněk v BALT dle tabulky (Tab. 3).

Izotypová kontrola sloužila k určení fluorescenčního pozadí vzorku. Každá protilátka konjugovaná s fluorochromem byla pipetována po 1  $\mu$ l k buněčné suspenzi, mimo směs protilátek CD3+CD16+CD56, kdy byly pipetovány 4  $\mu$ l. Takto označené vzorky byly inkubovány 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Před měřením na průtokovém cytometru NovoCyte<sup>®</sup> byly všechny zkumavky důkladně vortexovány. Na přístroji byl nastaven objem nasávání vzorku a panely protilátek konjugované s fluorochromy proti specifickým buněčným znakům sledovaných na imunitních buňkách v BALT.

Tab. 2 Stanovení počtu zkumavek BALT pro průtokovou cytometrii

Počet zkumavek	Původní objem vzorku [ml]	Celkový objem [ $\mu$ l]
2	méně než 10	300
3	10-20	450
4	více než 20	600

Tab. 3 Kombinace CD znaků imunitních buněk v BALT

Kombinace CD znaků	Imunitní buňky
CD45 <sup>+</sup>	Leukocyty
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	B-lymfocyty
CD3 <sup>+</sup>	T-lymfocyty
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> T-lymfocyty
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> T-lymfocyty
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	Regulační T-lymfocyty
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	Paměťové T-lymfocyty
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	NK buňky
CD15 <sup>+</sup>	Neutrofilly
CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	Makrofágy

### 3.2.3 Imunofenotypizace periferní krve

U vybraných pacientů byly získány kromě vzorků BALT i vzorky periferní krve, které byly zpracovány pro imunofenotypizaci. Po 50  $\mu$ l vzorku krve bylo pipetováno do 5ml zkumavek a byly přidány protilátky proti specifickým povrchovým znakům (viz. Tab. 3) konjugované s fluorochromem, s tím rozdílem, že oproti BALT, se v krvi detekují monocyty místo makrofágů. Po 20minutové inkubaci byl vzorek zlyzován lyzačním roztokem (4 ml) po dobu asi 2 minut. Zkumavky byly centrifugovány při 400 g, laboratorní teplotě, po dobu 7 minut. Supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 3 ml 1x PBS pufru a opět centrifugován při 400 g, laboratorní teplotě, po dobu 7 minut. Opět byl supernatant odlit a pelet finálně resuspendován ve 300  $\mu$ l 1x PBS pufru. Vzorky byly změřeny na průtokovém cytometru NovoCyte®.

### 3.2.4 Příprava cytospinů

Z vybraných vzorků BALT byly připraveny cytospiny, které byly posléze použity pro imunocytochemické barvení.

Pro stanovení počtu buněk v suspenzi bylo využito metody počítání buněk v Neubauerově komůrce. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 9  $\mu$ l buněčné suspenze a 1  $\mu$ l Trypanové modři. Pipetováním byla suspenze buněk promíchána. Na Neubauerovu komůrku pod krycí sklíčko bylo pipetováno 10  $\mu$ l směsi a buněčnost vzorku byla pozorována pod světelným mikroskopem. Byly spočítány živé neobarvené buňky v deseti čtvercích ohraničených třemi čarami. Rozměry jednoho čtverce byly 0,2x0,2 mm. Z průměrného počtu živých buněk byl určen počet buněk v 1 ml buněčné suspenze. Vzorek byl poté naředěn pomocí 1x PBS pufru na určitý objem tak, aby na jeden cytospin připadalo 200 000 buněk na 200  $\mu$ l suspenze. Následně byla zkompletována cytospinová sestava skládající se z podložního skla a jednoho filtračního papíru s otvorem. Označené podložní sklo bylo vloženo do kovového klipu. Na podložní sklo byl položen filtrační papír. Plastový nástavec byl přiložen tak, aby se otvor na plastovém kryl s otvorem ve filtračním papíru a suspenze tak mohla procházet na podložní sklo. Cytospinová sestava byla vložena do držáku cytocentrifugy. Zkušavka s naředěnou buněčnou suspenzí byla vortexována a do plastového nástavce bylo pipetováno 200  $\mu$ l této suspenze. Vzorek byl centrifugován při 72 g, při laboratorní teplotě po dobu

3 minut. Po odstranění filtračního papíru bylo podložní sklo opatrně vyjmuto z držáku a ponecháno schnout na buničině přes noc při laboratorní teplotě v digestoři. Po zaschnutí bylo podložní sklo v digestoři fixováno ponořením na jednu minutu do vychlazeného methanolu a poté ponecháno schnout v digestoři 10 minut. Dále byla zkontrolována přítomnost buněk na podložním skle pod světelným mikroskopem. Podložní sklo bylo zabaleno do kousku polyethylenového sáčku a uskladněno v krabici v mrazáku při -20 °C.

### **3.2.5 Imunocytochemické barvení cytospinů**

#### **3.2.5.1 Chromogenní barvení cytospinů**

První den byla jedna část cytospinů inkubována s primární myší protilátkou proti lidskému znaku CD68 a druhá část cytospinů inkubována s primární králičí protilátkou proti lidskému znaku CD14. Druhý den byly všechny cytospiny inkubovány se sekundární protilátkou soupravy (EnVision™ + Dual Link System-HRP) a barveny chromogenním barvivem DAB.

Po vyjmutí cytospinů z -20 °C byla pozorována buněčnost vzorku na cytospinech pod světelným mikroskopem. V digestoři byl pomocí olejového pera nakreslen kruh kolem fixovaných buněk na cytospinech.

Fixované buňky na cytospinech byly promyty 2 kapkami 1x PBS pufru. Cytospiny byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě v digestoři. Po inkubaci byl pomocí buničiny odsát 1x PBS pufr. Poté byly cytospiny permeabilizovány 2 kapkami permeabilizačního roztoku (0,1% Saponin-0,5% BSA-1x PBS) a cytospiny inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Po každé proběhlé inkubaci byl odsát buničinou roztok a následně byly přidány 2 kapky jednotlivých roztoků na cytospiny. Byly přidány 2 kapky roztoku blokujícího endogenní peroxidasy. Cytospiny byly inkubovány 7 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Dále byly přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku a cytospiny byly inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Poté byly přidány 2 kapky blokujícího proteiny a cytospiny byly inkubovány 25 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě.

V průběhu inkubace byla naředěna primární myší protilátka proti lidskému znaku CD68 (100x a 50x) a primární králičí protilátka proti lidskému znaku CD14

permeabilizačním roztokem. Po inkubaci byly přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku, cytopspiny byly ponechány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Po odsátí roztoku bylo pipetováno 100 µl 100x naředěné primární myší protilátky proti lidskému znaku CD68 na jeden cytopspin a na druhý 100 µl 50x naředěné primární myší protilátky proti lidskému znaku CD68. Dále bylo pipetováno 100 µl 100x naředěné primární králičí protilátky proti lidskému znaku CD14 na jeden cytopspin a na druhý 100 µl 50x naředěné primární králičí protilátky proti lidskému znaku CD14. Poté byly cytopspiny inkubovány v digestoři ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě přes noc.

Další den byl pomocí buničiny odsát přebytečný roztok s primární protilátkou. Následně cytopspiny promyty 2 kapkami promývacího roztoku a cytopspiny inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Cytopspiny byly třikrát promyty promývacím roztokem (0,5% BSA-1x PBS) a posléze byl roztok odsát buničinou.

Poté byly přidány 2 kapky sekundární protilátky soupravy (EnVision<sup>TM</sup> + Dual Link System-HRP) na cytopspiny, které byly dále inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Poté byly cytopspiny dvakrát promyty promývacím roztokem, cytopspiny byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě a roztok byl po inkubaci opět odsát buničinou. Na cytopspiny byly přidány 2 kapky DAB chromogenu a cytopspiny inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Cytopspiny byly dvakrát promyty destilovanou vodou, vysušeny v proudu vzduchu v digestoři a pozorovány pod světelným mikroskopem.

Na cytopspiny bylo pipetováno 100 µl barviva hematoxylinu a cytopspiny byly inkubovány 5 minut, při laboratorní teplotě. Následně byly cytopspiny promyty destilovanou vodou a cytopspiny byly vysušeny v proudu vzduchu v digestoři. Na cytopspiny byla přidána 1 kapka montovacího média Glycergelu.

Cytopspiny byly překryty krycím sklíčkem pro následné pozorování na skenovacím mikroskopu TissueFAXS.

### **3.2.5.2 Fluorescenční barvení cytopsinů**

První den byla jedna část cytopsinů inkubována s primární myší protilátkou proti lidskému znaku CD68 a druhá část cytopsinů byla inkubována s primární králičí protilátkou proti lidskému znaku CD14. Druhý den byly cytopspiny



inkubovány s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou proti primární protilátce a jaderným fluorescenčním barvivem DAPI Fluoromount-G®.

Vzorky od pacientů byly zpracovávány vždy po dvou cytopinech, kdy se postup zpracování lišil až v ředění primární protilátky proti lidskému znaku CD68 a CD14 (100x a 50x).

Po vyjmutí cytopinů z -20 °C byla pozorována buněčnost vzorku na cytopinech pod světelným mikroskopem. Pomocí olejového pera byl v digestoři nakreslen kruh kolem fixovaných buněk na cytopinech.

Fixované buňky byly promyty 2 kapkami promývacího roztoku (0,5% BSA-1x PBS). Cytospiny byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl pomocí buničiny odsát promývací roztok. Poté byly buňky permeabilizovány 2 kapkami permeabilizačního roztoku (0,1% Saponin-0,5% BSA-1x PBS) a cytopiny inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Po inkubaci byl odsát buničinou roztok a následně byly přidány 2 kapky jednotlivých roztoků na cytopiny, kdy po každé inkubaci byl následně odsát roztok pomocí buničiny. Byly přidány 2 kapky blokovacího roztoku blokujícího endogenní peroxidasu. Cytospiny byly inkubovány 7 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Dále přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku a cytopiny byly inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Poté přidány 2 kapky roztoku blokujícího proteiny a cytopiny byly inkubovány 25 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě.

V průběhu inkubace byla naředěna neoznačená primární myší protilátka proti lidskému znaku CD68 (100x a 50x) a primární králičí protilátka proti lidskému znaku CD14 (100x a 50x) permeabilizačním roztokem. Po inkubaci byly přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku, cytopiny byly inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Následně bylo pipetováno 100 µl 100x naředěné primární myší protilátky proti lidskému znaku CD68 na jeden cytopin a 100 µl 50x naředěné primární myší protilátky proti lidskému znaku CD68 na druhý cytopin. Stejným způsobem byla pipetována na cytopiny primární králičí protilátka proti lidskému znaku CD14. Cytospiny s primární protilátkou proti lidskému znaku CD68 a CD14 byly inkubovány v digestoři ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě přes noc.

Další den byl pomocí buničiny odsát přebytečný roztok s primární protilátkou. Následně byly cytopiny promyty 2 kapkami promývacího roztoku a cytopiny

inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce ve tmě. Cytospiny byly třikrát promyty promývacím roztokem a mezi každým promytím byl roztok odsát buničinou.

Bylo pipetováno 100  $\mu$ l sekundární polyklonální oslí protilátky proti primární myší protilátce IgG konjugovaná fluorochromem AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (ABCAM) (500x naředěná promývacím roztokem) na oba cytospiny. Dále bylo pipetováno 100  $\mu$ l sekundární polyklonální kozí protilátky proti primární králičí protilátce IgG konjugovaná fluorochromem AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (ABCAM) (500x naředěná promývacím roztokem) na oba cytospiny, které byly inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce.

Poté byly cytospiny dvakrát promyty promývacím roztokem, cytospiny inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce a roztok byl po inkubaci opět odsát buničinou. Cytospiny byly dvakrát promyty destilovanou vodou, vysušeny v proudu vzduchu v digestoři a pro kontrolu pozorovány pod světelným mikroskopem.

Na cytospiny bylo pipetováno 100  $\mu$ l média DAPI Fluoromount-G<sup>®</sup>, které slouží jednak jako montovací médium a zároveň jako jaderné barvivo vázající se na DNA, které je možné detekovat jako modrou fluorescenci. Cytospiny byly překryty krycím sklíčkem pro následné pozorování na fluorescenčním skenovacím mikroskopu TissueFAXS.

## 4 VÝSLEDKY

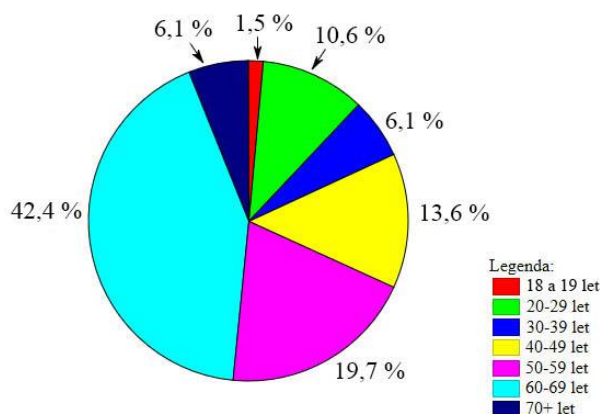
Pacientům po transplantaci plic byla odebrána BALT na III. Chirurgické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol v Praze. BALT byla převezena na pracoviště Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde byla zpracována k získání dat o zastoupení imunitních buněk v BALT, které byly dále využity pro statistické vyhodnocení a korelaci s klinickými daty. V rámci Moravy byla pacientům odebrána BALT po transplantaci plic na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice v Olomouci, která byla rovněž použita pro zpracování a následnou analýzu. K analýze byla určena BALT od pacientů po transplantaci plic, která odpovídala druhému alikvotnímu podílu při odběru BALT. Přičemž první alikvotní podíl BALT sloužil pro mikrobiologickou analýzu, která byla provedena v rámci nemocnice, kde byla odebrána BALT.

