

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Ivana Zubatá

Fyziologie a patologie nekonvenčních lymfocytů

Physiology and pathology of unconventional lymphocytes

Školitel: Doc. MUDr. Jan Novák, Ph.D.

Dizertační práce

Praha 2023

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze dne

Ivana Zubatá

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především mému školiteli doc. MUDr. Janu Novákovi Ph.D., za jeho trpělivé vedení v průběhu mého vědeckého i medicínského života. Díky jeho nadšení a ochotě mi bylo a stále je věnovat se výzkumu zábavou i relaxací. Nesmírně děkuji za všechny připomínky, motivující kritiku a především za mnoho času, který mi byl z jeho strany věnován. Mé poděkování patří také Mgr. Jitce Smetanové za předání dovedností v oblasti průtokové cytometrie.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za trpělivost a nikdy nekončící podporu, kterou mne vždy zahrnovali. Ráda bych také poděkovala svému manželovi Ivovi Zubatému za mnohaletou všestrannou podporu ve studiu i práci, za trpělivost a péči, kterou mi věnoval od dob začátků mého studia. Dále mé velké poděkování patří bratrovi Ing. Tomášovi Karlovi Ph.D. za celoživotní vedení a motivaci na poli vědy i v pracovním nasazení, za mnoho cenných rad a konzultace v přípravě publikací a nepostradatelnou pomoc při statistické analýze dat.

Děkuji též všem spolupracovníkům a vedení Hematologické kliniky FNKV a 3. lékařské fakulty UK za časový prostor a možnosti, které jsem v průběhu studia mohla využívat. Zvláštní poděkování bych ráda věnovala MUDr. Lubice Gahérové, MUDr. Kateřině Beníškové, MUDr. Veronice Řivnáčové za motivaci a pomoc nejen při korekturách odborných textů, ale i v medicínských rozhodnutích.

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

ZUBATÁ (rozená Karlová), Ivana. Fyziologie a patologie nekonvenčních lymfocytů. [Physiology and pathology of unconventional lymphocytes]. Praha, 2023. 131 stran, 2 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Hematologická klinika FNKV a 3. LF UK, Ústav imunologie a klinické biochemie 3. LF UK. Školitel: Doc. MUDr. Novák Jan, Ph.D.

ABSTRAKT

MAIT buňky, se sliznicí asociované T lymfocyty, jsou skupinou imunocytů, které mají schopnosti vrozené i adaptivní imunity. Jsou definovány expresí semi-invariantního TCR řetězce. Vykazují antiinfekční potenciál s cytotoxickými efektorovými funkcemi i imunomodulační schopnosti. Základní aktivační cesta je pomocí MR1 molekuly neklasické třídy MHC Ib, která je uplatňována v obraně proti bakteriím a mykózám. MAIT buňky jsou schopny i TCR nezávislé aktivace realizované prozánětlivými cytokiny. Uplatňují se v cytokinových bouřích mediovaných bakteriálními superantigeny i v protivirové obraně. Po aktivaci rychle reagují produkcí celé škály zánětlivých mediátorů, a to i z repertoáru adaptivní imunity Th1, Th2 a Th17 lymfocytů. Recentní práce ukazují rezistenci k některým xenobiotikům. Tato disertační práce představuje výsledky výzkumu fenotypu subpopulací MAIT buněk měřených průtokovou cytometrií. Stimulací ionomycinem a PMA jsme analyzovali jejich repertoár cytotoxických schopností. V hlavním výzkumném projektu je hypotéza antiinfekčního potenciálu a rezistence MAIT buněk vůči xenobiotikům aplikovaná do klinické praxe v oboru hematonekologie. Práce předkládá důkazy o protektivní roli MAIT buněk v době cytopenie časného posttransplantačního období, kdy dochází k výskytu febrilních neutropenií. Naše výsledky ukazují na časnější dimisi a méně závažné infekční komplikace (maximální hodnoty CRP) u pacientů s vyššími hodnotami MAIT lymfocytů. U pacientů v režimu BEAM, který je zatížen více komplikacemi, byla prokázána nižší transfuzní dependence (erytrocyty, trombocyty) a méně febrilních dní v případě přítomnosti větší populace MAIT buněk před zahájením myeloablativního režimu. Výsledky této práce přináší nové informace o zapojení nekonvenčních lymfocytů v obraně organismu a protektivní roli MAIT buněk v průběhu cytopenie autologní transplantace PBSC.

Klíčová slova: autologní transplantace PBSC, imunita, MAIT buňky, nekonvenční lymfocyty

ABSTRACT

MAIT cells, mucosal-associated T lymphocytes, are a group of immune cells that have both innate and adaptive immunity abilities. They are defined by the expression of a semi-invariant TCR chain. They exhibit anti-infective potential with cytotoxic effector functions and immunomodulatory capabilities. The primary activation pathway is through the MR1 molecule of the non-classical MHC Ib class which is exerted in defense against bacteria and mycoses. MAIT cells are also able to TCR-independent activation by pro-inflammatory cytokines. They are involved in cytokine storms mediated by bacterial superantigens and in antiviral defense. They respond rapidly by producing a wide range of inflammatory mediators, including the repertoire of adaptive immunity Th1, Th2 and Th17 lymphocytes. Recent work shows resistance to some xenobiotics. This dissertation presents the results of an investigation of the phenotype of MAIT cell subpopulations measured by flow cytometry. By stimulation with ionomycin and PMA we analyzed their repertoire of cytotoxic abilities. In the main research project the hypothesis of anti-infective potential and resistance of MAIT cells to xenobiotics is applied to clinical practice in the field of haematooncology. The thesis presents evidence for a protective role of MAIT cells during the cytopenias of the early post-transplant period when febrile neutropenia occurs. Our results indicate earlier dismissal and less severe infectious complications (maximum CRP values) in patients with higher MAIT lymphocyte levels. Patients on the BEAM regimen, which is burdened with more complications, showed lower transfusion dependency (erythrocytes, platelets) and fewer febrile days when they had a higher level of MAIT cell population before starting a myeloablative regimen. The results of this study provide new information on the involvement of unconventional lymphocytes in the body's defense and the protective role of MAIT cells during cytopenia of autologous PBSC transplantation.

Keywords: autologous PBSC transplantation, immunity, MAIT cells, unconventional lymphocytes

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity).
AML	Akutní myeloidní leukémie
APC	Antigen prezentující buňka
ASCT	Autologní transplantace kmenovými buňkami
CD	Crohnova choroba
CRP	C-reaktivní protein
ER	Endoplazmatické retikulum
ERD	Erythrocyty deleukotizované (transfuzní přípravek)
GCSF	Granulocyte colony stimulating factor (růstový faktor)
GVHd	Graft versus host disease (Reakce štěpu proti hostiteli)
HL/ NHL	Hodgkinův lymfom / Non-Hodgkinův lymfom
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (angl. transplantace krvetvornými kmenovými buňkami)
IBD	Idiopatické střevní zánět (ang. inflammatory bowel disease)
IFN	Interferony
IL / ILR	Interleukin / Interleukinový receptor
MAIT	Se sliznicí asociované T buňky (angl. Mucosal Associated Invariant T cells)
MHC complex)	Hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
NCI-CTCAE	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
NK/ iNKT	Natural killer/ Invariant natural killer T celles
PBSC	Periferní kmenové buňky
PMA	Phorbol myristate acetate
RS	Roztroušená skleróza
SLE	Systémový lupus erythemtodes
TAD	Trombocyty z aferezy deleukotizované
TCR	T-buněčný receptor (ang. T-cell receptor)
TLR	Toll-like receptor
UC	Ulcerózní kolitida

OBSAH

1. ÚVOD:	17
1.1. VROZENÝ A ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ SYSTÉM	18
1.2. CHARAKTERISTIKA MAIT BUNĚK	18
1.3. HISTORIE MAIT BUNĚK	20
1.4. TCR / iTCR RECEPTOR	21
1.5. MR1 MOLEKULA	22
1.6. FREKVENCE A LOKALIZACE MAIT BUNĚK	24
1.7. VÝVOJ MAIT BUNĚK	25
1.8. FENOTYPOVÝ PROFIL MAIT BUNĚK	25
1.9. SUBPOPULACE MAIT BUNĚK	26
1.10. AKTIVACE MAIT BUNĚK	27
1.11. CYTOKINOVÝ PROFIL MAIT BUNĚK	29
1.12. MAIT BUŇKY V ANTIMIKROIBÁLNÍ OBRANĚ	30
1.12.1. MAIT BUŇKY A VIRY	30
1.12.2. MAIT BUŇKY A MYKÓZY	31
1.12.3. MAIT BUŇKY A BAKTERIE	32
1.13. MAIT BUŇKY A AUTOIMUNITNÍ CHOROBY	33
1.14. MAIT BUŇKY A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ	37
1.15. MAIT BUŇKY A HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY	38
1.16. KLINICKÁ ČÁST	40
1.16.1. HEMATOONKOLOGIE	40
1.16.2. LYMFOMY	41
1.16.3. AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE	43
1.16.4. INFEKČNÍ KOMPLIKACE AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE ...	45
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	47
2.1. VÝZKUMNÝ PROJEKT:	47
Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie	47
2.2. VÝZKUMNÝ PROJEKT:	49
Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk	49
3. METODY A ANALÝZA	50
3.1. METODY A ANALÝZA: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie	50

3.1.1.	CHARAKTERISTIKA POPULACE	50
3.1.2.	POUŽITÉ MYELOABLATIVNÍ REŽIMY:	51
3.1.3.	PODPŮRNÁ TERAPIE	52
3.1.4.	METODIKA	52
3.1.5.	KLINICKÉ HODNOCENÍ PACIENTŮ A ODBĚR KRVE	52
3.1.6.	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	53
3.1.7.	STATISTICKÁ ANALÝZA	53
3.2.	METODY A ANALÝZA: Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk	54
3.2.1.	CHARAKTERISTIKA POPULACE	54
3.2.2.	METODIKA	54
3.2.3.	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	54
3.2.4.	IZOLACE A STIMULACE LIDSKÝCH PERIFERNÍCH MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK (PBMC)	55
3.2.5.	INTRACELULÁRNÍ BARVENÍ	55
3.2.6.	STATISTICKÁ ANALÝZA	55
4.	VÝSLEDKY	56
4.2.	VÝSLEDKY PUBLIKACE: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie)	56
4.2.	VÝSLEDKY PUBLIKACE: Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk	65
5.	DISKUZE A LIMITACE VÝZKUMU	69
5.1.	TERAPIE HEMATOONKOLOGICKÉHO ONEMOCNĚNÍ SNIŽUJE POČET MAIT BUNĚK	69
5.2.	CYTOKINOVÝ REPERTOÁR, FENOTYPOVÁ A FUNKČNÍ ANALÝZA MAIT BUNĚK	70
5.3.	MAIT POPULACE MÁ V PRŮBĚHU AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE PROTEKTIVNÍ FUNKCI:	72
6.	ZÁVĚR	78
7.	SOUHRN	80
8.	SUMMARY	81
9.	LITERATURA	82
10.	PUBLIKACE	115
11.	PŘÍLOHY	117

1. ÚVOD:

Imunita a její složky slouží jako řídicí systém v ochraně organismu, adaptaci na vnější podmínky a regulaci jednotlivých dějů uvnitř těla. Přestože je imunitní systém disperzní soustava molekul a buněk, funguje jako úzce propojená dynamická síť. Poznání jednotlivých funkcí a interakcí se v posledních letech stává velmi žádoucí. Léčebné postupy se v mnoha odvětvích medicíny posouvají k tzv. target terapii, cílené léčbě a imunoterapii. Je snaha o zjištění prediktivních faktorů k plánovaným léčbám a k medicínským postupům. Aby toto bylo možné, je potřeba objasnit a popsat jednotlivé složky imunity, jejich funkce a vzájemné interakce.

V současné době si významnou pozornost získávají i zdánlivě malé populace imunocytů. Je snaha o zjištění jejich role v organismu. Recentní výzkumné práce ukazují na důležitost jednotlivých subpopulací imunitních buněk. V rámci cílené terapie, biologické léčby a imunoterapie se výzkumníci snaží o jejich modulaci a využití jejich přirozených vlastností k terapii různých druhů onemocnění.

I tento výzkumný projekt postgraduálního studia je zaměřen na zdánlivě nevelkou populaci leukocytů, tzv. MAIT lymfocyty, které v minulých letech stály na hraně pozornosti medicíny.

Cílem práce je předložit komplexní soubor dosavadních poznatků ve fyziologii a patofyziologii invariantních imunitních buněk MAIT. Z hlediska své funkční pozice se nacházejí na hranici vrozené a získané imunity. Přes svou evoluční konzervovanost jsou schopny vykonávat funkce mnohem mladší adaptivní imunity. Mají významný potenciál ve vysvětlení patofyziologických procesů mnoha onemocnění. Tato postgraduální práce se zabývá analýzou fenotypu subpopulací MAIT buněk a jejich cytokinového repertoáru. Hlavní výzkumná část je zaměřena na jejich roli v procesu autologní transplantace krvetvorných elementů u pacientů s hematologickým onemocněním.

1.1. VROZENÝ A ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ SYSTÉM

Vrozený imunitní systém je první obrannou linií organismu. Mechanickou bariéru tvoří kůže a sliznice. Funkční bariéra je reprezentována skupinou tzv. vrozených imunitních buněk a humorálními složkami. Vrozená, někdy také nazývaná „nespecifická“ imunita je charakteristická svou okamžitou schopností odpovídat na antigenní stimuly. Při opakované expozici se rychlost odpovědi nemění. Uplatňují se zde nespecifické imunitní mechanismy. Buněčný kompartment reprezentují makrofágy, dendritické buňky, neutrofilů, bazofilů, žírných buněk a NK buňky.

Adaptivní imunita, také nazývaná „specifická“ nebo „získaná“, je zpočátku opožděná. Uplatňuje se zde schopnost imunitní paměti. Při opakovaných expozicích se zvyšuje rychlost i amplituda odezvy. Základními reprezentanty jsou dvě linie konvenčních lymfocytů B a T. Každá má své podskupiny a funkční specifika (Pasman & Kasper, 2017).

Mezi těmito dvěma konci spektra imunitní obrany leží několik typů buněk, které nelze zařadit ani mezi vrozené, ani mezi adaptivní imunocyty. Tyto buňky vykonávají efektorové funkce podobné cytokinové odpovědi adaptivní imunity s rychlostí, která je vlastní vrozeným imunitním složkám (Pasman & Kasper, 2017). Na rozdíl od rozmanitosti TCR receptorů konvenčních T buněk představuje receptor nekonvenčních T lymfocytů omezenou variabilitu a rozpoznává pouze konzervované, nepeptidové ligandy. Jsou známy tři základní typy nekonvenčních lymfocytů: MAIT buňky, $\gamma\delta$ T buňky a NKT buňky (Ivanov et al., 2014).

1.2. CHARAKTERISTIKA MAIT BUNĚK

MAIT buňky patří mezi nekonvenční lymfocyty popsané současně s objevem iNKT, jako druhá frakce neznámé populace $CD4^- CD8^-$ T lymfocytů (Porcelli et al., 1993). Studie z roku 2003 zabývající se výskytem těchto buněk v organismu dala vznik dnes známému názvu „sliznicí asociované lymfocyty“. Skupina vědců E. Treinera a F. Tilloye zjistila, že se tyto buňky vyskytují především v mukóze střeva a v plicích (Treiner et al., 2003). Pro MAIT buňky je charakteristická exprese semi-invariantního $TCR\alpha$ -

řetězec (u lidí většinou V α 7.2- J α 33/J α 20, u myši V α 19-J α 33), který se páruje s omezeným repertoárem TCR β -řetězců. Tato skutečnost má vliv na omezenou diverzitu TCR receptoru, který je znakem všech typů T lymfocytů. (Gherardin et al., 2016; Reantragoon et al., 2013). Aktivace a signalizace MAIT buněk byla popsána Tilloyem v roce 1999. MAIT lymfocyty využívají imunitní cestu restringovanou neklasickou třídou MHC like Ib (Tilloy et al., 1999) a prezentaci ligandů pomocí MR1 molekuly. Tato signální dráha je mezi druhy savců vysoce konzervovaná a je silný evoluční tlak na zachování repertoáru buněk MAIT, což dokládá i průkaz 90% sekvenční podobnosti mezi myším a lidským organismem (Riegert et al., 1998) a možnost aktivace lidské MAIT buňky pomocí potkaní, myší a bovinní MR1 molekuly (Huang et al., 2009). Aktivovat MAIT buňky lze metabolity některých vitaminů z řady B, jejichž produkce je typická pro bakterie (Gold et al., 2010; Kjer-Nielsen et al., 2012; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010). Aktivace MAIT buněk je ale možná i cestou nezávislou na TCR prostřednictvím IL-12 a IL-18, která je v organismu využívána při obraně proti virům (Paquin-Proulx et al., 2018; Van Wilgenburg et al., 2016). Po aktivačním signálu jsou buňky MAIT schopny produkovat celou škálu chemokinů a prozánětlivých cytokinů (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-22) (Gibbs et al., 2017; Gold et al., 2015; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010). V roce 2013 bylo dokázáno, že buňky MAIT jsou své efektorové funkce schopné vykonávat také prostřednictvím produkce granzymu a perforinu, jež se přímo účastní procesu buněčné apoptózy (Kurioka et al., 2015; Le Bourhis et al., 2013). Z předchozích sdělení je zřejmé, že MAIT buňky jsou i přes svou imunitní konzervovanost a omezenou receptorovou variabilitu schopny účasti v mnoha obranných mechanismech proti infekčním agens. Jsou schopny rozpoznávat bakterie, viry i mykózy (Meermeier et al., 2018).

V roce 2014 Lepore prokázal, že kromě prozánětlivých mechanismů, jsou MAIT buňky schopny produkce i cytokinů regulačních a funkčně inhibičních. Tuto hypotézu potvrdil ve své publikaci v roce 2019 i výzkumník Kelly, který prokázal schopnost MAIT buněk produkovat IL13. (Kelly et al., 2019; Lepore et al., 2014). Tyto výzkumy otevřely pole pro hledání role MAIT v autoimunitních a imunomodulačních procesech. (Kelly et al., 2019; Lepore et al., 2014). V posledních letech se však díky mnoha studiím dostává do popředí otázka významu MAIT buněk v roli nádorového dozoru, patogenezi tumorů a možnostech jejich imunoterapie. (Cogswell et al., 2021; Godfrey et al., 2019; Provine & Klenerman, 2020; Toubal et al., 2019)

1.3. HISTORIE MAIT BUNĚK

Jacques Miller, francouzsko-australský vědec, známý jako zakladatel teorie lymfocytárních populací a objevitel imunologického významu brzlíku, publikoval objev dvou základních druhů lymfocytů, později označovaných jako B a T, již v roce 1961 (Miller, 1961). Od tohoto klíčového objevu uplynulo necelých čtyřicet let, než se objevily první zmínky o nekonvenčních lymfocytech. Na rozdíl od jasně definovaných buněk specifické adaptivní imunity byla skupina nekonvenčních lymfocytů zpočátku velmi obtížně uchopitelná jednotka co do své funkce a postavení v imunitním systému.

Svůj název „nekonvenční“ získaly tyto nově objevené lymfocyty právě pro svou roli v imunitním systému, která stojí na hranici mezi vrozenou a získanou imunitou. V literatuře se z této skupiny imunitních buněk objevily nejdříve zmínky o iNKT lymfocytech. V roce 1993 vědec Steven Porcelli publikoval ve své práci zprávy o nalezení dosud neznámé populace CD4⁻ CD8⁻ (dvojitě negativní [DN]) α/β T buněk v periferní krvi člověka (Porcelli et al., 1993a). Od roku 1994 byla tato populace intenzivně zkoumána především vědci A. Bendelacem, O. Lantzem a skupinou vědců E. Treinera a F. Tilloye. Postupně byla populace těchto imunocytů s charakteristickým α řetězcem TRAV1-TRAJ33 TCR nalezena u lidí, myši a skotu (Lantz & Bendelac, 1994).

První publikace zabývající se deskriptivní charakteristikou nově nalezených T lymfocytů se objevila až v roce 1999. Zde se dosud nespecifikovaná skupina buněk objevila již jako jasně definovaná podskupina T lymfocytů CD3 pozitivních, u které byl jako charakteristický znak popsán α řetězec TCR receptoru složeným z hV α 7.2- J α 33 u lidí a mV α 19- J α 33 u myši. Řetězec β TCR receptoru byl definován jako řetězec s oligoklonálním repertoárem, jenž podléhá selekci nezávislé na TAP. Nezávislost na transportéru asociovaném s proteinovým komplexem naznačuje schopnost rozpoznávání nepeptidové ligandy, tzn jinou cestou než za pomoci klasické molekuly MHC I třídy. Skupina MAIT byla v této práci popsána jako dvojitě negativní (DN CD4⁻ CD8⁻) T buňky, u lidí také CD8 pozitivní populace, s efektorovým i paměťovým fenotypem (Tilloy et al., 1999). Již v této době se vědci zabývali otázkou funkce a významu nově popsané populace lymfocytů. Dnes známý a používaný název MAIT buňky, v překladu se sliznicí asociované invariantní T lymfocyty, však získala tato skupina buněk až v roce 2003, kdy byla publikována pilotní studie demonstrující výskyt MAIT buněk v lamina propria střevní

sliznice lidí i myši a byla popsána jejich funkční a vývojová závislost na MR1 molekule a střevní mikrobiotě (Treiner et al., 2003). Ve 21. století se vědci snaží objevit funkce a imunitní postavení této pozoruhodné skupiny buněk. Jejich zachování mezi druhy savců, četnost, konzervovanost a forma selekce však naznačuje významnou roli ve fyziologii organismů, jejichž schopnosti nelze zařadit striktně ani do adaptivní ani do vrozené imunity (Lantz & Legoux, 2018).

1.4. TCR / *i*TCR RECEPTOR

TCR receptor je molekula charakterizující povrch T lymfocytů. V případě konvenčních lymfocytů slouží k rozpoznání peptidových molekul, které jsou vystaveny na povrchu buněk pomocí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Právě díky signalizaci a interakci skrze TCR receptory dochází k aktivaci efektorových funkcí T lymfocytů (Hennecke & Wiley, 2001). Co do struktury je TCR transmembránový heterodimer. Tvoří dva typy řetězců, α a β nebo γ a δ (Hedrick et al., 1984; Malissen et al., 1984). Jeho části mají extracelulární, transmembránovou a intracelulární oblasti, při čemž variabilitu pro určité ligandy zajišťuje extracelulární doména se svou variabilní oblastí (Richman et al., 2009). Aby byla možná interakce s MHC komplexem je potřeba řada koreceptorů. Mezi hlavní patří CD3 molekula, charakteristická pro T lymfocytární populaci. Dále základní molekuly CD4 a CD8, které jsou deskriptivní pro subpopulace T lymfocytů dle jejich funkcí. CD4 molekula je charakteristická pro pomocné a regulační T lymfocyty, které mají převážně modulační funkce. TCR receptor s koreceptorem CD4 rozeznává molekuly v kontextu MHC II. třídy prezentující především exogenní molekuly pohlcené antigen prezentujícími buňkami. CD8 molekula charakterizuje populaci cytotoxických T lymfocytů (Cantor & Boyse, 1977; Shiku et al., 1975). Jak z názvu vyplývá, jedná se o lymfocyty, jež jsou schopny aktivace buněčné smrti. Zde je však potřeba prezentace antigenu MHC I. třídy. Tento typ komplexu se nachází na všech jaderných buňkách a slouží k prezentaci především intracelulárních antigenních peptidů. V případě napadení buňky intracelulárními patogeny, viry i IC bakteriemi, zajišťují přenos této informace CD8 T lymfocytům, které následně spustí aktivaci programované smrti napadené buňky (Parnes et al., 1989). Peptidy buňce vlastní vystavené v MHC komplexu monitorovány

T- regulačními lymfocyty nejsou antigenní pro CD8 T lymfocyty a jsou sledovány pod tzv. imunitní tolerancí (Taams & Akbar, 2005).

V souhrnu tedy konvenční T lymfocyty nesou na svém povrchu TCR receptor, který rozpoznává peptidové antigeny prezentované molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy I nebo třídy II. Přenosem informací pomocí interakcí TCR/MHC je vyvolána buněčná imunitní odpověď, jež v organismu zajistí antimikrobiální a protinádorovou imunitu. Díky TCR a struktuře jeho variabilní domény je zajištěna extrémní diverzita rozpoznání celé škály patogenů. Výše popsané charakteristiky a signalizace platí uniformně pro celý imunitní systém.

V případě nekonvenčních lymfocytů se však TCR receptor často označuje iTCR. Právě zkratka „i“ je zkratkou pro invariantní neboli neměnné vlastnosti. Invarianci TCR lze chápat v charakteru řetězce TCR α , pro nějž je typická v případě MAIT buněk malá diverzita. Charakteristická je i schopnosti kombinace pouze s malým počtem β řetězců, tak aby byl dán vznik funkční MAIT buňce. Tato skutečnost dále snižuje diverzitu populace MAIT buněk. U lidí je řetězec TCR α kódovaný segmentem V genu *TRAV1-2* a segmentem J genu *TRAJ33*, *TRAJ20* nebo *TRAJ12* (Gold et al., 2014; Lepore et al., 2014; Reantragoon et al., 2013; Tilloy et al., 1999), který se páruje s řetězcem TCR β kódovaným *TRBV6* nebo se segmentem *TRBV20* (Reantragoon et al., 2013). V širším kontextu lze invarianci TCR receptoru MAIT lymfocytů chápat i jako znak vymezující MAIT buňkám vysokou konzervovanost a současně mezidruhové zachování v průběhu imunitní evoluce. (Porcelli et al., 1993, 1993; Souter & Eckle, 2020).

1.5. MR1 MOLEKULA

V průběhu evoluce došlo k vývoji unikátního mechanismu schopného zjistit narušení homeostázy organismu v případě mikrobiální infekce, který je schopen spustit kaskádu ochranných procesů. Tento mechanismus je zajišťován hlavním histokompatibilním komplexem (MHC), jenž prezentuje intracelulární peptidy v případě MHC typu I a extracelulární peptidy v případě typu II. Prezentací ligandů dochází k interakci s T lymfocyty a dle prezentovaných molekul jsou buňky pod ochranou imunitní tolerance nebo se spustí kaskáda s cílem eliminovat buňky napadené patogeny (Mohan & Unanue, 2012; Neefjes et al., 2011). Kromě klasického komplexu prezentace antigenů MHC systémem

byl popsány i neklasický systém MHC, tzv. Ib, který vykazuje jen velmi omezený polymorfismus a vyšší tkáňovou specifitu (Shawar et al., 1994).

Zatímco klasická třída MHC se účastní obranných mechanismů vázaných na adaptivní imunitu, komplex neklasické MHC je regulátorem procesů vrozené imunity a prezentuje antigeny invariantním formám T lymfocytům. Mezi zástupce neklasického histokompatibilního komplexu patří právě MR1 molekula prezentující ligandy buňkám MAIT (Edholm et al., n.d.)

MR1 molekula váže ligandy pocházející z metabolismu riboflavinu, jež je využíván mnoha bakteriemi, mykobakteriemi a kvasinkami. Tato cesta se v metabolismu savců neuplatňuje, a proto je v jejich systému užívána k vysoce konzervované imunitní detekci patogenů. (Chua et al., 2012; Gold et al., 2013; Kjer-Nielsen et al., 2012; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010; Maggio et al., 2015).

Klíčovým objevem byla přesná identifikace molekul prezentovaných na MR1. Patří mezi ně 5-(2-oxopropylidenamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OP-RU) a 5-(2-oxoethylidenamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OE-RU) (Eckle et al., 2015; Mak et al., 2017). Některé studie však podporují hypotézu existence dalších ligandů MR1 (Meermeier et al., 2016).

Molekuly MR1 sídlí v endoplazmatickém retikulu (ER) v neúplně složené konformaci a nemohou být exprimovány na povrchu, dokud nedojde k vazbě ligandu a β 2-mikroglobulinu (McWilliam et al., 2016).

Metabolity riboflavinu jsou transportovány do ER, prostřednictvím tvorby Schiffovy báze se intracelulárně váží na MR1, následuje kompletní sbalení a asociace s β 2-mikroglobulinem. Komplex pak putuje přes ER a Golgiho aparát do buněčné membrány (McWilliam et al., 2016). MR1 molekula může být po prezentaci ligandu recyklována (Riegert et al., 1998). Většina molekul MR1 je degradována a putuje zpět intracelulárně, což přispívá k rychlé prezentaci riboflavinových ligandů a rychlé aktivaci buněk MAIT (McWilliam et al., 2016). Pro přenos signálu MR1 je také nezbytná signalizace NF- κ B (Ussher et al., 2016).

Nositelem MR1 molekuly může buď buňka se schopností prezentace antigenu (APC), jako jsou dendritické buňky (Gold et al., 2010; Van Wilgenburg et al., 2016), monocyty (Dusseaux et al., 2011c; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010a), makrofágy (Van Wilgenburg et al., 2016), B buňky (Jeffery et al., 2016; Salerno-Gonçalves et al., 2014)

nebo epiteliální buňky nepocházející z kostní dřeně buňky (Gold et al., 2010a; Jeffery et al., 2016) (H. Wang et al., 2019).

1.6. FREKVENCE A LOKALIZACE MAIT BUNĚK

U lidí byly MAIT buňky pozorovány v mnoha tkáních. Jako dosud nepopsaná populace T lymfocytů byly nalezeny nejdříve v periferní krvi lidí, myši a následně i skotu (Lantz & Bendelac, 1994; Porcelli et al., 1993). Posléze byla jejich přítomnost prokázána v lamina propria sliznice střeva, v plicích, lymfatické uzlině, brzlíku, játrech, gynekologickém traktu a v malé frakci i v pupečnickové krvi. (Bister et al., 2021; Dusseaux et al., 2011; Martin et al., 2009; Tang et al., 2013; Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003; Walker et al., 2012). V Periferní krvi tvoří MAIT buňky 1-10 %, průměrně 2,6 % T lymfocytů (CD3 + buněk). (Dusseaux et al., 2011; Gherardin, Souter, et al., 2018; Martin et al., 2009).

V gastrointestinálním traktu tvoří 1,5-10 % a v plicích 2-4 % z CD3+ buněk (Barber-Axthelm et al., 2020; Kurioka et al., 2016). V lymfatické uzlině bylo prokázáno pouze 1 % MAIT z CD3+ buněk (Barber-Axthelm et al., 2020; Dusseaux et al., 2011; Eberhard et al., 2014). Studie z roku 2013 se detailně zabývala proporcí a funkcí invariantních T buněčných liniích v játrech. Ačkoli byla studie omezena robustností počtu zkoumaných vzorků, z důvodu obtížného získání zdravé lidské jaterní tkáně, bylo prokázáno, že játra, konkrétně jaterní intrasinusoidální kompartment lymfocytů, obsahují velkou část buněk typu MAIT a tvoří rezervoár této populace (v průměru 15 %, 20-40 % frakce CD3+ buněk) (Dusseaux et al., 2011; Jo et al., 2014a; Kurioka et al., 2016; Mehta, Lett, et al., 2022; Tang et al., 2013a).

Byla prokázána přítomnost MAIT buněk i v gynekologickém traktu (Bister et al., 2021). V roce 2022 a 2023 byly publikovány dvě studie, které informují o přítomnosti MAIT buněk v mozkových plenách, kde pomáhají udržovat integritu meningeální bariery, podílejí se na expresi antioxidantních molekul a zachování homeostázy v mozkové tkáni (Bird, 2023; Y. Zhang et al., 2022).

1.7. VÝVOJ MAIT BUNĚK

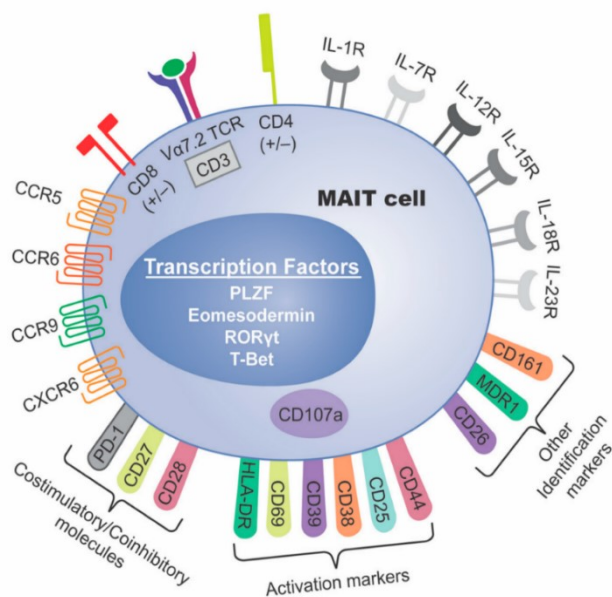
Vývoj všech linií T buněk je do určité míry závislý na brzlíku, což platí i pro skupinu nekonvenčních lymfocytů. Typickým zástupcem jsou iNKT buňky, které jsou také thymus dependentní. Expandují a získávají zde svůj fenotyp a funkce (Bendelac et al., 2007; Treiner & Lantz, 2006). I přes tento T buňkám vlastní uniformní vývojový znak je skupina MAIT cell částečně výjimkou. V pupečnickové krvi a brzlíku je lze nalézt jen zcela vzácně. Vykazují zde naivní fenotyp (Martin et al., n.d.). MAIT buňky patří mezi tzv. intraepiteliální lymfocyty jež mohou vykazovat určitou nezávislost svého vývoje na thymu. Je pro ně charakteristická schopnost časného úniku z brzlíku a migrace do tkání v raném stádiu (Lambolez et al., 2005). MAIT buňky se akumulují primárně ve střevní lamina propria a vyvíjejí se v procesu závislém na kmenzální flóře (Treiner et al., 2003). Martin a Treiner prokázali, že jsou buňky MAIT selektovány v thymu způsobem závislým na MR1 a jejich časná migrace do střeva, další vývoj a expanze je ovlivněn B lymfocyty a střevními bakteriemi. Postseleční MAIT buňka je tedy stále naivní a svůj paměťový fenotyp získává po migraci do tkání. MAIT tedy používá jedinečnou vývojovou dráhu, která je odlišná od iNKT i konvenčních T buněk (Martin et al., n.d.).

1.8. FENOTYPOVÝ PROFIL MAIT BUNĚK

Obr. (Cogswell et al., 2021)

Buňky MAIT vykazují fenotypy efektorové paměti CD45RA- CD45RO+CD95hiCD62Llo CD161+ (Dias et al., 2017). Jsou schopny produkce celé škály cytokinových receptorů IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-18R, IL-23R a IFNR, které aktivují buňky MAIT nezávisle na MR1 molekule. Exprimují PLZF s T

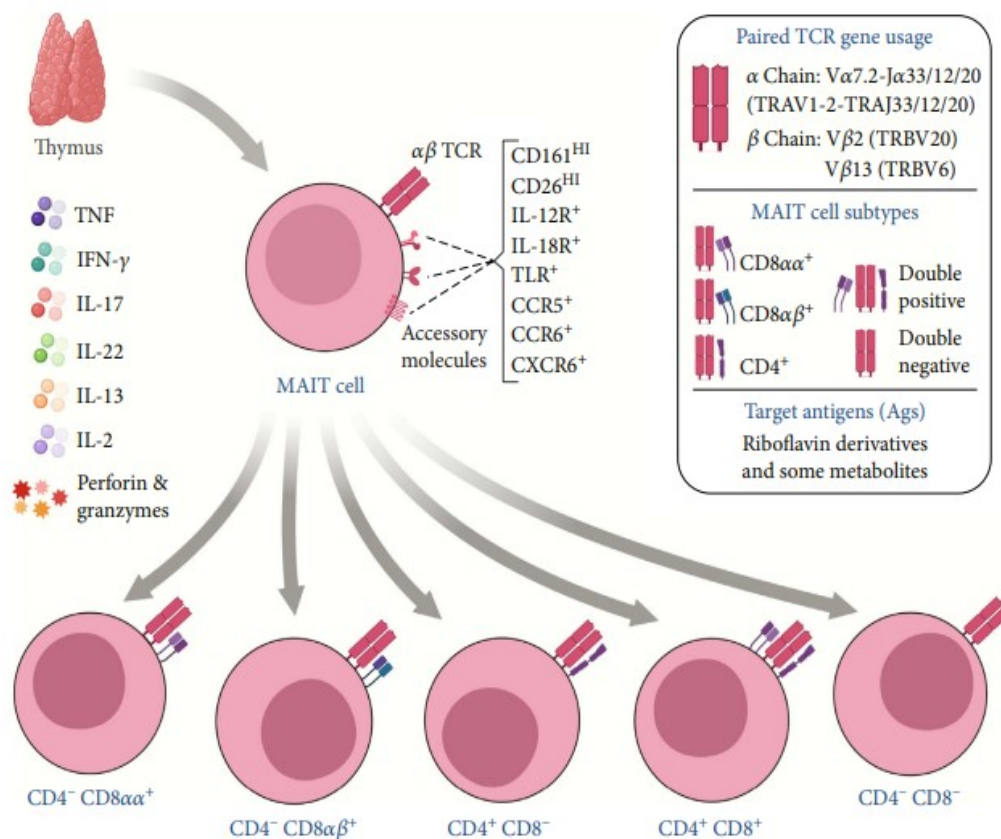
transkripčními faktory T-bet a ROR γ t, které MAIT buňkám umožňují maturaci a značnou



míru imunitní plasticity, jako schopnost sekretovat mediátory typické pro profil Th1, Th2 a Th17 T lymfocytů (De Araújo et al., 2021; Toubal et al., 2019). Ze znaků patřící k vrozené imunitě lze u buněk MAIT zmínit schopnost reakce na aktivační potenciál zprostředkovaný TLR (Tol-like receptors) (Chen et al., 2017). MAIT buňky také vykazují tkáňovou specifitu a schopnost migrace do místa zánětu. Tuto vlastnost jim umožňuje exprese homing-tissue receptorů, jako jsou CCR5, CCR6, CCR9 a CXCR6. Část populace MAIT exprimuje MDR (multi-drug rezistence) transportér zvaný ATP-binding cassette (ABC) transporters B1 (ABCB1) umožňující odolnost vůči některým xenobiotikům, který souvisí s rezistencí na chemoterapii (Dusseaux et al., 2011c). Na povrchu buněk MAIT jsou také některé NK receptory, včetně NKG2D (Dusseaux et al., 2011c)

1.9. SUBPOPULACE MAIT BUNĚK

(De Araújo et al., 2021)



Lidské buňky MAIT tvoří až 10 % T lymfocytů periferní krve. K jejich identifikaci se užívá fenotyp CD3+, jenž je společný všem T lymfocytům, a dále dva povrchové znaky typické pro lidské buňky MAIT V α 7.2 a CD161HI (Rahimpour et al., 2015).

Buňky MAIT nejsou samy o sobě uniformní skupinou. Tvoří je více subpopulací, které se kategorizují do pěti skupin dle exprese koreceptorů CD4 a CD8, jež mají souvislost i s funkčním zařazením v imunitním systému. MAIT lymfocyty tvoří subpopulace CD4+ CD8-, CD4+ CD8+, CD4- CD8-, CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +, CD4-CD8 $\alpha\beta$ +. Z již zmíněných jsou dvě poslední (CD4-CD8 $\alpha\alpha$ + a CD4-CD8 $\alpha\beta$ +) nejhojnější a proporcčně tvoří přibližně 80 % buněk MAIT (De Araújo et al., 2021; Gherardin, Loh, et al., 2018)

1.10. AKTIVACE MAIT BUNĚK

Do současné doby bylo prokázáno více způsobů aktivace buněk MAIT. Tyto aktivací cesty jsou spojeny s různými efektorovými funkcemi (Hinks & Zhang, 2020).

První možnost aktivace, která je závislá na interakci MR1-TCR, se uplatňuje především v kontextu infekčních zánětlivých procesů. V dalším způsobu aktivace se uplatňují cytokiny, zde nedochází k interakci MR1-TCR. Tato forma aktivace je zapojována především v případě antivirové obraně organismu. Třetí cestou je recentně popsán program „opravy tkání“, kde se opět uplatňuje aktivace TCR, avšak odlišným způsobem než v případě interakce s MR1 (Hinks & Zhang, 2020).

Diverzita imunitních odpovědí MAIT buněk ukazuje na schopnost zastupovat multifunkční efektorové buňky v mnoha patofyziologických procesech vrozené i získané imunity.

Základní a také nejdříve objevená cesta aktivace MAIT buněk je pomocí rozpoznávání derivátů syntézy riboflavinu, prezentovaných na restrikční molekule histokompatibilního komplexu MR1 (Corbett et al., 2014; Eckle et al., 2015; Kjer-Nielsen et al., 2012; Treiner et al., 2003). Uplatňují se meziprodukty syntézy vitamínu B2, které jsou využívány metabolismem mnoha bakterií, mykobakterií a kvasinek (Chua et al., 2012; Gold et al., 2013; Kjer-Nielsen et al., 2012; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010; Maggio et al., 2015). Tato cesta se v organismu savců neuplatňuje, a proto je v jejich systému užívána k imunitní detekci patogenů. Prezentace ligandu na MR1 molekule aktivuje MAIT buňky vazbou na TCR receptor. Je proto označována jako TCR

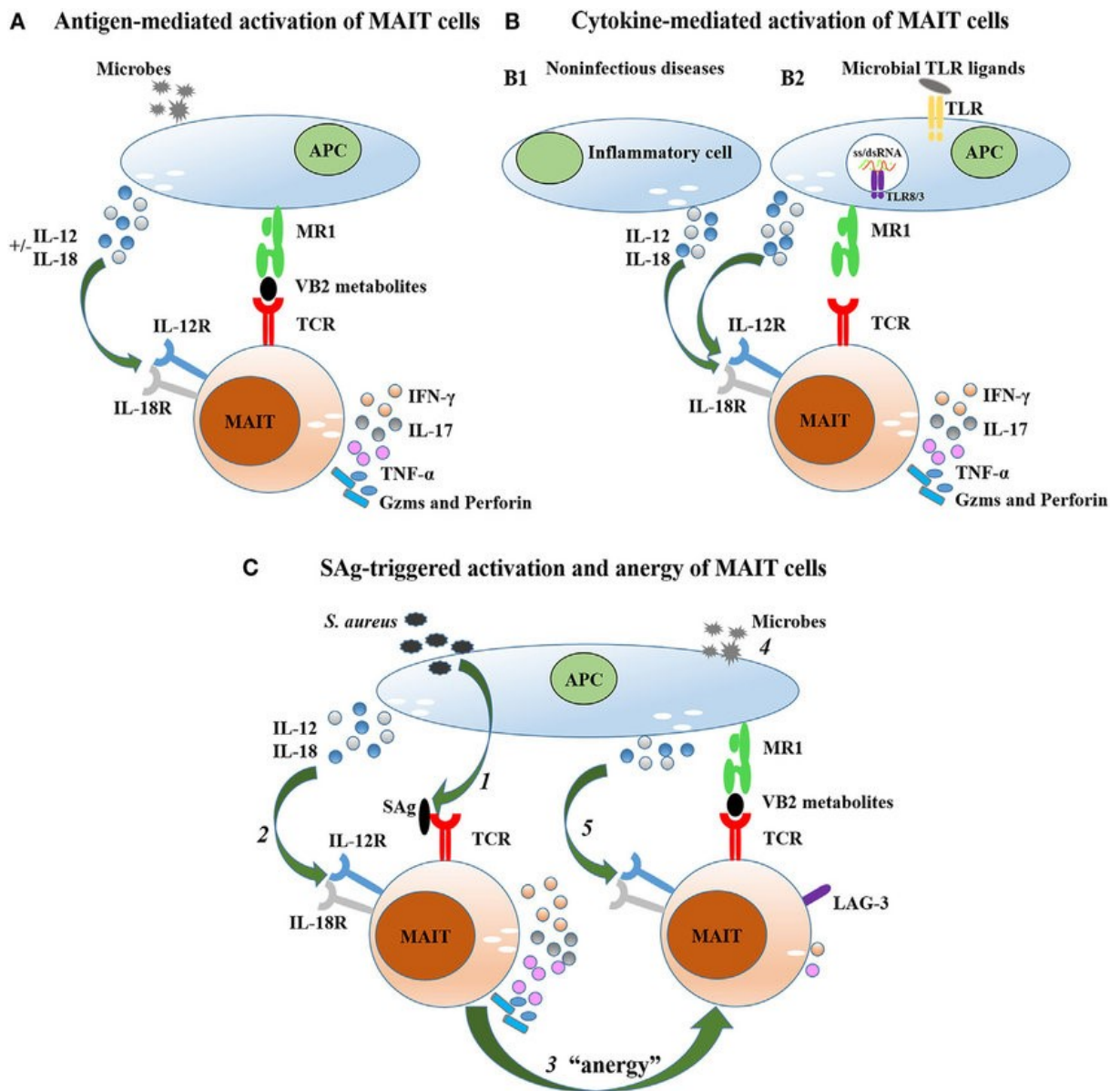
zprostředkovaná. MR1 molekula nese aktivační ligand na povrchu antigen prezentujících buněk nebo buněk epitelálních (Gold et al., 2010; Jeffery et al., 2016; H. Wang et al., 2019). Odezva MAIT buněk na prezentaci ligandu pomocí MR1 je rychlá, do 6hodin (Ussher et al., 2014).

Recentně byla popsána další forma aktivace MAIT buněk interakcí s TCR. Tato dráha však obchází prezentaci patogenu na MR1. V roce 2016 a 2017 vědci Emgård a Shaler prokázaly účast MAIT buněk v syndromu toxického šoku. Jak je známo, tato imunitní bouře je způsobena bakteriálními superantigeny streptokoky skupiny A a stafylokokovým enterotoxinem B. Tyto bakterie však nevyužívají ve svém metabolismu meziproducty syntézy riboflavinu, avšak produkují molekuly právě označované jako superantigeny, které jsou mimo jiné schopny specificky vázat TCR receptor MAIT buněk a tím je velice rychle aktivovat (Emgård et al., 2019; Shaler et al., 2017).

Dalším způsobem aktivace MAIT buněk je cesta cytokin-dependentní, označována také TCR nezávislá. Mezi aktivační cytokiny MAIT patří IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 a IFN typu I a některé typy TLR (Loh et al., 2016; Ussher et al., 2018; Van Wilgenburg et al., 2016; Wilgenburg et al., 2018). MAIT buňky reagují na cytokiny svou aktivací později než v případě MR1 molekuly, za cca 20- 24hodin (Ussher et al., 2014). Při této formě aktivace dochází k produkci cytolytických efektorových molekul, IFN- γ (Jo et al., 2014; Ussher et al., 2014; Van Wilgenburg et al., 2016) a uvolňování granzymu B a perforinu (Sattler, Dang-Heine, et al., 2015), které se přímo účastní indukce apoptózy napadených buněk.

Buňky MAIT pomáhají s opravou tkání a udržují homeostázu. V populaci MAIT lymfocytů byly identifikovány geny spojené s opravou a remodelací tkání (MMP25, Furin, PDGFB, TGFB1) a také s angiogenezí (CSF2, VEGFB, PDGFB), což naznačuje jejich tkáňově reparační potenciál (Lamichhane et al., 2019; Leng et al., n.d.).

Obr. (Xiao & Cai, 2017)



1.11. CYTOKINOVÝ PROFIL MAIT BUNĚK

Aktivované buňky MAIT mohou produkovat širokou škálu cytokinů. Patří mezi ně TNF- α , IFN- γ , IL-2, které náleží do spektra produktů lymfocytů typu Th1. Dále IL-4, IL-10 patří mezi cytokiny lymfocytů typu Th2 nebo IL-17, IL-22 z cytokinového repertoáru Th17 lymfocytů. Při stimulaci také dochází k produkci různých granzymů, v závislosti na typu aktivačního signálu a lokalizaci MAIT buněk vzrůstá hladina produkovaného granzymu A, B, K, M a perforinu (Nel et al., 2021).

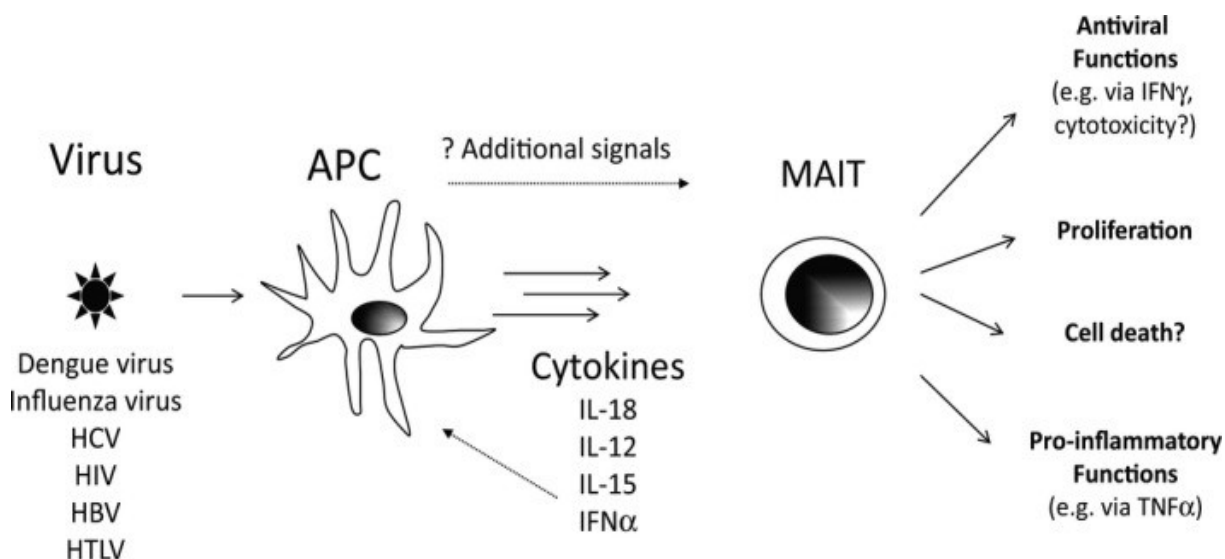
1.12. MAIT BUŇKY V ANTIMIKROIBÁLNÍ OBRANĚ

1.12.1. MAIT BUŇKY A VIRY

Buňky MAIT mají schopnost aktivace pomocí cytokinů, která je využívána především v obraně proti virům. Tuto vlastnost jim umožňuje exprese receptoru IL12R a IL18R (Ussher et al., 2018). V případě stimulace obou receptorů dochází k aktivaci MAIT buněk a zahájení produkce interferonu- γ (Ussher et al., 2014). Ačkoli populace T buněk exprimující CD161 ($CD8^+ \cdot CD4^+$ a $\gamma\delta$ T buňky) tuto schopnost sdílejí, jsou mezi lidskými mononukleární periferní krve buňky MAIT majoritním zdrojem interferonu- γ (J. Fergusson et al., n.d.; Ussher et al., 2014). IL 12 a IL18 stimuluje populaci MAIT také k produkci $TNF\alpha$ a k upregulaci granzymu B a CD69 (Van Wilgenburg et al., 2016). Stejně tak se na produkci interferonu- γ a upregulaci CD69, granzymu B a perforinu podílí IL15 (Sattler, Dang-Heine, et al., 2015). Přítomnost produktů MAIT buněk také potencuje protizánětlivé funkce B lymfocytů (M. Bennett et al., 2017). Jednotlivé subpopulace MAIT buněk se pozitivní zpětnou vazbou vzájemně potencují a ovlivňují (Dias et al., 2017).

Obr.

(Ussher et al., 2018b)



V roce 2016 Van Wilgenburg a kol. prokázali, že buňky infikované virem jsou schopny *in vitro* aktivovat MAIT lymfocyty způsobem závislým na cytokinech. Zjistili, že virus dengue, virus chřipky a virus hepatitidy C byly všechny schopny aktivovat buňky MAIT. Při bližším zkoumání viru hepatitidy C prokázali, že supernatant z buněk MAIT stimulovaných IL-12 a IL-18 byl schopen inhibovat replikaci viru pomocí produkce interferonu- γ . (Ussher et al., 2018; Van Wilgenburg et al., 2016). Z modelu MAIT buněk a chronické infekce HCV bylo prokázáno vyčerpávání jaterní i krevní populace MAIT v čase, včetně snížení jejich markerů aktivace (Billerbeck et al., 2010). Deplece MAIT buněk je také prokázána u pacientů infikovaných virem HIV (Cosgrove et al., n.d.; Leeansyah et al., n.d.). V případě viru chřipky (H1N1, H7N9) byla prokázána negativní korelace mezi populací MAIT a závažností průběhu (Loh et al., 2016; Van Wilgenburg et al., 2016). Naproti tomu v případě horečky Denque se zdá být závažnost průběhu dána imunopatologií, do které se MAIT zapojují (Van Wilgenburg et al., 2016).

Bylo prokázáno zapojení MAIT buněk v imunitní reakci proti SARS-CoV-2. Recentní studie v průběhu pandemie SARS-CoV-2 odhalily, že počet buněk MAIT klesá se závažností onemocnění, při čemž se populace MAIT obnovuje v periferní krvi v rekonvalescenci po onemocnění (Shi et al., 2021). MAIT buňky se pravděpodobně podílejí na poškození imunity COVID-19, dokonce i na plicní fibróze (Haeryfar et al., 2020; Shi et al., 2021)

Z již publikovaných prací je zřejmé, že MAIT buňky se imunitně významně účastní virových infekcí. V současné době se objevuje mnoho prací, které spekulují nad změnami krevního kompartmentu MAIT buněk v průběhu virových infekcí. Dosud není prokázáno, zda buňky MAIT mění hladiny svých populací z důvodu redistribuce ve tkáních a posílení imunitní obrany nebo z důvodu vyčerpání v čase. Jsou známá data o jejich možné protektivní funkci, ale i o jejich zapojení v imunopatogenezi chronických infekcí (Ussher et al., 2018).

1.12.2. MAIT BUŇKY A MYKÓZY

V rozpoznání mykotických infekcí je zapojena evolučně konzervovaná cesta MR1-TCR interakce. MAIT buňky jsou aktivovány prezentací metabolitů riboflavinu hub pomocí MR1 molekuly (Kjer-Nielsen et al., 2012). Po aktivaci buňky MAIT produkují IFN- γ ,

TNF- α , IL-17, IL-22 a rychle získávají cytotoxické funkce se schopností sekrece perforinu a granzymů (Dunne et al., 2021).

Již bylo prokázáno zapojení MAIT lymfocytů do imunitní odpovědi proti *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucorales* a *Aspergillus* (Dunne et al., 2021; Jahreis et al., 2018; Le Bourhis, Martin, Peguillet, et al., 2010).

Byla dokumentována role MAIT buněk v časně eliminaci patogenu mykotických infekcí. Současně je však předpoklad, že MAIT produkující IL-17 přispívají k patogenezi chronických zánětlivých onemocnění (Pisarska et al., 2020).

1.12.3. MAIT BUŇKY A BAKTERIE

Průkaz reakce MAIT buněk na bakteriální patogeny přinesl Gold a kol. a Le Bourhis a kol. v roce 2010. Předložili důkazy o schopnosti MAIT lymfocytů rozpoznávat produkty bakterií a plísní pomocí MR1 molekuly. Experimenty byly provedeny s monocyty infikovanými *Escherichia coli* a *Mycobacterium abscessus* (Gold et al., 2010; Le Bourhis, Martin, Péguillet, et al., 2010).

Postupně byla prokázána aktivace MAIT buněk antigeny prezentovanými MR1 molekulou při infekcích *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG a *Salmonella enterica* serovar typhimurium (Meermeier et al., 2018).

MAIT lymfocyty jsou schopné reakce i při styku s bakteriemi, jejichž ligandy nejsou prezentovány MR1 molekulou např. *Enterococcus faecalis*. Jedná se o aktivaci závislou na cytokinech, typicky na IL-12 a IL-18 podobně jako u virů (Meermeier et al., 2018).

Výzkumy zaměřené na syndrom toxického šoku prokázaly MAIT buňky jako významné producenty prozánětlivých cytokinů. V případě účasti MAIT lymfocytů v cytokinové bouři se jedná o aktivaci pomocí superantigenů, což bylo zjištěno při expozici exotoxinům bakterií *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* (Emgård et al., 2019; Shaler et al., 2017). Stejně tak jako u virových infekcí i u bakteriálních bylo pozorováno snížení MAIT buněk v periferní krvi v průběhu nemoci. V případě bakterií převládá hypotéza, že jsou buňky MAIT rekrutovány do infikovaných tkání a zde expandují v reakci na bakteriální infekce (Meermeier et al., 2018).

1.13. MAIT BUŇKY A AUTOIMUNITNÍ CHOROBY

Buňky MAIT regulují vrozenou a adaptivní imunitu a mohou podpořit rozvoj autoimunitních onemocnění. Autoimunitní onemocnění jsou charakterizována ztrátou imunitní tolerance k autoantigenům. Dochází při nich k trvalé nebo opakované imunitní reakci proti vlastním tkáním organismu, která vede k nadměrné produkci autoprotilátek a poškození orgánů. Chiba a kol. předložili důkazy o účasti MAIT buněk v autoimunitních procesech. Ve zvířecím modelu autoimunitní myelitidy byla popsána jejich protektivní funkce. U artritid naopak jejich prozánětlivá role (Chiba et al., 2018). Jedny z prvních zmínek o zapojení MAIT buněk v autoimunitním procesu však přinesl vědec Croxford v roce 2004.

V březnu 2023 Fan a kol. prezentovali publikaci s dosavadními znalostmi role MAIT buněk v různých autoimunitních chorobách. Roztroušená skleróza je charakterizována chronickou fokální zánětlivou demyelinizací, která vede k neuronální degeneraci, poškození axonů a reaktivní glióze. Přesná patogeneze onemocnění není známá a je považována za multifaktoriální proces, kde jedním z faktorů je abnormální reakce T buněk (Croxford et al., n.d.). Buňky MAIT jsou u pacientů s RS v místě zánětlivých fokusů mozku a v mozkomíšním moku, přičemž jejich kompartment v periferní krvi s aktivitou onemocnění klesá. (Croxford et al., n.d.). Jiná studie prokázala expanzi prozánětlivých CD161CD8⁺ T buněk v periferní krvi pacientů s RS. Tyto T buňky byly nalezeny jako součást mozkových infiltrátů po smrti u pacientů (Annibali et al., 2011). Bylo tedy prokázáno, že buňky MAIT mohou překročit hematoencefalickou bariéru a vstoupit do mozku, kde mohou hrát patogenní roli sekrecí prozánětlivých cytokinů (Le Bourhis, Martin, Peguillet, et al., 2010). Nejnovější literatura ukazuje, že střevní mikroflóra u pacientů s RS je odlišná od zdravých kontrol a je prokázána i odlišná reaktivita MAIT buněk na komezánělní bakteriální floru (Gargano et al., n.d.).

Byla zkoumána role MAIT buněk v patogenezi diabetu mellitu 1. typu. Toto autoimunitní onemocnění je způsobené selektivní destrukcí β buněk ostrůvků produkujících inzulín (Atkinson & Eisenbarth, 2001). Byla vyslovena hypotéza dvojí role MAIT lymfocytů. Ve střevní sliznici mají schopnost udržovat homeostázu díky produkci IL-17A a IL-22 a v oblasti pankreatu podporují smrt β buněk v ostrůvcích, přičemž kompartment MAIT buněk v periferní krvi je významně snížen. Tato skutečnost odráží migraci MAIT buněk do místa zánětu a současný jejich vyčerpání při chronické aktivaci.

V případě skupiny autoimunitních onemocnění jater byl také prokázán pokles MAIT buněk v periferní krvi, který souvisel s progresí onemocnění, zejména stupněm jaterní fibrózy (Berglin et al., 2014; Böttcher et al., 2018). Deplece buněk MAIT je způsobena opakovanou aktivací IL-12 a IL-18. IL-12 umožňuje buňkám MAIT produkovat IL-17A s následnou indukcí proliferace jaterních hvězdicových buněk. Následně tak zprostředkovává vývoj jaterní fibrózy za účasti granzymu B (Renand et al., 2018).

Zánětlivé onemocnění střev (IBD) zahrnuje Crohnovu chorobu (CD) a ulcerózní kolitidu (UC) s multifaktoriální vznikem kombinujícím genetické faktory, patologii střevní mikrobioty a abnormality slizniční imunity (Y. Zhang & Li, 2014). Buňky MAIT jsou aktivovány u IBD a zvyšují svou produkci IL-17, TNF- α a expresi CD69, která je spojena s aktivitou onemocnění (Haga et al., 2016; Tominaga et al., n.d.). Buňky MAIT mají v případě aktivity onemocnění změněný aktivovaný fenotyp, včetně vyšší exprese antigenu Ki67 a NKG2D. NKG2D je aktivovaný receptor pro NK buňky přítomný na povrchu buněk MAIT, který indukuje produkci prozánětlivých cytokinů. Klinické studie ukázaly, že anti-NKG2D protilátka může vyvolat klinickou remisi u některých pacientů s Crohnovou chorobou, což ukazuje na významnou roli NKG2D v patogenezi IBD a potenciál užití cílené terapie (Vadstrup & Bendtsen, 2017).

Bylo zjištěno zapojení MAIT lymfocytů i v patogenezi chronických zánětlivých artritid, včetně revmatoidní artritidy. Bylo prokázáno snížení populace MAIT buněk v periferní krvi, přičemž byli významně zvýšeny v oblasti zánětu kloubní synovie (Gracey et al., n.d.; Hayashi et al., 2016; Koppejan et al., 2019; Sugimoto et al., 2015; Toussirot et al., 2018). V případě spondyloartritid bylo prokázáno, že aktivované buňky MAIT produkovaly více IL-17 a IL-22 a exprese CD69 korelovala s aktivitou onemocnění (Hayashi et al., 2016).

Systémový lupus erythematoses (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění. Na patogenezi se podílí autoreaktivita T a B buněk, produkce autoprotilátek, ukládání imunitních komplexů a dysregulace vrozeného a adaptivního imunitního systému. Dochází následně k poškození jakéhokoli orgánu těla (Tsokos et al., 2016). I zde bylo prokázáno zapojení MAIT buněk v patogenezi. Byly prokázány funkční defekty MAIT lymfocytů a zvýšená exprese CD69, při čemž množství MAIT buněk v periferní krvi bylo sníženo (Cho et al., 2014). Je zajímavé, že aktivaci buněk MAIT zajišťují u pacientů s diagnózou SLE monocyty prostřednictvím dráhy závislé na MR1. Dochází také k aktivaci mediované cytokiny (např. IL-15, IL-12, IL-18 a IFN- α) bez potřeby exogenních antigenů. V případě

SLE by tedy aktivací indukovaná buněčná smrt mohla vysvětlit sníženou frekvenci buněk MAIT v periferní krvi (Chiba et al., 2017).

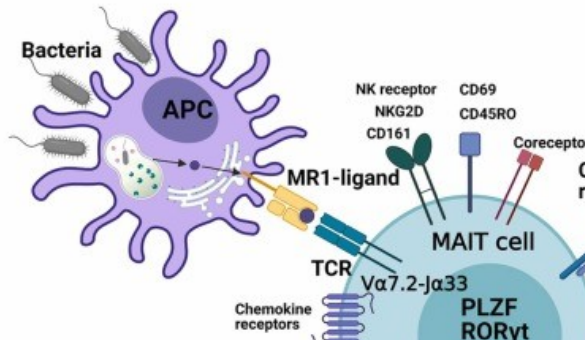
U Sjögrenova syndromu byly MAIT buňky nalezeny v biopsii slinných žláz postižených pacientů, přičemž toto nebylo prokázáno u zdravých kontrol a hladina v periferní krvi byla snižena. Na rozdíl od jiných autoimunitních chorob byla nalezena funkční abnormalita se sníženou expresí CD69 a nižší produkce TNF- α a IFN- γ ve srovnání se zdravými kontrolami. Dysfunkční buňky MAIT mohou vést k abnormální lokální imunitní odpovědi a tím spustit autoimunitní poškození s rozvojem sicca syndromu. Také byla prokázána produkce IL-17 MAIT buňkami, který je podezříván jako kofaktor v patogenezi Sjögrenova syndromu (J. J. Wang et al., 2016).

V případech ANCA asociovaných vaskulitid dochází k orgánovému poškození především pro nadměrnou aktivaci neutrofilů. Braudeau a kol. prokázali, že se frekvence buněk MAIT v periferní krvi pacientů snižuje a že i přes dosažení remise nedochází k plnému návratu hladin MAIT lymfocytů (Braudeau et al., 2016).

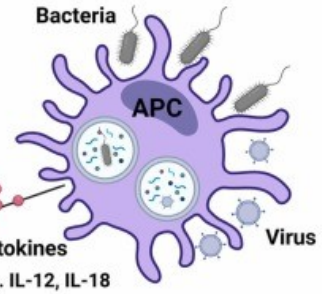
Z předchozích sdělení je zřejmé, že buňky MAIT přispívají k patogenezi autoimunitních onemocnění především sekrecí cytokinů IL-17, TNF- α a IFN- γ . Podílejí se na rozvoji a progresi autoimunitních onemocnění. Hladiny MAIT buněk v periferní krvi jsou u pacientů s autoimunitním onemocněním sniženy. Tento stav je vysvětlován migrací do místa zánětu, ale i zvýšenou apoptózou. Většina studií tedy prokazuje patologickou roli v potenciaci autoimunitního zánětu, avšak jsou i případy, kdy MAIT buňky sehrávají v autoimunitě protektivní roli, např. u diabetu mellitu produkcí IL-22 a IL-17A, které zajišťují udržení střevní integrity. Pozitivně se také uplatňuje schopnost MAIT buněk při reparaci poškozené tkáně. Přispívají k procesu hojení. Je tedy zřejmé, že úloha MAIT buněk je v případech autoimunitních zánětů dvojitá a je třeba další bližší zkoumání (Fan et al., 2023).

Obr.
(Fan et al., 2023b)

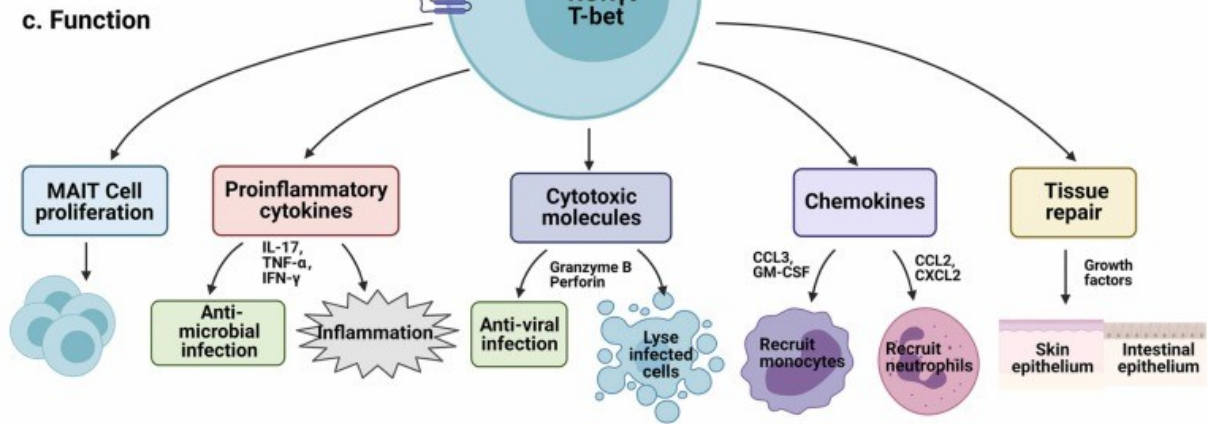
a. MR1-dependent activation



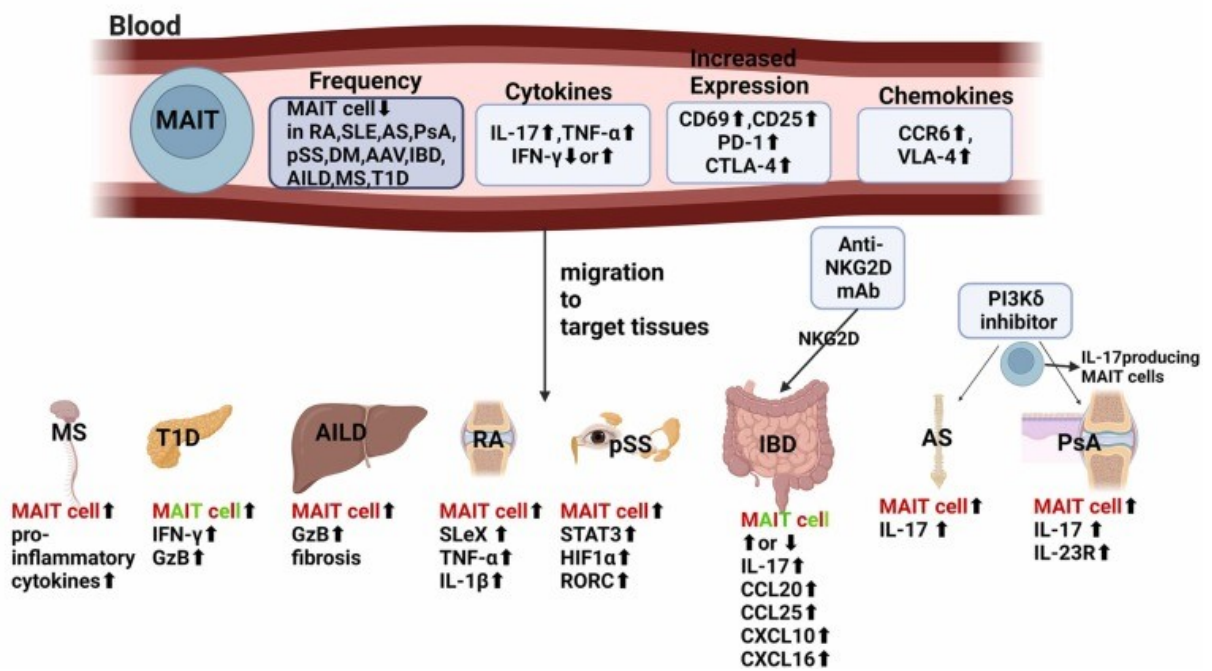
b. MR1-independent activation



c. Function



d. MAIT cells in Autoimmune Diseases



1.14. MAIT BUŇKY A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

V posledních letech se MAIT buňky stávají předmětem zájmu především v onkologickém výzkumu. Byla zkoumána jejich role v patofyziologii tumorigeneze a jejich postavení v imunitě nádorového dozoru.