V rámci diplomové práce bylo analyzováno celkem 106 BALT od 66 pacientů po transplantaci plic. Při zpracování byl zaznamenán objem a fyzický vzhled BALT, kdy objem BALT byl relevantním ukazatelem pro zpracování BALT (Tab. 4). Z hlediska fyzického vzhledu byla BALT nejčastěji opalescentní, mléčně zakalená, s výskytem drobných částic a shluků.

Z celkového počtu BALT od pacientů po transplantaci plic tvořili 63,6 % muži a 36,4 % ženy. Věk pacientů se pohyboval od 18 do 75 let, přičemž byl zaznamenán nejvyšší výskyt BALT od pacientů ve věku mezi 60 až 69 lety, což odpovídá 42,4 % všech pacientů (Obr. 7). K transplantaci plic byli indikováni zejména pacienti s diagnózami: CHOPN, IPF a CF. BALT byla odebrána pacientům v různých časových rozmezích, tj. měsíců až několika let po transplantaci plic za účelem sledování jejich zdravotního stavu. Pro zhodnocení aktuálního zdravotního stavu po transplantaci plic byla BALT pacientům odebrána několikrát.

Tab. 4 Četnost objemů analyzovaných BALT

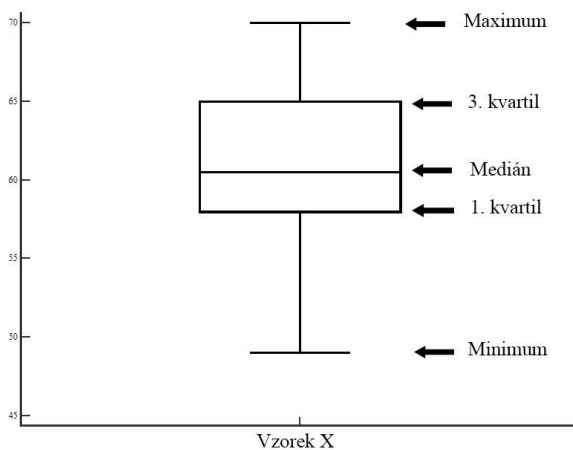
Původní objem [ml]	Počet BALT
méně než 10	4
10-20	31
více než 20	71



Obr. 7 Koláčový graf věkového rozmezí pacientů po transplantaci plic.

#### 4.1 Zastoupení populací hlavních imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině

Z měření na průtokovém cytometru NovoCyte<sup>®</sup> byly získány záznamy (dot-ploty), které sloužily k vyhodnocení procentuálního zastoupení hlavních populací imunitních buněk v BALT od pacientů po transplantaci plic. Na základě exprese znaku CD45<sup>+</sup> bylo stanoveno absolutní zastoupení imunitních buněk (leukocytů) v BALT od pacientů po transplantaci plic, které dosahovalo průměrného zastoupení 28,6 % s konfidenčním intervalem v rozsahu od 22,4 do 34,8 %. Ostatní buňky, které se vyskytovaly v BALT byly neimunitního původu, epitelové buňky a jiné částice. Průměrná koncentrace leukocytů v BALT byla 76,2 x 10<sup>6</sup> leukocytů/l s konfidenčním intervalem od 38,6 do 113,8 x 10<sup>6</sup> leukocytů/l. Podle (Obr. 8), jsou znázorněny krabicové grafy v diplomové práci.



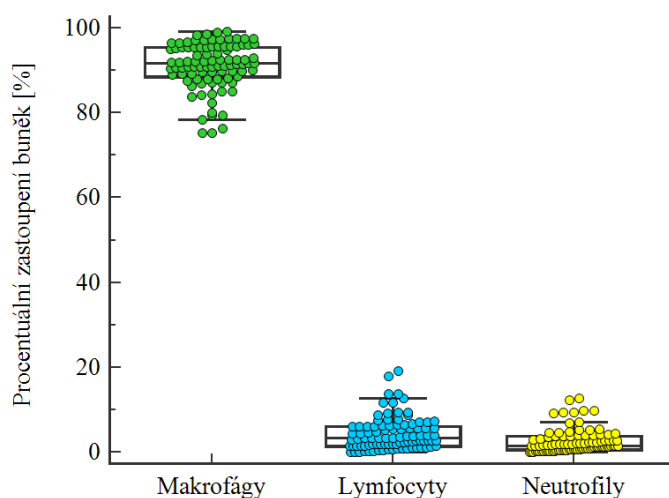
Obr. 8 Vzorový krabicový graf s popisem.

Nejvíce zastoupenou populací hlavních imunitních buněk v BALT od pacientů po transplantaci plic byla populace makrofágů s průměrným zastoupením 91,1 % a konfidenčním intervalem v rozsahu od 90,0 do 92,2 %. Populace lymfocytů se vyskytovala v BALT s průměrným zastoupením 4,4 %, s konfidenčním intervalem od 3,6 do 5,2 %. Zatímco nejméně byla zastoupena v BALT populace neutrofilů s průměrným zastoupením 2,6 % a konfidenčním intervalem od 2,0 do 3,1 % (Obr. 9).

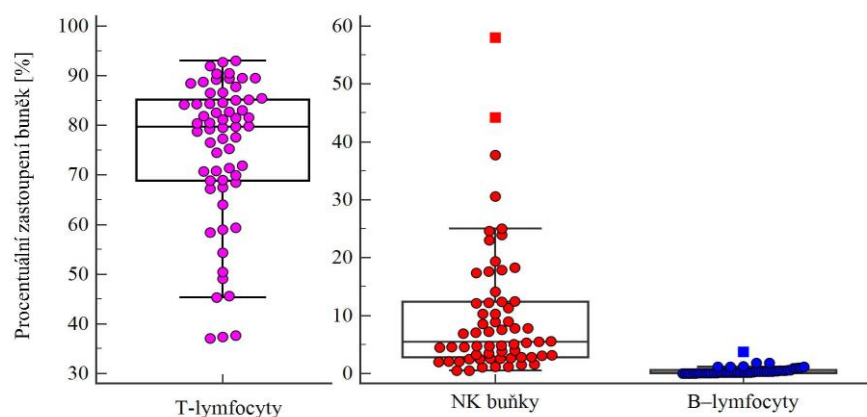
#### 4.2 Zastoupení imunitních buněk v lymfocytární populaci v bronchoalveolární lavážní tekutině

V BALT od pacientů po transplantaci plic byly analyzovány populace imunitních buněk T-lymfocytů, NK buněk a B-lymfocytů a subpopulace T-lymfocytů: CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, CD4<sup>+</sup> regulační T-lymfocyty v rámci populace T-lymfocytů.

Převažující zastoupení v lymfocytární populaci tvořila populace T-lymfocytů s průměrným zastoupením 75,1 % a konfidenčním intervalem od 71,4 do 78,8 %. Populace NK buněk se vyskytovala s průměrným zastoupením 9,9 % a konfidenčním intervalem od 7,2 do 12,7 %. Nejméně byla zastoupena populace B-lymfocytů s průměrným zastoupením 0,5 % a konfidenčním intervalem od 0,3 do 0,7 % (Obr. 10).



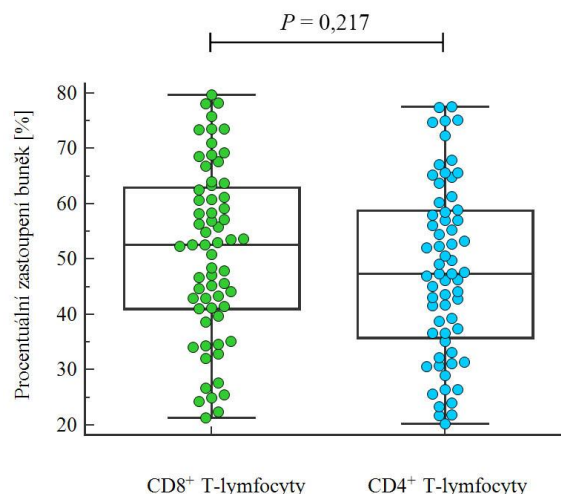
Obr. 9 Procentuální zastoupení populací makrofágů, lymfocytů a neutrofilů v BALT.



Obr. 10 Procentuální zastoupení populací T-lymfocytů, NK buněk a B-lymfocytů v BALT. Čtverce v grafu znázorňují odlehle hodnoty.

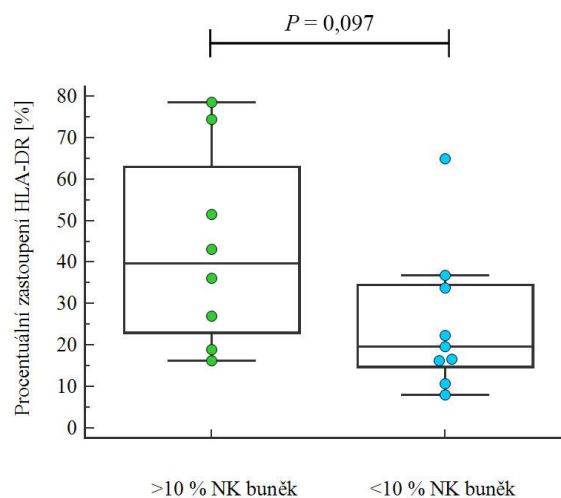
Subpopulace  $CD8^+$  T-lymfocytů se vyskytovala s průměrným zastoupením 51,3 %, s konfidenčním intervalem od 47,4 do 55,2 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,976$ ). Průměrné zastoupení subpopulace  $CD4^+$  T-lymfocytů bylo 47,9 %, s konfidenčním intervalem od 44,0 do 51,8 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,973$ ). Nepárovým t-testem byly zjištěny mezi subpopulací  $CD8^+$  T-lymfocytů a  $CD4^+$  T-lymfocytů statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,217$ ) (Obr. 11).

Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů bylo 0,9 a konfidenční interval dosahoval hodnot od 1,0 do 1,4. Dále byly sledovány  $CD4^+$  regulační T-lymfocyty. Vyskytovaly se s průměrným zastoupením 2,4 %, přičemž konfidenční interval byl od 1,1 do 3,6 %. Průměrné zastoupení exprese znaku paměťových buněk  $CD45RO^+$  na  $CD4^+$  T-lymfocytech bylo 80,5 %, konfidenční interval dosahoval hodnot v rozsahu od 76,5 do 84,6 %. Zatímco exprese znaku paměťových buněk  $CD45RO^+$  na  $CD8^+$  T-lymfocytech byla s průměrným zastoupením 70,2 % a konfidenčním intervalem od 65,5 do 74,9 %.



Obr. 11 Srovnání procentuálního zastoupení populací CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v BALT.

Byla sledována exprese aktivačního znaku HLA-DR na NK buňkách s průměrným zastoupením 33,8 % a konfidenčním intervalem od 22,5 do 45,1 %, bez normality dat ( $W=0,888$ ). V BALT s vyšší buněčností NK buněk (>10 %) byla exprese aktivačního znaku HLA-DR s průměrným zastoupením 43,3 %, konfidenční interval dosahoval hodnot od 23,5 do 63,0 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,917$ ). Nepárovým t-testem bylo zjištěno, že BALT s vyšším zastoupením NK buněk (>10 %) vykazovaly trend k vyšším hodnotám povrchové exprese HLA-DR na NK buňkách oproti BALT s nižším počtem NK buněk (<10 %) se statisticky nevýznamnými rozdíly ( $P=0,097$ ) (Obr. 12). Průměrné zastoupení exprese HLA-DR v BALT s nižším zastoupením NK buněk bylo s průměrným zastoupením 25,5 %, konfidenční interval dosahoval od 11,9 do 39,0 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,917$ ).

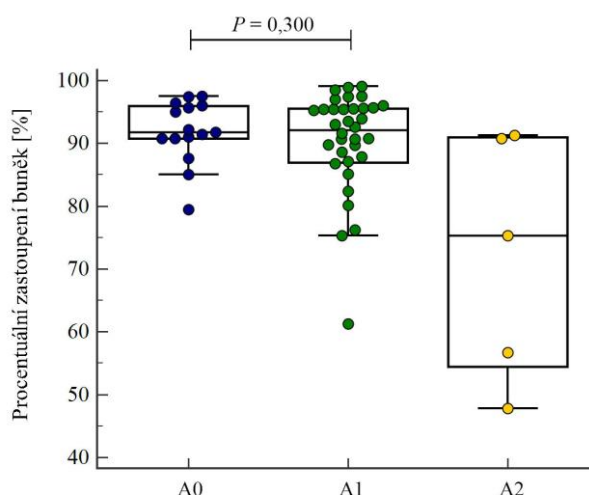


Obr. 12 Srovnání exprese HLA-DR na NK buňkách (více než 10 % NK buněk) a NK buněk (méně než 10 % NK buněk) v BALT.

### 4.3 Zastoupení populací imunitních buněk v bronchoalveolární lavážní tekutině ve vztahu k akutní rejekci

Bylo analyzováno procentuální zastoupení vybraných populací imunitních buněk, (makrofágů, lymfocytů, neutrofilů, NK buněk, poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů) v BALT a zkoumán jejich vztah k různým typům akutní rejekce. Přičemž data z BAL byla porovnáována s daty z transbronchiální biopsie. Jednotlivé populace imunitních buněk v BALT byly rozděleny do tří skupin typů akutní rejekce (pacienti bez akutní rejekce A0, s minimální akutní rejekcí A1 a pacienti s mírnou akutní rejekcí A2).