V roce 2019 se Duan a kol. zabývali funkcí MAIT buněk při vzniku tumorů jater. Jejich výsledky prokázaly kvantitativní depleci i funkční abnormality MAIT buněk u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Míra deficitu MAIT buněk odpovídala progresi onemocnění (Goswami et al., 2022). Deplece MAIT buněk byla zjištěna i u onemocnění, která jsou rizikovým faktorem pro vznik hepatálních nádorů jako infekce virem hepatitidy C, primární biliární cholangitida, alkoholická a nealkoholická steatosa (Beudeker et al., 2017; Y. Li et al., 2018; Setsu et al., 2018). Bylo také prokázáno, že buňky MAIT od pacientů s chronickým zánětem jater měly změněné sekrečních schopností. Po stimulaci nedokázaly zvýšit produkci granzymu, ale byly stále schopny produkovat IL-17 (Böttcher et al., 2018). IL-17 ve vyčerpaných buňkách MAIT by mohl být významným faktorem v rozvoji rakoviny a jaterní fibrózy (Fabre et al., 2016; J. P. Zhang et al., 2009). Fibrózu hepatální tkáně MAIT buňky umožňují aktivaci hvězdicových buněk právě pomocí IL-17 a potenciací aktivity jaterních myofibroblastů (Böttcher et al., 2018; Hegde et al., 2018). Detailní analýza MAIT lymfocytů ukázala změněný fenotyp i efektorové funkce buněk, které infiltrovali tumor. Bylo prokázáno, že nádorové prostředí může modulovat metabolismus MAIT buněk, které následně ztratily schopnost produkovat IFN γ , ale současně secernovaly IL-8. Tento cytokin je zapojený do angiogeneze a progresu nádoru. Bylo tedy prokázáno, že nádorové mikroprostředí by mohlo modulovat funkce MAIT buněk k fenotypům podporujících nádor v metastatických místech (Goswami et al., 2022).

Byly také provedeny výzkumy, které se zaměřují na roli MAIT buněk v patogenezi slizničních neoplázií. Snížení kompartmentu MAIT buněk v periferní krvi bylo prokázáno u karcinomu žaludku, tlustého střeva a plic. Deficit koreloval se stádiem onemocněním, hladinami sérového karcinoembryonálního antigenu (CEA) a hemoglobinem pacienta (Ling et al., 2016; Won et al., 2016). U nádoru tlustého střeva bylo zjištěno, že MAIT buňky infiltrovaly nádorovou tkáň (Sundström et al., 2015). I zde byla prokázána změna fenotypu ve smyslu posunu k cytokinovému repertoáru Th17 buněk, se zvýšenou sekrecí IL-17 a sníženou produkcí IFN- γ (Ling et al., 2016; Sundström et al., 2015).

In vitro studie buněk MAIT získaných z periferní krve zdravých dárců prokázaly, že mají cytotoxickou schopnost na buňky myeloidní leukémie (Won et al., 2016). Inkubační testy s buňkami kolorektálního karcinomu ukázaly, že aktivované buňky MAIT mohou zastavit buněčný cyklus v maligních buňkách. Snížení životaschopnosti nádorových buněk vlivem populace MAIT bylo prokázáno i u adenokarcinomu jícnu (Melo et al., 2019). Tato zjištění dokázaly, že buňky MAIT se mohou účastnit procesů bránící karcinogenezi. Stupeň infiltrace MAIT lymfocytů do nádorové tkáně však koreloval s progresí onemocnění a špatnou prognózou (Ling et al., 2016; Zabijak et al., 2015).

Odlíšné chování MAIT lymfocytů bylo zjištěno v případě solidních tumorů, které nebyly asociovány se sliznicí, jako nádory mozku, ledvin, štítné žlázy a prsu. Frekvence MAIT buněk v periferní krvi byla zvýšená a bylo prokázáno propojení efektorových funkcí s iNK, které korelovalo s expresí prozánětlivých cytokinů (Peterfalvi et al., 2008; Won et al., 2016).

1.15. MAIT BUŇKY A HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY

První studie, která se zaměřila na roli MAIT buněk u hematologických malignit byla publikována v roce 2017. Favreau a kol. studovali populaci T lymfocytů u mnohočetného myelomu. Pozorovali sníženou frekvenci MAIT buněk v periferní krvi a současně v kostní dřeni u nově diagnostikovaných pacientů, při čemž byla změněna kapacita produkce cytokinů. Bylo prokázáno, že buňky MAIT exprimovaly vyšší hladiny PD-1 ve srovnání se zdravými dárci. Při užití protilátky umožňující blokádu PD-1 došlo k částečné obnově MAIT populace. Zásadním objevem byl průkaz exprese MR1 molekuly buňkami mnohočetného myelomu, kdy buňky MAIT byly po aktivaci schopny cílit na nádorovou populaci (Favreau et al., 2017; Gherardin, Loh, et al., 2018).

Role MAIT buněk byla recentně zkoumána také u akutní myeloidní leukémie. Stejně jako u mnohočetného myelomu bylo pozorováno snížení frekvence MAIT buněk v periferní krvi. (Comont et al., 2022). Dynamika buněk MAIT byla specifická pro cytogenetický profil a molekulární podtypy akutních myeloidních leukémií. Populace MAIT lymfocytů periferní krve byla nižší u pacientů s nepříznivým cytogenetickým profilem (Treiner, 2023). Wu a kol ve studii z roku 2022 popsali klonální expanzi buněk MAIT v kostní dřeni pacientů se specifickým podtypem AML (NK AML M4/M5). Tato

studie jako první a jediná prokázala infiltraci kostní dřeně buňkami MAIT (W. Wu et al., 2022). Byla vyslovena hypotéza, že u AML by aktivace buněk MAIT mohla vést k jejich infiltraci do mikroprostředí nádoru. Tento průnik byl označen jako možný negativní faktor průběhu onemocnění (Treiner, 2023). Změny populace MAIT lymfocytů byly popsány i u chronické lymfatické leukemie. I zde byla cirkulující hladina MAIT buněk snížena (Bozorgmehr et al., 2023).

Transplantologie v hematologickém oboru je významnou oblastí zkoumání imunitních interakcí. Při alogenní transplantaci krvetvorných buněk dochází ke vzniku souboji imunitních systému donora a recipienta. Jedním z nejvýznamnějších komplikací je reakce štěpu proti hostiteli. Naopak reakce štěpu proti leukémii je žádoucí. Cílem léčebných přístupů je modulace imunitního systému tak, aby došlo k vyvážení obou imunitních systémů příjemce a dárce a zároveň nedošlo k odhojení štěpu. Nedávné studie prokázaly významnou úlohu MAIT buněk v průběhu alogenní transplantace kmenových hematopoetických buněk. Gao a kol. prokázali negativní korelaci mezi počtem buněk MAIT ve štěpu a rizikem akutní střevní GVHD a aktivací buněk MAIT bakteriemi produkujícími riboflavin (Gao et al., 2021). Snaha o vysvětlení funkce MAIT buněk v GVHD byla na myším modelu, který zkoumal Varelias a kol. v roce 2018. Výskyt buněk MAIT byl zjištěn v cílových orgánech GVHD (játra, plíce, střevo). Po dárcovském přenosu poskytovaly ochranu proti GVHD mechanismem inhibice alogenní CD4 T lymfocytů. Tento účinek byl mediovaný pomocí IL-17 a souvisel se střevní mikroflórou recipienta. Významné zjištěno bylo, že regulační funkce buněk MAIT v myším modelu byly omezeny na buňky MAIT recipienta, nikoli na transferované MAIT buňky ze štěpu (Varelias et al., 2018). Zkoumání GVHD u lidí přineslo informaci, že časný nárůst buněk MAIT po transplantaci pocházel z MAIT lymfocytů přeneseného štěpem. Došlo tedy k částečnému zpochybnění teorie rezistence buněk MAIT vůči chemoterapii, protože rekonstituce MAIT buněk pocházela většinou z MAIT lymfocytů odvozených ze štěpu (Treiner, 2023). Kawaguchi prokázal, že populace MAIT vykazovala regulační aktivitu proti proliferujícím konvenčním T buňkám, a tudíž měla ochranný účinek při reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) (Kawaguchi et al., 2018; Treiner, 2023).

Ačkoli při allogení transplantaci byly předloženy důkazy o obnově většiny populace MAIT buněk ze štěpu dárce, bylo mnoha studiemi prokázáno, že jsou MAIT lymfocyty schopny odolávat chemoterapii, díky expresi multi-drug resistance protein-1 (Comont et al., 2022; J. R. Fergusson et al., 2018; Turtle et al., 2009).

1.16. KLINICKÁ ČÁST

1.16.1. HEMATOONKOLOGIE

Hematoonkologie je úzce specializovaná část hematologického oboru. Zabývá se nádorovými onemocněními krevních elementů a imunitního systému. Pokrývá spektrum primárních tumorů lymfatických uzlin a nádorová onemocnění kostní dřeně.

Hematologická nádorová onemocnění lze dělit na lymfomy a leukémie. Lymfomy postihují primárně lymfatickou tkáň a chovají se obdobně jako solidní tumory. Leukémie mají pool nádorové populace v periferní krvi nebo kostní dřeni.

Incidence lymfomů trvale mírně vzrůstá. Základní dělení na Hodgkinovy (HL) a Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL) je odvozeno od rozdílné etiopatogeneze i rozdílné věkové distribuce. Hodgkinovy lymfomy mají peak výskytu mezi 20-30. věkem, NHL se objevují u starší populace. Ročně je v České republice nově diagnostikováno 250-300 pacientů s HL a 1500 pacientů s Non-Hodgkinovým lymfomem (*Prognóza Lymfomu Pokročila Nejvíc Ze Všech Nádorových Onemocnění | MT*, n.d.). Klasifikace WHO z roku 2016 obsahuje více než sto typů Non-Hodgkinova lymfomu (Swerdlow et al., n.d.).

Specifikum oboru jsou imunitní deficity, které vznikají u pacientů z principu základního hematologického onemocnění, ale i v důsledku terapie.

Postižení imunitního systému se projevuje kvalitativním i kvantitativním deficitem. Při základním onemocněním nedochází jen k orgánovému poškození, ale i k útlakům krvetvorné tkáně se vznikem anemie, trombocytopenie a leukopenie. Z krevních elementů může být postižena jakákoli složka samostatně, ale i všechny krevní řady najednou. Dochází ke snížení obranyschopnosti a jsou narušeny základní funkční bariéry organismu.

V případech vzniku neutropenie je organismus náchylný k bakteriálním a mykotickým nákazám (Herbrecht et al., 2000). Při lymfopenii se u pacientů setkáváme se sníženou imunitou vůči virům a intracelulárním, atypickým bakteriím (Oliveira et al., 1998; Seliger, 2019).

Ačkoli je v současné době trend posunu k cíleným terapiím, které působí selektivně na nádorové buňky, je stále základní léčebnou modalitou chemoterapie.

Chemoterapie, jako necílená léčba, poškozuje všechny buňky organismu. Z pohledu toxicity se její efekt projevuje ve všech složkách imunitního systému. Existují však

mechanismy, kterými před efektem chemoterapie unikají některé buňky organismu, ale i nádorové elementy. Tato schopnost je označována jako chemorezistence (Alimbetov et al., 2018).

Chemorezistentní lymfomy vykazují špatnou a krátkodobou odpověď na terapii. Taková onemocnění typicky nereagují na první linii léčby, nebo časně relabují. V obou případech je volbou podání 2. linie léčby s následnou konsolidací autologní transplantací kmenovými buňkami. Existují hematologické diagnózy, u kterých se k ASCT přistupuje již při dosažení odpovědi na první linii léčby. Jedná se buď o vysoce agresivní lymfomy nebo o mnohočetný myelom.

1.16.2. LYMFOMY

Lymfomy jsou skupina nádorových onemocnění, které vznikají z buněk imunitního systému postihující primárně lymfatickou tkáň. Jak již bylo zmíněno existují dvě základní skupiny lymfomů Hodgkinovy a Non-Hodgkinovy lymfomy. Obě skupiny mají více subtypů a liší se etiopatogenezi, věkovou distribucí i léčebným přístupem. Jejich klasifikace se řídí histologií, mírou agresivity a klinickým stádiem. K popisu rozsahu onemocnění se standartně již mnoho let užívá klasifikace Ann Arbor z roku 1971 (Carbone et al., 1971). Lymfomy se klinicky manifestují solidní nádorovou expanzí ve formě lymfadenopatie. Často se u pacientů přidružuje také systémová symptomatologie tzv. B příznaky, pocení, hubnutí, teploty. Obvyklým projevem je únava a celková nevykonnost. Lymfomy jsou nádory primárně imunitního systému, není tedy vzácností výskyt široké škály paraneoplastických projevů a atypických symptomů imitující jiná onemocnění. Diagnostika je tedy obtížná. Je často úspěšná až v pokročilých stádiích onemocnění.

Hodgkinovy lymfomy patří mezi nádorová onemocnění s bifázickým věkovým výskytem. Typicky se objevuje u mladých dospělých ve věku 20-30 let. Druhý peak se je u lidí ve věku kolem 60 let. HL tvoří přibližně 15 % všech lymfomů. Terapie Hodgkinova lymfomu představuje ve svém vývoji extrémní úspěch. Z nevléčitelného onemocnění došlo medicínským pokrokem k zařazení Hodgkinova lymfomu k onemocněním s vynikající prognózou. První linie terapie vede k vyléčení 80 % případů. Léčba je modifikovaná dle věku, komorbidit a klinického stádia onemocnění. U pacientů s rezistentní formou nebo relapsy onemocnění se přistupuje k druhé „záchranné“ linii

terapie s následnou vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací periferními kmenovými buňkami (Momotow et al., 2021). V současní době je i v případě Hodgkinova lymfomu snaha o zavedení cílené terapie snižující toxicitu léčby, která je u chemoterapie nevyhnutelná. Cílem je minimalizace jak časně, tak pozdní toxicity léčby.

Skupina Non-Hodgkinových lymfomů tvoří heterogenní skupinu lymfoproliferativních malignit z B-, T- lymfocytů nebo NK buněk. Dle poslední klasifikace Světové zdravotnické organizace z roku 2016 existuje více než 100 subtypů Non-Hodgkinova lymfomu (Swerdlow et al., n.d.). Ve vyspělých zemích jsou nejčastěji se vyskytujícími subtypy difúzní velkobuněčný lymfom (30 %) a folikulární lymfom (20 %). Všechny ostatní podtypy NHL mají frekvenci nižší než 10 % (Ekström-Smedby, 2006). Mezi základní rizikové faktory NHL patří imunoprese, viry, další patogeny, autoimunitní a chronické zánětlivé procesy, pracovní expozice rizikových chemikáliím (pesticidy). Nejznámějším rizikovým faktorem je imunoprese ve smyslu T-lymfocytární dysregulace a suprese typická pro pacienty s HIV/AIDS nebo po transplantacích. Dalším rizikovým a současně léčebně nepříznivým faktorem je předchozí chemoterapeutická léčba nebo radioterapie (Singh et al., 2020). Stejně jako u Hodgkinova lymfomu je i u Non-Hodgkinova lymfomu snaha o přesun léčebných možností k cílené terapii. V současné době však základní léčebnou modalitu stále tvoří různé chemoterapeutické režimy. V případě vysoké agresivity nádoru, rezistence k první linii terapie nebo při relapsu onemocnění je volen přístup záchranné léčby druhé linie s konsolidací vysokodávkovanou chemoterapií a autologní transplantací PBSC.

Částečně se od lymfomů vymezuje hematologická malignita mnohočetný myelom. Tvoří přibližně 10 % hematologických malignit a 1 % všech neoplázií. Jedná se o malignitu vznikající ze zralé B linie, plazmatických buněk, které si ve většině případů zachovávají produkci imunoglobulinů. Tyto bílkovinné produkty klonální linie se nazývají tzv. paraproteiny, které se kumulují v tkáních a způsobují orgánové dysfunkce. Diagnosticky je důležitá přítomnost tetrády příznaků se zkratkou KRAB (hyperkalcémie, renální selhání, anemie a osteolytické léze), která vystihuje patofyziologickou podstatu mnohočetného myelomu. Osteolytická ložiska často asociovaná s hyperkalcémií vznikají převahou aktivity osteoklastů nad osteoblasty, jež je způsobena vlivem maligních plazmocytů. Tento jev se klinicky manifestuje patologickými zlomeninami a ložiskovým řídnutím kostní hmoty. Anemie je obrazem nedostatku erytrocytární komponenty při chronických chorobách, útlaku postižené kostní dřene

klonálními plazmatickými buňkami a je asociovaná s renálním selháním, které je u mnohočetného myelomu velmi časté a při neléčeném onemocnění nevyhnutelné. (Blackwell et al., n.d.; Leukemia & 2009, 2009; S. V. Rajkumar, 2022). Terapie mnohočetného myelomu má zcela odlišné modalities. Jedná se o primárně chronické relaps-remitující onemocnění, kde byla již od počátku snaha odklonu od konvenční chemoterapie. Dle standardních postupů se v úvodu podává indukční léčba složená z kortikosteroidů, imunomodulancia a inhibitorů proteazomu, na kterou v případě alespoň částečné terapeutické odpovědi navazuje vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací periferními kmenovými buňkami. Dle úspěšnosti léčby, délky trvání remise a stavu pacienta se může proces ASCT v případě myelomu opakovat i vícekrát. (S. Rajkumar et al., n.d.; S. V. Rajkumar, 2022; Vincent Rajkumar et al., 2014)

1.16.3. AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE

U 20–30 % pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem (NHL) a 15 % pacientů s Hodgkinovým lymfomem (HL) dochází po první linii terapie k relapsu onemocnění nebo nedosažení remise. U těchto pacientů se proto v druhé linii léčby po indukční záchraně terapii podává konsolidace ve formě vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací periferními kmenovými buňkami (Zahid et al., 2017). Argumentace k zavedení ASCT do standardních postupů poskytuje studie z roku 1995. Pacienti s NHL ve skupině podstupující ASCT měli celkové 5leté přežití 53 % vs 32 % u pacientů bez konsolidace ASCT (Philip et al., 1995). Studie z roku 2002 potvrdila tento benefiční přístup i u pacientů s relapsem HL. Ve tříletém sledovacím období bylo 55 % pacientů s HL podstupující ASCT bez relapsu onemocnění, oproti 34 % pacientů, kteří obdrželi pouze konvenční záchranou chemoterapii. Benefičt konsolidační terapie ASCT již v první linii byl opakovaně prokázán i u mnohočetného myelomu, kde provedení ASCT prohlubuje léčebnou odpověď a prodlužuje bezrelapsové období (Bazarbachi et al., n.d.).

Proces autologní transplantace probíhá po předchozím sběru periferních kmenových buněk na extrakorporálním separátoru. Aby toto bylo možné musí dojít ke stimulaci kmenových buněk pomocí GCSF (faktor stimulující granulocytární kolonie). Standardním přístupem je podání tzv. stimulačního režimu chemoterapie, která je buď součástí záchrané linie nebo se jedná o stimulační cyklus cyklofosfamidem. Po chemoterapii

dochází k přechodnému dřevému útlumu, kdy je zahájena „hyperstimulace“ faktorem stimulující granulocytární kolonie, která způsobí předčasné a nadměrné vyplavení buněk kostní dřevě, které obsahují i buňky kmenové (CD34+). Množení kmenových buněk pod clonou GCSF se klinicky často manifestuje pulzujícími kostními bolestmi. Následující den je zpravidla možné separovat kmenové buňky z periferní krve separátorem. Jejich kvantita ve štěpu se ověřuje pomocí průtokové cytometrie. Požadavek na úspěšný sběr k provedení ASCT je $3.0 \times 10^6/\text{kg}$ ve štěpu. Kmenové buňky se následně zamrazí a užijí se až v době po vysokodávkované chemoterapii.

Samotná autologní transplantace začíná příjmem pacienta k hospitalizaci. V České republice je v současnosti stále standardem průběh ASCT v nemocničním zařízení v přísně sterilních podmínkách, ačkoli ve světě je již diskutována možnost ambulantních ASCT režimů (Reid et al., 2016).

V den příjmu pacienta je zaveden centrální žilní přístup k prevenci poškození periferního venózního řečiště vysokodávkovanou chemoterapií a je podána prehydratační fáze. Další den je zahájena vysokodávkovaná chemoterapie. Je mnoho režimů na bázi melphalanu u mnohočetného myelomu a kombinací chemoterapeutik u lymfomů. Užitá cytostatika se liší dle základní diagnózy a lokálních zvyklostí. Význam podání myeloablativního režimu je dvojnásobný, příprava kostní dřevě na usídlení kmenových buněk a současně další prohloubení terapeutické odpovědi po záchranné léčbě a destrukce reziduálních nádorových buněk.

Po podání myeloablativního režimu dochází k nástupu dřevé aplázie. Za den D0 je označován den převodu periferních kmenových buněk, které se podávají ihned po rozmražení.

Dřevá aplázie trvá po dobu homingu, expanze a diferenciaci podaných kmenových buněk. Jedná se o vysoce rizikové období hluboké cytopenie. Klinicky je nejvíce riziková neutropenie pro své infekční komplikace označované jako febrilní neutropenie. Naprostá většina pacientů trpí slizničním zánětem, mukosítidou, která vzniká po chemoterapii ztrátou imunitního dozoru na sliznicích v průběhu celého gastrointestinálního traktu. Trombocytopenie a anemie jsou denně sledovány a substituovány transfuzními přípravky. Dle protokolu je součástí podpůrné léčby podání GCSF (faktor stimulující granulocytární kolonie), který podporuje časnější rekonstituci neutrofilních granulocytů a snižuje výskyt infekčních komplikací (Klein et al., 2021). V současné době je standardním postupem také profylaktické podávání antimikrobiální terapie. Prevence infekčních komplikací se liší dle

zvyklostí jednotlivých pracovišť. Pravidlem je podávání antibiotické, antimykotické a antivirové medikace. Antibiotická prevence na většině pracovišť zahrnuje také prevenci pneumocystózy. Podpůrná léčba zahrnuje také analgetickou a antiemetickou terapii ev. parenterální výživu.

1.16.4. INFEKČNÍ KOMPLIKACE AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE

Infekce představují významnou příčinu morbidit autologní transplantace. Klíčovým rizikovým faktorem je imunodeficit, který vzniká jako kombinace základního onemocnění a jeho terapie. Mezi verifikované předtransplantační rizikové faktory, které předpovídají závažný průběh infekčních komplikací v průběhu ASCT, patří špatný výkonnostní stav, vyšší věk, komorbidity (diabetes a selhání ledvin), dále přetížení železem, kouření a vysoká nádorová zátěž (Miceli et al., 2006; Sheean et al., 2006). Dalším rizikovým faktorem je intenzita a typ léčby před zahájením ASCT (Kato et al., 2010; M. Y. Lee et al., 2008).

Mezi hospitalizační rizikové faktory infekčních komplikací patří délka neutropenie, závažnost mukozitidy a žilní vstupy (Çelebi et al., 2000; McCann et al., 2009; Zambelli et al., n.d.).

Naprostá většina infekčních komplikací je bakteriálních, způsobena majoritně grampozitivními organismy (Çelebi et al., 2000; Nucci & Anaissie, 2015). S pokrokem podpůrné léčby došlo ke změně distribuce infekčních agens způsobující komplikace v době ASCT. Do konce 80. let bylo zastoupení infekčních agens grampozitivních a gramnegativních bakterií rovnoměrné. Po zavedení antibiotické profylaxe chinolony se snížila incidence gramnegativních infekcí za cenu navýšení grampozitivních (Engels et al., 1998). V poslední době také vlivem antibiotického tlaku dochází k výskytům rezistentních infekcí vč. gramnegativními patogeny (Engels et al., 1998; Viscoli & Castagnola, 2002). Objevuje se také výrazný nárůst kolitidy způsobené *Clostridium difficile* (Dubberke et al., 2007).

Neutropenie v časném potransplantačním období v kombinaci s mukozitidou gastrointestinálního traktu predisponuje ke vzniku kandidových infekcí. Zavedení antimykotické profylaxe do rutinní praxe v ASCT významně snížilo incidenci kandidóz

(Abi-Said et al., 1997). Invazivní aspergilózy jsou v zastoupení mykotických agens v ASCT pouze minoritou. Typicky se vyskytují u pacientů s hlubokou a prodlouženou neutropenií (>10–15 dní). Taková se u pacientů v ASCT standartně nevyskytuje (Nucci & Anaissie, 2015). Výskyt invazivních aspergilóz je tedy nízký a nalezneme je pouze u vysoce předléčených pacientů, typicky purinovými analogy (Gil et al., 2009; Nucci et al., 2009).

Virové infekce jsou omezeny především na HSV a respirační virózy (influenza A, B, RSV) (Nucci & Anaissie, 2015). V případě, že není podávána antivirotická profylaxe vyvine naprostá většina pacientů reaktivaci HSV s projevem vředů v dutině ústní, které potencují závažnosti mukozitidy (Dignani et al., 2002; Ramphal et al., 2007; Wade et al., 1984). Za standartní antivirotické profylaxe je výskyt virových infekcí minimální, v některých studiích nulový.

Z přechozích sdělení je zřejmé, že v současnosti nastavená antimikrobiální profylaxe významně snížila časnou transplantační mortalitu (Nucci & Anaissie, 2015).

VÝZKUMNÁ ČÁST

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1. VÝZKUMNÝ PROJEKT:

Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie (Karlova Zubata et al., 2023)

Hypotéza: MAIT populace má v průběhu autologní transplantace protektivní funkci

Výzkumné otázky a dílčí hypotézy:

Z předchozích sdělení je zřejmé, že i přes svou evoluční konzervovanost a omezenou TCR repertoárovou diverzitu (Tilloy et al., 1999), mají MAIT buňky širokou roli v imunitním systému. Jejich možný protektivní potenciál byl zkoumán v peri a časném posttransplantačním období v průběhu hospitalizace pacientů s hematologickým onemocněním.

V kontextu klinické medicíny a složitosti interakcí imunitního systému neexistuje jedna specificky definovaná veličina, kterou lze in vivo testovat jako protektivní faktor.

Protektivní roli konkrétního imunitního vlivu lze definovat pouze pomocí nepřímých klinických a laboratorních ukazatelů. Na základě již dostupných dat nejvýznamnějších komplikací v průběhu ASCT byly testovány dílčí hypotézy vždy v korelaci se vstupní hodnotou MAIT buněk před podáním vysokodávkované chemoterapie (Reid et al., 2016; Waszczuk-Gajda et al., 2022).

Následující hypotézy byly definovány z předem určených klinických a laboratorních ukazatelů, které odráží tíži komplikací v průběhu ASCT:

1) MAIT buňky zlepšují klinický průběh infekčních komplikací:

Testována byla velikost populace MAIT buněk s klinickými markery odrážejícími tíži infekčních komplikací. Za klinické markery byly zvoleny: počet febrilních dní, počet dní s nutností podání intravenózních antibiotik a tíže mukositivity. Mukositivity byla definovaná gradem dle NCI-CTCAE Grading Scale, počtem dní s nutností podání opioidních analgetik a parenterální výživy. Byla testována hypotéza kauzality mukositivity, MAIT buněk a jaterního postižení.

2) MAIT buňky snižují závažnost infekčních komplikací:

Testována byla velikost populace MAIT buněk s infekčním laboratorním marker (peak/maximální hodnota CRP)

3) MAIT buňky snižují závažnost dřeňové aplázie v průběhu ASCT:

Testována byla velikost populace MAIT buněk s tíží dřeňové aplázie. Závažnost dřeňové aplázie byla definována dnem engraftmentu (přihojení) neutrofilních granulocytů, trombocytů, počtem dní s potřebou podání GCSF, počtem podaných transfuzních přípravků trombocytů a erytrocytů.

4) Pacienti s vyšším počtem MAIT buněk jsou dříve dimitováni (propuštění z hospitalizace), v lepším celkovém stavu:

Testovány byly dva ukazatele komplexně shrnující odraz závažnosti průběhu autologní transplantace: počet dní hospitalizace, resp. den dimise pacientů a Karnofského skóre (rozdíl při příjmu pacienta a při propuštění pacienta z hospitalizace)

Cílem práce bylo sledovat faktory odrážející průběh a komplikace autologní transplantace periferními kmenovými buňkami u hematoonkologických pacientů a korelovat je s populací MAIT buněk (měřeno před podáním vysokodávkované chemoterapie).

2.2. VÝZKUMNÝ PROJEKT:

Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk (Brozova, Karlova et al., 2016)

Hypotéza: Subpopulace MAIT lymfocytů jsou rozdílné a mají různé efektorové funkce.

Výzkumné otázky a cíle:

Jedna z původních a klíčových prací publikovaná Dusseauxem v roce 2011 popisuje homogenitu populace MAIT buněk a efektorovou podobnost jejich subpopulací. (Dusseaux et al., 2011).

V tomto výzkumném projektu byla položena základní otázka, zda existují rozdíly mezi subpopulacemi MAIT buněk, jaký je jejich fenotyp, cytotoxický potenciál a cytokinový profil. MAIT lymfocyty definované fenotypem $CD3^+ \gamma\delta$ - $CD4$ - $V\alpha$ 7.2+ $CD161^{++}$ byly podrobeny analýze povrchových markerů a byl zkoumán jejich cytokinový repertoár po stimulaci PMA a ionomycinem.

Cílem práce bylo analyzovat cytokinový profil MAIT buněk, jejich cytotoxický potenciál, sledovat rozdíly mezi populacemi $CD8^+$ a DN ($CD8$ - $CD4$ -) MAIT lymfocytů a zařadit jejich roli do kontextu nekonvenčních lymfocytů (srovnání s iNKT buňkami).

3. METODY A ANALÝZA

3.1. METODY A ANALÝZA: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie

(Karlova Zubata et al., 2023)

3.1.1. CHARAKTERISTIKA POPULACE

Zkoumaná populace byla složena z pacientů postižených hematologickým onemocněním, kteří byli léčeni vysokodávkovanou chemoterapií a autologními kmenovými buňkami.

Skupinu tvořili pacienti s diagnózou mnohočetný myelom v první linii léčby jako konsolidační terapie po dosažení remise nebo alespoň částečného vyléčení základní choroby (parciální remise). Druhou skupinu tvořili pacienti trpící lymfomovým onemocněním, jeho relapsem, refrakterní chorobou nebo vysoce agresivními formami lymfomů, které jsou dle léčebných protokolů indikovány k autologní transplantaci v první linii léčby.

Studovaná populace se skládala ze 100 pacientů, 58 mužů a 42 žen, ve věku 25 až 73 let. Hematologické diagnózy zahrnovaly relabující/ refrakterní Hodgkinův lymfom (9 pacientů), relabující/refrakterní Non-Hodgkinův lymfom (22 pacientů), první linie Non-Hodgkinova lymfomu (12 pacientů) a mnohočetný myelom (57 pacientů).

V autologní transplantaci PBSC se užívají různé typy přípravných vysokodávkovaných chemoterapií dle typu základního hematologického onemocnění. Ve zkoumané populaci obdrželo 37 pacientů režim BEAM, 48 pacientů HD Melphalan, 10 pacientů BuMel, 4 pacienti režim Carmustin/Thiotepa/Etoposid a 1 pacient Carmustin/Thiotepa.

Obr. (Karlova Zubata et al., 2023):

Patients		100
Gender (M/F)		58/42
Median (range) age (years)		61 (25–73)
Primary diagnosis	R/R HL	9
	R/R NHL	22
	First line NHL	12
	Myeloma	57
Months from diagnosis to transplant	median (range)	11.5 (3–313)
Number of pretransplant treatments (lines)		1.5 (1–6)
Clinical outcome pre-ASCT	CR or PR	94
	SD or PD	6
The time interval (days) from last chemotherapy	median (range)	89.5 (12–408)
Conditioning regimens	BEAM	37
	HD Mel	48
	BuMel	10
	carmustine/thiotepa/etoposid	4
	carmustine + thiotepa	1

R/R, relapsed/refractory; HL, Hodgkin lymphoma; NHL, Non-Hodgkin Lymphoma; ASCT, Autologous stem cell transplantation; CR, complete remission; PR, partial remission; SD, stable disease; PD, progressive disease; BEAM, BiCNU/carmustine, etoposide, Ara-C, melphalan; HD, High-dose; Mel, melphalan; BiCNU, bis-chloro-ethylnitrosourea

3.1.2. POUŽITÉ MYELOABLATIVNÍ REŽIMY:

Před provedením převodu kmenových buněk (CD34+) byl pacientům podán myeloablativní režim volený dle základní hematologické diagnózy.

BEAM (karmustin 300 mg/m² v den -6; etoposid 100 mg/m² dvakrát denně ve dnech -5, -4, -3 a -2; cytarabine 100 mg/m² dvakrát denně ve dnech -5, -4, -3 a -2 a melfalan 140 mg/m² v den -1)

HD Mel (melfalan 200 mg/m² v den -1)

Karmustin, thiotepa, etoposid (karmustin 400 mg/m² v den -5; thiotepa 5 mg/kg dvakrát denně ve dnech -4 a -3; a etoposid 150 mg/m² ve dnech -5, -4 a -3)

BuMel (busulfan 3 mg/kg ve dnech -6, -5, -4 a -3; melfalan 140 mg/m² ve dne -2)

Karmustin + thiotepa (karmustin 400 mg/m² den -6, thiotepa 2×5 mg/kg/den ve dnech -5 a -4)

3.1.3. PODPŮRNÁ TERAPIE

Podpůrná léčba byla poskytována dle vnitřních doporučení Hematologické kliniky FNKV, 3. LF UK. Protiinfekční profylaxe byla zahájena den po provedení převodu periferních kmenových buněk, v případě časného nástupu cytopenie i dříve. Profylaxe se skládala z antibakteriální (ciprofloxacin 500 mg dvakrát denně), antimykotické (flukonazol 100 mg dvakrát denně) a antivirové (acyklovir 400 mg dvakrát denně nebo valacyklovir 500 mg dvakrát denně) preventivní medikace. Standardem je i podání profylaxe pneumocysty (sulfamethoxazol 400 mg/trimethoprim 80 mg jednou denně). G-CSF bylo zahájeno v den +8 u pacientů s lymfomem a v den +10 u pacientů s myelomem. V případě závažných infekčních komplikací byla G-CSF zahájena dříve.

3.1.4. METODIKA

Korelováno bylo množství buněk MAIT (měřeno průtokovou cytometrií) v periferní krvi 100 dospělých pacientů před zahájením myeloablativního režimu ASCT s klinickými a laboratorními markery.

3.1.5. KLINICKÉ HODNOCENÍ PACIENTŮ A ODBĚR KRVE

Klinická data a laboratorní biochemické markery byly analyzovány retrospektivně a nezávisle na údajích o buňkách MAIT. Lékař hodnotící klinické ukazatele nebyl informován o hladině MAIT lymfocytů. Mukositida byla hodnocena podle klasifikace NCI-CTCAE Grading Scale. Klinické parametry (febrilních dny, dny s potřebou aplikace nitrožilních antibiotik, dny s potřebou podání parenterální výživy a opioidů, stupeň mukozitidy, Karnofského skóre) byly denně sledovány a hodnoceny. Laboratorní biochemické a hematologické parametry byly měřeny rutinními klinickými protokoly od dne přijetí do dimise pacienta. Krevní buňky byly denně analyzovány automatickým strojem Sysmex XN-1000 v certifikované laboratoři FNKV. Vstupní odběr

pacientů před podáním myeloablativní chemoterapií byl analyzován průtokovou cytometrií.

3.1.6. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Vzorky byly obarveny, promyty (PBS) a lyzovány NH_4Cl . K identifikaci MAIT populace byly užity komerční cytochromy charakteristické pro fenotyp MAIT lymfocytů (BD Pharmingen a Biolegend): CD3 PerCP-Cy5.5 (UCHL1) pozitivní, TCR γ/δ PE-Cy7 (11F2) negativní, TCR $\text{V}\alpha 7.2$ APC (3C10) pozitivní a CD161 APC-Cy7 (HP-3G10) pozitivní. Průtoková cytometrie byla prováděna strojem FACSCantoII (BD Biosciences). Data z průtokové cytometrie byla analyzována softwarovou aplikací FlowJo (Tree Star).

3.1.7. STATISTICKÁ ANALÝZA

Data byla analyzována pomocí neparametrického (Spearmanův Rho) a parametrického (Pearsonův Rho) korelačního koeficientu, který je však limitován statistickými předpoklady v podobě homoskedasticity a normality. V případech, kdy tyto předpoklady nebyly splněny, byl použit Spearmanův koeficient pořadové korelace, s jednostrannou alternativní hypotézou. Hladina statistické významnosti byla apriori volena na hodnotě 5 %. Ve statistické analýze vztahující se k indukci výsledků na stanovené hypotézy je v případě použití statistických metod a testů explicitně uváděna konkrétní p-hodnota.

3.2. METODY A ANALÝZA: Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk

(Brozova, Karlova et al., 2016)

3.2.1. CHARAKTERISTIKA POPULACE

K analýze byly užity vzorky krve 10 zdravých dárců (šest žen a čtyři muži). Průměrný věk byl 34,3 let (25–46).

3.2.2. METODIKA

MAIT buňky byly indentifikovány pomocí průtokové cytometrie značením charakteristického fenotypu: CD3+ $\gamma\delta$ - CD4- V α 7.2+ CD161++. U pozitivní populace byly pomocí průtokové cytometrie detekovány povrchové molekuly. Následně byly buňky izolovány, stimulovány a k další analýze bylo užito intracelulární barvení. Hodnocena byla exprese CD znaků a subpopulace MAIT.

3.2.3. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Periferní krev byla analyzována průtokovou cytometrií. K analýze fenotypu bylo užito barvení komerčními cytochromy (BD Pharmingen, Biolegend, R&D Systems): anti-CD3 (UCHT1), anti-CD8 (HIT8a), anti-TCR- γ / 5-1 (11F2), anti-CD16 (3G8), anti-CD25 (M-A251), anti-CD27 (M-T271), anti-CD28 (CD28.8), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD56 (MY31), anti-CD62L (DREG-56), anti-CD95 (DX2), anti-CD158b (CH-L), anti-CD184 (12G5), anti-CD195 (3A9), anti-CD244 (2-69) a anti-CD107a (H4A3); CD8 (RPA-T8), anti-V α 7.2⁺ (3C10) anti-CD26 (BA5b), anti-CD94 (DX22), anti-CD122 (TU27), anti-CD127 (A019D5), anti CD150 (A12 (7D4), anti-CD158a (HP-MA4), anti-CD161 (HP-3G10), antiTCR V α 7.2 (3C10), anti-CD186 (K041E5), anti-CD192 (K036C2), anti-CD196 (G034E3), anti-NKp80 (5D12), anti-CD314 (1D11); anti-NKG2A (131411). Buňky byly

měřeny pomocí stroje FACSCanto II (BD Bioscience) a vyhodnocovány softwarovou aplikací FlowJo (Tree Star).

3.2.4. IZOLACE A STIMULACE LIDSKÝCH PERIFERNÍCH MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK (PBMC)

PBMC byly izolovány z plné heparinizované krve centrifugací v gradientu Histopaque®⁻¹⁰⁷⁷ (Sigma-Aldrich). Izolované PBMC byly resuspendovány přes noc v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) s 10 % FBS při 37 °C. Následující den byly buňky stimulovány PMA (forbol myristát acetát) a ionomycinem v přítomnosti brefeldinu A (BD Pharmingen: Leukocyte Activation Cocktail, s BD GolgiPlug) v médiu RPMI-1640 s 10% FBS po dobu 5 hodin při 37 °C.

3.2.5. INTRACELULÁRNÍ BARVENÍ

Stimulované PBMC byly barveny povrchovými protilátkami (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD161, anti-TCRV α 7.2, anti-TCR- γ / 5-1) a ponechány po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě, poté byly promyty a fixovány BD Phosflow Lyse/Fix Buffer 5X (BD Bioscience). Následně byly buňky permeabilizovány BD Phosflow Perm Buffer II (BD Bioscience). Vzorčky byly poté obarveny anti-granzym B (CLB-GB-11), anti-TNF- α (MAb11), anti-IFN- γ (4S.B3) (Exbio), anti-IL-17 (SCPL1362) anti-IL-4 (8D4-8) a IgG1 (MOPC-21) (BD Pharmingen) a anti-IL-10 (JES319F1) (Biolegend), následně promyty a analyzovány průtokovou cytometrií.

3.2.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

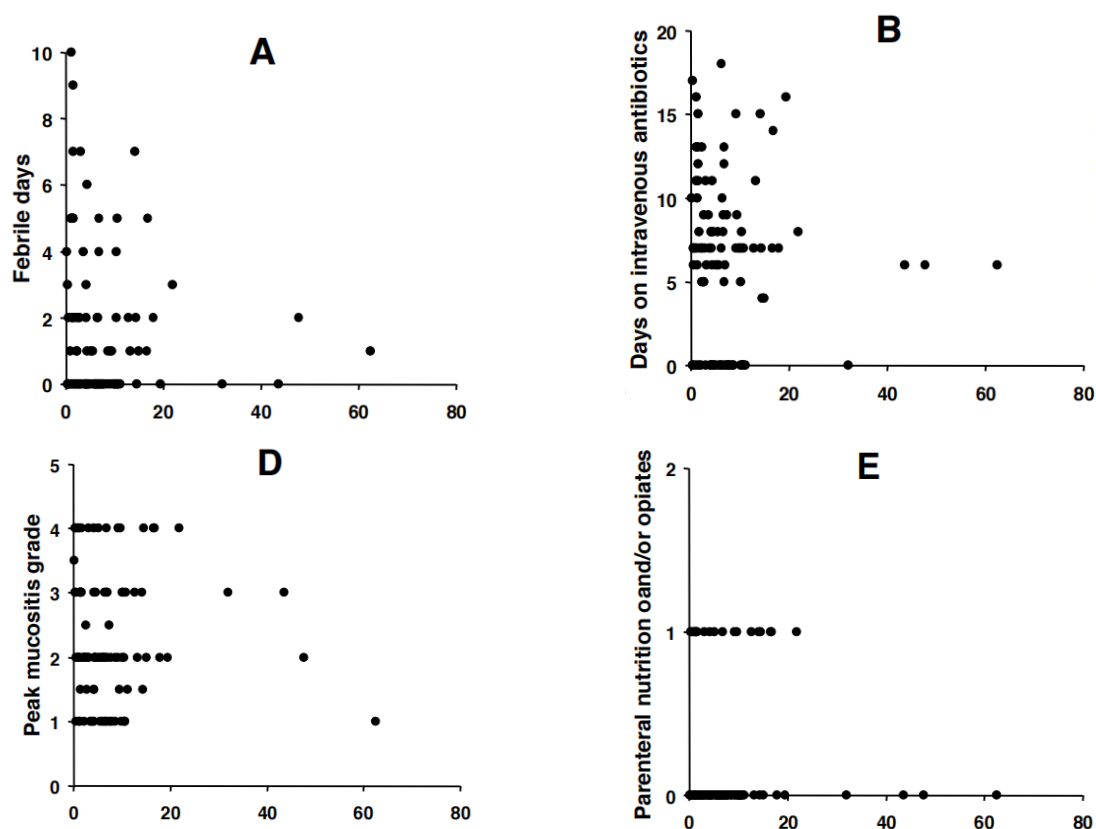
Data byla analyzována pomocí Mann–Whitneyho U -testu, z důvodu nutnosti splnění statistických předpokladů.

4. VÝSLEDKY

4.2. VÝSLEDKY PUBLIKACE: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie (Karlova Zubata et al., 2023)

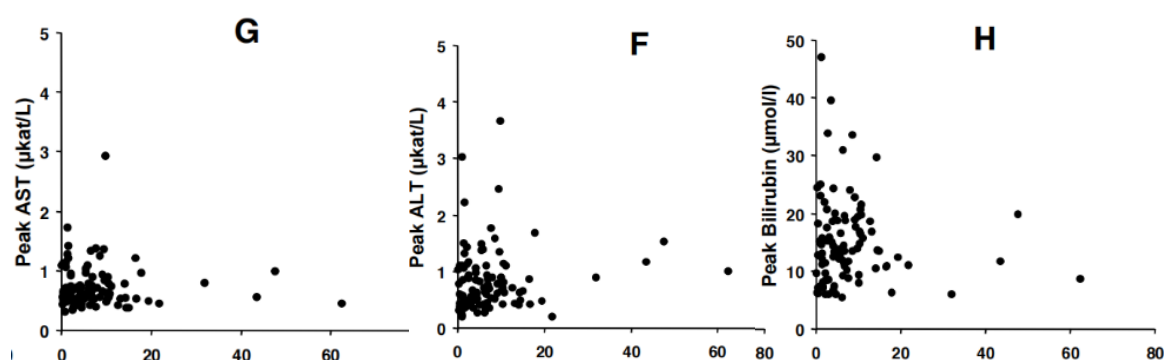
Klinické markery odrážející tíži infekčních komplikací:

Každý bod grafu odpovídá jednotlivému pacientovi a ukazuje korelaci mezi množstvím buněk MAIT/ μl naměřeným den před zahájením myeloablativní chemoterapie (osa x) a sledovaným parametrem (osa y: Fig. A – Fig. O):



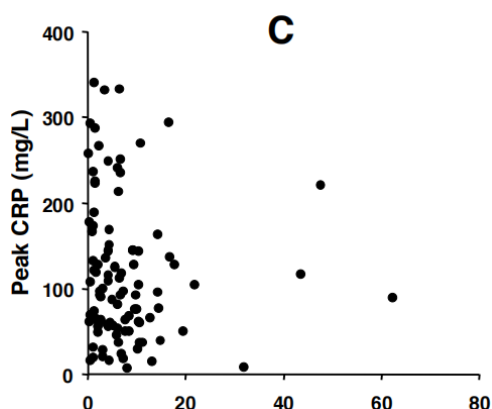
V klinických markerech odrážející tíži infekčních komplikací v průběhu ASCT nebyla prokázána statisticky významná negativní korelace (počet febrilních dní: Fig. A, Spearman's $Rho = -0.123$, $P = 0.111$, počet dní intravenozních antibiotik: Fig. B, Spearman's $Rho = -0.142$, $P = 0.080$, mukositida NCI-CTCAE Grading Scale: Fig. D, Spearman's $Rho = -0.056$, $P = 0.288$, parenterální výživa: Fig. E Student's t-test $P = 0.313$, intravenózní opioidy Fig. E, Student's t-test $P = 0.966$).

Laboratorní marker odrážející tíži hepatálního postižení:



Játra jsou rezervoárem MAIT buněk a současně klíčovým orgánem eliminující patogeny z oblasti střeva. Cytopenie úzce souvisí se vznikem mukositivity trávicího traktu. Na základě vazby zdroje patogenu ze střeva při mukozitidě s jeho možným prostupem do jater a následně oběhu bylo testováno, zda antimikrobiální dozor MAIT buněk ve střevě může vézt k mírnějšímu jaternímu poškození v průběhu infekčních komplikací. Statistické testování neprokázalo významnou korelaci mezi markery jaterních funkcí a populací MAIT (peak ALT, Fig. F, Spearman's $Rho=0,149$, $P=0,069$, peak AST, Fig. G, Spearman's $Rho=0,017$, $P=0,431$, peak bilirubin, Fig. H, Spearman's $Rho = 0,041$, $P = 0,342$).

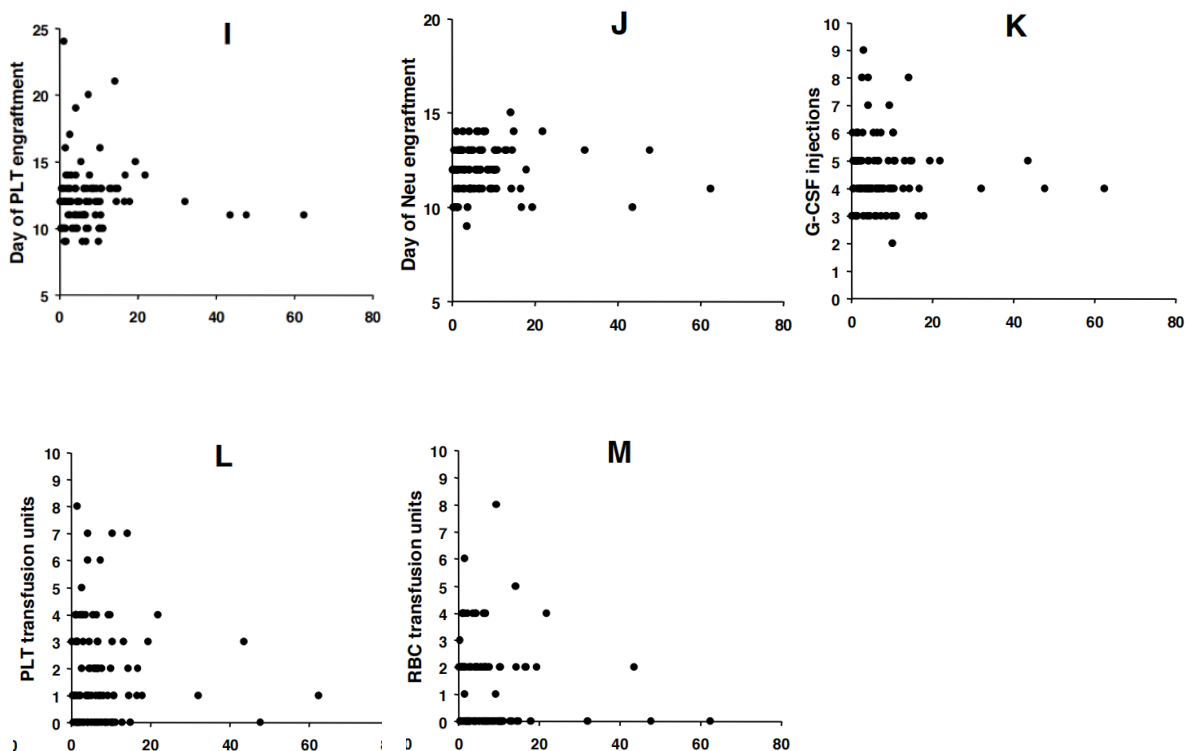
Laboratorní marker odrážející tíži infekčních komplikací:



Nejvýznamnějším markerem přítomnosti zánětu v organismu je sérový C-reaktivní protein. Hodnota CRP koreluje se závažností probíhající infekce (Lelubre et al., 2013; Sproston & Ashworth, 2018; Ziv-Baran et al., 2018). Byla prokázána statisticky významná negativní korelaci mezi velikostí populace MAIT a maximální hodnotou CRP

(Fig. C, Spearman's $Rho = -0,176$, $P = 0,040$). Tyto výsledky podporují hypotézu protektivní role MAIT buněk v terénu infekčních komplikací ASCT.

Markery odrážející tíži dřeňové aplazie:



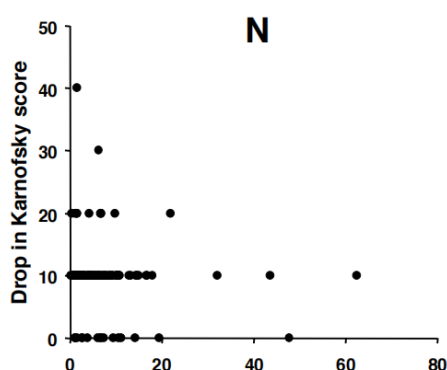
K popisu průběhu aplazie jsou užívány hodnoty krevních elementů a faktory je ovlivňující (G-CSF, transfuzní terapie). Byla testována hypotéza korelace MAIT buněk s délkou a závažností dřeňové aplazie, která je významným faktorem komplikací transplantace.

Byla zamítnuta hypotéza negativní korelace mezi MAIT buňkami a dnem přihojení trombocytů/neutrofilních granulocytů, počtem podaných G-CSF a počtem podaných transfuzí trombocytů (engraftment PLT, Fig. I, Spearmanovo $Rho = 0,131$, $P = 0,096$, engraftment Neu, Fig. J, Spearman's $Rho = 0,105$, $P = 0,149$, počet injekcí G-CSF, Fig. K, Spearmanovo $Rho = -0,089$, $P = 0,190$, počet podaných transfuzí trombocytů, Fig. L, Spearman's $Rho = -0,093$, $P = 0,178$).

Byla prokázána statisticky významná negativní korelace mezi populací MAIT a počtem podaných transfuzních jednotek (Fig. M, Spearmanovo $Rho = -0,180$, $P = 0,036$). Byla tedy potvrzena hypotéza, že vyšší hodnota populace MAIT před zahájením ASCT predikuje

nižší potřebu podání erytrocytární transfuzní terapie. Je tedy možné, že vyšší hodnota MAIT buněk predikuje méně významný útlum erytroidní řady krevních elementů.

Parametry odrážející toxicitu autologní transplantace:



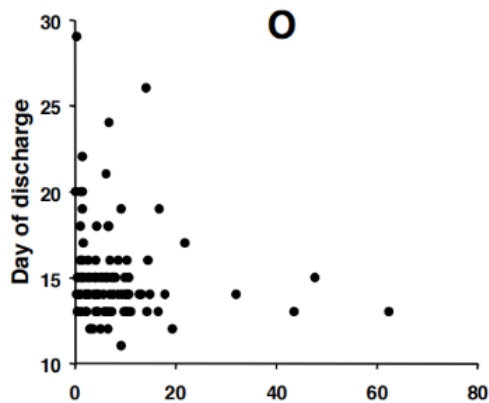
Klíčové parametry, které hodnotí toxicitu transplantace jsou Karnofského skóre a den dimise pacienta.

V klinické praxi je celé škála skórovacích systému k hodnocení performance statu pacienta, v tomto výzkumu bylo zvoleno Karnofského skóre (Schag et al., 1984):

- 100 % – normální stav, bez obtíží, bez známek onemocnění
- 90 % – schopen normální aktivity, velmi málo symptomů
- 80 % – schopen normální aktivity s mírnými obtížemi, symptomy
- 70 % – soběstačný, neschopen normálních aktivit či práce
- 60 % – občas vyžaduje pomoc, zvládá většinu osobních potřeb
- 50 % – často potřebuje pomoc, často vyžaduje lékařskou léčbu
- 40 % – invalidita, vyžaduje speciální péči a pomoc
- 30 % – těžká invalidita, indikace k přijetí do nemocnice
- 20 % – těžce nemocný, potřeba urgentní hospitalizace, vyžaduje podpůrná opatření a léčbu
- 10 % – moribundní, rychle progredující fatální onemocnění
- 0 % – smrt

Tento skórovací systém byl užit při příjmu pacienta a při jeho dimisi, rozdíl mezi hodnotami byl vhodným parametrem ke statistickému testování k posouzení vlivu transplantace na celkový stav pacienta. Nevýhodou skórovacích systému posuzující

celkový stav pacienta je zatížen subjektivitou hodnocení jednotlivců. Hodnota MAIT lymfocytů byla proto zaslepena. V případě otázky vlivu MAIT buněk na pokles Karnofského skóre mezi příjmem a dimisí pacienta nebyla prokázána staticky významná negativní korelace (drop Karnofsky score Fig. N, Spearmanovo $Rho=-0,116$, $P=0,125$)



V případě testování klíčového parametru průběhu transplantace byla zjištěna významná negativní korelaci mezi počtem buněk MAIT před transplantací a dnem dimise pacienta.

Byla tedy potvrzena hypotéza, že u pacientů s vyšším počtem MAIT buněk před zahájením transplantace byla doba hospitalizace v transplantaci významně kratší. Tato skutečnost odráží méně komplikovaný průběh transplantace (Fig. O, Spearmanovo $Rho=-0,175$, $P=0,041$).

Homogenizace populace:

Vzhledem k heterogenitě populace, která je dána více faktory (základní diagnózou pacientů, počtem a typem předchozích linií léčby, transplantačním protokolem), bylo provedeno statistické testování pro pacienty s režimem BEAM. Jedná se o skupinu pacientů s diagnózou Hodgkinovy/ non-Hodgkinovy lymfomy, u kterých jsou užívány v terapii konvenční chemoterapeutické režimy a kde je unifonní conditioning ASCT. Pozornost pacientům s režimem BEAM byla také věnována pro výskyt větší toxicity a více komplikací v průběhu ASCT.

Obr.: (Karlova Zubata et al., 2023)

Conditioning regimens	BEAM	37
	HD Mel	48
	BuMel	10
	carmustine/thiotepa/etoposid	4
	carmustine + thiotepa	1

Obr.: (Karlova Zubata et al., 2023)

Months from diagnosis to transplant	median (range)	11.5 (3-313)
Number of pretransplant treatments (lines)		1.5 (1-6)
Clinical outcome pre-ASCT	CR or PR	94
	SD or PD	6
The time interval (days) from last chemotherapy	median (range)	89.5 (12-408)

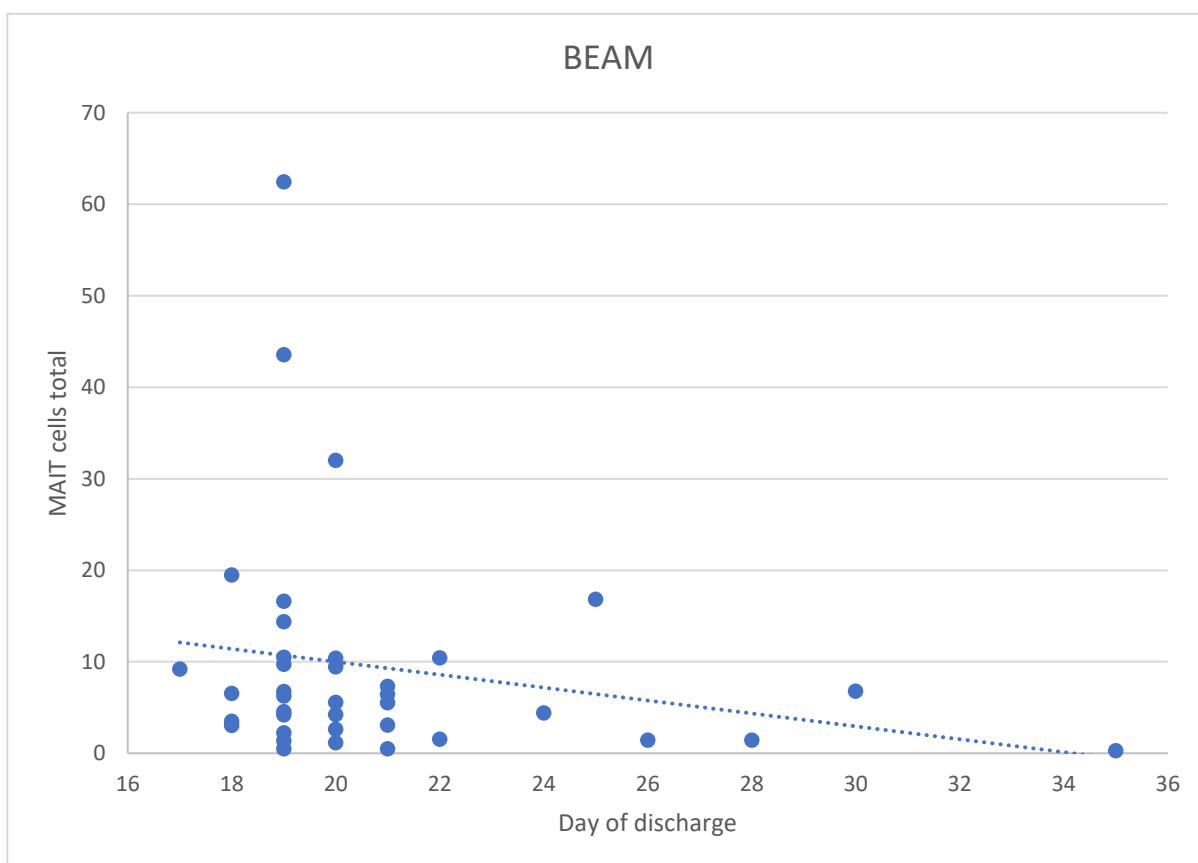
Statistické vyhodnocení pacientů s režimem BEAM: klinické markery

		Correlations	MAIT total
Spearman's rho	MAIT total	Correlation Coefficient	1,000
		Sig. (1-tailed)	.
		N	38
	ENGRAFTMENT PLT D+:	Correlation Coefficient	,185
		Sig. (1-tailed)	,134
		N	38
	ENGREFTMENT NEU D+:	Correlation Coefficient	-,053
		Sig. (1-tailed)	,376
		N	38
	GF od,	Correlation Coefficient	,071
		Sig. (1-tailed)	,335
		N	38
	GF amount	Correlation Coefficient	-,156
		Sig. (1-tailed)	,174
		N	38
	extra GF	Correlation Coefficient	,060
		Sig. (1-tailed)	,359
		N	38
	Subst TAD	Correlation Coefficient	-,294*
		Sig. (1-tailed)	,036
		N	38
	Subst ERD	Correlation Coefficient	-,354*
		Sig. (1-tailed)	,015
		N	38
	Febrile days	Correlation Coefficient	-,295*
		Sig. (1-tailed)	,036
		N	38
	Karnof pre	Correlation Coefficient	,100
		Sig. (1-tailed)	,276
		N	38
	Karnof po	Correlation Coefficient	,081
		Sig. (1-tailed)	,314
		N	38
	Rozdíl Karnof (-)	Correlation Coefficient	-,157
		Sig. (1-tailed)	,174
		N	38
	Day of discharge	Correlation Coefficient	-,253
		Sig. (1-tailed)	,063
		N	38
	Mucositis gr	Correlation Coefficient	-,012
		Sig. (1-tailed)	,472
		N	38

Statistické vyhodnocení pacientů s režimem BEAM: laboratorní marker

Correlations				
			MAIT total	CRP_MAX
Spearman's rho	MAIT total	Correlation Coefficient	1,000	-,212
		Sig. (1-tailed)	.	,100
		N	38	38
	CRP_MAX	Correlation Coefficient	-,212	1,000
		Sig. (1-tailed)	,100	.
		N	38	38

Grafické vyhodnocení pacientů s režimem BEAM: Každý bod grafu odpovídá jednotlivému pacientovi a ukazuje korelaci mezi množstvím buněk MAIT/ μl a dnem dimise



Komentář výsledků:

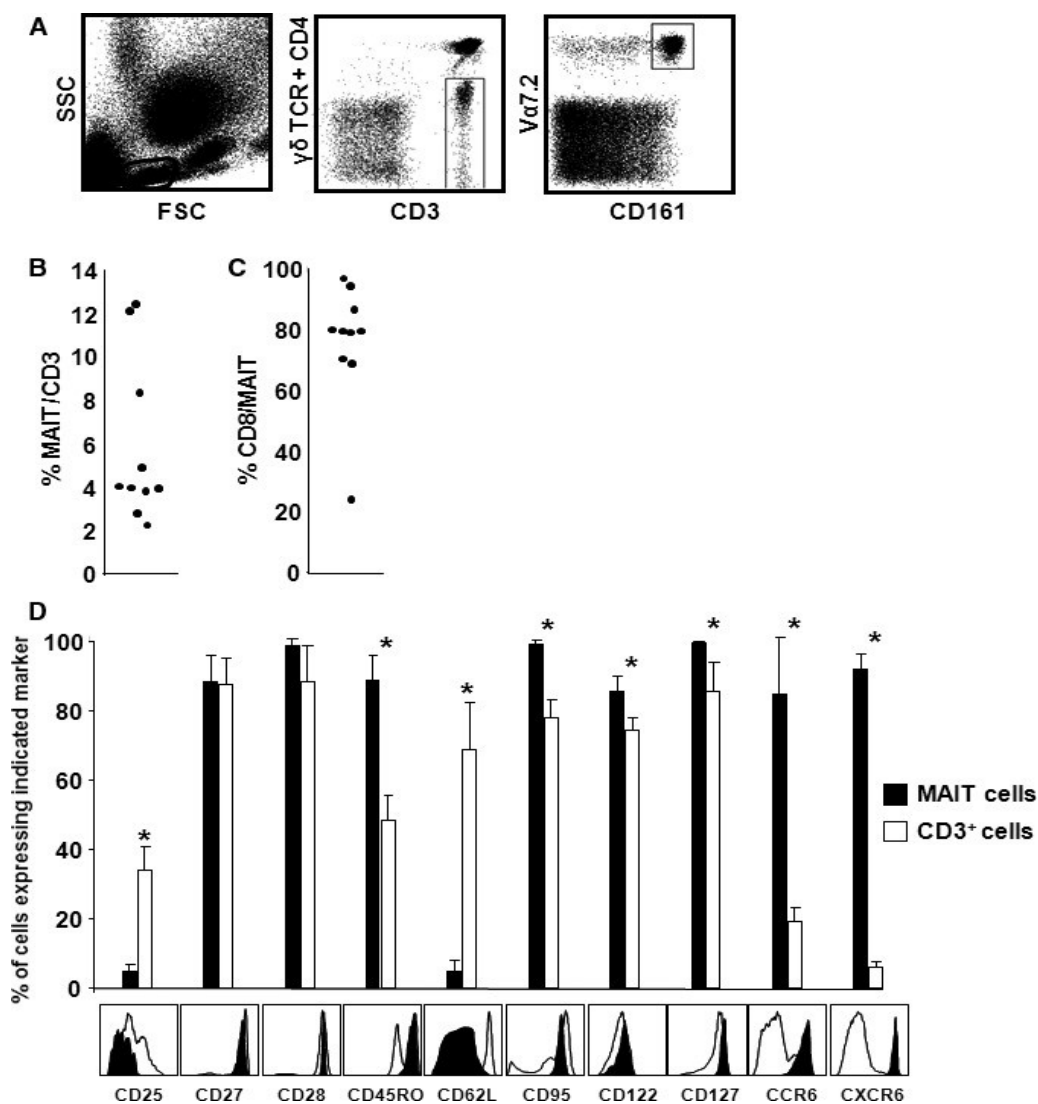
Testováním pacientů v režimu BEAM byla prokázána statisticky významná negativní korelace mezi počtem MAIT buněk před podáním chemoterapie a markerem závažnosti klinického průběhu infekce, počtem febrilních dní (Spearmanovo $Rho = -0,295$, $P = 0,036$).

Byla potvrzena hypotéza negativní korelace velikosti populace MAIT a tíže dřeňové aplázie průkazem záporné korelace počtu MAIT buněk a počtem podaným transfuzních jednotek erytrocytů i trombocytů (TRF. erytrocytů: Spearmanovo $Rho = -0,354$, $P = 0,015$, TRF trombocytů: Spearmanovo $Rho = -0,294$, $P = 0,036$). Testováním počtu MAIT buněk a maximální hodnoty CRP, byla zjištěna negativní korelace (Spearmanovo $Rho = -0,212$) na hladině významnosti $P = 0,1$. Dále byla zjištěna záporná korelace počtu MAIT buněk se dnem dimise pacientů na hladině významnosti $P = 0,063$ (Spearmanovo $Rho = -0,253$). Při testování na subpopulaci MAIT BEAM nevyšla dostatečně statisticky významná negativní korelace mezi hodnotou CRP, dnem dimise pacientů a počtem MAIT buněk, zřejmě z důvodu relativně malé velikosti vzorku v subpopulaci a z ní vyplývajících vlastností, které souvisejí s klesající silou statistického testu o nulové hodnotě korelačního koeficientu (Spearman's Rho).