U pacientů bez akutní rejekce A0 byly makrofágy více zastoupeny v BALT ve srovnání se skupinou pacientů s rejekcí typu A1. Průměrné zastoupení makrofágů u skupiny pacientů bez rejekce A0 bylo 91,9 %, s konfidenčním intervalem od 89,1 do 94,6 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,894$ ). Dále průměrné zastoupení makrofágů u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 bylo 88,9 %, s konfidenčním intervalem od 85,3 do 92,5 % a normálním rozdělením dat ( $W=0,780$ ). Makrofágy u skupiny pacientů s rejekcí typu A2, nebyly vyhodnoceny z důvodu nedostatku klinických dat, i když je patrné, že oproti skupinám A0 a A1 mají někteří pacienti s typem rejekce A2 významně snížené procentuální zastoupení populace makrofágů. Nepárovým t-testem byly zjištěny mezi populací makrofágů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,300$ ) (Obr. 13).

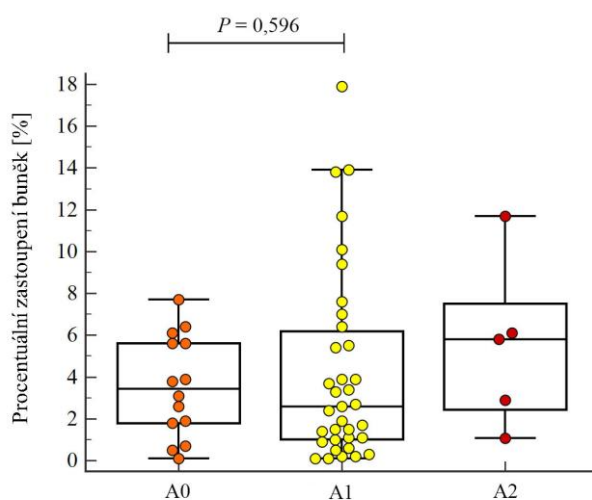


Obr. 13 Srovnání procentuálního zastoupení makrofágů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT.

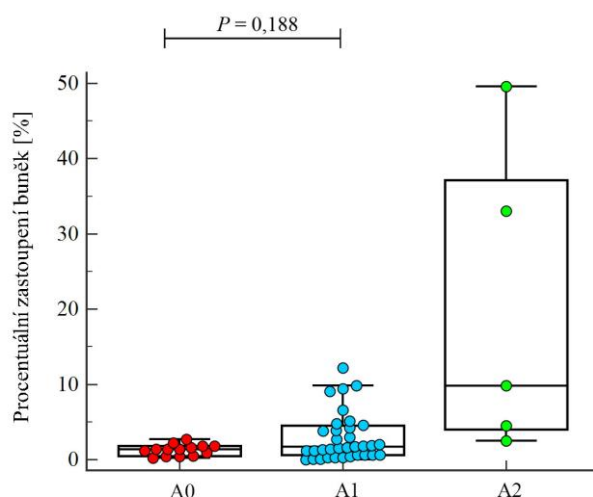


Lymfocyty u skupiny pacientů bez rejekce A0 byly méně zastoupeny v BALT s průměrným zastoupením 3,6 %, s konfidenčním intervalem od 2,2 do 5,0 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,950$ ) ve srovnání se skupinou pacientů s rejekcí typu A1. Lymfocyty u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 byly s průměrným zastoupením 4,3 % v BALT, s konfidenčním intervalem od 2,7 do 5,8 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,819$ ). Lymfocyty u skupiny pacientů s rejekcí typu A2, nebyly vyhodnoceny z důvodu nedostatku klinických dat. Nepárovým t-testem byly zjištěny mezi populací lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,596$ ) (Obr. 14).

Neutrofilů byly méně zastoupeny v BALT u skupiny pacientů bez rejekce A0 s průměrným zastoupením 1,3 %, s konfidenčním intervalem od 0,9 do 1,7 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,955$ ). Neutrofilů u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 byly více zastoupeny v BALT ve srovnání se skupinou pacientů bez rejekce A0. Neutrofilů u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 byly s průměrným zastoupením 2,9 %, s konfidenčním intervalem od 1,8 do 4,0 %, bez normálního rozdělení dat ( $W=0,805$ ). Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zjištěny mezi populací neutrofilů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,188$ ) (Obr. 15). Z grafu je patrné, že oproti skupinám A0 a A1 mají někteří pacienti s typem rejekce A2 procentuální zastoupení neutrofilů významně zvýšené.

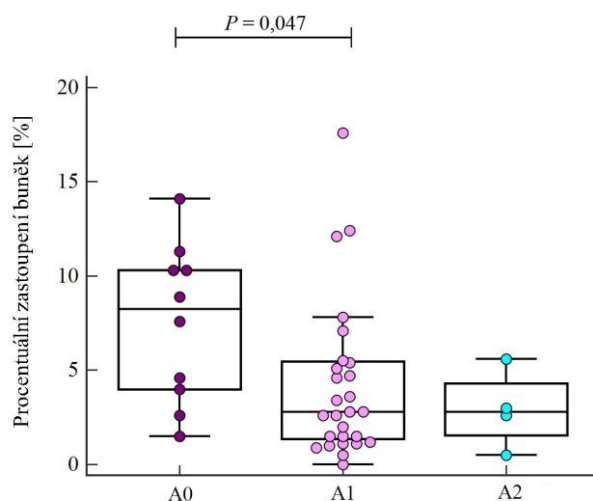


Obr. 14 Srovnání procentuálního zastoupení lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT.



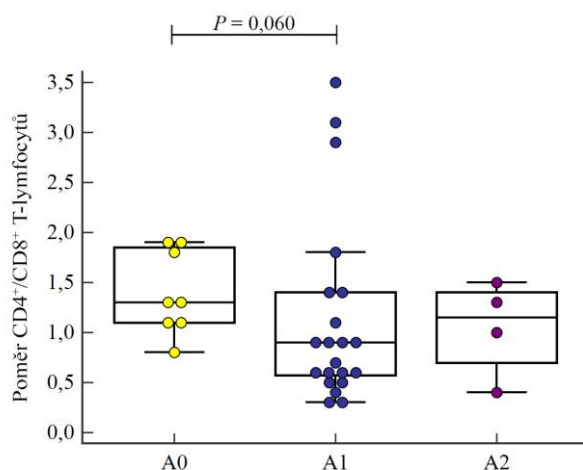
Obr. 15 Srovnání procentuálního zastoupení neutrofilů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT.

NK buňky u skupiny pacientů bez rejekce A0 byly více zastoupeny v BALT s průměrným zastoupením 7,5 %, s konfidenčním intervalem od 4,5 do 10,5 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,951$ ). NK buňky u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 byly méně zastoupeny v BALT s průměrným zastoupením 4,7 %, s konfidenčním intervalem od 2,8 do 6,7 %, s rozdělením dat, které nedosahovalo normality ( $W=0,773$ ). NK buňky u skupiny pacientů s rejekcí typu A2, nebyly vyhodnoceny z důvodu nedostatku klinických dat, i když je patrné, že oproti skupině A0 mají pacienti s typem rejekce A2 významně snížené procentuální zastoupení populace NK buněk. Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zjištěny mezi populací NK buněk u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT statisticky významné rozdíly ( $P=0,047$ ) (Obr. 16).



Obr. 16 Srovnání procentuálního zastoupení NK buněk u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT.

Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce A0 bylo nižší ve srovnání se skupinou pacientů s rejekcí typu A1. Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce (A0) bylo 1,4, s konfidenčním intervalem od 1,1 do 1,8, s normálním rozdělením dat ( $W= 0,889$ ). Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů s rejekcí typu A1 bylo 1,1, s konfidenčním intervalem od 0,7 do 1,6, bez normálního rozdělení dat ( $W= 0,770$ ). Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů s rejekcí typu A2, nebylo vyhodnoceno z důvodu nedostatku klinických dat. Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zjištěny mezi poměrem  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P= 0,060$ ) (Obr. 17).



Obr. 17 Srovnání zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů u skupiny pacientů bez rejekce A0 a rejekce typu A1 v BALT.

## 4.4 Sledování pacientů po transplantaci plic v čase

Pacientům po transplantaci plic byly odebrány vzorky dvěma metodami: transbronchiální biopsií a BAL. Protokolární transbronchiální biopsií byly odebírány vzorky vždy v prvním, třetím, šestém a dvanáctém měsíci. Na oddělení patologie příslušné nemocnice, kde byly biopsie provedeny, byly vyhodnoceny stupně akutní rejekce a zánětu dýchacích cest.

### 4.4.1 Výskyt akutních rejekcí u pacientů 1 měsíc po transplantaci

U devatenácti z 66 pacientů nebyla k dispozici klinická data z transbronchiální biopsie. V tabulce (Tab. 5) byly ohodnoceny stupně akutní rejekce a zánětu dýchacích cest u pacientů v době prvního měsíce po transplantaci plic, stanovený metodou transbronchiální biopsie, ze které je patrné, že nejvíce pacientů nemá žádné známky akutní rejekce (A0, n= 22), méně pak bylo pacientů s minimálními známkami akutní rejekce (A1, n= 18). Pouze u 7 pacientů byly zaznamenány známky mírné akutní rejekce.

Tab. 5 Výskyt akutní rejekce a zánětu dýchacích cest u pacientů v době prvního měsíce po transplantaci plic stanovený metodou transbronchiální biopsie

Stupně akutní rejekce a zánětu dýchacích cest	Počet pacientů n= 47
*A0 **B0	16
*A0 §BX	6
†A1 **B0	6
†A1 ††B1	3
†A1 §BX	9
‡A2 **B0	1
‡A2 §BX	6

\*A0 Bez akutní rejekce; †A1 Minimální akutní rejekce; ‡A2 Mírná akutní rejekce; §BX Nehodnotitelný vzorek; \*\*B0 Bez důkazů zánětů dýchacích cest; ††B1 Minimální zánět dýchacích cest.

#### 4.4.2 Výskyt akutních rejekcí a korelace s imunitními populacemi v bronchoalveolární lavážní tekutině

Pro dlouhodobé sledování pacientů během prvního roku po transplantaci bylo vybráno 5 pacientů, u kterých byly vzorky odebrány metodou transbronchiální biopsie (protokolární) (Tab. 6) a rovněž byla u stejných pacientů provedena BAL.

Tab. 6 Sledování vybraných pacientů (n= 5) v průběhu prvního roku po transplantaci plic metodou transbronchiální biopsie

Pacient	Odebrání vzorku	Typ rejekce
A	1. měsíc	‡A2 §BX
	3. měsíc	*A0 **B0
	6. měsíc	†A1 ††B1
B	1. měsíc	*A0 §BX
	3. měsíc	*A0 §BX
	6. měsíc	†A1 §BX
C	1. měsíc	*A0 **B0
	3. měsíc	†A1 §BX
	6. měsíc	‡A2 ††B1
D	1. měsíc	*A0 §BX
	3. měsíc	†A1 **B0
	6. měsíc	*A0 §BX
	12. měsíc	‡A2 **B0
E	1. měsíc	*A0 §BX
	3. měsíc	†A1 **B0
	6. měsíc	*A0 §BX
	12. měsíc	‡A2 **B0

\*A0 Bez akutní rejekce; †A1 Minimální akutní rejekce; ‡A2 Mírná akutní rejekce; §BX Nehodnotitelný vzorek; \*\*B0 Bez důkazů zánětů dýchacích cest; ††B1 Minimální zánět dýchacích cest.

Pacient A (ŽENA, 21 let): Pacientce po transplantaci plic byla odebrána BALT metodou BAL v prvním a ve třetím měsíci. V rámci třetího měsíce se výrazně snížilo procentuální zastoupení NK buněk ve srovnání s prvním měsícem. Byl zaznamenán nárůst průměrného zastoupení poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a procentuálního zastoupení neutrofilů (Tab. 7).

Pacient B (MUŽ, 61 let): Pacientovi po transplantaci plic byla odebrána BALT metodou BAL ve třetím a v šestém měsíci. V šestém měsíci se výrazně zvýšilo procentuální zastoupení populace NK buněk a byl zaznamenán pokles procentuálního zastoupení populace lymfocytů a průměrného zastoupení poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů ve srovnání s třetím měsícem (Tab. 8).

Pacient C (MUŽ, 63 let): Pacientovi po transplantaci plic byla odebrána BALT metodou BAL ve třetím a v šestém měsíci. V šestém měsíci se značně zvýšilo procentuální zastoupení populace lymfocytů ve srovnání s třetím měsícem (Tab. 9).