Hypotéza, že vyšší počet MAIT buněk zlepšuje celkový fyzický stav pacientů s režimem BEAM v průběhu ASCT byla zamítnuta (Spearmanovo $Rho = -0,157$, $P = 0,174$) stejně jako vliv MAIT na závažnost průběhu mukositivity (Spearmanovo $Rho = -0,012$, $P = 0,472$).

4.2. VÝSLEDKY PUBLIKACE: Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk (Brozova, Karlová et al., 2016)

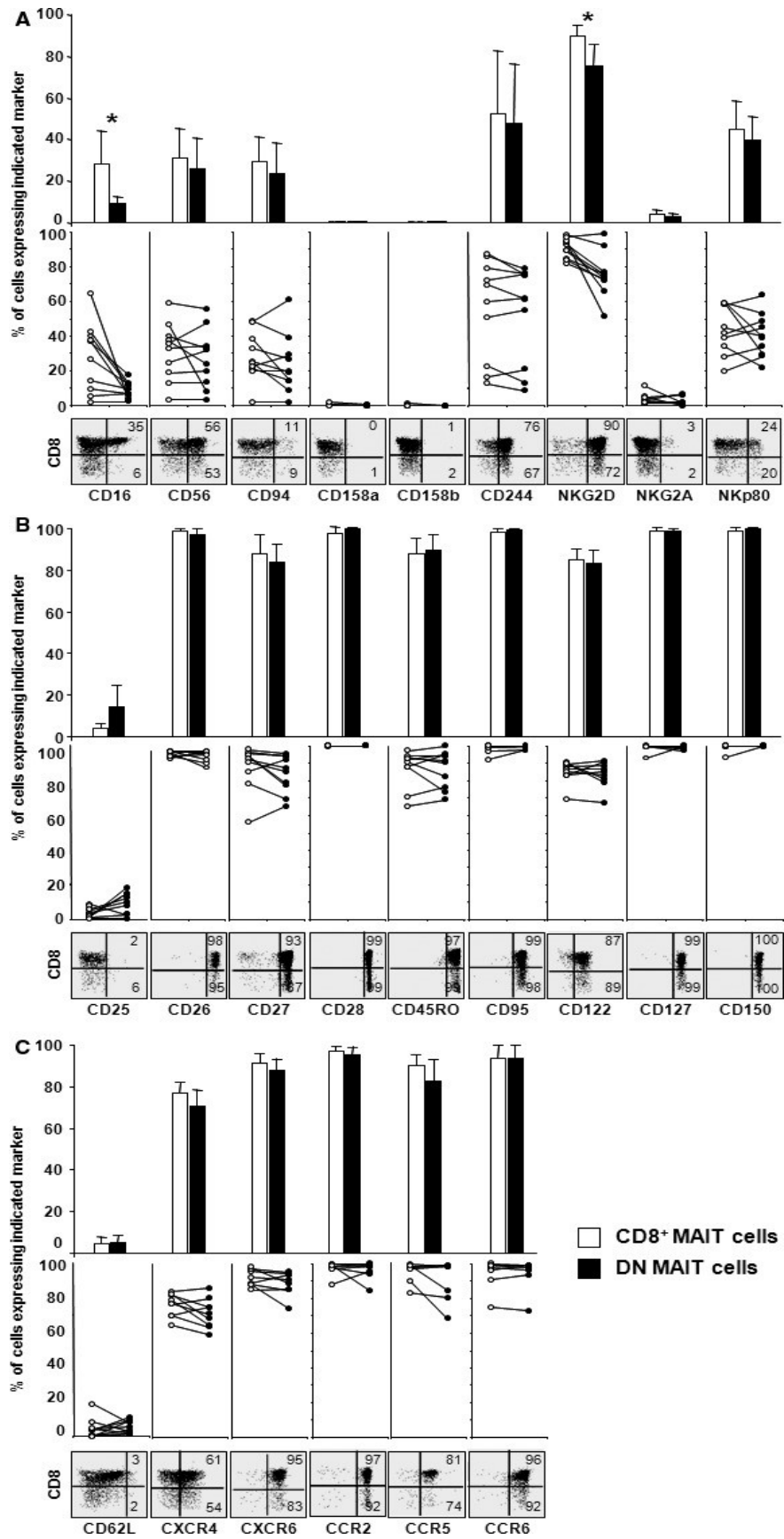
Obr.1.:



Komentář k výsledkům: obr. 1

Průměrné procento buněk MAIT z CD3⁺ lymfocytů bylo 5,85 % (obr. B) (rozmezí 2,24–12,46 %). Srovnání exprese povrchových markerů mezi MAIT buňkami a konvenčními CD3⁺ T lymfocyty (obr. D). Byl analyzován fenotyp MAIT buněk: D25⁻ CD27⁺ CD28⁺ CD45RO⁺ CD62L⁻ CD95⁺ CD122⁺ CD127⁺ CCR6⁺ CXCR6⁺, Tento fenotyp odpovídá aktivovanému, paměťovému a tkáňově naváděnému imunitnímu profilu.

Obr. 2.:



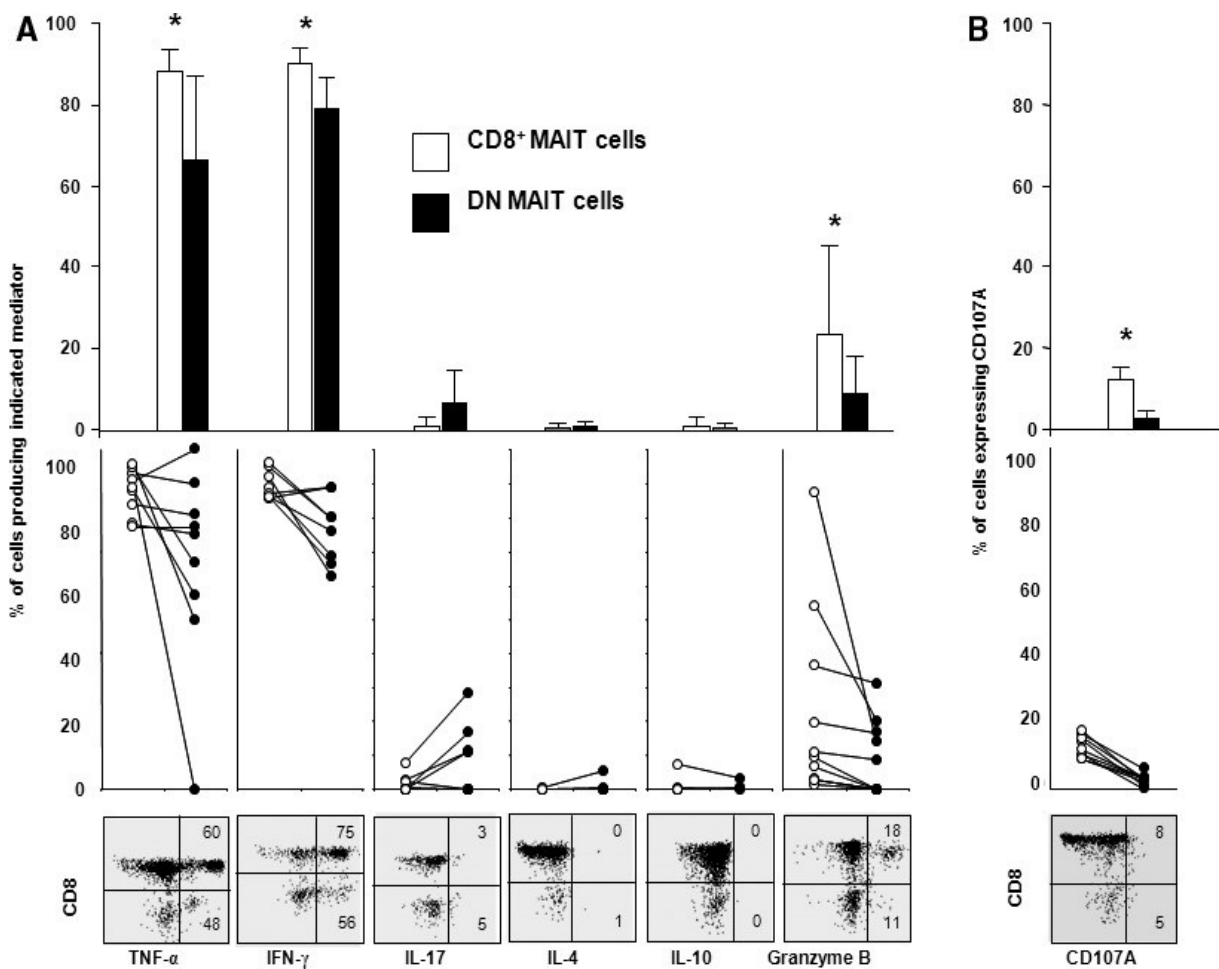
Komentář k výsledkům: obr.2

Expresse CD16 je vyšší u CD8⁺ než u DN MAIT buněk (28 % pozitivních CD8⁺ oproti 9 % pozitivních DN MAIT buněk; $P < 0,01$) a NKG2D (90,4 % pozitivních CD8⁺ oproti 76 % pozitivních DN MAIT buněk; $P = 0,01$). CD56, CD94, CD244, NKG2A a NKp80 byly exprimovány stejným způsobem oběma populacemi MAIT. Nebyla prokázána exprese CD158a ani CD158b (obr. A).

Nebyl prokázán rozdíl v expresi testovaných T buněčných markerů (CD25, CD26, CD27, CD28, CD45RO, CD95, CD122, CD127, CD150) (obr. B).

Mezi oběma subpopulacemi nebyl pozorován rozdíl v expresi tissue-homing fenotypu (CD62L⁻ CXCR4⁺ CXCR6⁺ CCR2⁺ CCR5⁺ CCR6⁺) (obr. C).

Obr.3



Komentář k výsledkům: obr.3: stav po stimulaci PMA a ionomycinem:

Nebyla prokázána produkce IL-4 nebo IL-10. Byla detekována silná produkce prozánětlivých látek a cytotoxické cytokiny. Až 82,4 % buněk MAIT produkovalo TNF- α a 85,9 % produkovalo IFN- γ . Prozánětlivé a cytotoxické cytokiny byly produkovány více CD8+ než DN MAIT buňkami: TNF- α : 87,8 % oproti 66,3 %; $P = 0,048$ a IFN- γ 89,9% oproti 78,9 %; $P = 0,03$; granzym B: 23,2 % oproti 9,0 %; $P < 0,001$) (obr.A).

5. DISKUZE A LIMITACE VÝZKUMU

5.1. TERAPIE HEMATOONKOLOGICKÉHO ONEMOCNĚNÍ SNIŽUJE POČET MAIT BUNĚK

Publikace: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie (Karlova Zubata et al., 2023)

Medián hodnot z analyzovaného datového souboru MAIT buněk periferní krve hematoonkologických pacientů je 0,89 % z T lymfocytů (0,03 – 11,3 %). Hodnota je nižší než dříve publikovaná sdělení velikosti populace MAIT získané z lidské krve zdravých dárců (1-10 % T lymfocytů) (Y. R. Li et al., 2023; Treiner et al., 2003). Tato skutečnost může být dána ovlivněním imunitního systému předchozími chemoterapeutickými léčbami (Comont et al., 2022; Gherardin, Loh, et al., 2018b; Shao et al., 2021), ale i možnou interakcí MAIT buněk s reziduální nádorovou populací (Comont et al., 2022; Gherardin, Loh, et al., 2018).

I přes experimenty prokazující vliv chemoterapeutik na snížení MAIT buněk v periferní krvi (Comont et al., 2022; Gherardin, Loh, et al., 2018b; Shao et al., 2021) ukazují recentní studie určitou míru rezistence zkoumané populace vůči některým cytostatickým léčbám (Chaudhary et al., 1992; Dusseaux et al., 2011c; Patterson et al., 2022; Turtle et al., 2009b). MAIT buňky vykazují povrchové znaky CD161^{hi} a CD8 pozitivitu. T lymfocyty s tímto fenotypem mají schopnost rezistence vůči chemoterapeutickým režimům díky expresi MDR (multidrug resistance transporter). MDR propůjčuje buňkám zvýšenou efluxní kapacitu vůči některým xenobiotikům. Bylo prokázáno, že tyto buňky exprimují vysoké hladiny MDR označovaného jako ABCB1 (také nazývaného P-gp, MDR1 a P-glycoprotein) (Chaudhary et al., 1992; Dusseaux et al., 2011; Patterson et al., 2022; Turtle et al., 2009).

Námi naměřené hodnoty MAIT buněk před zahájením myeloablativního režimu ASCT jsou v souladu s publikovanými výzkumy zabývajícími se vlivem cytostatik na snížení populace MAIT buněk (Comont et al., 2022b; Gherardin, Loh, et al., 2018b; Shao et al., 2021). Ve světle nových informací ukazující rezistenci některých subpopulací MAIT vůči xenobiotikům (Chaudhary et al., 1992; Dusseaux et al., 2011c; Patterson et al., 2022; Turtle et al., 2009b) je možné, že tato subpopulace nekonvenčních lymfocytů tvoří rezervoár antimikrobiální obrany organismu u pacientů v imunitním deficitu po chemoterapeutických léčbách nebo jiných situacích imunitní paralýzy.

5.2. CYTOKINOVÝ REPERTOÁR, FENOTYPOVÁ A FUNKČNÍ ANALÝZA MAIT BUNĚK

Publikace: Analýza fenotypu a funkce subpopulací slizničně asociovaných invariantních T buněk (Brozova, Karlova et al., 2016)

Původní práce Dusseauxe z roku 2011 zmiňuje, že MAIT a iNKT buňky, jako dvě skupiny imunocytů patřící k nekonvenčním lymfocytům, sdílejí mnoho podobností. Dusseaux připomíná především podobnost v efektorových funkcích obou typů buněk. Vysoký počet MAIT buněk v lidských játrech a periferní krvi je analogem vysokého počtu iNKT buněk v játrech a periferní krvi u myši. iNKT buňky jsou v lidských játrech a krvi v nízkém počtu ve srovnání s MAIT buňkami. Proto Dusseaux vyslovil tezi o funkčním překrytí obou populací (Dusseaux et al., 2011). Navíc se kvůli podobnostem jejich fenotypů často předpokládalo, že nálezy z oblasti buněk iNKT platí také pro buňky MAIT. To vedlo k rutinnímu použití buněk iNKT jako referenční populaci pro studium buněk MAIT (Van Kaer et al., 2018).

Obě populace jsou skutečně velmi podobné. Oba typy buněk patří mezi nekonvenční lymfocyty, které jsou schopné reakcí podobných adaptivní imunitě, resp. konvenčním T lymfocytům. Rychlost jejich odpovědi však připomíná imunitu vrozenou. Fungují tedy jako přemostující článek mezi oběma typy imunitních systémů. U obou typů buněk jak MAIT, tak i NKT bylo prokázáno zapojení do protiinfekční a protinádorové obrany organismu, ale i účast v imunopatogenezi autoimunitních onemocnění. Obě populace exprimují invariantní TCR řetězec s omezeným repertoárem a jsou restringované MHC neklasickou třídou. Oba typy buněk reagují na vysoce konzervované nepeptidové ligandy, v případě iNKT pomocí CD1d molekuly a v případě MAIT buněk pomocí MR1 molekuly.

iNKT buňky tvoří dvě základní subpopulace, CD4⁺ a CD4⁻ (resp. DN, double negativní). Předpokládá se, že DN iNKT buňky jsou prozánětlivé a exprimují převážně NK markery. Populace CD4⁺ je orientována na pomoc B lymfocytům, má pravděpodobně regulační funkci. Je zdrojem protizánětlivých a Th2 cytokinů, jako je IL-4 nebo IL-10. (Gumperz et al., 2002; P. T. Lee et al., 2002).

V případě populace MAIT buněk lze dominantní subpopulace rozdělit na základě exprese CD8, CD8⁺ a CD8⁻ CD4⁻ DN (dvojitě negativní). Ještě donedávna se předpokládalo, že buňky MAIT u lidí tvoří homogenní populaci se smíšenou funkcí Th1/Th17. (Hill et al., 2016; Kurioka et al., 2016).

Položili jsme si tedy otázku, zda existuje funkční analogie mezi iNKT a MAIT buňkami. Zkoumali jsme fenotyp a cytokinový repertoár MAIT buněk po stimulaci ionomycinem a PMA.

V krvi zdravých dárců jsme identifikovali fenotypové složení subpopulací MAIT se zaměřením na buňky exprimující CD8⁺ a CD4⁻ CD8⁻ (DN) znaky. Převahu tvořily buňky s povrchovou expresí CD8. Naměřená data nejsou v rozporu s jinými publikovanými pracemi (Dusseaux et al., 2011; Martin et al., 2009; Reantragoon et al., n.d.). Buňky CD4⁺ tvoří pouze 0-5 % z MAIT lymfocytů, proto je tato minoritní sub populace v mnoha analýzách explicitně vynechávána. Stejný přístup jsme zvolili i v našem projektu a zaměřili jsme se na analýzu dvou hlavních populací (CD8⁺ a DN).

Náš výzkum prokazuje podobnost obou subpopulací buněk MAIT, ne však úplnou homogenitu, která je publikována v původní práci Dusseauxe. Verifikovali jsme fenotypový profil MAIT buněk vykazující jak paměťové, efektorové, tak i prozánětlivé schopnosti a tkáňový homing.

I přes práce popisující schopnost MAIT buněk secernovat IL10, jsme po stimulaci ionomycinem a PMA produkci IL 10 nepozorovali (Ioannidis et al., 2020). Lepore v roce 2014 popsal uvolnění cytokinu IL 4 a IL 10 v případě stimulace MAIT lymfocytů pomocí buněk infikovaných E.Coli (Lepore et al., 2014). V tomto ohledu naše zjištění odpovídá dříve publikované práci Dusseauxe (Dusseaux et al., 2011). Může se jednat o jev spojený se specifickým typem stimulace MAIT buněk, což ukazuje na možnou imunitní plasticitu. Dále jsme prokázali významnou produkci prozánětlivých látek jako TNF- α , IFN- γ , granzymu B v obou subpopulacích MAIT. Prozánětlivé a cytotoxické cytokiny byly statisticky významně více produkovány CD8 pozitivními MAIT buňkami. Stejně tak marker degranulace CD107A, který odráží cytotoxický potenciál imunocytů.

Pozorovali jsme, že vyšší podíl CD8⁺ než DN MAIT buněk, který exprimoval CD16 a NKG2D. NKG2D aktivuje cytotoxické funkce NK buněk (Lanier et al., 2008). CD16 molekula má schopnost vázat Fc fragment IgG protilátek. Vzniklá vazba indukuje kaskádu signálů vedoucí k cytotoxické aktivitě ve smyslu ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita). Tato schopnost MAIT buněk je v současné době diskutována v mnoha klinických studiích ve smyslu antimikrobiální i protinádorové imunity (Haeryfar et al., 2018; Vié Nelly Robillard et al., 2008). Pokud jsou buňky MAIT schopny aktivně užívat svůj receptor CD16 v imunitních drahách in vivo, jednalo by se o další možný způsob aktivace MAIT a tím poznání dalšího způsobu zapojení v obranyschopnosti organismu.

Kombinace prokázaných fenotypových vlastností ukazuje významný efektorový cytotoxický potenciál MAIT buněk, především CD8 pozitivních. Prokázali jsme tedy rozdílnost subpopulací MAIT buněk a vyvrátili tezi o jejich homogenosti zmiňovanou Dusseauxem (Dusseaux et al., 2011). Funkční podobnosti se zde však vyskytují, a to i s NKT buňkami. Zásadní rozdíl pozorujeme v menší funkční polaritě. MAIT buňky vykazují ve svých dvou hlavních subpopulacích (CD8+ a DN) spíše prozánětlivý cytotoxický repertoár cytokinů. NKT buňky mají ve svých subpopulacích spíše regulační versus cytotoxické efektorové funkce. Je však možné, že polarizace cytokinového repertoáru nekonvenčních lymfocytů je částečně dána vnějšími faktory. Bylo prokázáno ovlivnění cytokinové produkce MAIT i iNKT buněk střevní mikroflórou i nádorovým mikroprostředím (Goswami et al., 2022; Q. Lin et al., 2020).

5.3. MAIT POPULACE MÁ V PRŮBĚHU AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE PROTEKTIVNÍ FUNKCI:

Publikace: Vysoký počet předtransplantačních MAIT buněk předpovídá příznivý průběh myeloidní aplazie (Karlova Zubata et al., 2023)

Téma výzkumného projektu protektivní role MAIT buněk v ASCT vychází z předchozích poznatků schopnosti MAIT buněk odolávat některým cytostatikům a současně z jejich prokázaného antiinfekčního potenciálu (Chaudhary et al., 1992; Dusseaux et al., 2011; Meermeier et al., 2018; Patterson et al., 2022; Turtle et al., 2009). K vytvoření hypotézy nás vedla přítomnost hlubokých neutropenií, která kontrastuje s nízkou mortalitou v ASCT.

Neutropenii gr. III – IV, způsobenou úvodní vysokodávkovanou chemoterapií, nalézáme v průběhu transplantace u všech pacientů. Takto hluboká cytopenie diskvalifikuje organismus ze základní imunitní obrany proti bakteriím a mykózám (Cumbo & Segal, 2004; Herbrecht et al., 2000). Úspěšnost ASCT je však stran léčby nejen hematologických malignit, ale i zvládnutí infekčních komplikací vysoká. Mortalita je dle evropských dat nízká. V závislosti na zdroji a skladbě pacientů se pohybuje od 1 do 4 %, přičemž pacienti s lymfoproliferativním onemocněním mají závažnější průběh ASCT (Jantunen et al., 2006; Marini et al., 2019; Mohyuddin et al., 2020; Stotler et al., 2008). Peritransplantační mortalita a morbidita je způsobena převážně infekčními komplikacemi (Waszczuk-Gajda

et al., 2022). Tato skutečnost vede k zamyšlení, jaká složka imunitního systému zabezpečuje v tomto rizikovém období antimikrobiální imunitu.

Infekční komplikace v průběhu ASCT jsou z velké části způsobeny narušením střevní mikrobiální bariery při mukositidě nasedající na neutropénii. (Sampson et al., 2017; Waszczuk-Gajda et al., 2022). Do doby engraftmentu autologního štěpu dochází k přechodné imunitní paralýze. Tento imunitní deficit je dán funkčně cytopenií a anatomicky narušením střevní sliznice se vznikem možné cesty prostupu patogenů do oběhu (Sampson et al., 2017; Waszczuk-Gajda et al., 2022). Vzhledem k přítomnosti MAIT buněk ve sliznici lamina propria střeva, je základní otázkou, zda se jejich antimikrobiální role dostává do popředí v době neutropenie.

V souboru dat 100 pacientů, kteří trpěli hematologickým onemocněním a byli indikováni k autologní transplantaci, jsme zkoumali populaci MAIT buněk před zahájením chemoterapie v ASCT. Získané hodnoty u jednotlivých pacientů jsme korelovali s laboratorními a klinickými parametry ukazujícími komplikovanost průběhu transplantace. Zaměřili jsme se především na infekční komplikace a míru toxicity transplantace, kterou jsme testovali pomocí skórování celkového fyzického stavu pacientů při příjmu a dimisi (Karnofského index) a celkovou dobu hospitalizace, resp. den dimise pacienta.

V případě rozdílu Karnofského skóre při příjmu a dimisi jsme neprokázali signifikantní vliv MAIT populace na změnu fyzického stavu pacienta v průběhu ASCT. Jak již bylo zmíněno skórovací systémy hodnotící fyzický stav pacienta jsou zatíženy určitou mírou subjektivity jak hodnoceného (pacient) tak hodnotitele (ošetřující lékař). Proto byla naměřená data MAIT populace zaslepena.

Jeden z klíčových ukazatelů toxicity transplantace je den dimise pacientů. Potřebná délka hospitalizace poskytuje komplexní informaci o komplikovanosti průběhu ASCT. Prokázali jsme statisticky významnou negativní korelaci mezi MAIT buňkami a dnem dimise pacientů. Pacienti s větší populací MAIT buněk před podáním chemoterapie byli dříve propuštěni z hospitalizace.

Délku hospitalizace pacientů v průběhu autologní transplantace určují komplikace a doba příhojení štěpu kmenových buněk.

Jak již bylo zmíněno, komplikace v průběhu transplantace jsou převážně infekčního původu (Waszczuk-Gajda et al., 2022). V klinické praxi se v diagnostice infekčních komplikací užívá laboratorní marker s-CRP (sérový C reaktivní protein). Tato bílkovina je hlavním reaktantem akutní fáze zánětu. Zvýšená hodnota CRP ukazuje na přítomnost

infekčních komplikací. Hodnoty, neboli míra zvýšení CRP, informují o možné přítomnosti i závažnosti infekce (Lelubre et al., 2013; Sproston & Ashworth, 2018; Ziv-Baran et al., 2018). V souboru dat 100 pacientů jsme v průběhu transplantace monitorovali trend zánětlivých markerů. Prokázali jsme statisticky významnou zápornou korelaci počtu MAIT buněk před zahájením ASCT s maximálními hodnotami CRP. Předložené výsledky mohou tedy ukazovat na roli MAIT buněk v průběhu infekčních komplikací ASCT, kdy pacienti s vyšší populací MAIT buněk mají méně závažné průběhy infekcí. Laboratorní markery zánětu vč. s-CRP však nepatří mezi specifické ukazatele pouze infekčních nemocí. K jejich elevaci může dojít i při reakcích hypersenzitivity např. na cytostatika nebo konzervační složky štěpu PBSC (R. Y. Lin et al., 2001). Stejně tak se clearance proteinových složek plazmy mění u pacientů s chronickým renálním postižením. U hematologických pacientů jsou renální funkce dlouhodobě atakovány jednak základním onemocněním (mnohočetný myelom) a jednak léčebnými režimy. V záchranných režimech lymfoproliferativních onemocnění se často kombinují chemoterapie na bázi platiny, pro kterou je nefrotoxicita charakteristická (Madas & Harrington, 1978). I myeloablativní režimy transplantací vykazují významnou nefrotoxicitu (Lameire, 2013; Leung et al., 2005). Míra zvýšení CRP může být tedy ovlivněna i sníženou renální funkční rezervou hematologických pacientů. (Panichi et al., 2001; S. C. Wu et al., 2020).

Závažnost toxicity ASCT je v mnoha studiích hodnocena hloubkou a délkou probíhající cytopenie. Zkoumali jsme vliv MAIT buněk na průběh transplantační cytopenie. Neprokázali jsme vliv MAIT lymfocytů na délku neutropenie ani na dobu engraftmentu trombocytů. Pozorovali jsme však statisticky významnou negativní korelaci mezi počtem MAIT buněk a potřebou transfuzní terapie erytrocytů a v případě režimu BEAM i trombocytů. Pacienti s vyšším počtem MAIT buněk měli tedy nižší transfuze dependenci, což odráží možný vliv MAIT lymfocytů na hloubku cytopenie v transplantačním období. Anemie i trombocytopenie je v případě ASCT významně způsobena podanou chemoterapií. V minulosti však byly také předloženy důkazy o vlivu infekce a systémového zánětu na erytropoezu a trombopoezu. Anemie se objevuje na pozadí akutního i chronického zánětu (Fraenkel, 2017). Stejně tak i trombocytopenie byla opakovaně prokázána v obraze kriticky nemocných a u pacientů trpících závažnými infekcemi nebo sepsí (Thomas et al., n.d.). Přesný mechanismus obou dějů není znám a je v rozporu s uznávaným konceptem stimulačního vlivu akutní infekce a hypoxického stresu na erytropoezu a trombopoezu (L. F. Bennett et al., 2020; Fraenkel, 2017; Thomas et al.,

n.d.). Některé práce zmiňují možný podíl útlumu kostní dřeně dysbalancí vystupňovaného zánětlivého procesu s nadprodukcí proinflamatorních cytokinů v kombinaci se zánětem indukovanou hemofagocytozou (Fraenkel, 2017; Thomas et al., n.d.). Trombocytopenie a anemie jsou uznávány jako nezávislý rizikový faktor mortality u pacientů na JIP a kriticky nemocných (Fraenkel, 2017; Vanderschueren et al., 2000). Je tedy možné, že MAIT buňky mají v kontextu hloubky dřevňového útlumu protektivní modulační vliv díky kombinací svého repertoáru inflamatorních i zánět-supresivních cytokinů a mají současně protektivní vliv na hloubku imunitní zánětlivé odpovědi.

Kromě laboratorních parametrů jsme hodnotili i klinický průběh ASCT. Z faktorů, které nepřímou ukázkou na závažnost průběhu komplikací jsme testovali následující: počet febrilních dní, počet dní s nutností podání intravenózních antibiotik a tíže mukositivity. Slizniční zánět je klinicky hodnocen dle NCI-CTCAE Grading Scale, který odráží i nutnost podání parenterální výživy a analgetik. V případě testování klinických faktorů na celém souboru dat 100 pacientů jsme statisticky významný vliv MAIT lymfocytů neprokázali. S ohledem na heterogenitu populace způsobenou spektrem základní diagnózy, druhem předchozích linií léčby a transplantačním režimem jsme provedli selektivní testování homogenní skupiny pacientů dle conditioningu. Zaměřili jsme se na režim BEAM, kde jsou užívána konvenční cytostatika a ve kterém jsou pacienti zatíženi delší cytopenií s vyšší incidencí komplikací (Jantunen et al., 2006; Kaloyannidis et al., 2019; Stotler et al., 2008).

Ve skupině pacientů v režimu BEAM jsme prokázali statisticky významnou negativní korelaci mezi velikostí populace MAIT buněk a počtem febrilních dní. Statisticky významnou kauzalitu mezi MAIT buňkami a závažností mukositivity dle gradu jsme neprokázali.

Febrilie pacientů jsou monitorovány pro časný zachycení nástupu infekce. V době ASCT se zvýšení teploty vyskytuje nejčastěji jako projev febrilní neutropenie. Doba poklesu tělesné teploty pod 38 °C je považována za klinickou známku ústupu infekčního onemocnění nebo za stav, kdy se infekce dostává pod kontrolu imunitního systému, resp. antimikrobiální léčby. Dle získaných výsledků, byla potvrzena hypotéza mírnějšího klinického průběhu infekcí u pacientů v režimu BEAM v případě přítomnosti vyšší populace MAIT buněk, hodnoceno na počtu febrilních dní. Klinická manifestace narušení imunitní homeostazy febrilií není však specifická pouze pro infekční komplikace. Je nutno diskutovat možný vliv podané léčby, kdy je v současné době dobře znám cytosarový

syndrom indukující neinfekční febrilie až po dobu několika dní. Cytosar je součástí režimu BEAM a je podáván v úvodu ASCT. I přihojení kmenových buněk může být asociováno s bouřlivou reakcí až s obrazem systémové zánětlivé odpovědi. Tzv engraftment syndrom je typicky asociován s tzv horečkou z přihojení „engraftment fever“ (Alali et al., 2020; Pramanik et al., 2019).

Mukositida je běžně se vyskytující toxicita související s podáním chemoterapeutické léčby. Vzhledem k lokalizaci MAIT buněk preferenčně na sliznicích jsme zkoumali jejich roli ve vývoji mukositidy u pacientů v ASCT. Neprokázali jsem statisticky významný vliv MAIT buněk na stupeň závažnosti mukositidy. Grading Scale NCI-CTCAE hodnotí vizuální projev orální mukositidy, narušení per os příjmu a přidruženou bolest. Klinický obraz vznikající při mukositidě nemusí být však dán pouze příznaky vycházejícími z mukositidy samotné. Narušení per orálního příjmu u pacientů v ASCT často vzniká z emetogenního efektu léčby nebo ze sníženého apetitu z dysgeuzie, která je asociovaná s podáním chemoterapie. (Sözeri & Kutlutürkan, 2015; Sroussi et al., 2017).

V roce 2014 bylo diskutováno zavedení nové nosologické jednotky „febrilní mukositidy“. Byla prokázána kauzalita se závažností střevní mukositidy, peakem CRP a febrilií (Blijlevens et al., 2005; Van der Velden et al., 2014). Etiologie horečky však zůstala nevysvětlena u 30–50 % neutropenických pacientů. Neexistovali žádné mikrobiologické kultivační důkazy, které by definovaly přítomnost infekce (Pagano et al., 2011). Je tedy diskutována hypotéza, že horečka nemusí vždy souviset s infekcí. V případě narušení slizniční bariery se na vzniku febrilie nepodílí pouze vstup patogenu skrze narušenou bariéru, ale i kombinace faktorů uvolněných DAMP a PAMP střevní mikrobioty. Narušení střevní bariéry se tedy může projevit systémovou imunitní reakcí bez ohledu na přítomnosti patogenu samotného. Podkladem může být rozvoj tzv. imunogenní buněčné smrti, která vzniká v reakci na uvolnění DAMP chemoterapií poškozených buněk. S progresí zánětlivé odpovědi dochází ke zhoršení stavu slizniční bariéry a prohlubuje se riziko prostupu patogenů, rozvoji bakterémie a infekce. Rizikovost neutropenických pacientů v průběhu transplantace je vysoká, a proto je v klinické praxi při vzniku první febrilie nebo vzestupu CRP zahajována empirická antibiotická terapie. Tento postup je opakovaně diskutován pro riziko rozvoje bakteriální rezistence. Prevencí těchto stavů se zdá být modulace počáteční zánětlivé odpovědi při vznikajícím „sterilním“ zánětu na sliznicích, který je indukovan chemoterapií. Buňky MAIT jsou v tomto ohledu zajímavým a perspektivním cílem. Se svou rozpoznávací schopností a spektrem efektorových funkcí,

kteře kombinují vrozenou a adaptivní imunitu, cytotoxické i imunomodulační vlastnosti by mohly být řešením v případě snahy nalézt terapeutické možnosti ovlivnění infekčních komplikací v průběhu neutropenie (Van der Velden et al., 2014). V současné době existují procesy, které umožňují in vitro modifikovat efektorové funkce imunitních buněk a následně je transferovat zpět do organismu. Tento terapeutický přístup se označuje jako buněčná terapie chimérickým antigenním receptorem a je již zavedena v terapii nádorů s receptorovou modifikací konvenčních T lymfocytů (CAR-T). Přednosti využití MAIT buněk jsou v tomto ohledu významné. MAIT lymfocyty nejsou selektovány klasickými MHC/peptidovými komplexy a exprimují semiinvariantní T buněčný receptor, tudíž nezprostředkovávají alogenní reaktivitu. Mohou být tedy novým zdrojem univerzálních efektorových buněk pro alogenní terapii CAR-T buňkami bez nutnosti inaktivace jejich endogenního TCR receptoru (Bohineust et al., 2021). Od roku 2020 došlo k významným objevům v oblasti protinádorové terapie se zkoumáním efektu CAR-MAIT. Byly také předloženy důkazy o schopnosti MAIT buněk překonávat bakteriální rezistence vůči antibiotikům (Boulouis et al., 2020). Recentně se vědci zabývali možnostmi využít MAIT buňky jako vakcinační cíle. V roce 2021 Nicolas Provine a kol. předložili důkazy o roli MAIT buněk při vakcinaci adenovirovým vektorem. Aktivace buněk MAIT pozitivně korelovala s reakcemi T buněk vyvolanými vakcínou a MAIT buňky se staly terčem výzkumu jako kandidát k posílení vakcinační imunity (Provine et al., 2021). Toto téma bylo více zkoumáno v době pandemie SARS-CoV-2, kdy publikace Boulouisové přinesla informace o vlivu MAIT buněk na velikost imunitní odpovědi na vakcínu proti Covid19 (Boulouis et al., 2022). V dalším našem výzkumném projektu zabývajícím se vakcinační buněčnou i humorální imunitou proti SARS-CoV-2 u hematologických pacientů, kteří absolvovali B depleční terapii, jsme významnou roli MAIT buněk nepotvrdili (Bacova et al., 2022). Může se jednat o důkaz potřeby funkční B lymfocytární linie k expanzi a modulaci MAIT lymfocytů. Zvažovat lze také kombinaci vlivu hematologické léčby, nádorové populace nebo změněné střevní mikrobioty při konkomitantních antiinfekčních profylaxích.

Z předchozích sdělení je zřejmé, že se MAIT buňky zapojují do komplexních imunitních odpovědí a je žádoucí zkoumat je v širším kontextu imunitního systému. Cílem výzkumných snažení je možnost využít komplexní imunitní repertoár MAIT buněk, jejich antiinfekční potenciál, imunitní modulační schopnosti i protinádorový efekt (Bohineust et al., 2021; Kurioka et al., 2016).

6. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá fyziologií a patologií imunitní populace nekonvenční lymfocytů MAIT buněk, která stojí svými schopnostmi na pomezí vrozené a získané imunity. Cílem práce bylo podat komplexní souhrn dosavadních poznatků a prezentace námi provedených výzkumných projektů zabývajících se rolí MAIT buněk v organismu.

Řešili jsme otázku funkční a fenotypové charakterizace MAIT buněk. Dusseaux ve své původní práci popisuje, že dosud nebyly nalezeny funkční a fenotypové rozdíly mezi subpopulací DN (CD4-CD8-) a CD8 pozitivních MAIT buněk (Dusseaux et al., 2011). V našem výzkumném projektu jsme pomocí stimulace ionomycinem a PMA analyzovali efektorové funkce MAIT lymfocytů. Zjistili jsme významný cytotoxický potenciál se schopností produkce prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IFN- γ a granzymu B). Současně jsme popsali schopnost MAIT buněk exprimovat molekuly CD16, NKG2D a CD107A, které jsou více zastoupeny na povrchu subpopulace s CD8 pozitivitou. Tímto jsme prokázali vyšší prozánětlivý a cytotoxický potenciál CD8+ MAIT buněk oproti DN (CD4-CD8-) MAIT buňkám a také rozdílnost subpopulací MAIT lymfocytů.

V hlavním výzkumném projektu jsme studovali populaci MAIT lymfocytů a její postavení v imunitním systému u hematologických pacientů v průběhu autologní transplantace periferními kmenovými buňkami. Hypotéza protektivní role MAIT buněk vychází z publikovaných dat o rezistenci některých MAIT lymfocytů vůči xenobiotikům (Dusseaux et al., 2011; Patterson et al., 2022) a současně z údajů o nízké mortalitě, která je v průběhu autologní transplantace zaznamenána i přes výskyt hlubokých neutropenií po myeloablativním režimu.

Imunitní složky, které si zachovávají antiinfekční potenciál v tomto období přechodné imunitní paralýzy je třeba ozřejmit dalšími studiemi. My jsme však popsali dosud nepublikované role MAIT buněk v tomto rizikovém období cytopenie ASCT.

Potvrdili jsme hypotézu, že MAIT buňky mají protektivní roli v době postchemoterapeutického útlumu kostní dřeně v průběhu autologní transplantace periferními kmenovými buňkami. Dle zkoumaných parametrů jsme prokázali méně komplikovaný průběh transplantace pacientů s vyšší hodnotou MAIT buněk před zahájením vysokodávkované chemoterapie. Pacienti s vyšším zastoupením MAIT buněk měli nižší hodnoty zánětlivých parametrů a byli dříve dimittováni z hospitalizace. Ačkoli

jsou MAIT buňky asociované se sliznicí, neprokázali jsme jejich vliv na závažnost probíhající mukozitidy.

Ve skupině pacientů, kteří absolvovali chemoterapeutický režim BEAM, jenž je spojen se závažnějším průběhem autologní transplantace, jsme prokázali, že vyšší počet MAIT buněk redukuje u pacientů počet febrilních dní. Dále jsme u pacientů s režimem BEAM zjistili významně nižší transfuzní dependenci erytrocytů i trombocytů, ale nebylo prokázáno zkrácení doby přihojení myeloidní řady. Zjištění podává informaci o vlivu MAIT buněk na hloubku cytopenie, která je často asociovaná s infekčními komplikacemi a je obrazem zánětlivého prostředí organismu.

Tato práce přináší nové poznatky o populaci nekonvenčních MAIT lymfocytů a jejich zapojení v imunitním systému. MAIT lymfocyty jsou v současné době považovány za jeden z předních cílů nových léčebných přístupů využívající imunoterapii. Proto má výzkum fyziologických i patofyziologických vlastností MAIT buněk významné postavení. Jejich další studium by mohlo přinést poznatky k nalezení nových terapeutických možností v oblasti onkologie i infekční medicíny.

7. SOUHRN

MAIT buňky jsou skupina nekonvenčních lymfocytů, která tvoří slizniční bariéru v mnoha orgánových systémech. Svými funkcemi stojí na pomezí vrozené a adaptivní imunity. Mají významnou evoluční konzervovanost a omezenou TCR repertoárovou variabilitu. Jsou aktivovány invariantním TCR receptorem, kterému jsou MHC komplexem Ib (MR1 molekulou) prezentovány metabolity vitamínu B2. MAIT buňky se uplatňují i po aktivaci cytokiny nebo bakteriálními superantigeny. Vykazují paměťové, prozánětlivé, imunomodulační schopnosti a tkáňový homing. Jejich role byla prokázána v obraně proti patogenům, bakteriím, virům i mykozám. Zapojují se do imunopatologických reakcí u autoimunitních onemocnění, v cytokinových bouřích a chronickém zánětu. V posledních letech jsou intenzivně zkoumány pro možnost jejich využití jako univerzálních dárcovských buněk k obraně proti infekcím a v imunoterapii nádorů. Výzkumným cílem této práce bylo analyzovat cytokinový repertoár průtokovou cytometrií a hodnotit rozdílnost subpopulací MAIT lymfocytů. Po stimulaci ionomycinem a PMA byl prokázán vyšší cytotoxický potenciál MAIT buněk CD8 pozitivních oproti DN populaci (CD4-CD8-). Byla zjištěna exprese CD16 a NKG2D, marker degranulace CD107A a významná produkce prozánětlivých látek jako TNF- α , IFN- γ , granzymu B. Hlavní výzkumný projekt byl zaměřen na využití cytotoxického potenciálu MAIT buněk v antiinfekční obraně organismu v době autologní transplantace periferními kmenovými buňkami. Nejvýznamnější komplikací ASCT jsou infekce, které probíhají závažnou formou jako febrilní neutropenie. MAIT lymfocyty mají schopnost rezistence vůči některým xenobiotikům. Naše práce prokázala protektivní funkci MAIT buněk v době autologní transplantace PBSC. Pacienti s vyšším počtem MAIT buněk byli dříve dimítováni a měli nižší hodnoty zánětlivých parametrů. U pacientů v chemoterapeutickém režimu BEAM bylo pozorováno méně febrilních dní a nižší potřeba transfuzní terapie v průběhu ASCT v případě vyššího počtu MAIT buněk před zahájením vysokodávkované chemoterapie.

8. SUMMARY

MAIT cells are a group of unconventional lymphocytes. They form a mucosal barrier in many organ systems. Their functions are at the interface of innate and adaptive immunity. They have significant evolutionary conservation and limited TCR repertoire variability. They are activated by an invariant TCR receptor to which vitamin B2 metabolites are presented by MHC complex Ib (MR1 molecule). MAIT cells are also activated by cytokines or bacterial superantigens. MAIT cells exhibit memory, pro-inflammatory, immunomodulatory and tissue homing abilities. Their role has been demonstrated in defense against pathogens, bacteria, viruses and mycoses. They are involved in immunopathological responses in autoimmune diseases, cytokine storms and chronic inflammation. They have been investigated for their potential use as universal donor cells for defense against infections and in cancer immunotherapy. The research aim of this study was to analyze the cytokine repertoire by flow cytometry and to assess the diversity of MAIT lymphocyte subpopulations. After stimulation with ionomycin and PMA, a higher cytotoxic potential of CD8-positive MAIT cells compared to the DN population (CD4-CD8-) was demonstrated. The expression of CD16 and NKG2D, the degranulation marker CD107A and a significant production of pro-inflammatory substances such as TNF- α , IFN- γ , granzyme B were detected. The main research project was focused on the use of cytotoxic potential of MAIT cells in anti-infective defence during autologous transplantation PBSC. The most important complications of ASCT is febrile neutropenia. MAIT lymphocytes have the capacity for resistance to some xenobiotics. Our study demonstrated the protective function of MAIT cells during ASCT. Patients with higher numbers of MAIT cells were early discharged from the hospital and had lower levels of inflammatory parameters. Fewer febrile days and a lower need for transfusion therapy during ASCT were observed in patients on the BEAM chemotherapeutic regimen with higher MAIT cell counts before high-dose chemotherapy.

9. LITERATURA

1. Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H., & Vartivarian, S. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different candida species. *Clinical Infectious Diseases*, 24(6), 1122–1128.
<https://doi.org/10.1086/513663>
2. Alali, M., Elmuti, lena, & Bartlett, A. (2020). 1162. Engraftment fever (EF) in Pediatric stem cell transplantation (SCT): Risk Factors, Etiology and Outcomes. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(Suppl 1), S607.
<https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA439.1348>
3. Alimbetov, D., Askarova, S., Umbayev, B., Davis, T., & Kipling, D. (2018). Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 1690, 19(6), 1690. <https://doi.org/10.3390/IJMS19061690>
4. Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D. F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., Borsellino, G., Aloisi, F., Battistini, L., & Salvetti, M. (2011). CD161highCD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*, 134(2), 542–554.
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ354>
5. Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05415-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05415-0)
6. Bacova, B., Kohutova, Z., Zubata, I., Gaheerova, L., Kucera, P., Heizer, T., Mikesova, M., Karel, T., & Novak, J. (2022). Cellular and humoral immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in patients treated with either Ibrutinib or Rituximab. *Clinical and Experimental Medicine*, 1.
<https://doi.org/10.1007/S10238-022-00809-0>
7. Barber-Axthelm, I. M., Kent, S. J., & Juno, J. A. (2020). Understanding the Role of Mucosal-Associated Invariant T-Cells in Non-human Primate Models of HIV Infection. *Frontiers in Immunology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02038>
8. Bazarbachi, A. H., Al Hamed, R., Malard, F., Bazarbachi, A., Harousseau, J.-L., & Mohty, M. (n.d.). *Induction therapy prior to autologous stem cell*

transplantation (ASCT) in newly diagnosed multiple myeloma: an update.

<https://doi.org/10.1038/s41408-022-00645-1>

9. Bendelac, A., Savage, P. B., & Teyton, L. (2007). The Biology of NKT Cells. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Immunol.25.022106.141711*, 25, 297–336. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.25.022106.141711>
10. Bennett, L. F., Liao, C., Quickel, M. D., Yeoh, B. S., Vijay-Kumar, M., Hankey-Giblin, P., Sandeep Prabhu, K., & Paulson, R. F. (2020). Inflammation induces stress erythropoiesis through heme-dependent activation of SPI-C HHS Public Access. *Sci Signal*, 12(598). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aap7336>
11. Bennett, M., Trivedi, S., Iyer, A., leukocyte..., J. H. – J. of, & Library, 2017 – Wiley Online. (2017). Human mucosal-associated invariant T (MAIT) cells possess capacity for B cell help. *J. Leukoc. Biol*, 102(5), 1261–1269. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0317-116R>
12. Berglin, L., Bergquist, A., Johansson, H., Glaumann, H., Jorns, C., Lunemann, S., Wedemeyer, H., Ellis, E. C., & Björkström, N. K. (2014). In situ characterization of intrahepatic non-parenchymal cells in PSC reveals phenotypic patterns associated with disease severity. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105375>
13. Beudeker, B. J. B., Van Oord, G. W., Arends, J. E., Schulze Zur Wiesch, | Julian, Marieke, | Van Der Heide, S., Robert, | De Knecht, J., Verbon, A., Boonstra, | Andre, Mark, | Claassen, A. A., & Claassen, M. A. A. (2017). Mucosal-associated invariant T-cell frequency and function in blood and liver of HCV mono-and HCV/HIV co-infected patients with advanced fibrosis. *Wiley Online Library*, 38(3), 458–468. <https://doi.org/10.1111/liv.13544>
14. Billerbeck, E., Kang, Y. H., Walker, L., Lockstone, H., Grafmueller, S., Fleming, V., Flint, J., Willberg, C. B., Bengsch, B., Seigel, B., Ramamurthy, N., Zitzmann, N., Barnes, E. J., Thevanayagam, J., Bhagwanani, A., Leslie, A., Oo, Y. H., Kollnberger, S., Bowness, P., ... Klenerman, P. (2010). Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3006–3011. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914839107>

15. Bird, L. (2023). Meningeal MAIT cells preserve brain homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 23(1), 4. <https://doi.org/10.1038/S41577-022-00824-Y>
16. Bister, J., Crona Guterstam, Y., Strunz, B., Dumitrescu, B., Haij Bhattarai, K., Özenci, V., Brännström, M., Ivarsson, M. A., Gidlöf, S., & Björkström, N. K. (2021). Human endometrial MAIT cells are transiently tissue resident and respond to *Neisseria gonorrhoeae*. *Mucosal Immunology*, 14(2), 357–365. <https://doi.org/10.1038/S41385-020-0331-5>
17. Blackwell, K., Gascón, P., Sigounas, G., Jolliffe, L., & Blackwell, K. L. (n.d.). *rHuEPO and Improved Treatment Outcomes: Potential Modes of Action; rHuEPO and Improved Treatment Outcomes: Potential Modes of Action*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-90005-41>
18. Blijlevens, N., Donnelly, J., & DePauw, B. (2005). Inflammatory response to mucosal barrier injury after myeloablative therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. <https://www.nature.com/articles/1705118>
19. Bohineust, A., Turret, M., Derivry, L., & Caillat-Zucman, S. (2021). Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, a new source of universal immune cells for chimeric antigen receptor (CAR)-cell therapy. *Bulletin Du Cancer*, 108(10), S92–S95. <https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2021.07.003>
20. Böttcher, K., Rombouts, K., Saffioti, F., Roccarina, D., Rosselli, M., Hall, A., Luong, T. V., Tsochatzis, E. A., Thorburn, D., & Pinzani, M. (2018). MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. *Hepatology*, 68(1), 172–186. <https://doi.org/10.1002/HEP.29782>
21. Boulouis, C., Kammann, T., Cuapio, A., Parrot, T., Gao, Y., Mouchtaridi, E., Wullimann, D., Lange, J., Chen, P., Akber, M., Rivera Ballesteros, O., Muvva, J. R., Sällberg Chen, M., Healy, K., Sobkowiak, M., Söderdahl, G., Blennow, O., Österborg, A., Mielke, S., ... Sandberg, J. K. (2022). MAIT cell compartment characteristics are associated with the immune response magnitude to the BNT162b2 mRNA anti-SARS-CoV-2 vaccine. *Molecular Medicine*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/S10020-022-00484-7>
22. Boulouis, C., Sia, W. R., Gulam, M. Y., Teo, J. Q. M., Png, Y. T., Phan, T. K., Mak, J. Y. W., Fairlie, D. P., Poon, I. K. H., Koh, T. H., Bergman, P., Lim, C.

- M., Wang, L. F., Kwa, A. L. H., Sandberg, J. K., & Leeansyah, E. (2020). Human MAIT cell cytolytic effector proteins synergize to overcome carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, *18*(6).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000644>
23. Bozorgmehr, N., Hnatiuk, M., Peters, A. C., & Elahi, S. (2023). Depletion of polyfunctional CD26^{high}CD8⁺ T cells repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology and Oncology*, *12*(1).
<https://doi.org/10.1186/S40164-023-00375-5>
24. Braudeau, C., Amouriaux, K., Néel, A., & Herbreteau, G. (2016). Persistent deficiency of circulating mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in ANCA-associated vasculitis. *Journal Of*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841116300282>
25. Brozova, J., Karlova, I., & Novak, J. (2016). Analysis of the Phenotype and Function of the Subpopulations of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, *84*(4), 245–251.
<https://doi.org/10.1111/SJI.12467>
26. Cantor, H., & Boyse, E. A. (1977). Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by T-cell Subclasses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *41*(1), 23–32.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1977.041.01.006>
27. Carbone, P., Kaplan, H., Musshoff, K., Smithers, D., & Tubiana, M. (1971). Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Research*.
28. Çelebi, H., Akan, H., Akçağlayan, E., Üstün, C., & Arat, M. (2000). Febrile neutropenia in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation and conventional chemotherapy for malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, *26*(2), 211–214.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BMT.1702503>
29. Chaudhary, P. M., Mechetner, E. B., & Roninson, I. B. (1992). Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes [see comments]. *Blood*, *80*(11), 2735–2739.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.V80.11.2735.2735>

30. Chen, Z., Wang, H., D'Souza, C., Sun, S., Kostenko, L., Eckle, S. B. G., Meehan, B. S., Jackson, D. C., Strugnell, R. A., Cao, H., Wang, N., Fairlie, D. P., Liu, L., Godfrey, D. I., Rossjohn, J., McCluskey, J., & Corbett, A. J. (2017). Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunology*, *10*(1), 58–68.
<https://doi.org/10.1038/MI.2016.39>
31. Chiba, A., Murayama, G., & Miyake, S. (2018). Mucosal-associated invariant T cells in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN), 1333.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01333/BIBTEX>
32. Chiba, A., Tamura, N., Yoshikiyo, K., Murayama, G., Kitagaichi, M., Yamaji, K., Takasaki, Y., & Miyake, S. (2017). Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, *19*(1).
<https://doi.org/10.1186/S13075-017-1257-5>
33. Cho, Y., Kee, S., Kim, T., Jin, H., & Kim, M. (2014). Mucosal-Associated Invariant T Cell Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal Of*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302701>
34. Chua, W. J., Truscott, S. M., Eickhoff, C. S., Blazevic, A., Hoft, D. F., & Hansen, T. H. (2012). Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infection and Immunity*, *80*(9), 3256–3267. <https://doi.org/10.1128/IAI.00279-12>
35. Cogswell, D. T., Gapin, L., Tobin, H. M., McCarter, M. D., & Tobin, R. P. (2021). MAIT Cells: Partners or Enemies in Cancer Immunotherapy? *Cancers*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13071502>
36. Comont, T., Nicolau-Travers, M. L., Bertoli, S., Recher, C., Vergez, F., & Treiner, E. (2022a). MAIT cells numbers and frequencies in patients with acute myeloid leukemia at diagnosis: association with cytogenetic profile and gene mutations. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *71*(4), 875–887.
<https://doi.org/10.1007/S00262-021-03037-9>
37. Corbett, A. J., Eckle, S. B. G., Birkinshaw, R. W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z., Reantragoon, R., Meehan, B., Cao, H., Williamson, N. A., Strugnell, R. A., Van Sinderen, D., Mak, J. Y. W., Fairlie, D. P., Kjer-Nielsen,

- L., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2014). T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 2014 509:7500, 509(7500), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nature13160>
38. Cosgrove, C., Ussher, J., Blood, A. R. —, Journal, T., & ashpublications.org, 2013 —. (n.d.). Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺/MAIT cells in HIV infection. Retrieved May 9, 2023, from <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/121/6/951/31428>
39. Croxford, J., Miyake, S., Huang, Y., (2006). Invariant V_α19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7, 987–994 <https://www.nature.com/articles/ni1370>
40. Cumbo, T. A., & Segal, B. H. (2004). Prevention, Diagnosis, and Treatment of Invasive Fungal Infections in Patients with Cancer and Neutropenia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2(5), 455–469. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2004.0036>
41. De Araújo, N. D., Gama, F. M., De Souza Barros, M., Ribeiro, T. L. P., Alves, F. S., Xabregas, L. A., Tarragô, A. M., Malheiro, A., & Costa, A. G. (2021). Translating Unconventional T Cells and Their Roles in Leukemia Antitumor Immunity. *Journal of Immunology Research*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6633824>
42. Dias, J., Leeansyah, E., & Sandberg, J. K. (2017). Multiple layers of heterogeneity and subset diversity in human MAIT cell responses to distinct microorganisms and to innate cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), E5434–E5443. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1705759114>
43. Dignani, M. C., Mykietiuk, A., Michelet, M., Intile, D., Mammana, L., Desmery, P., Milone, G., & Pavlovsky, S. (2002). Valacyclovir prophylaxis for the prevention of Herpes simplex virus reactivation in recipients of progenitor cells transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 29(3), 263–267. <https://doi.org/10.1038/SJ.BMT.1703354>
44. Dubberke, E. R., Reske, K. A., Yan, Y., Olsen, M. A., Clifford McDonald, L., & Fraser, V. J. (2007). Clostridium difficile—Associated Disease in a Setting of Endemicity: Identification of Novel Risk Factors. *Academic.Oup.Com*, 45(12), 1543. <https://doi.org/10.1086/523582>

45. Dunne, M. R., Wagener, J., Loeffler, J., Doherty, D. G., & Rogers, T. R. (2021). Unconventional T cells – New players in antifungal immunity. *Clinical Immunology*, 227. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2021.108734>
46. Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., & Lantz, O. (2011a). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161 hi IL-17-secreting T cells. *Blood*, 117(4), 1250–1259. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-08-303339>
47. Eberhard, J. M., Hartjen, P., Kummer, S., Schmidt, R. E., Bockhorn, M., Lehmann, C., Balagopal, A., Hauber, J., Van Lunzen, J., & Wiesch, J. S. Zur. (2014). CD161+ MAIT cells are severely reduced in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals independently of disease progression. *PloS One*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0111323>
48. Eckle, S. B. G., Corbett, A. J., Keller, A. N., Chen, Z., Godfrey, D. I., Liu, L., Mak, J. Y. W., Fairlie, D. P., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2015). Recognition of Vitamin B precursors and byproducts by mucosal associated invariant T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(51), 30204–30211. <https://doi.org/10.1074/JBC.R115.685990>
49. Edholm, E.-S., Grayfer, L., & Robert, J. (n.d.). *Evolution of nonclassical MHC-dependent invariant T cells*. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1701-5>
50. Ekström-Smedby, K. (2006). Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma – a review. *Acta Oncologica*, 45(3), 258–271. <https://doi.org/10.1080/02841860500531682>
51. Emgård, J., Bergsten, H., McCormick, J. K., Barrantes, I., Skrede, S., Sandberg, J. K., & Norrby-Teglund, A. (2019). MAIT cells are major contributors to the cytokine response in group A streptococcal toxic shock syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), 25923–25931. https://doi.org/10.1073/PNAS.1910883116/SUPPL_FILE/PNAS.1910883116.SAPP.PDF

52. Engels, E. A., Lau, J., & Barza, M. (1998). Efficacy of quinolone prophylaxis in neutropenic cancer patients: A meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, *16*(3), 1179–1187. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.3.1179>
53. Fabre, J., Giustiniani, J., Garbar, C., Antonicelli, F., Merrouche, Y., Bensussan, A., Bagot, M., & Al-Dacak, R. (2016). Targeting the tumor microenvironment: The protumor effects of IL-17 related to cancer type. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS17091433>
54. Fan, Q., Nan, H., Li, Z., Li, B., Zhang, F., & Bi, L. (2023). New insights into MAIT cells in autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *159*, 114250. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.114250>
55. Favreau, M., Venken, K., Faict, S., Maes, K., De Veirman, K., De Bruyne, E., Leleu, X., Boon, L., Elewaut, D., Vanderkerken, K., & Menu, E. (2017). Both mucosal-associated invariant and natural killer T-cell deficiency in multiple myeloma can be countered by PD-1 inhibition. *Haematologica*, *102*(7), e266–e270. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2017.163758>
56. Fergusson, J. R., Ussher, J. E., Kurioka, A., Klenerman, P., & Walker, L. J. (2018). High MDR-1 expression by MAIT cells confers resistance to cytotoxic but not immunosuppressive MDR-1 substrates. *Clinical and Experimental Immunology*, *194*(2), 180–191. <https://doi.org/10.1111/CEI.13165>
57. Fergusson, J., Smith, K., Fleming, V., reports, N. R.-C., & 2014, undefined. (n.d.). CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Elsevier*. Retrieved May 9, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714008286>
58. Fraenkel, P. G. (2017). Anemia of Inflammation: A Review. *The Medical Clinics of North America*, *101*(2), 285. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2016.09.005>
59. Gao, M. G., Hong, Y., Zhao, X. Y., Pan, X. A., Sun, Y. Q., Kong, J., Wang, Z. D., Wang, F. R., Wang, J. Z., Yan, C. H., Wang, Y., Huang, X. J., & Zhao, X. S. (2021). The Potential Roles of Mucosa-Associated Invariant T Cells in the Pathogenesis of Gut Graft-Versus-Host Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.720354/FULL>

60. Gargano, F., Guerrera, G., Piras, E., ... B. S. – H., & ncbi.nlm.nih.gov, 2022 – . (n.d.). Proinflammatory mucosal-associated invariant CD8⁺ T cells react to gut flora yeasts and infiltrate multiple sclerosis brain
61. Retrieved May 17, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9376942/>
62. Gherardin, N. A., Keller, A. N., Woolley, R. E., Le Nours, J., Ritchie, D. S., Neeson, P. J., Birkinshaw, R. W., Eckle, S. B. G., Waddington, J. N., Liu, L., Fairlie, D. P., Uldrich, A. P., Pellicci, D. G., McCluskey, J., Godfrey, D. I., & Rossjohn, J. (2016). Diversity of T Cells Restricted by the MHC Class I-Related Molecule MR1 Facilitates Differential Antigen Recognition. *Immunity*, 44(1), 32–45. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.12.005>
63. Gherardin, N. A., Loh, L., Admojo, L., Davenport, A. J., Richardson, K., Rogers, A., Darcy, P. K., Jenkins, M. R., Prince, H. M., Harrison, S. J., Quach, H., Fairlie, D. P., Kedzierska, K., McCluskey, J., Uldrich, A. P., Neeson, P. J., Ritchie, D. S., & Godfrey, D. I. (2018). Enumeration, functional responses and cytotoxic capacity of MAIT cells in newly diagnosed and relapsed multiple myeloma. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22130-1>
64. Gherardin, N. A., Souter, M. N. T., Koay, H. F., Mangas, K. M., Seemann, T., Stinear, T. P., Eckle, S. B. G., Berzins, S. P., d’Udekem, Y., Konstantinov, I. E., Fairlie, D. P., Ritchie, D. S., Neeson, P. J., Pellicci, D. G., Uldrich, A. P., McCluskey, J., & Godfrey, D. I. (2018). Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunology and Cell Biology*, 96(5), 507–525. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12021>
65. Gibbs, A., Leeansyah, E., Introini, A., Paquin-Proulx, D., Hasselrot, K., Andersson, E., Broliden, K., Sandberg, J. K., & Tjernlund, A. (2017). MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunology*, 10(1), 35–45. <https://doi.org/10.1038/MI.2016.30>
66. Gil, L., Kozłowska-Skrzypczak, M., Mol, A., Poplawski, D., Styczynski, J., & Komarnicki, M. (2009). Increased risk for invasive aspergillosis in patients with lymphoproliferative diseases after autologous hematopoietic SCT. *Bone*

Marrow Transplantation, 43(2), 121–126.

<https://doi.org/10.1038/BMT.2008.303>

67. Godfrey, D. I., Koay, H. F., McCluskey, J., & Gherardin, N. A. (2019). The biology and functional importance of MAIT cells. *Nature Immunology*, 20(9), 1110–1128. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0444-8>
68. Gold, M. C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M. E., Vogt, T. M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G. M., Chua, W. J., Yu, Y. Y. L., Lantz, O., Cook, M. S., Null, M. D., Jacoby, D. B., Harriff, M. J., Lewinsohn, D. A., Hansen, T. H., & Lewinsohn, D. M. (2010). Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biology*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000407>
69. Gold, M. C., Eid, T., Smyk-Pearson, S., Eberling, Y., Swarbrick, G. M., Langley, S. M., Streeter, P. R., Lewinsohn, D. A., & Lewinsohn, D. M. (2013). Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunology*, 6(1), 35–44. <https://doi.org/10.1038/MI.2012.45>
70. Gold, M. C., McLaren, J. E., Reistetter, J. A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G. M., Yu, Y. Y. L., Hansen, T. H., Lund, O., Nielsen, M., Gerritsen, B., Kesmir, C., Miles, J. J., Lewinsohn, D. A., Price, D. A., & Lewinsohn, D. M. (2014). MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/JEM.20140507>
71. Gold, M. C., Napier, R. J., & Lewinsohn, D. M. (2015). MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunological Reviews*, 264(1), 154–166. <https://doi.org/10.1111/IMR.12271>
72. Goswami, S., Wu, L., Zhou, J., Duan, M., Shi, J.-Y., Wu, L.-J., Wang, X.-Y., Ma, J.-Q., Zhang, Z., Shi, Y., Ma, L.-J., Zhang, S., Xi, R.-B., Cao, Y., Zhou, J., Fan, J., Zhang, X.-M., & Gao, Q. (2022). Activated and Exhausted MAIT Cells Foster Disease Progression and Indicate Poor Outcome in Hepatocellular Carcinoma

73. . *Clinical Cancer Research*, 25(11), 3304–3316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3040>
74. Gracey, E., Qaiyum, Z., ... I. A. – A. of the, & ard. . Retrieved May 17, 2023, from <https://ard.bmj.com/content/75/12/2124.short>
75. Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T., & Brenner, M. B. (2002). Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. *Journal of Experimental Medicine*, 195(5), 625–636. <https://doi.org/10.1084/JEM.20011786>
76. Haeryfar, S. M. M., Shaler, C. R., & Rudak, P. T. (2018). Mucosa-associated invariant T cells in malignancies: a faithful friend or formidable foe? *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 67(12), 1885–1896. <https://doi.org/10.1007/S00262-018-2132-1>
77. Haeryfar, S. M. (2020). MAIT cells in COVID-19: heroes, villains, or both?. *Critical Reviews™ in Immunology*, 40(2). <https://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,62b8a7004695c197,3b2722c3786d7296.html>
78. Haga, K., Chiba, A., Shibuya, T., Osada, T., Ishikawa, D., Kodani, T., Nomura, O., Watanabe, S., & Miyake, S. (2016). MAIT cells are activated and accumulated in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 31(5), 965–972. <https://doi.org/10.1111/JGH.13242>
79. Hayashi, E., Chiba, A., Tada, K., & Haga, K. (2016). Zapojení invariantních T buněk spojených se sliznicí u ankylozující spondylitidy. *The Journal Of*. <https://www.jrheum.org/content/43/9/1695.short>
80. Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., & Davis, M. M. (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, 308(5955), 149–153. <https://doi.org/10.1038/308149a0>
81. Hegde, P., Weiss, E., Paradis, V., Wan, J., Mabire, M., Sukriti, S., Rautou, P. E., Albuquerque, M., Picq, O., Gupta, A. C., Ferrere, G., Gilgenkrantz, H., Kiaf, B., Toubal, A., Beaudoin, L., Lettéron, P., Moreau, R., Lehuen, A., & Lotersztajn, S. (2018). Mucosal-associated invariant T cells are a profibrogenic immune cell population in the liver. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-04450-Y>

82. Hennecke, J., & Wiley, D. C. (2001). T Cell Receptor-MHC Minireview Interactions up Close I MHC molecules the peptide, usually derived from proteins in the cytoplasm of any cell, is generated by the proteasome, transported into the endoplasmic reticu. *Cell*, *104*, 1–4.
83. Herbrecht, R., Neuville, S., Letscher-Bru, V., Natarajan-Amé, S., & Lortholary, O. (2000). Fungal infections in patients with neutropenia: challenges in prophylaxis and treatment. *Drugs & Aging*, *17*(5), 339–351. <https://doi.org/10.2165/00002512-200017050-00002>
84. Hill, T. M., Bezbradica, J. S., Kaer, L., & Joyce, S. (2016). CD1d -Restricted Natural Killer T Cells . *ELS*, 1–27. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0020180.PUB2>
85. Hinks, T. S. C., & Zhang, X. W. (2020). MAIT Cell Activation and Functions. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1014. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01014/BIBTEX>
86. Huang, S., Martin, E., Kim, S., Yu, L., Soudais, C., Fremont, D. H., Lantz, O., & Hansen, T. H. (2009). MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells was highly conserved in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8290–8295. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903196106>
87. Ioannidis, M., Cerundolo, V., & Salio, M. (2020). The Immune Modulating Properties of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1556. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01556>
88. Ivanov, S., Paget, C., & Trottein, F. (2014). Role of Non-conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus. *PLoS Pathogens*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004300>
89. Jahreis, S., Böttcher, S., Hartung, S., Rachow, T., Rummeler, S., Dietl, A.-M., Haas, H., Hochhaus, A., & Von Lilienfeld-Toal, M. (2018). Human MAIT cells are rapidly activated by *Aspergillus* spp. in an APC-dependent manner. *Eur. J. Immunol*, *48*(10), 1698–1706. <https://doi.org/10.1002/eji.201747312>
90. Jantunen, E., Itälä, M., Lehtinen, T., Kuittinen, O., Koivunen, E., Leppä, S., Juvonen, E., Koistinen, P., Wiklund, T., Nousiainen, T., Remes, K., & Volin, L. (2006). Early treatment-related mortality in adult autologous stem cell

transplant recipients: a nation-wide survey of 1482 transplanted patients.