Tab. 7 Procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pacienta A v prvním a ve třetím měsíci

Odběr BALT	Lymfocyty [%]	Makrofágy [%]	Neutrofily [%]	NK buňky [%]	Poměr CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-lymfocytů	Typ akutní rejekce
1. měsíc	6,9	81,7	1,3	9,2	1,0	A2 BX
3. měsíc	5,9	87,8	2,4	2,5	1,4	A0

Tab. 8 Procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pacienta B ve třetím a v šestém měsíci

Odběr BALT	Lymfocyty [%]	Makrofágy [%]	Neutrofily [%]	NK buňky [%]	Poměr CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-lymfocytů	Typ akutní rejekce
3. měsíc	3,8	86,3	0,5	7,5	1,9	A0 BX
6. měsíc	1,0	82,8	0,5	15,3	0,4	A1 BX

Tab. 9 Procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pacienta C ve třetím a v šestém měsíci

Odběr BALT	Lymfocyty [%]	Makrofágy [%]	Neutrofily [%]	NK buňky [%]	Poměr CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-lymfocytů	Typ akutní rejekce
3. měsíc	0,5	87,0	1,4	10,1	1,0	A1 BX
6. měsíc	2,4	84,9	1,5	11,0	0,4	A2 B1

Pacient D (MUŽ, 64 let): Pacientovi po transplantaci plic byla odebrána BALT metodou BAL ve třetím, v šestém a ve dvanáctém měsíci. Ve srovnání s šestým a dvanáctým měsícem byly NK buňky nejvíce zastoupeny ve třetím měsíci a nejméně byly zastoupeny neutrofilly. Zatímco v šestém měsíci bylo sníženo procentuální zastoupení lymfocytů ve srovnání s třetím měsícem. Ve dvanáctém měsíci bylo výrazně sníženo procentuální zastoupení NK buněk (Tab. 10).

Pacient E (ŽENA, 45 let): Pacientce po transplantaci plic byla odebrána BALT metodou BAL ve třetím, v šestém a ve dvanáctém měsíci. Ve třetím měsíci byla populace lymfocytů ve srovnání s šestým a dvanáctým měsícem značně snížena. V šestém měsíci byly nejméně zastoupeny neutrofilly a bylo značně zvýšeno procentuální zastoupení NK. Ve dvanáctém měsíci bylo výrazně zvýšeno procentuální zastoupení lymfocytů, zatímco průměrné zastoupení poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů bylo značně sníženo ve srovnání s třetím a šestým měsícem (Tab. 11).

Tab. 10 Procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pacienta D ve třetím, v šestém měsíci a ve dvanáctém měsíci

Odběr BALT	Lymfocyty [%]	Makrofágy [%]	Neutrofilly [%]	NK buňky [%]	Poměr CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-lymfocytů	Typ akutní rejekce
3. měsíc	2,9	79,4	0,3	16,6	0,8	A1 B0
6. měsíc	0,6	90,0	1,2	7,4	0,9	A0 BX
12. měsíc	1,5	92,4	4,1	1,6	0,5	A2 B0

Tab. 11 Procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pacienta E ve třetím, v šestém měsíci a ve dvanáctém měsíci

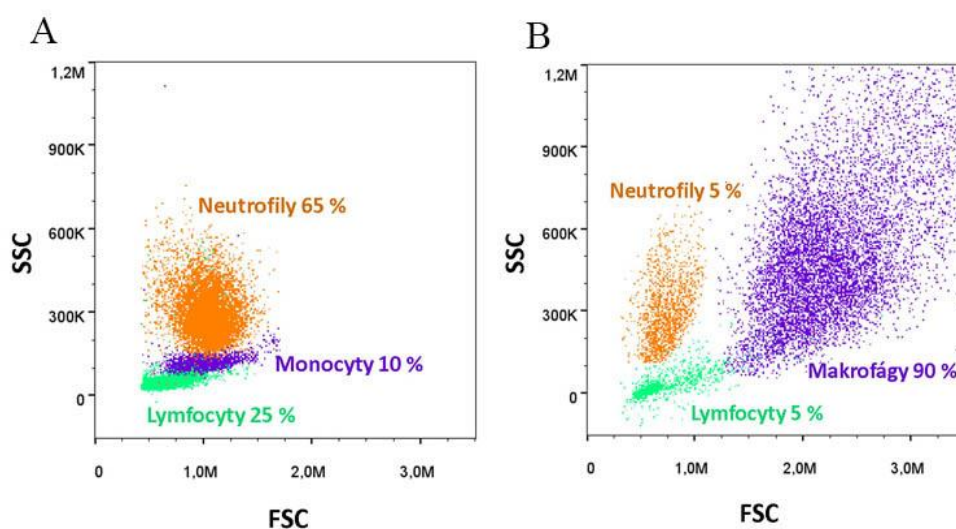
Odběr BALT	Lymfocyty [%]	Makrofágy [%]	Neutrofilly [%]	NK buňky [%]	Poměr CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-lymfocytů	Typ akutní rejekce
3. měsíc	3,5	80,4	8,9	4,4	2,7	A1 B0
6. měsíc	5,9	83,4	0,8	8,2	1,7	A0 BX
12. měsíc	12,0	77,0	10,0	0,5	1,0	A2 B0

## 4.5 Zastoupení populací imunitních buněk v periferní krvi a bronchoalveolární lavážní tekutině

V periferní krvi byla značně převládající populace neutrofilů. Nejméně byly zastoupeny v periferní krvi monocyty, přičemž monocyty se v BALT vyskytovaly pouze v aktivované formě jako makrofágy. Ve srovnání s BALT byla zde nejvíce zastoupena populace makrofágů (Obr. 18).

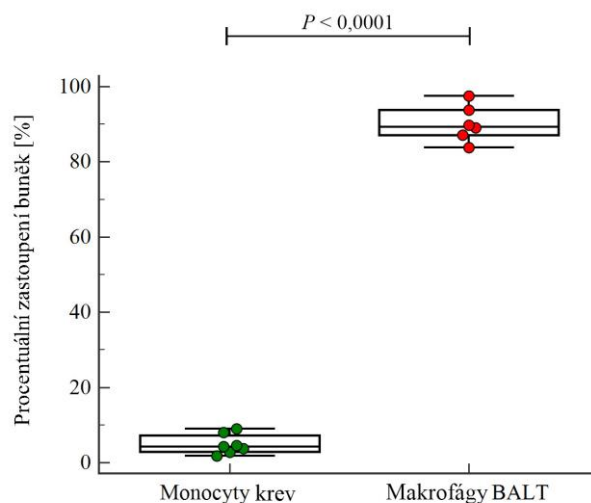
Bylo sledováno průměrné zastoupení populací imunitních buněk v periferní krvi a BALT od pacientů ( $n=7$ ) po transplantaci plic.

**Monocyty** byly méně zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 4,9 %, s konfidenčním intervalem od 2,4 do 7,3 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,901$ ). Monocyty v BALT (pouze aktivovaná forma jako makrofágy) byly více zastoupeny v BALT s průměrným zastoupením 90,2 %, s konfidenčním intervalem od 85,1 do 95,3 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,978$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací monocytů v periferní krvi a makrofágů v BALT statisticky významné rozdíly ( $P < 0,0001$ ) (Obr. 19).



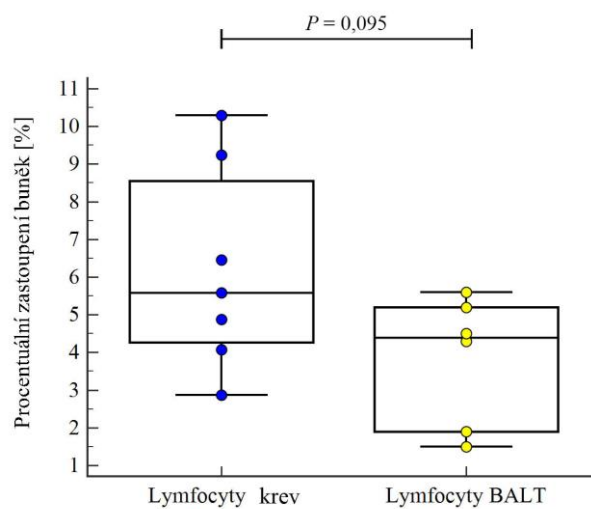
Obr. 18 Srovnání procentuálního zastoupení hlavních populací imunitních buněk v periferní krvi a v BALT. A) Periferní krev; B) BALT. FSC Přímý rozptyl světla; SSC Boční rozptyl světla.





Obr. 19 Srovnání procentuálního zastoupení monocytů v periferní krvi a makrofágů v BALT.

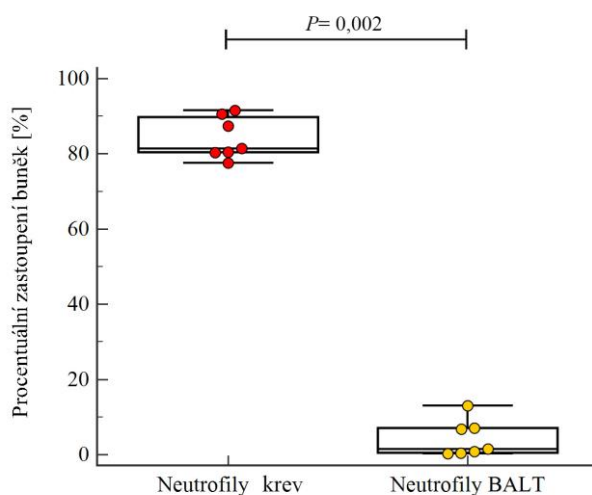
**Lymfocyty** byly více zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 6,2 %, s konfidenčním intervalem od 3,7 do 8,7 %. Při testování normality bylo zjištěné normální rozdělení dat ( $W=0,940$ ). Méně se lymfocyty vyskytovaly v BALT, s průměrným zastoupením 3,8 %, s konfidenčním intervalem od 2,0 do 5,6 % a s normálním rozdělením dat ( $W=0,864$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,095$ ) (Obr. 20).



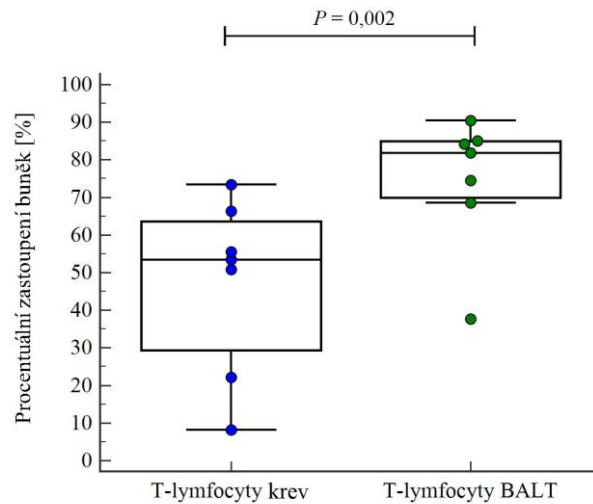
Obr. 20 Srovnání procentuálního zastoupení lymfocytů v periferní krvi a BALT.

**Neutrofilly** byly více zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 84,2 %, s konfidenčním intervalem od 79,1 do 89,3 %, s normálním rozdělením dat ( $W= 0,880$ ). Méně byly neutrofilly zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 4,3 %, s konfidenčním intervalem od 0,0 do 8,8 %, s normálním rozdělením dat ( $W= 0,827$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací neutrofilů v periferní krvi a BALT statisticky významné rozdíly ( $P= 0,002$ ) (Obr. 21).

**T-lymfocyty** byly méně zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 47,2 %, s konfidenčním intervalem od 25,4 do 68,9 %, s normálním rozdělením dat ( $W= 0,900$ ). Více byly T-lymfocyty zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 74,6 %, s konfidenčním intervalem od 58,1 do 91,1 %, s normálním rozdělením dat ( $W= 0,810$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací T-lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky významné rozdíly ( $P= 0,002$ ) (Obr. 22).

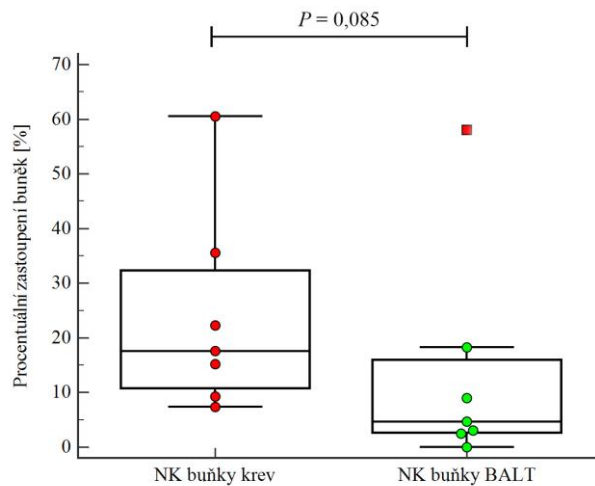


Obr. 21 Srovnání procentuálního zastoupení neutrofilů v periferní krvi a BALT.



Obr. 22 Srovnání procentuálního zastoupení T-lymfocytů v periferní krvi a BALT.

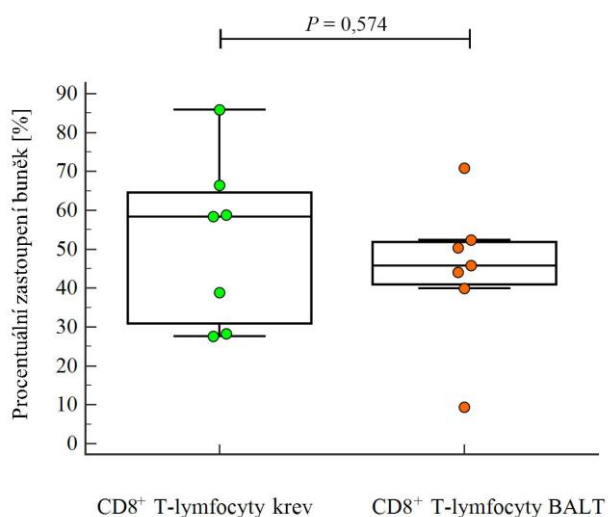
**NK buňky** byly více zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 24,0 %, s konfidenčním intervalem od 6,8 do 41,2 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,851$ ). Méně byly NK buňky zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 13,7 %, s konfidenčním intervalem od 0,0 do 32,6 %, s rozdělením dat bez normality ( $W=0,694$ ). Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zjištěny mezi populací NK v periferní krvi a BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,085$ ) (Obr. 23).



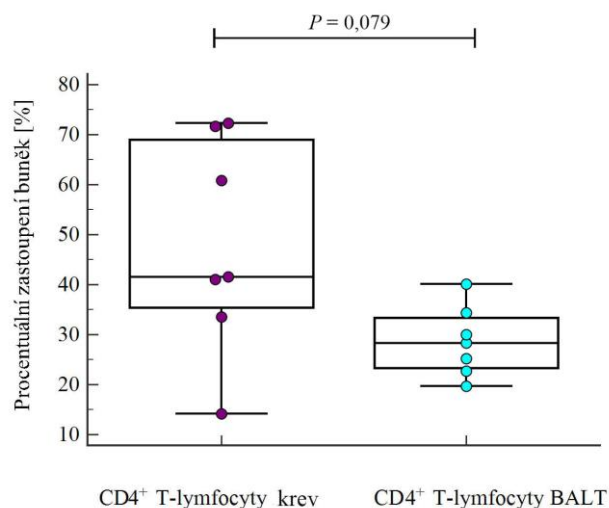
Obr. 23 Srovnání procentuálního zastoupení NK buněk v periferní krvi a BALT. Čtverec v grafu znázorňuje odlehlou hodnotu.

**CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty** byly více zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 52,0 %, s konfidenčním intervalem od 32,2 do 71,9 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,926$ ). Méně byly CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 44,7 %, s konfidenčním intervalem od 27,6 do 61,7 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,901$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,574$ ) (Obr. 24).

**CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty** byly více zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 47,9 %, s konfidenčním intervalem od 28,0 do 67,7 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,927$ ). Méně byly CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 28,6 %, s konfidenčním intervalem od 22,2 do 35,1 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,977$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky nevýznamné rozdíly ( $P=0,079$ ) (Obr. 25).

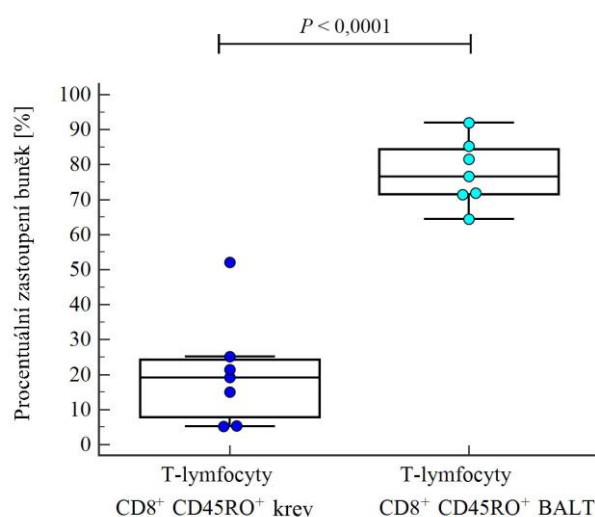


Obr. 24 Srovnání procentuálního zastoupení CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT.



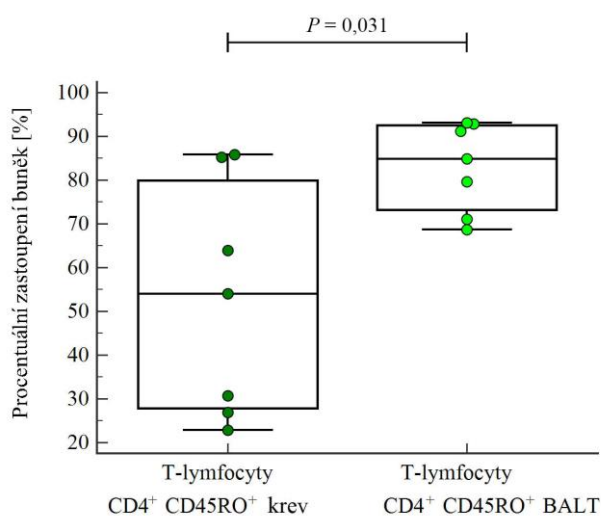
Obr. 25 Srovnání procentuálního zastoupení CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT.

**CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocyty** byly méně zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 20,5 %, s konfidenčním intervalem od 5,8 do 35,2 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,861$ ). Více byly zastoupeny CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocyty v BALT, s průměrným zastoupením 77,6 %, s konfidenčním intervalem od 69,0 do 86,3 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,981$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky významné rozdíly ( $P < 0,0001$ ) (Obr. 26).



Obr. 26 Srovnání procentuálního zastoupení CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT.

**CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocyty** byly méně zastoupeny v periferní krvi, s průměrným zastoupením 52,8 %, s konfidenčním intervalem od 28,0 do 77,6 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,878$ ). Více byly CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocyty zastoupeny v BALT, s průměrným zastoupením 83,1 %, s konfidenčním intervalem od 73,6 do 92,5 %, s normálním rozdělením dat ( $W=0,875$ ). Párovým t-testem byly zjištěny mezi populací CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT statisticky významné rozdíly ( $P=0,031$ ) (Obr. 27).



Obr. 27 Srovnání procentuálního zastoupení CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T-lymfocytů v periferní krvi a BALT.

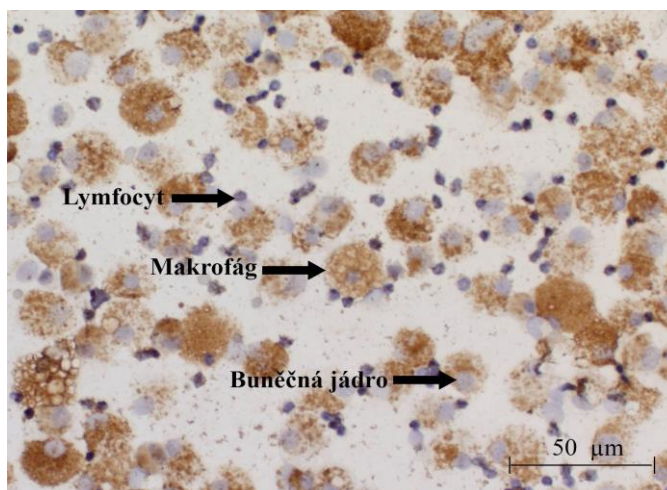
## 4.6 Imunocytochemické barvení cytospinů

Z příslušných vzorků BALT od pacientů po transplantaci plic byly připraveny cytospiny, které byly použity k imunocytochemickému barvení.

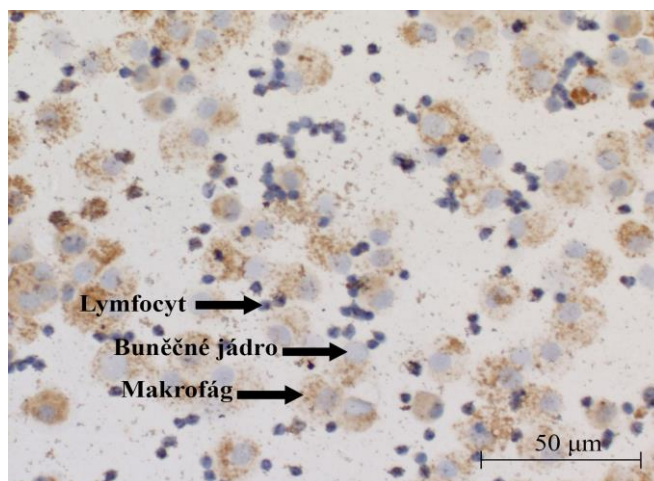
V případě chromogenního barvení byla jedna část cytospinů inkubována s primární myší protilátkou proti lidskému znaku CD68 a druhá část cytospinů inkubována s primární králičí protilátkou proti lidskému znaku CD14. Druhý den byly cytospiny inkubovány se sekundární protilátkou soupravy (EnVision<sup>TM</sup> + Dual Link System-HRP) a barveny chromogenním barvivem DAB.

Byly pozorovány znaky CD68 a CD14, které detekovaly přítomnost makrofágové populace ve vzorku BALT. Znak CD68 byl silně exprimován v cytoplazmatických granulech makrofágů (Obr. 28). Zatímco na povrchu makrofágů byl exprimován znak CD14 (Obr. 29). Proto chromogenní barvení cytospinů proti znaku CD14, nebylo tak intenzivní jako u barvení cytospinů proti znaku CD68. K vizualizaci buněčných jader bylo použito barvivo hematoxylin.

Na obrázcích (Obr. 28 a 29) bylo na cytospinech patrné vyšší zastoupení lymfocytů v BALT, což by mohlo značit nastupující akutní rejekci plicního štěpu.

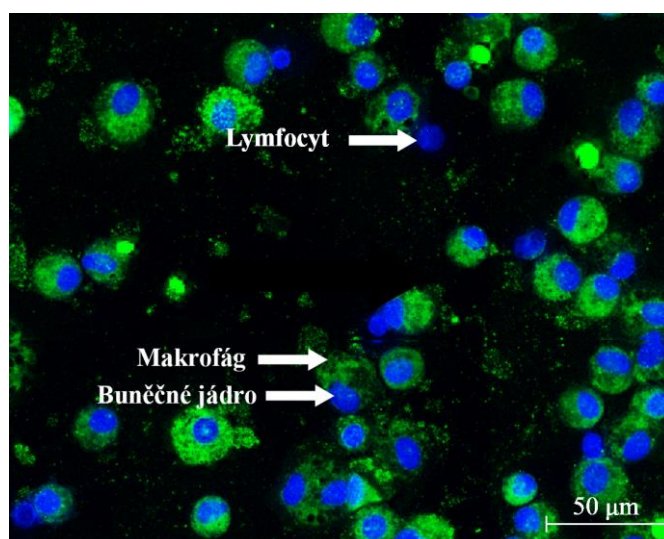


Obr. 28 Cytospiny z chromogenního barvení, znak CD68 detekoval makrofágovou populaci (hnědé zbarvení) a pomocí barviva hematoxylinu byla pozorována buněčná jádra (modré zbarvení).



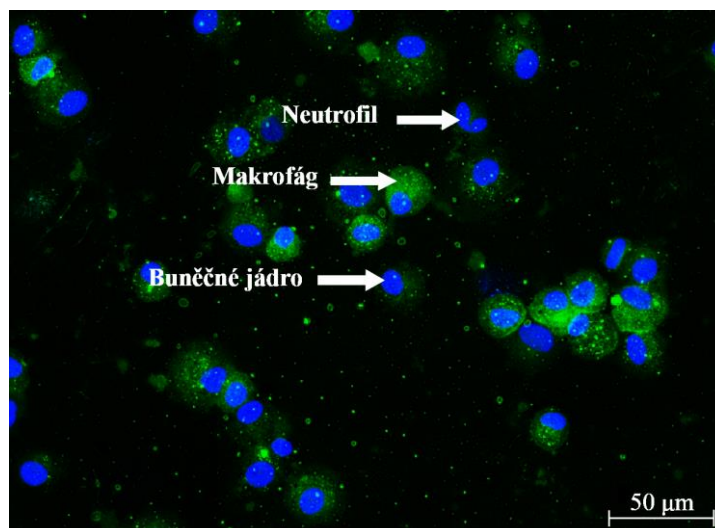
Obr. 29 Cytospiny z chromogenního barvení, znak CD14 detekoval makrofágovou populaci (hnědé zbarvení) a pomocí barviva hematoxylinu byla pozorována buněčná jádra (modré zbarvení).

Fluorescenčním barvením byla jedna část cytospinů inkubována s primární myší protilátkou proti lidskému znaku CD68 (Obr. 30). Druhá část cytospinů byla inkubována s primární králičí protilátkou proti lidskému znaku CD14 (Obr. 31). Druhý den byly cytospiny inkubovány s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou proti primární protilátce. K vizualizaci buněčných jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI Fluoromount-G<sup>®</sup>. Z obrázků (Obr. 30 a 31) je patrné převažující zastoupení makrofágů na cytospinech z BALT. Bylo možné pozorovat značnou velikost (až desítky µm) a vysokou granularitu u makrofágové populace.



Obr. 30 Cytospiny z fluorescenčního barvení, znak CD68 detekoval makrofágovou populaci (zelené zbarvení) a pomocí fluorescenčního barviva DAPI byla pozorována buněčná jádra (modré zbarvení).





Obr. 31 Cytospiny z fluorescenčního barvení, znak CD14 detekoval makrofágovou populaci (zelené zbarvení) a pomocí fluorescenčního barviva DAPI byla pozorována buněčná jádra (modré zbarvení).

## 5 DISKUZE

Transplantace plic je zavedeným léčebným přístupem u vybraných skupin pacientů s pokročilým plicním onemocněním (Arcasoy a Kotloff, 1999; Yusen *et al.*, 2015). Navzdory zlepšení v chirurgické, pooperační a imunosupresivní oblasti je však celkové přežití po transplantaci plic nižší, na rozdíl od pacientů, u kterých byl transplantován jiný orgán (Orens a Garrity, 2009; Yusen *et al.*, 2015). Je to způsobeno především rozvojem chronické rejekce plic, jejímž nejčastějším fenotypem je syndrom bronchiolitis obliterans. Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj chronické dysfunkce plic je výskyt opakovaných epizod akutní rejekce vyššího stupně (Sharples *et al.*, 2002). K diagnóze akutní rejekce se využívá invazivní metoda transbronchiální biopsie (Stewart *et al.*, 2007b). Nicméně, autoři Greenland *et al.* (2014) ve svých studiích uvádějí, že imunofenotypizace imunitních buněk BALT může být použita k posouzení pravděpodobnosti akutní rejekce u pacientů po transplantaci plic.