European Journal of Haematology, 76(3), 245–250.

<https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.2005.00605.X>

91. Jeffery, H. C., Van Wilgenburg, B., Kurioka, A., Parekh, K., Stirling, K., Roberts, S., Dutton, E. E., Hunter, S., Geh, D., Braitch, M. K., Rajanayagam, J., Iqbal, T., Pinkney, T., Brown, R., Withers, D. R., Adams, D. H., Klenerman, P., & Oo, Y. H. (2016). Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *Journal of Hepatology*, 64(5), 1118–1127. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.12.017>
92. Jo, J., Tan, A. T., Ussher, J. E., Sandalova, E., Tang, X. Z., Tan-Garcia, A., To, N., Hong, M., Chia, A., Gill, U. S., Kennedy, P. T., Tan, K. C., Lee, K. H., De Libero, G., Gehring, A. J., Willberg, C. B., Klenerman, P., & Bertoletti, A. (2014). Toll-like receptor 8 agonist and bacteria trigger potent activation of innate immune cells in human liver. *PLoS Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004210>
93. Kaloyannidis, P., Hashmi, H. Al, Rauf, M. S., Maghfoor, I., Salman, H., Kafnar, S., Darweesh, M., Mutahar, E., Shaibani, E. Al, Bacal, J., Apostolidis, I., Elhassan, T. A., Anezi, K. Al, & Akhtar, S. S. (2019). BEAM Versus Single Agent High Dose Melphalan (HDM) Conditioning Regimen for Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant (ASCT): A Retrospective Matched Analysis in Relapse/Refractory Hodgkin Lymphoma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(3), S187–S188. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.773>
94. Karlova Zubata, I., Smetanova Brozova, J., Karel, T., Bacova, B., & Novak, J. (2023). High pre-transplant Mucosal Associated Invariant T Cell (MAIT) count predicts favorable course of myeloid aplasia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 167. <https://doi.org/10.5507/bp.2023.011>
95. Kato, H., Yamamoto, K., Matsuo, K., Oki, Y., Taji, H., Kuwatsuka, Y., Seto, M., Kagami, Y., & Morishima, Y. (2010). Clinical impact and predisposing factors of delayed-onset neutropenia after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for B-cell non-Hodgkin lymphoma: association with an incremental risk of infectious events. *Annals of Oncology : Official Journal of*

the European Society for Medical Oncology, 21(8), 1699–1705.

<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ008>

96. Kawaguchi, K., Umeda, K., Hiejima, E., ... A. I.-I. journal of, & 2018, undefined. (2018). Influence of post-transplant mucosal-associated invariant T cell recovery on the development of acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow. *Springer*, 108(1), 66–75.
<https://doi.org/10.1007/s12185-018-2442-2>
97. Kelly, J., Minoda, Y., Meredith, T., Cameron, G., Philipp, M. S., Pellicci, D. G., Corbett, A. J., Kurts, C., Gray, D. H. D., Godfrey, D. I., Kannourakis, G., & Berzins, S. P. (2019). Chronically stimulated human MAIT cells are unexpectedly potent IL-13 producers. *Immunology and Cell Biology*, 97(8), 689–699. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12281>
98. Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A. J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N. A., Purcell, A. W., Dudek, N. L., McConville, M. J., O’Hair, R. A. J., Khairallah, G. N., Godfrey, D. I., Fairlie, D. P., Rossjohn, J., & McCluskey, J. (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*, 491(7426), 717–723. <https://doi.org/10.1038/NATURE11605>
99. Klein, E. M., Sauer, S., Klein, S., Tichy, D., Benner, A., Bertsch, U., Brandt, J., Kimmich, C., Goldschmidt, H., Müller-Tidow, C., Jordan, K., & Giesen, N. (2021). Antibiotic prophylaxis or granulocyte-colony stimulating factor support in multiple myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Cancers*, 13(14).
<https://doi.org/10.3390/CANCERS13143439/S1>
100. Koppejan, H., Jansen, D. T. S. L., Hameetman, M., Thomas, R., Toes, R. E. M., & Van Gaalen, F. A. (2019). Altered composition and phenotype of mucosal-associated invariant T cells in early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S13075-018-1799-1>
101. Kurioka, A., Ussher, J. E., Cosgrove, C., Clough, C., Fergusson, J. R., Smith, K., Kang, Y. H., Walker, L. J., Hansen, T. H., Willberg, C. B., & Klenerman, P. (2015). MAIT cells are licensed through granzyme exchange to

- kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunology*, 8(2), 429–440.
<https://doi.org/10.1038/MI.2014.81>
102. Kurioka, A., Walker, L. J., Klenerman, P., & Willberg, C. B. (2016). MAIT cells: new guardians of the liver. *Clinical & Translational Immunology*, 5(8), e98. <https://doi.org/10.1038/CTI.2016.51>
103. Lambolez, F., Arcangeli, M. L., Joret, A. M., Pasqualetto, V., Cordier, C., Di Santo, J. P., Rocha, B., & Ezine, S. (2005). The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nature Immunology* 2005 7:1, 7(1), 76–82. <https://doi.org/10.1038/ni1293>
104. Lameire, N. (2013). *In-depth Review Nephrotoxicity of recent anti-cancer agents*. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft135>
105. Lamichhane, R., Schneider, M., De La, S. M., Tyndall, J. D. A., Vernall, A. J., & Ussher Correspondence, J. E. (2019). TCR- or Cytokine-Activated CD8⁺ Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. *CellReports*, 28, 3061–3076.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.054>
106. Lanier, L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495–502 (2008). <https://doi.org/10.1038/ni1581>
107. Lantz, O., & Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor α Chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4-8- T cells in mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 1077–1106. <https://doi.org/10.1084/JEM.180.3.1097>
108. Lantz, O., & Legoux, F. (2018). MAIT cells: an historical and evolutionary perspective. *Immunology and Cell Biology*, 96(6), 564–572.
<https://doi.org/10.1111/IMCB.1034>
109. Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N. E., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M. L., Soudais, C., & Lantz, O. (2013). MAIT Cells Detect and Efficiently Lyse Bacterially-Infected Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003681>
110. Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., Ngo, C., Riteau, B., Duban, L., Robert, D., Rottman, M., Soudais, C., & Lantz, O. (2010a).

- Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nature Immunology*, 11(8), 701–708. <https://doi.org/10.1038/NI.1890>
111. Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., Ngo, C., Riteau, B., Duban, L., Robert, D., Rottman, M., Soudais, C., & Lantz, O. (2010b). Erratum: Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells (Nature Immunology (2010) 11 (701-708)). *Nature Immunology*, 11(10), 969. <https://doi.org/10.1038/NI1010-969A>
 112. Lee, M. Y., Chiou, T. J., Hsiao, L. T., Yang, M. H., Lin, P. C., Poh, S. B., Yen, C. C., Liu, J. H., Teng, H. W., Chao, T. C., Wang, W. S., & Chen, P. M. (2008). Rituximab therapy increased post-transplant cytomegalovirus complications in Non-Hodgkin's lymphoma patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of Hematology*, 87(4), 285–289. <https://doi.org/10.1007/S00277-007-0397-0>
 113. Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L., & Bendelac, A. (2002). Distinct Functional Lineages of Human V α 24 Natural Killer T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(5), 637–641. <https://doi.org/10.1084/JEM.20011908>
 114. Leeansyah, E., Ganesh, A., Blood, M. Q. –, Journal, T., & ashpublications.org, 2013 –. (n.d.). Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. Retrieved May 9, 2023, from <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/121/7/1124/31520>
 115. Lelubre, C., Anselin, S., Zouaoui Boudjeltia, K., Biston, P., & Piagnerelli, M. (2013). Interpretation of C-reactive protein concentrations in critically ill patients. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/124021>
 116. Leng, T., Akther, H., Hackstein, C., Powell, K., reports, T. K.-C., & 2019, undefined. (n.d.). TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions. *Cell.Com*. Retrieved May 16, 2023, from [https://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247\(19\)31098-8.pdf](https://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247(19)31098-8.pdf)

117. Lepore, M., Kalinichenko, A., Colone, A., Paleja, B., Singhal, A., Tschumi, A., Lee, B., Poidinger, M., Zolezzi, F., Quagliata, L., Sander, P., Newell, E., Bertoletti, A., Terracciano, L., De Libero, G., & Mori, L. (2014). Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β 2 repertoire. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS4866>
118. Leung, N., Slezak, J. M., Bergstralh, E. J., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Wolf, R. C., & Gertz, M. A. (2005). Acute renal insufficiency after high-dose melphalan in patients with primary systemic amyloidosis during stem cell transplantation. *American Journal of Kidney Diseases*, 45(1), 102–111. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.09.015>
119. Li, Y., Huang, B., Jiang, X., Chen, W., Zhang, J., Wei, Y., Chen, Y., Lian, M., Bian, Z., Miao, Q., Peng, Y., Fang, J., Wang, Q., Tang, R., Gershwin, M. E., & Ma, X. (2018). Mucosal-associated invariant T cells improve nonalcoholic fatty liver disease through regulating macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01994/FULL>
120. Li, Y. R., Zhou, K., Wilson, M., Kramer, A., Zhu, Y., Dawson, N., & Yang, L. (2023). Mucosal-associated invariant T cells for cancer immunotherapy. *Molecular Therapy*, 31(3), 631–646. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2022.11.019>
121. Lin, Q., Kuypers, M., Philpott, D. J., & Mallewaey, T. (2020). The dialogue between unconventional T cells and the microbiota. *Mucosal Immunology*, 13(6), 867–876. <https://doi.org/10.1038/S41385-020-0326-2>
122. Lin, R. Y., Trivino, M. R., Curry, A., Pesola, G. R., Knight, R. J., Lee, H. S., Bakalchuk, L., Tenenbaum, C., & Westfal, R. E. (2001). Interleukin 6 and C-reactive protein levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 87(5), 412–416. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62923-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62923-7)
123. Ling, L., Lin, Y., Zheng, W. *et al.* Circulating and tumor-infiltrating mucosal associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients. *Sci Rep* 6, 20358 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep20358>

124. Loh, L., Wang, Z., Sant, S., Koutsakos, M., Jegaskanda, S., Corbett, A. J., Liu, L., Fairlie, D. P., Crowe, J., Rossjohn, J., Xu, J., Doherty, P. C., McCluskey, J., & Kedzierska, K. (2016). Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18- dependent activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(36), 10133–10138. https://doi.org/10.1073/PNAS.1610750113/SUPPL_FILE/PNAS.201610750S1.PDF
125. Madias, N. E., & Harrington, J. T. (1978). Platinum nephrotoxicity. *The American Journal of Medicine*, *65*(2), 307–314. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90825-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90825-2)
126. Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., Meierovics, A. I., Yabe, I., & Cowley, S. C. (2015). Control of Francisella tularensis intracellular growth by pulmonary epithelial cells. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138565>
127. Mak, J. Y. W., Xu, W., Reid, R. C., Corbett, A. J., Meehan, B. S., Wang, H., Chen, Z., Rossjohn, J., McCluskey, J., Liu, L., & Fairlie, D. P. (2017). Stabilizing short-lived Schiff base derivatives of 5-aminouracils that activate mucosal-associated invariant T cells. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14599>
128. Malissen, M., Minard, K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Goverman, J., Hunkapiller, T., Prystowsky, M. B., Yoshikai, Y., Fitch, F., Mak, T. W., & Hood, L. (1984). Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. *Cell*, *37*(3), 1101–1110. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90444-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90444-6)
129. Marini, C., Maia, T., Bergantim, R., Pires, J., Aguiar, E., Guimarães, J. E., & Trigo, F. (2019). Real-life data on safety and efficacy of autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma. *Annals of Hematology*, *98*(2), 369–379. <https://doi.org/10.1007/S00277-018-3528-X/FIGURES/4>
130. Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I. C., Tilloy, F., Cherif, S., Vera, G., Latour, S., Soudais, C., & Lantz, O. (2009). Stepwise development of mait cells in mouse

- and human. *PLoS Biology*, 7(3), 0525–0536. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000054>
131. Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Lè Ne Laude, H., Cile Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I. C., Tilloy, F., Phane Cherif, S., Vera, G., Latour, S., Soudais, C., & Lantz, O. (n.d.). Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. <https://doi.org/10.1371/journal>
 132. McCann, S., Schwenkglenks, M., ... P. B.-B. marrow, & 2009, undefined. (2009). The Prospective Oral Mucositis Audit: relationship of severe oral mucositis with clinical and medical resource use outcomes in patients receiving high-dose melphalan. *Nature.Com*, 43(2), 141–147. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.299>
 133. McWilliam, H. E. G., Eckle, S. B. G., Theodosis, A., Liu, L., Chen, Z., Wubben, J. M., Fairlie, D. P., Strugnell, R. A., Mintern, J. D., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Villadangos, J. A. (2016). The intracellular pathway for the presentation of Vitamin B-related antigens by the antigen-presenting molecule MR1. *Nature Immunology*, 17(5), 531–537. <https://doi.org/10.1038/NI.3416>
 134. Meermeier, E. W., Harriff, M. J., Karamooz, E., & Lewinsohn, D. M. (2018). MAIT cells and microbial immunity. *Immunology and Cell Biology*, 96(6), 607. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12022>
 135. Meermeier, E. W., Laugel, B. F., Sewell, A. K., Corbett, A. J., Rossjohn, J., McCluskey, J., Harriff, M. J., Franks, T., Gold, M. C., & Lewinsohn, D. M. (2016). Human TRAV1-2- negative MR1-restricted T cells detect *S. pyogenes* and alternatives to MAIT riboflavin-based antigens. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms12506>
 136. Mehta, H., Lett, M. J., Klenerman, P., & Filipowicz Sinnreich, M. (2022). MAIT cells in liver inflammation and fibrosis. *Seminars in Immunopathology*, 44(4), 429. <https://doi.org/10.1007/S00281-022-00949-1>
 137. Melo, A. M., O'Brien, A. M., Phelan, J. J., Kennedy, S. A., Wood, N. A. W., Veerapen, N., Besra, G. S., Clarke, N. E., Foley, E. K., Ravi, A., MacCarthy, F., O'Toole, D., Ravi, N., Reynolds, J. V., Conroy, M. J., Hogan, A. E., O'Sullivan, J., & Dunne, M. R. (2019). Mucosal-associated invariant T cells display diminished effector capacity in oesophageal adenocarcinoma.

Frontiers in Immunology, 10(JULY).

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01580/FULL>

138. Miceli, M. H., Barlogie, B., Miceli, M. H., Dong, L., Graziutti, M. L., Fassas, A., Thertulien, R., Rhee, V., Barlogie, B., & Anaissie, E. J. (2006). Iron overload is a major risk factor for severe infection after autologous stem cell transplantation: a study of 367 myeloma patients. *Nature.Com*, 37(9), 857–864. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705340>
139. Miller, J. F. A. P. (1961). IMMUNOLOGICAL FUNCTION OF THE THYMUS. *The Lancet*, 278(7205), 748–749. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)90693-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(61)90693-6)
140. Mohan, J. F., & Unanue, E. R. (2012). Unconventional recognition of peptides by T cells and the implications for autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 12(10), 721–728. <https://doi.org/10.1038/NRI3294>
141. Mohyuddin, G. R., Abbasi, S., Okoniewski, M., McClune, B., Abdallah, A. O., Ganguly, S., McGuirk, J., & Shune, L. (2020). Inpatient mortality of patients with multiple myeloma and renal impairment undergoing autologous stem cell transplantation. *European Journal of Haematology*, 105(5), 571–577. <https://doi.org/10.1111/EJH.13487>
142. Momotow, J., Borchmann, S., Eichenauer, D. A., Engert, A., Sasse, S., Engert@uni, A., & De (-Koeln. (2021). Clinical Medicine Hodgkin Lymphoma-Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. *J. Clin. Med*, 10. <https://doi.org/10.3390/jcm10051125>
143. Neefjes, J., Jongasma, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/NRI3084>
144. Nel, I., Bertrand, L., Toubal, A., & Lehuen, A. (2021). MAIT cells, guardians of skin and mucosa? *Mucosal Immunology* 2021 14:4, 14(4), 803–814. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00391-w>
145. Nucci, M., & Anaissie, E. (2015). *Infections After High-Dose Chemotherapy and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44000-1_4

146. Nucci, M., Diseases, E. A.-C. I., & 2009, undefined. (2009). Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents. *Academic. Oup. Com*, 49(8), 1211–1236.
<https://doi.org/10.1086/605664>
147. Oliveira, S. C., Harms, J. S., Rech, E. L., Rodarte, R. S., Bocca, A. L., Goes, A. M., & Splitter, G. A. (1998). The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), 77–84. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100010>
148. Pagano, L., Caira, M., Nosari, A., & Rossi, G. (2011). Etiology of Febrile Episodes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From the Hema e-Chart Registry.
<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/1105898>
149. Panichi, V., Migliori, M., De Pietro, S., Taccola, D., Bianchi, A. M., Norpoth, M., Metelli, M. R., Giovannini, L., Tetta, C., & Palla, R. (2001). C reactive protein in patients with chronic renal diseases. *Renal Failure*, 23(3–4), 551–562. <https://doi.org/10.1081/JDI-100104737>
150. Paquin-Proulx, D., Avelino-Silva, V. I., Santos, B. A. N., Silveira Barsotti, N., Siroma, F., Fernandes Ramos, J., Coracini Tonacio, A., Song, A., Maestri, A., Barros Cerqueira, N., Felix, A. C., Levi, J. E., Greenspun, B. C., de Mulder Rougvie, M., Rosenberg, M. G., Nixon, D. F., & Kallas, E. G. (2018). MAIT cells are activated in acute Dengue virus infection and after in vitro Zika virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006154>
151. Parnes, J. R., Von Hoegen, P., Miceli, M. C., & Zamoyska, R. (1989). Role of CD4 and CD8 in Enhancing T-cell Responses to Antigen. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54(2), 649–655.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.076>
152. Paskan, L., & Kasper, D. L. (2017). Building Conventions for Unconventional Lymphocytes. *Immunological Reviews*, 279(1), 52.
<https://doi.org/10.1111/IMR.12576>

153. Patterson, M. T., Nunes, N. S., Wachsmuth, L. P., Panjabi, A., Fletcher, R. E., Khan, S. M., Dimitrova, D., Kanakry, J. A., Luznik, L., & Kanakry, C. G. (2022). Efflux capacity and aldehyde dehydrogenase both contribute to CD8+ T-cell resistance to posttransplant cyclophosphamide. *Blood Advances*, 6(17), 4994–5008. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2022006961>
154. Peterfalvi, A., Gomori, E., Magyarlaki, T., Pal, J., Banati, M., Javorhazy, A., Szekeres-Bartho, J., Szereday, L., & Illes, Z. (2008). Invariant Va7.2-J α 33 TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. *International Immunology*, 20(12), 1517–1525. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXN111>
155. Philip, T., Guglielmi, C., Hagenbeek, A., Somers, R., Van Der Lelie, H., Bron, D., Sonneveld, P., Gisselbrecht, C., Cahn, J.-Y., Harousseau, J.-L., Coiffier, B., Biron, P., Mandelli, F., & Chauvin, F. (1995). Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 333(23), 1540–1545. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512073332305>
156. Pisarska, M., Dunne, M., ... D. O. – E. J. of, & Library, 2020 – Wiley Online. (2020). Interleukin-17 producing mucosal associated invariant T cells - emerging players in chronic inflammatory diseases? *Eur. J. Immunol.* 2020, 50(8), 1098–1108. <https://doi.org/10.1002/eji.202048645>
157. Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B., & Balk, S. P. (1993). Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4–8– $\alpha\beta$ T cells demonstrates preferential use of several V β genes and an invariant TCR α chain. *Journal of Experimental Medicine*, 178(1), 1–16. <https://doi.org/10.1084/JEM.178.1.1>
158. Pramanik, R., Kancharla, H., Bakhshi, S., Sharma, A., Gogia, A., Malik, P., Sahoo, R. K., Batra, A., Thulkar, S., & Kumar, L. (2019). Engraftment Syndrome: A Retrospective Analysis of the Experience at a Tertiary Care Institute. *Clinical Hematology International*, 1(2), 114. <https://doi.org/10.2991/CHL.D.190504.001>
159. *Prognóza lymfomu pokročila nejvíc ze všech nádorových onemocnění | MT.* (n.d.). Retrieved May 2, 2023, from

<https://www.tribune.cz/medicina/prognoza-lymfomu-pokrocila-nejvic-ze-vsech-nadorovych-onemocneni/>

160. Provine, N. M., Amini, A., Garner, L. C., Spencer, A. J., Dold, C., Hutchings, C., Reyes, L. S., FitzPatrick, M. E. B., Chinnakannan, S., Oguti, B., Raymond, M., Ulaszewska, M., Troise, F., Sharpe, H., Morgan, S. B., Hinks, T. S. C., Lambe, T., Capone, S., Folgiori, A., ... Klenerman, P. (2021). MAIT cell activation augments adenovirus vector vaccine immunogenicity. *Science*, 371(6528).
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAX8819/SUPPL_FILE/AAX8819_PROVINE_SM.PDF
161. Provine, N. M., & Klenerman, P. (2020). MAIT Cells in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 38, 203–228.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-080719-015428>
162. Rahimpour, A., Koay, H. F., Enders, A., Clanchy, R., Eckle, S. B. G., Meehan, B., Chen, Z., Whittle, B., Liu, L., Fairlie, D. P., Goodnow, C. C., McCluskey, J., Rossjohn, J., Uldrich, A. P., Pellicci, D. G., & Godfrey, D. I. (2015). Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 1095–1108.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20142110>
163. Rajkumar, S., Krve, S. K.-časopis o rakovině, & 2020, undefined. (n.d.). Multiple myeloma current treatment algorithms. *Nature.Com*. Retrieved May 3, 2023, from <https://www.nature.com/articles/s41408-020-00359-2>
164. Rajkumar, S. V. (2022). Multiple Myeloma: 2022 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *American Journal of Hematology*, 97(8), 1086. <https://doi.org/10.1002/AJH.26590>
165. Ramphal, R., Grant, R. M., Dzolganovski, B., Constantin, J., Tellier, R., Allen, U., Weitzman, S., Matlow, A., Petric, M., & Sung, L. (2007). Herpes simplex virus in febrile neutropenic children undergoing chemotherapy for cancer: A prospective cohort study. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(8), 700–704. <https://doi.org/10.1097/INF.0B013E31805CDC11>
166. Reantragoon, R., Corbett, A., ... I. S. – J. of E., & rupress.org, 2013 –. (n.d.). Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in

- mucosal-associated invariant T cells. Retrieved April 25, 2023, from <https://rupress.org/jem/article-abstract/210/11/2305/41566>
167. Reantragoon, R., Corbett, A. J., Sakala, I. G., Gherardin, N. A., Furness, J. B., Chen, Z., Eckle, S. B. G., Uldrich, A. P., Birkinshaw, R. W., Patel, O., Kostenko, L., Meehan, B., Kedzierska, K., Liu, L., Fairlie, D. P., Hansen, T. H., Godfrey, D. I., Rossjohn, J., McCluskey, J., & Kjer-Nielsen, L. (2013). Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(11), 2305. <https://doi.org/10.1084/JEM.20130958>
168. Reid, R. M., Baran, A., Friedberg, J. W., Phillips, G. L., Liesveld, J. L., Becker, M. W., Wedow, L., Barr, P. M., & Milner, L. A. (2016). Outpatient administration of BEAM conditioning prior to autologous stem cell transplantation for lymphoma is safe, feasible, and cost-effective. *Cancer Medicine*, *5*(11), 3059–3067. <https://doi.org/10.1002/CAM4.879>
169. Renand, A., Habes, S., Mosnier, J. F., Aublé, H., Judor, J. P., Vince, N., Hulin, P., Nedellec, S., Métairie, S., Archambeaud, I., Brouard, S., Gournay, J., & Conchon, S. (2018). Immune Alterations in Patients With Type 1 Autoimmune Hepatitis Persist Upon Standard Immunosuppressive Treatment. *Hepatology Communications*, *2*(8), 972–985. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1202>
170. Richman, S. A., Aggen, D. H., Dossett, M. L., Donermeyer, D. L., Allen, P. M., Greenberg, P. D., & Kranz, D. M. (2009). Structural features of T cell receptor variable regions that enhance domain stability and enable expression as single-chain V α V β fragments. *Mol Immunol*, *46*(5), 902–916. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.021>
171. Riegert, P., Wanner, V., & Bahram, S. (1998). Genomics, Isoforms, Expression, and Phylogeny of the MHC Class I-Related MR1 Gene. *The Journal of Immunology*, *161*(8), 4066–4077. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.8.4066>
172. Roodman, G. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* *23*, 435–441 (2009). <https://doi.org/10.1038/leu.2008.336>

173. Salerno-Gonçalves, R., Rezwan, T., & Szein, M. B. (2014). B cells modulate mucosal associated invariant T cell immune responses. *Frontiers in Immunology*, 4(DEC). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00511/FULL>
174. Sampson, M. M., Nanjappa, S., & Greene, J. N. (2017). Mucositis and oral infections secondary to gram negative rods in patients with prolonged neutropenia. *IDCases*, 9, 101. <https://doi.org/10.1016/J.IDCR.2017.06.014>
175. Sattler, A., Dang-Heine, C., Reinke, P., & Babel, N. (2015). IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *European Journal of Immunology*, 45(8), 2286–2298. <https://doi.org/10.1002/EJI.201445313>
176. Sattler, A., Dang-Heine, C., žurnál..., P. R. – evropský, & Library, 2015 – Wiley Online. (2015). IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *Eur. J. Immunol*, 45(8), 2286–2298. <https://doi.org/10.1002/eji.201445313>
177. Schag, C. C., Heinrich, R. L., & Ganz, P. A. (1984). Karnofsky performance status revisited: reliability, validity, and guidelines. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2(3), 187–193. <https://doi.org/10.1200/JCO.1984.2.3.187>
178. Seliger, B. (2019). The Role of the Lymphocyte Functional Crosstalk and Regulation in the Context of Checkpoint Inhibitor Treatment—Review. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02043>
179. Setsu, T., Yamagiwa, S., Tominaga, K., Kimura, N., Honda, H., Kamimura, H., Tsuchiya, A., Takamura, M., & Terai, S. (2018). Persistent reduction of mucosal-associated invariant T cells in primary biliary cholangitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 33(6), 1286–1294. <https://doi.org/10.1111/JGH.14076>
180. Shaler, C. R., Choi, J., Rudak, P. T., Memarnejadian, A., Szabo, P. A., Tun-Abraham, M. E., Rossjohn, J., Corbett, A. J., McCluskey, J., McCormick, J. K., Lantz, O., Hernandez-Alejandro, R., & Haeryfar, S. M. M. (2017). MAIT cells launch a rapid, robust and distinct hyperinflammatory response to bacterial superantigens and quickly acquire an anergic phenotype that impedes their cognate antimicrobial function: Defining a novel mechanism of

- superantigen-induced immunopathology and immunosuppression. *PLOS Biology*, *15*(6), e2001930. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2001930>
181. Shao, C., Zhu, C., Zhu, Y., Hao, J., Li, Y., Hu, H., Si, L., Zhong, F., Wang, X., & Wang, H. (2021). Decrease of peripheral blood mucosal-associated invariant T cells and impaired serum Granzyme-B production in patients with gastric cancer. *Cell and Bioscience*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00518-9/FIGURES/5>
182. Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R., & Rich, R. R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-b molecules. *Annual Review of Immunology*, *12*, 839–880. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.12.040194.004203>
183. Sheean, P. M., Freels, S. A., Helton, W. S., & Braunschweig, C. A. (2006). Adverse Clinical Consequences of Hyperglycemia from Total Parenteral Nutrition Exposure during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *12*(6), 656–664. <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2006.01.010>
184. Shi, J., Zhou, J., Zhang, X., Hu, W., Zhao, J. F., Wang, S., Wang, F. S., & Zhang, J. Y. (2021). Single-Cell Transcriptomic Profiling of MAIT Cells in Patients With COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *12*, 3112. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.700152/BIBTEX>
185. Shiku, H., Kisielow, P., Bean, M. A., Takahashi, T., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., & Old, L. J. (1975). Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *141*(1), 227–241. <https://doi.org/10.1084/JEM.141.1.227>
186. Singh, R., Shaik, S., Negi, B. S., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Parihar, A. S., & Sharma, U. (2020). Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, *9*(4), 1834. https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_1037_19
187. Souter, M. N. T., & Eckle, S. B. G. (2020). Biased MAIT TCR Usage Poised for Limited Antigen Diversity? *Frontiers in Immunology*, *11*, 1845. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01845>

188. Sözeri, E., & Kutlutürkan, S. (2015). Taste Alteration in Patients Receiving Chemotherapy. *The Journal of Breast Health, 11*(2), 81.
<https://doi.org/10.5152/TJBH.2015.2489>
189. Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology, 9*(APR), 754.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00754>
190. Sroussi, H. Y., Epstein, J. B., Bensadoun, R. J., Saunders, D. P., Lalla, R. V., Migliorati, C. A., Heavilin, N., & Zumsteg, Z. S. (2017). Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Medicine, 6*(12), 2918.
<https://doi.org/10.1002/CAM4.1221>
191. Stotler, C., Rybicki, L., Kalaycio, M., Dean, R., Copelan, E. A., Sobecks, R., Pohlman, B., Andresen, S., Sweetenham, J., Cherni, K., Chan, J., & Bolwell, B. J. (2008). Non-Relapse Mortality (NRM) after Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) Is Reduced with Stringent Follow-up Post-Transplant. *Blood, 112*(11), 2155–2155.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.V112.11.2155.2155>
192. Sugimoto, C., Konno, T., Wakao, R., Fujita, H., Fujita, H., & Wakao, H. (2015). Mucosal-Associated invariant T Cell Is a potential marker to distinguish fibromyalgia syndrome from arthritis. *PLoS ONE, 10*(4).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121124>
193. Sundström, P., Ahlmanner, F., Akéus, P., Sundquist, M., Alsen, S., Yrlid, U., Börjesson, L., Sjöling, Å., Gustavsson, B., Wong, S. B. J., & Quiding-Järbrink, M. (2015). Human Mucosa-Associated Invariant T Cells Accumulate in Colon Adenocarcinomas but Produce Reduced Amounts of IFN- γ . *The Journal of Immunology, 195*(7), 3472–3481.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1500258>
194. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (n.d.). *Review Series THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision of the World Health*

Organization classification of lymphoid neoplasms.