Cílem předkládané diplomové práce je imunofenotypizace populací imunitních buněk BALT u pacientů po transplantaci plic.

V diplomové práci bylo stanoveno absolutní zastoupení imunitních buněk (leukocytů) v BALT od pacientů po transplantaci plic, které dosahovalo průměrného zastoupení 28,6 % s konfidenčním intervalem v rozsahu od 22,4 do 34,8 %. Průměrná koncentrace leukocytů v BALT byla  $76,2 \times 10^6$  leukocytů/l s konfidenčním intervalem od  $38,6$  do  $113,8 \times 10^6$  leukocytů/l. V literatuře byly publikovány mírně vyšší počty leukocytů v BALT ( $140-442 \times 10^6$  leukocytů/l) u stabilních příjemců po transplantaci plic (Greenland *et al.*, 2014). I když v jiné studii byly počty leukocytů proměnlivé v závislosti na čase po transplantaci (75 dní po transplantaci  $234 \times 10^6$  leukocytů/l, po 2. roce  $120 \times 10^6$  leukocytů/l) (Slebos *et al.*, 2002). V naší práci nebyly počty leukocytů vztahované k době po transplantaci. V jiné studii byly zjištěny u pacientů s akutní rejekcí výrazně zvýšené počty leukocytů ( $200-700 \times 10^6$  leukocytů/l) ve srovnání s pacienty bez rejekce (Greenland *et al.*, 2014).

V rámci této diplomové práce bylo dále hodnoceno procentuální zastoupení hlavních populací imunitních buněk (makrofágů, lymfocytů, neutrofilů) v BALT od pacientů po transplantaci plic. Nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk v BALT byly makrofágy s průměrným zastoupením 91,1 %, s konfidenčním

intervalem od 90,0 do 92,2 %. Populace lymfocytů se vyskytovala s průměrným zastoupením 4,4 %, s konfidenčním intervalem od 3,6 do 5,2 % a nejméně byly zastoupeny neutrofilů s průměrným zastoupením 2,6 %, s konfidenčním intervalem od 2,0 do 3,1 %. Autoři ve svých studiích uvádějí podobná procentuální zastoupení hlavních populací imunitních buněk v BALT u stabilních příjemců po transplantaci plic: 71-94 % makrofágů, 5-19 % lymfocytů a 4-12 % neutrofilů (Tiroke *et al.*, 1999; Slebos *et al.*, 2002). V další studii bylo zjištěno snížené procentuální zastoupení populace makrofágů na 30-70 % v BALT u skupiny pacientů s akutní rejekcí (Vanaudenaerde *et al.*, 2006; Speck *et al.*, 2016). Zároveň byl zaznamenán značný procentuální nárůst populace lymfocytů na 10-60 %. Zvýšeny byly rovněž neutrofilů na 15-30 % oproti 4-12 % ve srovnání se skupinou stabilních příjemců (Vanaudenaerde *et al.*, 2006; Speck *et al.*, 2016). V případě procentuálního zastoupení lymfocytů v BALT někteří autoři uvádějí zvýšení při akutní rejekci, avšak v případě obliterující bronchiolitidy naopak dochází ke snížení procentuálního zastoupení této populace (Reynaud-Gaubert *et al.*, 2002). Nicméně, různorodé výsledky mohou souviset s různými metodickými přístupy, časovými body odběru BALT, diagnózou pacientů a imunosupresivními režimy.

Dále v diplomové práci bylo hodnoceno procentuální zastoupení populací lymfocytárních buněk (T-lymfocytů, NK buněk a B-lymfocytů) a subpopulací T-lymfocytů ( $CD4^+$  T-lymfocytů,  $CD8^+$  T-lymfocytů a  $CD4^+$  regulačních T-lymfocytů) v BALT. V rámci lymfocytární populace byly převládající T-lymfocyty v BALT s průměrným zastoupením 75,1 %, s konfidenčním intervalem 71,4-78,8 %. Dále byla analyzována subpopulace  $CD4^+$  T-lymfocytů a  $CD8^+$  T-lymfocytů. Průměrné zastoupení subpopulace  $CD4^+$  T-lymfocytů bylo 48,0 %, s konfidenčním intervalem 44,0-51,8 %. Subpopulace  $CD8^+$  T-lymfocytů byla průměrně zastoupena 51,3 %, s konfidenčním intervalem 47,4-55,2 %. Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů bylo 0,9, s konfidenčním intervalem 1,0-1,4.

Ve studii Whitehead *et al.* (1995) uvádějí 60-ti % zastoupení T-lymfocytů,  $CD4^+$  T-lymfocyty s průměrným zastoupením 25 % a  $CD8^+$  T-lymfocyty s průměrným zastoupením 40 % u stabilních příjemců po transplantaci plic. Průměrné zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů se u stabilních příjemců po transplantaci značně lišila mezi jednotlivými studii: 0,8 (Griffith *et al.*, 1988) a 3,0 (Hamm *et al.*, 1991). Výsledky naměřené v rámci diplomové práce se shodují s výše uvedenými studii až na hodnoty  $CD4^+$  T-lymfocytů, které byly vyšší v naší

skupině pacientů. Nicméně, ve studii na zvířecím modelu byl pozorován pokles poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů v souvislosti s výskytem akutní rejekce v důsledku zvýšení CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u krys (Higashi *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1993).

Dále byly hodnoceny CD4<sup>+</sup> regulační T-lymfocyty s průměrným zastoupením 2,4 %. Na zvířecích modelech tolerance transplantace bylo zjištěno, že regulační T-lymfocyty mohou zabránit vzniku rejekce (Neujahr *et al.*, 2009). Jiná studie Bhorade *et al.* (2010) uvádí, že vyšší procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů nad 3,2 % může ochránit před vznikem BOS. V diplomové práci bylo naměřené procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů nižší než v uvedené práci, ačkoliv v naší skupině pacientům nebyl diagnostikován BOS.

Na našem souboru bylo detekováno procentuální zastoupení NK buněk 9,9 % v rámci lymfocytární populace. Někteří autoři zjistili procentuální pokles zastoupení populace NK buněk během akutní rejekce (menší než 5 %) a kombinované rejekce s infekcí (Greenland *et al.*, 2014). Zatímco zvýšené procentuální zastoupení větší než 5 % NK buněk v BALT spojují s větší pravděpodobností infekce po transplantaci plic (Greenland *et al.*, 2014). Tyto nálezy byly v souladu s novějším výzkumem, kdy bylo prokázáno, že deficit NK buněk v BALT se zvětšuje během akutní rejekce při studiu transplantace plic u myši (Jungraithmayr *et al.*, 2013). V naší skupině pacientů bylo zjištěno, že pacienti s vyšším procentuálním zastoupením populace NK buněk měli zároveň zvýšenou expresi HLA-DR na NK buňkách ve srovnání s pacienty s nižším procentuálním zastoupením populace NK buněk, což svědčí o aktivaci této populace.

Nejméně zastoupenou populací v BALT byly B-lymfocyty s průměrným zastoupením 0,5 % v rámci lymfocytární populace. V literatuře bylo zvýšené procentuální zastoupení B-lymfocytů asociováno s akutní rejekcí (Gregson *et al.*, 2008; Greenland *et al.*, 2014).

V diplomové práci jsme se dále zaměřili na srovnání procentuálního zastoupení hlavních imunitních populací a subpopulací T-lymfocytů v BALT a periferní krvi od sedmi pacientů po transplantaci plic. Analýza periferní krve odhalila zvýšené zastoupení populace neutrofilů s průměrným zastoupením 84,2 %, populace NK buněk s průměrným zastoupením 24,0 % a široké rozmezí průměrného zastoupení poměru CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů od 0,2 do 2,6. Tyto výsledky mohou poukazovat na infekční stav, či známky rejekce. Po analýze imunitních buněk v BALT a srovnání s periferní krví bylo zjištěno, že u některých pacientů

jsou vysoké procentuální zastoupení populace NK buněk detekovány v obou vzorcích, stejně jako mírně zvýšené procentuální zastoupení populace lymfocytů či neutrofilů, jejichž zvýšení u pacientů s akutní rejekcí bylo popsáno v literatuře (Shennib *et al.*, 1996). Tikkanen *et al.*, (2001) stanovili míru neutrofilie nad 12 % v BALT po měsíci od transplantace plic jako ukazatel akutní rejekce (se specifitou 82 % a citlivostí 74 %). Zajímavé bylo zjištění, že největší rozdíly v imunitních populacích mezi krví a BALT, byly u  $CD4^+$  a  $CD8^+ CD45RO^+$  paměťových T-lymfocytů, přičemž mnohonásobně vyšší procentuální zastoupení byly detekovány v BALT.

Někteří autoři Whitehead *et al.* (1995) demonstrovali výrazné rozdíly mezi T-lymfocyty a jejich subpopulacemi v BALT a ve vzorcích periferní krve. Nicméně se tyto poznatky neshodují s výsledky naměřenými v rámci diplomové práce. Autoři v jiné studii poukazují na snížené procentuální zastoupení  $CD4^+$  T-lymfocytů v BALT, zatímco procentuální zastoupení  $CD8^+$  T-lymfocytů zůstává stabilní po transplantaci, což vede ke snížení průměrného zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů (Crim *et al.*, 1996). Důvod snížení průměrného zastoupení poměru  $CD4^+/CD8^+$  T-lymfocytů v BALT zůstává nejasný, nicméně mohlo by se jednat o akumulaci cytotoxických T-lymfocytů v plicním štěpu bez příznaků rejekce plic (Prior *et al.*, 1992).

V diplomové práci byly hodnoceny populace imunitních buněk v BALT vztažené ke třem skupinám pacientů (pacienti bez akutní rejekce, s akutní rejekcí typu A1 a typu A2) podle typu rejekce získané z hodnocení vzorku transbronchiální biopsie. Byly zjištěny značné rozdíly, zejména v procentuálním zastoupení populace makrofágů, neutrofilů a NK buněk mezi podskupinami pacientů s rejekcí a pacienty bez rejekce, i když statisticky nebylo možné z důvodů malého počtu pacientů (s typem rejekce A2) získat statisticky relevantní výsledky. Nízké procentuální zastoupení populace NK buněk v BALT u pacientů s akutní rejekcí však byly v naprosté shodě s literaturou (Greenland *et al.*, 2014).

V další části diplomové práce jsme sledovali změny procentuálního zastoupení populací imunitních buněk v BALT u pěti pacientů během prvního roku po transplantaci plic. U pacienta A došlo k nárůstu procentuálního zastoupení populace NK buněk, což by naznačovalo spíše na přítomnost infekce nebo aktivaci procesů v plicích. U pacienta B došlo pouze k lehkému zvýšení procentuálního zastoupení populace lymfocytů, přičemž se nález z transbronchiální biopsie změnil

v průběhu roku ze stavu bez rejekce na známky rejekce typu A1. V případě pacienta C, u kterého došlo k rozvoji rejekce A1, došlo k poklesu procentuálního zastoupení populace NK buněk. U pacienta D došlo v souladu se vyšším stupněm rejekce A2 ke zvýšení procentuálního zastoupení neutrofilů, stejně jako u pacienta E, kde současně došlo ke zvýšení procentuálního zastoupení lymfocytů a snížení procentuálního zastoupení populace NK buněk. Naše výsledky naznačují, že procentuální zastoupení imunitních populací v BALT velmi často koreluje s klinickým stavem pacienta po transplantaci.

Naše nálezy prokázaly heterogenní výsledky v buněčném rozpočtu v BALT u pacientů po transplantaci plic. Důvodem různorodých výsledků mohou být různé primární diagnózy pacientů, doby odběru BALT, metodické přístupy a imunosupresivní režimy. Vyšetření BALT cytometrickou imunofenotypizací samo o sobě nemůže být použito k diagnostice akutní rejekce, avšak ve spojení s dalšími vyšetřeními se může stát užitečným vodítkem ke stanovení správné diagnózy a použití vhodné léčby. Naše pilotní data naznačují rozdíly mezi skupinou pacientů bez akutní rejekce a s akutní rejekcí. Bude potřeba další studie, aby potvrdily přínosnost vyšetření imunitních buněk v BALT pro diagnostiku rejekcí.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma transplantace plic, komplikace vzniklé po transplantaci plic. Dále jsou v diplomové práci detailněji popsány imunofenotypy imunitních buněk. V neposlední řadě jsou shrnuty metody průtoková cytometrie a imunocytochemie.

V experimentální části diplomové práce byla provedena imunofenotypizace imunitních buněk BALT u pacientů po transplantaci plic, které byly odebrány metodou BAL. V experimentální části bylo stanoveno absolutní zastoupení imunitních buněk a procentuální zastoupení hlavních imunitních populací (makrofágů, lymfocytů a neutrofilů) v BALT od pacientů po transplantaci plic. Nejvíce byly v BALT zastoupeny makrofágy, dále lymfocyty a nejméně neutrofilů.

V diplomové práci byla analyzována lymfocytární populace (T-lymfocyty, NK buňky, B-lymfocyty) a subpopulace T-lymfocytů ( $CD4^+$  a  $CD8^+$  T-lymfocyty a  $CD4^+$  regulační T-lymfocyty). V rámci lymfocytární populace byly převládající T-lymfocyty a nejméně byly zastoupeny B-lymfocyty. Minoritní zastoupení v rámci subpopulací T-lymfocytů představovaly  $CD4^+$  regulační T-lymfocyty. U sedmi pacientů po transplantaci byly srovnány procentuální zastoupení imunitních buněk v BALT a v periferní krvi.

Dále byly hodnoceny populace imunitních buněk v BALT a porovnány se stupněm akutní rejekce. Zde byl zaznamenán se zvyšujícím se stupněm akutní rejekce významný nárůst procentuálního zastoupení populace neutrofilů a zároveň pokles procentuálního zastoupení populace makrofágů a NK buněk.

V další části diplomové práce bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení populací imunitních buněk v BALT od pěti pacientů v období během jednoho roku po transplantaci plic. Výsledky byly porovnávány s aktuálním stupněm akutní rejekce. Z výsledků bylo patrné, že změny v procentuálním zastoupení imunitních populací v BALT se mění v závislosti na stupni akutní rejekce, popřípadě přítomnosti infekce.

I když nelze imunofenotypizační analýzou BALT, jako materiálu získaného neinvazivní metodou BAL, získat stoprocentní výsledky potvrzující klinický stav pacienta po transplantaci plic, jeví se tato metoda jako velmi užitečná pro zpřesnění diagnózy a v rozhodování výběru vhodné léčby.

## 7 LITERATURA

- Arcasoy S. M., Kotloff R. M. (1999): Lung Transplantation. *New England Journal of Medicine* **340**, 1081–1091.
- Baughman R. P., Spencer R. E., Kleykamp B. O., Rashkin M. C., Douthit M. M. (2000): Ventilator associated pneumonia: quality of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage sample affects diagnostic yield. *The European respiratory journal* **16**, 1152–7.
- Bedoret D., Wallemacq H., Marichal T., Desmet C., Quesada Calvo F., Henry E., Closset R., Dewals B., Thielen C., Gustin P., de Leval L., Van Rooijen N., Le Moine A., Vanderplassen 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. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3723–38.
- 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**, 540–6.
- Boasquevisque C. H. R., Yildirim E., Waddel T. K., Keshavjee S. (2009): Surgical Techniques: Lung Transplant and Lung Volume Reduction. *Proceedings of the American Thoracic Society* **6**, 66–78.
- Boltjes A., van Wijk F. (2014): Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Frontiers in Immunology* **5**, 131.
- Bronchoalveolární laváž- možnosti a rizika provedení, interpretace některých výsledků: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842> (23. 11. 2018).
- Brown M., Wittwer C. (2000): Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* **46**, 1221–1229.
- Burke C. M., Theodore J., Dawkins K. D., Yousem S. A., Blank N., Billingham M. E., Van Kessel A., Jamieson S. W., Oyer P. E., Baldwin J. C. (1984): Post-transplant obliterative bronchiolitis and other late lung sequelae in human heart-lung transplantation. *Chest* **86**, 824–9.
- Carrillo J. L. M., Rodríguez F. P. C., Coronado O. G., García M. A. M., Cordero J. F. C. (2017): Physiology and Pathology of Innate Immune Response Against Pathogens. *Physiology and Pathology of Immunology*.
- Cerwenka A., Lanier L. L. (2001): Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* **1**, 41–49.
- Chaplin D. D. (2010): Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S3–S23.
- Chotinantakul K., Leeanansaksiri W. (2012): Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Research* **2012**, 1–16.
- Christie J. D., Bavaria J. E., Palevsky H. I., Litzky L., Blumenthal N. P., Kaiser L. R., Kotloff R. M. (1998): Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* **114**, 51–60.
- Christie J. D., Kotloff R. M., Aha V. N., Tino G., Pochettino A., Gaughan C., DeMissie E., Kimmel S. E. (2005): The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine* **171**, 1312–6.
- Christie J. D., Edwards L. B., Kucheryavaya A. Y., Aurora P., Dobbels F., Kirk R., Rahmel A. O., Stehlik J., Hertz M. I. (2010): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report—2010. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **29**, 1104–1118.
- Christie J. D., Edwards L. B., Kucheryavaya A. Y., Benden C., Dipchand A. I., Dobbels F., Kirk R., Rahmel A. O., Stehlik J., Hertz M. I., International Society of Heart and Lung Transplantation (2012): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report—2012. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **31**, 1073–1086.
- Collins P. D., Marleau S., Griffiths-Johnson D. A., Jose P. J., Williams T. J. (1995):



- Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1169–74.
- Collins J., Müller N. L., Kazerooni E. A., Paciocco G. (2000): CT Findings of Pneumonia After Lung Transplantation. *American Journal of Roentgenology* **175**, 811–818.
- Colobran R., Casamitjana N., Roman A., Faner R., Pedrosa E., Arostegui J. I., Pujol-Borrell R., Juan M., Palou E. (2009): Copy number variation in the CCL4L gene is associated with susceptibility to acute rejection in lung transplantation. *Genes & Immunity* **10**, 254–259.
- Colonna M., Trinchieri G., Liu Y.-J. (2004): Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* **5**, 1219–1226.
- Costabel U., Guzman J. (1992): Effect of smoking on bronchoalveolar lavage constituents. *The European respiratory journal* **5**, 776–9.
- 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**, 1041–1046.
- Dancey J. T., Deubelbeiss K. A., Harker L. A., Finch C. A. (1976): Neutrophil kinetics in man. *The Journal of clinical investigation* **58**, 705–15.
- Daud S. A., Yusef R. D., Meyers B. F., Chakinala M. M., Walter M. J., Aloush A. A., Patterson G. A., Trulock E. P., Hachem R. R. (2007): Impact of Immediate Primary Lung Allograft Dysfunction on Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **175**, 507–513.
- Davies L. C., Jenkins S. J., Allen J. E., Taylor P. R. (2013): Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* **14**, 986–95.
- de Perrot M., Liu M., Waddell T. K., Keshavjee S. (2003): Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**, 490–511.
- de Vito Dabbs A., Hoffman L. A., Iacono A. T., Zullo T. G., McCurry K. R., Dauber J. H. Are symptom reports useful for differentiating between acute rejection and pulmonary infection after lung transplantation? *Heart & lung : the journal of critical care* **33**, 372–80.
- Dzierzak E., Philipsen S. (2013): Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a011601.
- Egan T. M., Murray S., Bustami R. T., Shearon T. H., McCullough K. P., Edwards L. B., Coke M. A., Garrity E. R., Sweet S. C., Heiney D. A., Grover F. L. (2006): Development of the New Lung Allocation System in the United States. *American Journal of Transplantation* **6**, 1212–1227.
- Egan T. M., Edwards L. B. (2016): Effect of the lung allocation score on lung transplantation in the United States. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **35**, 433–439.
- Estenne M., Maurer J. R., Boehler A., Egan J. J., Frost A., Hertz M., Mallory G. B., Snell G. I., Yousem S. (2002): Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **21**, 297–310.
- Fiedler K., Brunner C. (2012): Mechanisms Controlling Hematopoiesis. In: *Hematology - Science and Practice*. InTech.
- Fishman J. A., Rubin R. H. (1998): Infection in Organ-Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine* **338**, 1741–1751.
- França C. N., Izar M. C. O., Hortêncio M. N. S., do Amaral J. B., Ferreira C. E. S., Tuleta I. D., Fonseca F. A. H. (2017): Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clinical Science* **131**, 1215–1224.
- Freud A. G., Becknell B., Roychowdhury S., Mao H. C., Ferketich A. K., Nuovo G. J., Hughes T. L., Marburger T. B., Sung J., Baiocchi R. A., Guimond M., Caligiuri M. A. (2005): A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56bright Natural Killer Cells. *Immunity* **22**, 295–304.
- Galli S. J., Maurer M., Lantz C. S. (1999): Mast cells as sentinels of innate immunity. *Current opinion in immunology* **11**, 53–9.
- Galli S. J., Tsai M. (2010): Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology* **40**, 1843–1851.
- Girnita D. M., Webber S. A., Zeevi A. (2008): Clinical Impact of Cytokine and Growth Factor

- Genetic Polymorphisms in Thoracic Organ Transplantation. *Clinics in Laboratory Medicine* **28**, 423–440.
- Glanville A. R., Baldwin J. C., Burke C. M., Theodore J., Robin E. D. (1987): Obliterative bronchiolitis after heart-lung transplantation: apparent arrest by augmented immunosuppression. *Annals of internal medicine* **107**, 300–4.
- Goldberg M., Lima O., Morgan E., Ayabe H. A., Luk S., Ferdman A., Peters W. J., Cooper J. D. (1983): A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **85**, 821–6.
- Gong J. L., McCarthy K. M., Rogers R. A., Schneeberger E. E. (1994): Interstitial lung macrophages interact with dendritic cells to present antigenic peptides derived from particulate antigens to T cells. *Immunology* **81**, 343–51.
- 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 : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **14**, 831–40.
- 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**, 371–8.
- Grover F. L., Fullerton D. A., Zamora M. R., Mills C., Ackerman B., Badesch D., Brown J. M., Campbell D. N., Chetham P., Dhaliwal A., Diercks M., Kinnard T., Niejadlik K., Ochs M. (1997): The past, present, and future of lung transplantation. *American journal of surgery* **173**, 523–33.
- Guilinger R. A., Paradis I. L., Dauber J. H., Yousem S. A., Williams P. A., Keenan R. J., Griffith B. P. (1995): The importance of bronchoscopy with transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in the management of lung transplant recipients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **152**, 2037–2043.
- Hamm M., Hoepfer M., Wagner T. (1991): Cell profiles in BAL during rejection and viral infection following lung and heart–lung transplantation. *European Respiratory Journal* **18**, 368.
- Happle C., Lachmann N., Kuljec J., Wetzke M., Ackermann M., Brenning S., Mucci A., Jirno A. C., Groos S., Mirenska A., Hennig C., Rodt T., Bankstahl J. P., Schwerk N., Moritz T., Hansen G. (2014): Pulmonary transplantation of macrophage progenitors as effective and long-lasting therapy for hereditary pulmonary alveolar proteinosis. *Science Translational Medicine* **6**, 250ra113.
- Hardy J. D., Webb W. R., Dalton M. L., Walker G. R. (1963): Lung homotransplantation in man. *JAMA* **186**, 1065–74.
- Hauschildt S., Kleine B. (1995): Bacterial stimulators of macrophages. *International review of cytology* **161**, 263–331.
- Higashi K., Imura M., Yada I., Namikawa S., Yuasa H., Kusagawa M. (1987): Experimental lung transplantation in the rat: study of rejection monitoring using monoclonal antibodies. *Transplantation proceedings* **19**, 1049–51.
- Hoffman W., Lakkis F. G., Chalasani G. (2016): B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* **11**, 137–54.
- Hopkins P. M., Aboyoun C. L., Chhajed P. N., Malouf M. A., Plit M. L., Rainer S. P., Glanville A. R. (2002): Prospective analysis of 1,235 transbronchial lung biopsies in lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **21**, 1062–7.
- Husain A. N., Mirza M. K. (2013): Lung Transplantation-Related Pathology: Definition, Epidemiology, Etiology. *Medscape*, <https://emedicine.medscape.com/article/2078700-overview>.
- Iribarne A., Russo M. J., Davies R. R., Hong K. N., Gelijns A. C., Bacchetta M. D., D'Ovidio F., Arcasoy S., Sonett J. R. (2009): Despite Decreased Wait-List Times for Lung Transplantation, Lung Allocation Scores Continue to Increase. *Chest* **135**, 923–928.

- Jakubzick C. V., Randolph G. J., Henson P. M. (2017): Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology* **17**, 349–362.
- Junggraithmayr W., Codarri L., Bouchaud G., Krieg C., Boyman O., Gyölvézi G., Becher B., Weder W., Münz C. (2013): Cytokine Complex-expanded Natural Killer Cells Improve Allogeneic Lung Transplant Function via Depletion of Donor Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **187**, 1349–1359.
- Kanasky W. F., Anton S. D., Rodrigue J. R., Perri M. G., Szwed T., Baz M. A. (2002): Impact of body weight on long-term survival after lung transplantation. *Chest* **121**, 401–6.
- Kanji S., Pompili V. J., Das H. (2011): Plasticity and maintenance of hematopoietic stem cells during development. *Recent patents on biotechnology* **5**, 40–53.
- Knol E. F., Olszewski M. (2011): Basophils and mast cells: Underdog in immune regulation? *Immunology letters* **138**, 28–31.
- Kobayashi S. D., Malachowa N., DeLeo F. R. (2017): Influence of Microbes on Neutrophil Life and Death. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**, 159.
- Koenderman L., Buurman W., Daha M. R. (2014): The innate immune response. *Immunology Letters* **162**, 95–102.
- Kondo T., Wu G. Du, Saito R., Marchevsky A. M., Prehn J., Matloff J. M., Waters P. F., Jordan S. C. (1993): Immunocytologic Analysis of Cells Obtained from Bronchoalveolar Lavage in a Model of Rat Lung Allograft Rejection. *Journal of Surgical Research* **55**, 351–356.
- Koordináční středisko transplantací (KST): <https://www.kst.cz/> (5. 3. 2019).
- Langer R. M. (2011): Vladimir P. Demikhov, a Pioneer of Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings* **43**, 1221–1222.
- Lanier L. L. (2005): NK Cell Recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 225–274.
- Lehnert B. E., Valdez Y. E., Holland L. M. (1985): Pulmonary Macrophages: Alveolar and Interstitial Populations. *Experimental Lung Research* **9**, 177–190.
- Leonard C. T., Soccia P. M., Singer L., Berry G. J., Theodore J., Holt P. G., Doyle R. L., Rosen G. D. (2000): Dendritic Cells and Macrophages in Lung Allografts A Role in Chronic Rejection? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**, 1349–54.
- Lima O., Cooper J. D., Peters W. J., Ayabe H., Townsend E., Luk S. C., Goldberg M. (1981): Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung autotransplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **82**, 211–5.
- Lischke R. (2006): *Imunosupresivní terapie u pacientů po transplantaci plic a její komplikace*. Disertační práce, Univerzita Karlova Praha, Česká republika.
- Lloveras J. (2004): Use of cyclosporine in renal transplantation. *Transplantation Proceedings* **36**, S107–S113.
- MacKenzie J. R., Mattes J., Dent L. A., Foster P. S. (2001): Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *Journal of immunology* **167**, 3146–55.
- Martin T. R., Raghu G., Maunder R. J., Springmeyer S. C. (1985): The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *The American review of respiratory disease* **132**, 254–60.
- Martín T., Chen D.-F., Palmer S. M. (2009): Acute rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Proceedings of the American Thoracic Society* **6**, 54–65.
- Mayadas T. N., Cullere X., Lowell C. A. (2014): The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 181–218.
- Mengel M., Sis B., Haas M., Colvin R. B., Halloran P. F., Racusen L. C., Solez K., Cendales L., Demetris A. J., Drachenberg C. B., Farver C. F., Rodriguez E. R., Wallace W. D., Glotz D., Banff meeting report writing committee (2012): Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* **12**, 563–570.
- Meyer K. (2007): Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Tool. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **28**, 546–560.
- 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., Wood B., American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease (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**, 1004–1014.
- Mogayzel P. J., Yang S. C., Wise B. V., Colombani P. M. (2001): Eosinophilic infiltrates in a pulmonary allograft: a case and review of the literature. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **20**, 692–5.
- Moreau A., Valey E., Anegon I., Cuturi M.-C. (2013): Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3**, a015461.
- Moss P. A. H., Rosenberg W. M. C., Bell J. I. (1992): The Human T Cell Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Immunology* **10**, 71–96.
- 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**, 2300–2311.
- Nethercott H. E., Brick D. J., Schwartz P. H. (2011): Immunocytochemical analysis of human pluripotent stem cells. *Methods in molecular biology* **767**, 201–20.
- Neujahr D. C., Cardona A. C., Ulukpo O., Rigby M., Pelaez A., Ramirez A., Gal A. A., Force S. D., Lawrence E. C., Kirk A. D., Larsen C. P. (2009): Dynamics of Human Regulatory T Cells in Lung Lavages of Lung Transplant Recipients. *Transplantation* **88**, 521–527.
- Orens J. B., Estenne M., Arcasoy S., Conte J. V., Corris P., Egan J. J., Egan T., Keshavjee S., Knoop C., Kotloff R., Martinez F. J., Nathan S., Palmer S., Patterson A., Singer L., Snell G., Studer S., Vachiery J. L., Glanville A. R., Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation (2006): International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **25**, 745–55.
- Orens J. B., Garrity E. R. (2009): General Overview of Lung Transplantation and Review of Organ Allocation. *Proceedings of the American Thoracic Society* **6**, 13–19.
- Parekh K., Meyers B. F., Patterson G. A., Guthrie T. J., Trulock E. P., Damiano R. J., Moazami N. (2005): Outcome of lung transplantation for patients requiring concomitant cardiac surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **130**, 859–863.
- Pozniak J., Kolařík J., Myšíková D., Šimonek J., Schützner J., Pafko P., Lischke R. (2015): The first lung re-transplantation in the Czech Republic. *Rozhledy v chirurgii: mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti* **94**, 135–8.
- Prior C., Klima G., Gatringer C., Aigner F., Margreiter R. Cell profiles in serial bronchoalveolar lavage after human heart-lung transplantation. *Acta cytologica* **36**, 19–25.
- Quantz M. A., Bennett L. E., Meyer D. M., Novick R. J. (2000): Does human leukocyte antigen matching influence the outcome of lung transplantation? An analysis of 3,549 lung transplantations. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **19**, 473–9.
- Reitz B. A., Wallwork J. L., Hunt S. A., Pennock J. L., Billingham M. E., Oyer P. E., Stinson E. B., Shumway N. E. (1982): Heart-Lung Transplantation. *New England Journal of Medicine* **306**, 557–564.
- Reynaud-Gaubert M., Thomas P., Gregoire R., Badier M., Cau P., Sampol J., Giudicelli R., Fuentes P. (2002): Clinical utility of bronchoalveolar lavage cell phenotype analyses in the postoperative monitoring of lung transplant recipients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **21**, 60–66.
- Rothenberg M. E. (2004): Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *The Journal of allergy and clinical immunology* **113**, 11–28.
- Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. (2006): Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* **212**, 8–27.
- Sanderson C. J. (1992): Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* **79**, 3101–9.
- Sato M., Waddell T. K., Wagnetz U., Roberts H. C., Hwang D. M., Haroon A., Wagnetz D.,

- Chaparro C., Singer L. G., Hutcheon M. A., Keshavjee S. (2011): Restrictive allograft syndrome (RAS): A novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **30**, 735–742.
- Schneider C., Nobs S. P., Heer A. K., Kurrer M., Klinke G., van Rooijen N., Vogel J., Kopf M. (2014): Alveolar Macrophages Are Essential for Protection from Respiratory Failure and Associated Morbidity following Influenza Virus Infection. *PLoS Pathogens* **10**, e1004053.
- Sharples L. D., McNeil K., Stewart S., Wallwork J. (2002): Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **21**, 271–81.
- Shennib H., Lee A. G., Serrick C., Giaid A. (1996): Altered nonspecific lymphocyte cytotoxicity in bronchoalveolar lavage of lung transplant recipients: can it be useful in monitoring rejection or infection? *Transplantation* **62**, 1262–7.
- Shi H. Z., Humbles A., Gerard C., Jin Z., Weller P. F. (2000): Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *The Journal of clinical investigation* **105**, 945–53.
- Slebos D.-J., Scholma J., Marike Boezen H., Koëter 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**, 501–507.
- Speck N. E., Schuurmans M. M., Murer C., Benden C., Huber L. C. (2016): Diagnostic value of plasma and bronchoalveolar lavage samples in acute lung allograft rejection: differential cytology. *Respiratory research* **17**, 74.
- Stewart S., Fishbein M. C., Snell G. I., Berry G. J., Boehler A., Burke M. M., Glanville A., Gould F. K., Magro C., Marboe C. C., McNeil K. D., Reed E. F., Reinsmoen N. L., Scott J. P., Studer S. M., Tazelaar H. D., Wallwork J. L., Westall G., Zamora M. R., Zeevi A., Yousem S. A. (2007a): Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **26**, 1229–1242.
- Stewart S., Fishbein M. C., Snell G. I., Berry G. J., Boehler A., Burke M. M., Glanville A., Gould F. K., Magro C., Marboe C. C., McNeil K. D., Reed E. F., Reinsmoen N. L., Scott J. P., Studer S. M., Tazelaar H. D., Wallwork J. L., Westall G., Zamora M. R., Zeevi A., Yousem S. A. (2007b): Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **26**, 1229–1242.
- Summers C., Rankin S. M., Condliffe A. M., Singh N., Peters A. M., Chilvers E. R. (2010): Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 318–24.
- Thabut G., Christie J. D., Ravaud P., Castier Y., Brugière O., Fournier M., Mal H., Lesèche G., Porcher R. (2008): Survival after bilateral versus single lung transplantation for patients with chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective analysis of registry data. *The Lancet* **371**, 744–751.
- Tikkanen J., Lemström K., Halme M., Pakkala S., Taskinen E., Koskinen P. (1999): Detailed analysis of cell profiles in peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and CMV infection in lung and heart-lung allograft recipients. *Transplantation proceedings* **31**, 163–4.
- Tikkanen J., Lemström K., Halme M., Pakkala S., Taskinen E., Koskinen P. (2001): Cytological monitoring of peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and cytomegalovirus infection in lung and heart–lung allograft recipients. *Clinical transplantation* **15**, 77–88.
- Tiroke A. H., Bewig B., Haverich A. (1999): Bronchoalveolar lavage in lung transplantation. State of the art. *Clinical transplantation* **13**, 131–57.
- Toronto Lung Transplant Group (1986): Unilateral Lung Transplantation for Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **314**, 1140–1145.
- Toussaint M., Fievez L., Drion P.-V., Cataldo D., Bureau F., Lekeux P., Desmet C. J. (2013): Myeloid hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  prevents airway allergy in mice through macrophage-

- mediated immunoregulation. *Mucosal Immunology* **6**, 485–497.
- Trulock E. P., Ettinger N. A., Brunt E. M., Pasque M. K., Kaiser L. R., Cooper J. D. (1992): The role of transbronchial lung biopsy in the treatment of lung transplant recipients. An analysis of 200 consecutive procedures. *Chest* **102**, 1049–54.
- Trulock E. P., Edwards L. B., Taylor D. O., Boucek M. M., Keck B. M., Hertz M. I. (2005): Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report—2005. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **24**, 956–967.
- Vanaudenaerde B. M., Dupont L. J., Wuyts W. A., Verbeken E. K., Meyts I., Bullens D. M., Dilissen E., Luyts L., Van Raemdonck D. E., Verleden G. M. (2006): The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *European Respiratory Journal* **27**, 779–787.
- Vázquez-Gutiérrez J. L., Langton M. (2015): Current potential and limitations of immunolabeling in cereal grain research. *Trends in Food Science & Technology* **41**, 105–117.
- Venuta F., Van Raemdonck D. (2017): History of lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease* **9**, 5458–5471.
- Wedemeyer J., Tsai M., Galli S. J. (2000): Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Current opinion in immunology* **12**, 624–31.
- Weiss E. S., Allen J. G., Merlo C. A., Conte J. V., Shah A. S. (2009): Survival After Single Versus Bilateral Lung Transplantation for High-Risk Patients With Pulmonary Fibrosis. *The Annals of Thoracic Surgery* **88**, 1616–1626.
- Westphalen K., Gusarova G. A., Islam M. N., Subramanian M., Cohen T. S., Prince A. S., Bhattacharya J. (2014): Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* **506**, 503–506.
- Whitehead B. F., Stoehr C., Finkle C., Patterson G., Theodore J., Clayberger C., Starnes V. A. (1995): Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respiratory medicine* **89**, 27–34.
- Whitson B. A., Hayes D., Jr (2014): Indications and outcomes in adult lung transplantation. *Journal of thoracic disease* **6**, 1018–23.
- Yeung J. C., Keshavjee S. (2014): Overview of clinical lung transplantation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **4**, a015628.
- Yousem S. A., Berry G. J., Cagle P. T., Chamberlain D., Husain A. N., Hruban R. H., Marchevsky A., Otori N. P., Ritter J., Stewart S., Tazelaar H. D. (1996): Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **15**, 1–15.
- Yousem S. A. (1997): The potential role of mast cells in lung allograft rejection. *Human Pathology* **28**, 179–182.
- Yusen R. D., Edwards L. B., Kucheryavaya A. Y., Benden C., Dipchand A. I., Goldfarb S. B., Levvey B. J., Lund L. H., Meiser B., Rossano J. W., Stehlik J. (2015): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **34**, 1264–1277.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACR	akutní celulární rejekce
AM	alveolární makrofágy
APC	Allofykocyanin
APC-Cy7	Allofykocyanin-cyanin 7
BAL	bronchoalveolární laváž
BALT	bronchoalveolární lavážní tekutina
BCR	B-buněčný receptor
BOS	bronchiolitis obliterans syndrom
BSA	Hovězí sérový albumin
CD	diferenciační skupiny
CF	cystická fibróza
CLAD	chronická dysfunkce aloštěpu plic
CLP	společný lymfoidní progenitor
CMP	společný myeloidní progenitor
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenyldol
DC	dendritické buňky
FBS	Fetální hovězí sérum
FEV1	vitální kapacita plic
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FoxP3	transkripční faktor P3
FSC	přímý rozptyl světla
GMP	společný progenitor granulocytů, monocytů a makrofágů
HIV	virus lidské imunodeficiency
HLA	lidský leukocytární antigen
HRP	křenuv peroxidasa
HSC	hematopoetické kmenové buňky
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IL-5	interleukin 5
IM	intersticiální makrofágy
IPF	idiopatická plicní fibróza
ISHLT	Mezinárodní společnost pro transplantaci srdce a plic

LAS	plicní alokační skóre
mDC	klasické myeloidní dendritické buňky
MEP	společný progenitor erytrocytů/megakaryocytů
MPP	multipotentní progenitor
NK	přirození zabíječi
OB	obliterující bronchiolitida
PAMP	molekulární struktury na povrchu asociované s patogenem
PBS	fosfátový pufr
pDC	plazmocytoidní dendritické buňky
PE	Fykoerythryn
PE-Cy7	Fykoerythryn-cyanin 7
PerCP-Cy5.5	Peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5
PGD	primární dysfunkce štěpu
PMN	polymorfonukleární leukocyty
RAS	restrikční syndrom aloštěpu plic
SSC	boční rozptyl světla
TCR	T-buněčný receptor
TLR	Toll-like receptor
TRM	tkáňově reziduální makrofágy