<https://doi.org/10.1182/blood-2016>

195. Taams, L. S., & Akbar, A. N. (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 293, 115–131. https://doi.org/10.1007/3-540-27702-1_6
196. Tang, X.-Z., Jo, J., Tan, A. T., Sandalova, E., Chia, A., Tan, K. C., Lee, K. H., Gehring, A. J., De Libero, G., & Bertolotti, A. (2013). IL-7 Licenses Activation of Human Liver Intrasinusoidal Mucosal-Associated Invariant T Cells. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3142–3152. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1203218>
197. Thomas, K., Jiří, C., Daniel, L., Aleš, K., Jaroslav, R., Ivan, N., & Martin, M. (n.d.). *Trombocyty v sepsi*.
198. Tilloy, F., Treiner, E., Park, S. H., Garcia, C., Lemonnier, F., De La Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., & Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor α chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted α/β T cell subpopulation in mammals. *Journal of Experimental Medicine*, 189(12), 1907–1921. <https://doi.org/10.1084/JEM.189.12.1907>
199. Tominaga, K., Yamagiwa, S., Setsu, T., ... N. K. – B., & jstage.jst.go.jp, 2017 –. (n.d.). Possible involvement of mucosal-associated invariant T cells in the progression of inflammatory bowel diseases. Retrieved May 17, 2023, from https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/38/2/38_111/_article/-char/ja/
200. Toubal, A., Nel, I., Lotersztajn, S., & Lehuen, A. (2019). Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nature Reviews Immunology*, 19(10), 643–657. <https://doi.org/10.1038/S41577-019-0191-Y>
201. Toussiro, É., Laheurte, C., Gaugler, B., Gabriel, D., & Saas, P. (2018). Increased IL-22-and IL-17A-producing mucosal-associated invariant T cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *Frontiers in Immunology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01610/FULL>
202. Treiner, E. (2023). Mucosal-associated invariant T cells in hematological malignancies: Current knowledge, pending questions. *Frontiers in Immunology*, 14, 1160943. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1160943>

203. Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., & Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, *422*(6928), 164–169. <https://doi.org/10.1038/NATURE01433>
204. Treiner, E., & Lantz, O. (2006). CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Current Opinion in Immunology*, *18*(5), 519–526. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2006.07.001>
205. Tsokos, G. C., Lo, M. S., Costa Reis, P., & Sullivan, K. E. (2016). Nové poznatky o imunopatogenezi systémového lupus erythematos. *Recenze Přírody*, *12*. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>
206. Turtle, C. J., Swanson, H. M., Fujii, N., Estey, E. H., & Riddell, S. R. (2009). A Distinct Subset of Self-Renewing Human Memory CD8+ T Cells Survives Cytotoxic Chemotherapy. *Immunity*, *31*(5), 834–844. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2009.09.015>
207. Ussher, J. E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., Mettke, E., Kurioka, A., Hansen, T. H., Klenerman, P., & Willberg, C. B. (2014). CD161++CD8+ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *European Journal of Immunology*, *44*(1), 195–203. <https://doi.org/10.1002/EJI.201343509>
208. Ussher, J. E., van Wilgenburg, B., Hannaway, R. F., Ruustal, K., Phalora, P., Kurioka, A., Hansen, T. H., Willberg, C. B., Phillips, R. E., & Klenerman, P. (2016). TLR signaling in human antigen-presenting cells regulates MR1-dependent activation of MAIT cells. *European Journal of Immunology*, *46*(7), 1600–1614. <https://doi.org/10.1002/EJI.201545969>
209. Ussher, J. E., Willberg, C. B., & Klenerman, P. (2018). MAIT cells and viruses. *Immunology and Cell Biology*, *96*(6), 630–641. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12008>
210. Vadstrup, K., & Bendtsen, F. (2017). Anti-NKG2D mAb: A New Treatment for Crohn's Disease? *International Journal of Molecular Sciences 2017, Vol. 18, Page 1997*, *18*(9), 1997. <https://doi.org/10.3390/IJMS18091997>
211. Van der Velden, W. J. F. M., Herbers, A. H. E., Netea, M. G., & Blijlevens, N. M. A. (2014). Mucosal barrier injury, fever and infection in neutropenic

- patients with cancer: Introducing the paradigm febrile mucositis. *British Journal of Haematology*, 167(4), 441–452. <https://doi.org/10.1111/BJH.13113>
212. Van Kaer, L., Mori, L., Paquin Proulx, D., Garner, L. C., Provine, N. M., & Klenerman, P. (2018). *insights into Mucosal-Associated invariant T Cell Biology From Studies of invariant Natural Killer T Cells*. 9, 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01478>
213. Van Wilgenburg, B., Scherwitzl, I., Hutchinson, E. C., Leng, T., Kurioka, A., Kulicke, C., De Lara, C., Cole, S., Vasanaawathana, S., Limpitikul, W., Malasit, P., Young, D., Denney, L., Moore, M. D., Fabris, P., Giordani, M. T., Oo, Y. H., Laidlaw, S. M., Dustin, L. B., ... Zitzmann, N. (2016). MAIT cells are activated during human viral infections. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11653>
214. Vanderschueren, S., De Weerd, A., Malbrain, M., Vankersschaever, D., Frans, E., Wilmer, A., & Bobbaers, H. (2000). Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Critical Care Medicine*, 28(6), 1871–1876. <https://doi.org/10.1097/00003246-200006000-00031>
215. Varelias, A., Bunting, M. D., Ormerod, K. L., Koyama, M., Olver, S. D., Straube, J., Kuns, R. D., Robb, R. J., Henden, A. S., Cooper, L., Lachner, N., Gartlan, K. H., Lantz, O., Kjer-Nielsen, L., Mak, J. Y. W., Fairlie, D. P., Clouston, A. D., McCluskey, J., Rossjohn, J., ... Hill, G. R. (2018). Recipient mucosal-associated invariant T cells control GVHD within the colon. *Journal of Clinical Investigation*, 128(5), 1919–1936. <https://doi.org/10.1172/JCI91646>
216. Vié Nelly Robillard, H., Garand, R., Gallot, G., Béatrice Clémenceau, S., Vivien, R., & Berthomé, M. (2008). Effector Memory $\alpha\beta$ T Lymphocytes Can Express Fc γ RIIIa and Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *The Journal Of*, 180, 5327–5334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5327>
217. Vincent Rajkumar, S., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., ... San Miguel, J. F. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Onkologie Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)

218. Viscoli, C., & Castagnola, E. (2002). Treatment of febrile neutropenia: What is new? *Current Opinion in Infectious Diseases*, *15*(4), 377–382. <https://doi.org/10.1097/00001432-200208000-00004>
219. Wade, J. C., Newton, B., Flournoy, N., & Meyers, J. D. (1984). Oral acyclovir for prevention of herpes simplex virus reactivation after marrow transplantation. *Annals of Internal Medicine*, *100*(6), 823–828. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-6-823>
220. Walker, L. J., Kang, Y. H., Smith, M. O., Tharmalingham, H., Ramamurthy, N., Fleming, V. M., Sahgal, N., Leslie, A., Oo, Y., Geremia, A., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., Lauer, G. M., Lantz, O., Adams, D. H., Powrie, F., Barnes, E., & Klenerman, P. (2012). Human MAIT and CD8 α cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8⁺ T cells. *Blood*, *119*(2), 422–433. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-05-353789>
221. Wang, H., Kjer-Nielsen, L., Shi, M., D'Souza, C., Pediongco, T. J., Cao, H., Kostenko, L., Lim, X. Y., Eckle, S. B. G., Meehan, B. S., Zhu, T., Wang, B., Zhao, Z., Mak, J. Y. W., Fairlie, D. P., Teng, M. W. L., Rossjohn, J., Yu, D., De St Groth, B. F., ... Chen, Z. (2019). IL-23 costimulates antigen-specific MAIT cell activation and enables vaccination against bacterial infection. *Science Immunology*, *4*(41). https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAW0402/SUPPL_FILE/AAW0402_TABLE_S1.XLSX
222. Wang, J. J., Macardle, C., Weedon, H., Beroukas, D., & Banovic, T. (2016). Mucosal-associated invariant T cells are reduced and functionally immature in the peripheral blood of primary Sjögren's syndrome patients. *Eur. J. Immunol*, *46*(10), 2444–2453. <https://doi.org/10.1002/eji.201646300>
223. Waszczuk-Gajda, A., Penack, O., Sbianchi, G., Koster, L., Blaise, D., Reményi, P., Russell, N., Ljungman, P., Trneny, M., Mayer, J., Iacobelli, S., Kobbe, G., Scheid, C., Apperley, J., Touzeau, C., Lenhoff, S., Jantunen, E., Anagnostopoulos, A., Paris, L., ... Basak, G. W. (2022). Complications of Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma: Results from the CALM Study. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(12), 3541. <https://doi.org/10.3390/JCM11123541>

224. Wilgenburg, B. van, Loh, L., Chen, Z., Pediongco, T. J., Wang, H., Shi, M., Zhao, Z., Koutsakos, M., Nüssing, S., Sant, S., Wang, Z., D'Souza, C., Jia, X., Almeida, C. F., Kostenko, L., Eckle, S. B. G., Meehan, B. S., Kallies, A., Godfrey, D. I., ... Hinks, T. S. C. (2018). MAIT cells contribute to protection against lethal influenza infection in vivo. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07207-9>
225. Won, E. J., Ju, J. K., Cho, Y. N., Jin, H. M., Park, K. J., Kim, T. J., Kwon, Y. S., Kee, H. J., Kim, J. C., Kee, S. J., & Park, Y. W. (2016). Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer. *Oncotarget*, 7(46), 76274–76290. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11187>
226. Wu, S. C., Liang, C. X., Zhang, Y. L., & Hu, W. P. (2020). Elevated serum procalcitonin level in patients with chronic kidney disease without infection: A case-control study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(2). <https://doi.org/10.1002/JCLA.23065>
227. Wu, W., Liang, X., Li, H., Huang, X., Wan, C., Xie, Q., & Liu, Z. (2022). Landscape of T Cells in NK-AML(M4/M5) Revealed by Single-Cell Sequencing. *Journal of Leukocyte Biology*, 112(4), 745–758. <https://doi.org/10.1002/JLB.5A0721-396RR>
228. Xiao, X., & Cai, J. (2017). Mucosal-Associated Invariant T Cells: New Insights into Antigen Recognition and Activation. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01540>
229. Zabijak, L., Attencourt, C., Guignant, C., Chatelain, D., Marcelo, P., Marolleau, J. P., & Treiner, E. (2015). Increased tumor infiltration by mucosal-associated invariant T cells correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(12), 1601–1608. <https://doi.org/10.1007/S00262-015-1764-7>
230. Zahid, U., Akbar, F., Amaraneni, A., Husnain, M., Chan, O., Riaz, I. Bin, McBride, A., Iftikhar, A., & Anwer, F. (2017). A review of autologous stem cell transplantation in Lymphoma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 12(3), 217. <https://doi.org/10.1007/S11899-017-0382-1>
231. Zambelli, A., Montagna, D., ... G. D. P.-A., & 2002, undefined. (n.d.). Evaluation of infectious complications and immune recovery following high-

- dose chemotherapy (HDC) and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Europepmc.Org*. Retrieved May 3, 2023, from <https://europepmc.org/article/med/12552979>
232. Zhang, J. P., Yan, J., Xu, J., Pang, X. H., Chen, M. S., Li, L., Wu, C., Li, S. P., & Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17- producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Hepatology*, *50*(5), 980–989. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2008.12.033>
233. Zhang, Y., Bailey, J. T., Xu, E., Singh, K., Lavaert, M., Link, V. M., D’Souza, S., Hafiz, A., Cao, J., Cao, G., Sant’Angelo, D. B., Sun, W., Belkaid, Y., Bhandoola, A., McGavern, D. B., & Yang, Q. (2022). Mucosal-associated invariant T cells restrict reactive oxidative damage and preserve meningeal barrier integrity and cognitive function. *Nature Immunology*, *23*(12), 1714–1725. <https://doi.org/10.1038/S41590-022-01349-1>
234. Zhang, Y., & Li, Y. (2014). Zánětlivé onemocnění střev: patogeneze. *Světový Gastroenterologický Časopis: WJG*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3886036/>
235. Ziv-Baran, T., Wasserman, A., Shteinvil, R., Zeltser, D., Shapira, I., Shenhar-Tsarfaty, S., Meilik, A., Goldiner, I., Rogowski, O., Berliner, S., & Halpern, P. (2018). C-reactive protein and emergency department seven days revisit. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *481*, 207–211. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2018.03.022>

10. PUBLIKACE

Publikace k tématu disertační práce

Analysis of the Phenotype and Function of the Subpopulations of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Scand J Immunol.* 2016 Oct;84(4):245-51. doi: 10.1111/sji.12467. PMID: 27474379. Brozova J, **Karlova I**, Novak J. IF 3,889

High pre-transplant Mucosal Associated Invariant T Cell (MAIT) count predicts favorable course of myeloid aplasia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2023 Mar 10. doi: 10.5507/bp.2023.011. Epub ahead of print. PMID: 36896825. **Karlova Zubata I**, Smetanova Brozova J, Karel T, Bacova B, Novak J. IF 1,648

Cellular and humoral immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in patients treated with either Ibrutinib or Rituximab. *Clin Exp Med.* 2022 Mar 29:1–9. doi: 10.1007/s10238-022-00809-0. Epub ahead of print. PMID: 35352210; PMCID: PMC8963888.

Bacova B, Kohutova Z, **Zubata I**, Gaherova L, Kucera P, Heizer T, Mikesova M, Karel T, Novak J. IF 5,057

Publikace nevztahující se k tématu disertační práce

Immune thrombocytopenia in a patient with essential thrombocythemia after SARS-CoV-2 infection: A case report. *Hematology Transfusion and Cell Therapy*, 2023, vol. Epub: 2022 Apr 27. ISSN 2531-1379. Bačová B., Maco M., Geislerová L., **Zubatá I.**, Kozák T., Novák J. IF 0,396

Acute myeloid leukemia with variant t(8;10;21). *Leuk Res Rep.* 2022 Sep 15;18:100350. doi: 10.1016/j.lrr.2022.100350. PMID: 36158314; PMCID: PMC9489803

Bacova B, Sobotka J, Kacirkova P, Rivnacova V, **Karlova/Zubata I**, Novak J. 0,258

Primary diffuse large B-cell lymphoma of the parietal bone. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2021, vol. 84, s. 214-216. ISSN 1210-7859

Hrudka J., Eis V., Prouzová Z., Holešta M., **Zubatá I.**, Šámal F. IF 0,355

Horečka nejasného původu. Vnitřní lékařství, 2021, vol. 67. ISSN 0042-773X, Grebenyuk V., Kryštůfková O., Gregová M., Sokalská-Jurkiewicz M., Steinbauerová R., Sukovská M., Gaheřová L., **Zubatá I.** IF 0,131

Unusual periungual nodulocystic lesions leading to the diagnosis of extranodal marginal zone lymphoma. Indian Journal of Dermatology, 2020, vol. 65, s. 83-84. ISSN 0019-5154. Gkalpakiotis S., Arenberger P., Sticová E., **Karlová I.**, Arenbergerová M. IF 1,757

Nové možnosti léčby relapsu akutní myeloidní leukemie FLT3 pozitivní, Aktuální témata v onkologii očima českých lékařů ROČNÍK 7, ČÍSLO 4 , ČERVENEC 2022, **MUDr. Ivana Zubatá**, doc. MUDr. Jan Novák, Ph.D., doc. RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D., Ing. Kateřina Mužíková, prof. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D., MBA, MUDr. Veronika Řivnáčová, MUDr. Petra Kačířková, MUDr. Kateřina Beníšková, MUDr. Viktorie Juríková, MUDr. Mária Maco, MUDr. Barbora Bačová Hematologická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha, bez IF

Léčba primárně splenického lymfomu bez vilózních lymfocytů s leukemizací. Acta Medicinæ, 2021, vol. 10, s. 60-62. ISSN 1805-398X, **Zubatá I.**, Beníšková K., Novák J., Bačová B, bez IF

High pre-transplant Mucosal Associated Invariant T Cell (MAIT) count predicts favorable course of myeloid aplasia

Ivana Karlova Zubata¹, Jitka Smetanova Brozova², Tomas Karel³, Barbora Bacova^{2,4}, Jan Novak^{1,4}

Aims. Mucosal Associated Invariant T (MAIT) cells are unconventional T cells with anti-infective potential. MAIT cells detect and fight against microbes on mucosal surfaces and in peripheral tissues. Previous works suggested that MAIT cells survive exposure to cytotoxic drugs in these locations. We sought to determine if they maintain their anti-infective functions after myeloablative chemotherapy.

Methods. We correlated the amount of MAIT cells (measured by flow cytometry) in the peripheral blood of 100 adult patients before the start of myeloablative conditioning plus autologous stem cell transplantation with the clinical and laboratory outcomes of aplasia.

Results. The amount of MAIT cells negatively correlated with peak C-reactive protein level and the amount of red blood cell transfusion units resulting in earlier discharge of patients with the highest amount of MAIT cells.

Conclusion. This work suggests the anti-infectious potential of MAIT cells is maintained during myeloid aplasia.

Key words: MAIT cells, ASCT, infection, complications

Received: September 7, 2022; Revised: February 20, 2023; Accepted: February 20, 2023; Available online: March 10, 2023

<https://doi.org/10.5507/bp.2023.011>

© 2023 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

¹Department of Haematology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Srobarova 50, 100 34, Prague 10, Czech Republic

²Central Laboratories of the Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Srobarova 50, 100 34, Prague 10, Czech Republic

³Department of Statistics and Probability, Faculty of Informatics and Statistics, University of Economics and Business in Prague, Na mestí W. Churchilka 1938/4, 130 67, Prague 3, Czech Republic

⁴Department of Immunology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, 100 00, Prague 10, Czech Republic

Corresponding author: Jan Novak, e-mail: novakjan@centrum.cz

INTRODUCTION

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are a recently discovered population of T cells. MAIT cells are often called unconventional, as they differ in many ways from classical major histocompatibility complex (MHC) restricted T cells^{1,2}. Unlike highly polymorphic classical MHC molecules that present peptides, MAIT cells recognize metabolites of vitamin B presented by monomorphic MHC class I-like protein (MR1) (ref.^{4,5}). Contrary to the infinite repertoire of conventional MHC restricted T cells, MAIT cells' repertoire is conserved, consisting of an invariant T cell receptor (TCR) α -chain (V α 7.2-J α 33) associated with limited TCR β -chain repertoire^{6,7}. MAIT cells can be detected in human blood, where they account for approximately 5% of T cells⁸, and they are enriched on mucosal surfaces and in the liver, where they account for up to 35% of T cells⁵. The main function of MAIT cells is probably to protect the mucosal barriers against invading microbes. Indeed, MAIT cells respond to a broad range of microbial organisms including *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* or *Candida albicans*^{9,10}. Grimaldi and colleagues provided clinical proof of the concept of antimicrobial surveillance by MAIT cells. The prospective study on intensive care unit (ICU) showed that patient with MAIT cell depletion had a higher incidence of ICU-acquired infections¹¹.

Our recent study suggested that MAIT cells kept their anti-infective potential even after myeloablative conditioning and autologous stem cell transplantation (ASCT). The pilot study on 29 patients showed that patients with the highest amount of MAIT cells pre-transplant tended to have less infectious complications during aplasia as measured by peak C-reactive protein (CRP) level, febrile days or days on intravenous antibiotics¹². Here we report results of extended blind prospective study on 100 patients designed to confirm or disprove the hypothesis of anti-infective potential in MAIT cells during myeloid aplasia.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The studied population consisted of 100 patients treated by high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in the Department of Haematology of the 3rd Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Czech Republic. Further characteristics of the patients are provided in Table 1 and the Results section. The research was carried out in accordance with the latest Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (Ethics committee of the 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic, dated 16 Nov 2016).

Table 1. Clinical characterization of the patients.

Patients		100
Gender (M/F)		58/42
Median (range) age (years)		61 (25-73)
Primary diagnosis	R/R HL	9
	R/R NHL	22
	First line NHL	12
	Myeloma	57
Months from diagnosis to transplant	median (range)	11.5 (3-313)
Number of pretransplant treatments (lines)		1.5 (1-6)
Clinical outcome pre-ASCT	CR or PR	94
	SD or PD	6
The time interval (days) from last chemotherapy	median (range)	89.5 (12-408)
Conditioning regimens	BEAM	37
	HD Mel	48
	BuMel	10
	carmustine/thiotepa/etoposid	4
	carmustine + thiotepa	1

R/R, relapsed/refractory; HL, Hodgkin lymphoma; NHL, Non-Hodgkin Lymphoma; ASCT, Autologous stem cell transplantation; CR, complete remission; PR, partial remission; SD, stable disease; PD, progressive disease; BEAM, BiCNU/carmustine, etoposide, Ara-C, melphalan; HD, High-dose; Mel, melphalan; BiCNU, bis-chloro-ethylnitrosourea

Conditioning regimens

The following myeloablative regimens were used: BEAM (carmustine 300 mg/m² on day -6; etoposide 100 mg/m² twice a day on days -5, -4, -3, and -2; cytarabine 100 mg/m² twice a day on days -5, -4, -3, and -2; and melphalan 140 mg/m² on day -1), high-dose melphalan (melphalan 200 mg/m² on day -1), carmustine, thiotepa and etoposide (carmustine 400 mg/m² on day -5; thiotepa 5 mg/kg twice a day on days -4 and -3; and etoposide 150 mg/m² on days -5, -4, and -3), BuMel (busulfan 3 mg/kg on days -6, -5, -4, and -3; melphalan 140 mg/m² on day -2) and carmustine + thiotepa (carmustine 400 mg/m² day -6, thiotepa 2×5 mg/kg/day on days -5 and -4). The transplant was performed if at least 3.0×10⁶/kg CD34+ peripheral blood stem cells were available.

Supportive treatment

Supportive care was provided according to institutional guidelines. Anti-infective prophylaxis started the day after peripheral stem cell transfer, in some cases earlier with the early onset of cytopenia. Prophylaxis consisted of antibacterial (ciprofloxacin 500 mg twice a day) anti-pneumocystis (sulfamethoxazole 400 mg/trimethoprim 80 mg once a day), antifungal (fluconazole 100 mg twice a day) and antiviral (aciclovir 400 mg twice a day or valaciclovir 500 mg twice a day) prophylaxis.

According to the institutional guidelines, the G-CSF support was started on day +8 in lymphoma patients and on day +10 in myeloma patients. In case of severe infectious complications, the G-CSF was started earlier.

Table 2. Laboratory characterization of the patients pretransplant.

Leukocytes x 10 ⁹ /mL, median (range)	4.85 (1.8-10.7)
Lymphocytes %, median (range)	19.1 (1.7-51.6)
Lymphocytes x 10 ⁹ /mL, median (range)	0.95 (0.13-2.68)
T cells % (from lymphocytes), median (range)	64.65 (25.1-93.26)
MAIT cells % (from T cells), median (range)	0.89 (0.03-11.3)
MAIT cells /μL, median (range)	5.55 (0.13-11.3)

Patient monitoring and blood sampling

Laboratory biochemical and haematological parameters were measured by routine clinical protocols from admission to the discharge of the patient. Blood cells were analysed daily by an automatic Sysmex XN-1000 machine using standard certified procedures. In some patients, the enumeration was confirmed by optical microscopy.

Flow cytometry

The MAIT cell count in peripheral blood was measured by flow cytometry before the start of high-dose chemotherapy on the day of admission for transplantation. The samples (whole peripheral blood in EDTA) were

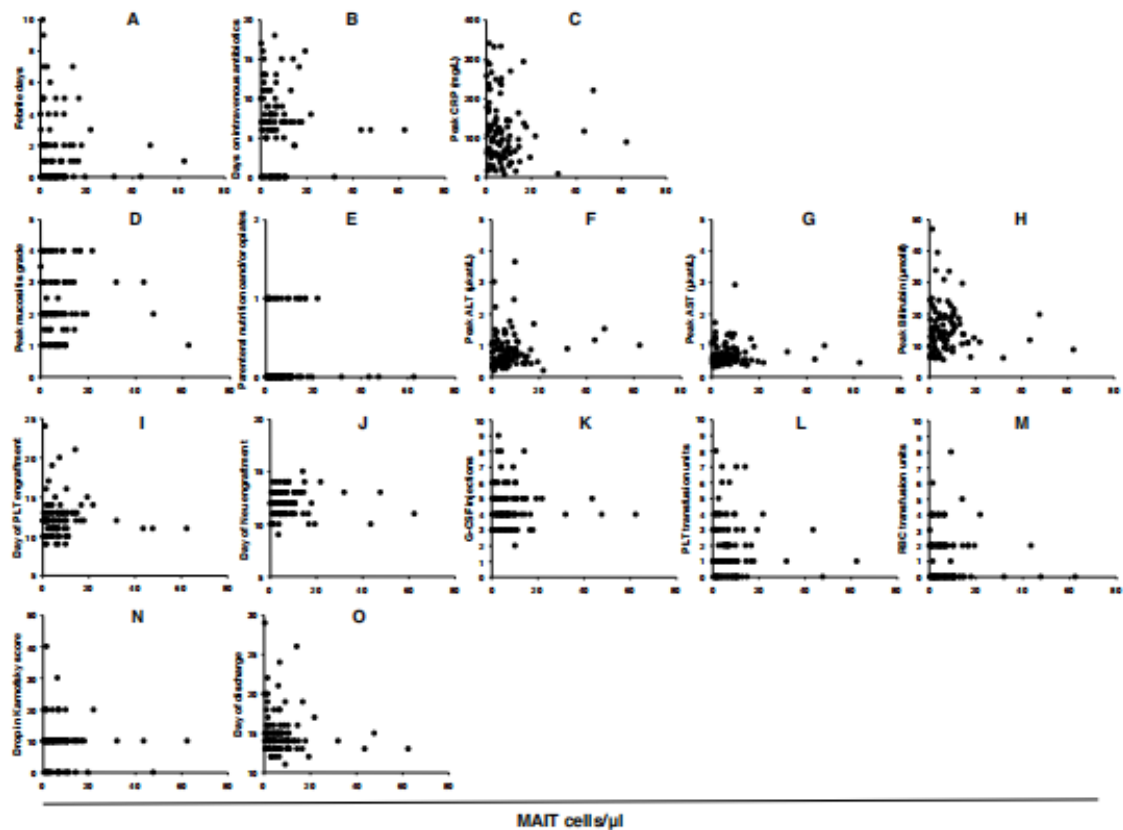


Fig. 1. Correlation between the amount of MAIT cells and clinical/laboratory outcomes of myeloid aplasia.

Each dot corresponds to an individual patient and shows a correlation between the amount of MAIT cells/ μL measured a day before the start of myeloablative conditioning and: A. Febrile ($\geq 38^\circ\text{C}$) days. B. Days on intravenous antibiotics. C. Peak CRP (C-reactive protein) level during aplasia. D. Peak mucositis grade. E. Requirement of parenteral nutrition (Yes/No). F. Peak ALT (alanine aminotransferase) level during aplasia. G. Peak AST (aspartate aminotransferase) level during aplasia. H. Peak bilirubin level during aplasia. I. Day of platelet engraftment. J. Day of neutrophil engraftment. K. Amount of G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) injections. L. Amount of red blood cell transfusion units (RBC). M. Amount of platelet transfusion units. N. Drop in Karnofsky score. O. Day of discharge.

stained, washed (PBS), and lysed by NH_4Cl . MAIT cells were defined as follows: CD3 PerCP-Cy5.5 (UCHT1) positive, TCR γ/δ PE-Cy7 (11F2) negative, TCR $\text{V}\alpha 7.2$ APC (3C10) positive and CD161 APC-Cy7 (HP-3G10) bright. Monoclonal antibodies were purchased from BD Pharmingen and Biologend. Cells were acquired with a FACSCantoII (BD Biosciences). Flow cytometry data was analysed by the software application FlowJo (Tree Star).

Engraftment

Granulocyte engraftment was defined as the first of 3 consecutive days with an ANC (Absolute Neutrophil Count) over $0.5 \times 10^9/\text{L}$. Platelet engraftment was defined as the first of three consecutive days with platelet count over $20 \times 10^9/\text{L}$ without the need for platelet transfusion.

Clinical parameters

Clinical data and laboratory biochemical markers were analysed retrospectively and independently from

data on MAIT cells. Mucositis was scored according to the NCI-CTCAE Grading Scale classification. All clinical parameters (febrile days, days of intravenous antibiotic application, days on opioid analgesics and parenteral nutrition, grade of mucositis, Karnofsky score) were monitored daily.

Statistical analysis

The data were analysed using non-parametric (Spearman's Rho) and parametric (Pearson's Rho) correlation coefficient. In the case of Pearson's correlation, we had to normalize the data. The results of the two tests were comparable. We tested the independence for each pair of variables using the t-test. Correlation coefficient Rho shows the power of statistical dependence between the pair of considered variables. A positive coefficient indicates possible agreement and a negative coefficient value indicates possible disagreement.

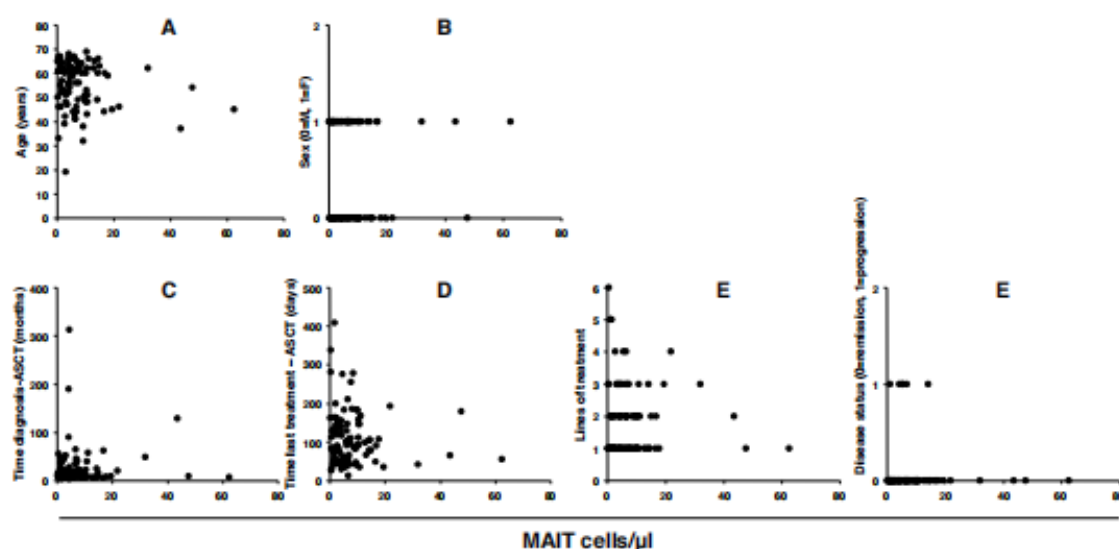


Fig. 2. What factors influence the amount of MAIT cells pretransplant?

Each dot corresponds to an individual patient and shows a correlation between an amount of MAIT cells/ μL measured a day before start of myeloablative conditioning and: A. Age. B. Sex. C. Time between the diagnosis of the malignancy and ASCT (Autologous Stem Cell Transplantation). D. Time between the last treatment and ASCT. E. Lines of previous treatments. F. Disease status at ASCT (remission Yes/No).

RESULTS

1. Clinical characteristics of the patients

100 patients treated for Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma and Plasma cell myeloma indicated for myeloablative conditioning and autologous stem cell transplantation were recruited (Table 1). The median age was 61 (range 25–73). The vast majority of the patients were in remission before the start of conditioning (94 patients). According to the underlying disease, the conditioning consisted of either BEAM (carmustine, etoposide, cytarabine and melphalan; 37 patients) or high-dose melphalan (HD-Mel; 48 patients), busulphan and melphalan (BuMel; 10 patients), carmustine, thiotepa and etoposide (4 patients) or carmustine + thiotepa (1 patient). All patients underwent several lines of cytotoxic treatments (median 1.5, range 1–6) before myeloablative conditioning. The mean time from the last treatment to ASCT varied from 12 days to 408 days (with a median of 89.5).

2. Immunological laboratory description of the patients

The median lymphocyte count and percentage of lymphocytes among white blood cells was on the lower limit of the normal (Table 2). The median percentage of MAIT cells among T cells was 0.89% and the median amount of MAIT cells per microliter was 5.55. These values are lower than in the general population of corresponding age, reflecting the exposure to previous cytotoxic treatments and possibly interaction with cancer cells^{13,14}.

3. Correlation of pretransplant MAIT cell count with clinical complications of myeloid posttransplant aplasia

Myeloablative conditioning induces deep thrombocytopenia and neutropenia leading to the risk of bleeding, infections and injury of the mucosal surface. We hypothesized that MAIT cells survived the myeloablative conditioning and maintained their function. We thus investigated the correlation between pretransplant MAIT cell count and clinical and laboratory markers of early posttransplant complications. Regarding infectious complications, we failed to find a significant correlation between MAIT cell count and febrile days (Fig. 1A, Spearman's $Rho = -0.123$, $P = 0.111$) or days on intravenous antibiotics (Fig. 1B, Spearman's $Rho = -0.142$, $P = 0.080$). MAIT cell count showed a significant negative correlation with peak C-reactive protein levels (CRP); (Fig. 1C, Spearman's $Rho = -0.176$, $P = 0.040$).

Mucositis is inflammation of the oral mucosa induced by chemotherapy and bone marrow transplantation. It is associated with leukopenia and possibly with bacterial colonization. It was thus reasonable to correlate MAIT cell count with the severity of mucositis¹⁵.

We failed to reveal any correlation between MAIT cell count and the peak WHO grade of mucositis (Fig. 1D, Spearman's $Rho = -0.056$, $P = 0.288$) or MAIT cell count and the use of parenteral nutrition (Student's t-test $P = 0.313$) or intravenous opioids (Student's t-test $P = 0.966$), (Fig. 1E).

Both anatomical (mucositis) and functional (cytopenia) disruption of the antimicrobial barrier may lead to liver injury, as the liver is crucial for clearing toxins

and pathogens that reach the circulatory system from the gut. Better control of microbes in the gut by MAIT cells may result in milder liver injury¹⁶; we thus measured bilirubin, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels. The peak level from a period of aplasia was correlated with the pretransplant MAIT cell count. None of the parameters showed any correlation with pretransplant MAIT cell count (ALT; Fig. 1F, Spearman's $Rho=0.149$, $P=0.069$), (AST; Fig. 1G, Spearman's $Rho=0.017$, $P=0.431$), (bilirubin; Fig. 1H, Spearman's $Rho=0.041$, $P=0.342$).

The clinical characteristics usually used to describe the course of aplasia also involve the day of neutrophil and platelet engraftment (for definition see material and methods), the amount of platelet transfusion units used and the use of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) injections. There was no correlation between pretransplant MAIT cell count and the day of platelet engraftment (Fig. 1I, Spearman's $Rho=0.131$, $P=0.096$), the day of neutrophil engraftment (Fig. 1J, Spearman's $Rho=0.105$, $P=0.149$), the number of G-CSF injections (Fig. 1K, Spearman's $Rho=-0.089$, $P=0.190$) or the amount of platelet transfusion units (Fig. 1L, Spearman's $Rho=-0.093$, $P=0.178$). Significantly negative correlation was found between MAIT cell count and red blood cell transfusion units (Fig. 1M, Spearman's $Rho=-0.180$, $P=0.036$).

All mentioned parameters merge into two key clinical parameters: day of discharge and drop in Karnofsky score. While there was no a significant correlation between drop in Karnofsky score (Fig. 1N, Spearman's $Rho=-0.116$, $P=0.125$), we found a significant negative correlation between pretransplant MAIT cell count and the day of discharge (Fig. 1O, Spearman's $Rho=-0.175$, $P=0.041$). Patients with a high amount of MAIT cells pretransplant were likely to be discharged earlier. Owing to the heterogeneity of the patients, we conducted separate analysis of two homogenous groups of patients. The first group contained only multiple myeloma patients treated with Mel200 (Supplementary Fig. 1). The other group contained only NHL patients treated with BEAM (Supplementary Fig. 2). MAIT cell amount negatively correlated with a day of discharge in both groups. Moreover, the amount of MAIT cells negatively correlated with febrile days and amount of transfusion units of both red blood cells and platelets within the BEAM group (data not shown).

4. What factors influence pretransplant MAIT cell count?

We finally asked if high MAIT cell count is an independent favorable prognostic marker of myeloid aplasia or if a high MAIT cell count identifies patients who would have better prognosis anyway. For example, longer time between the last chemotherapy and ASCT (ref.¹⁷) and lower age and remission of the disease at the time of transplant¹⁸ are associated with better survival in NHL. Fig. 2 shows that the amount of MAIT cells prior to the ASCT does not correlate with age (Fig. 2A, Spearman's $Rho=0.098$, $P=0.165$), sex (Fig. 2B, Student's t-test, $P=0.486$),

time from diagnosis to ASCT (Fig. 2C, Spearman's $Rho=-0.058$, $P=0.284$), time from the last treatment to ASCT (Fig. 2D, Spearman's $Rho=0.002$, $P=0.491$), number of pretransplant regimens (Fig. 2E, Spearman's $Rho=-0.057$, $P=0.288$) or clinical outcome pre-Tx - patients in complete or partial remission versus patients in stable or progressive disease (Fig. 2F, Student's t-test, $P=0.404$).

DISCUSSION

Bacterial infection is the major cause of morbidity and mortality in the early period after hematopoietic stem cell transplantation. The development of the infection is related to two critical factors - duration and depth of neutropenia and disruption of the mucocutaneous barrier, respectively. Both are the direct consequence of conditioning regimens.

Current prophylactic options are restricted to two strategies. These include the use of myeloid growth factors to reduce the depth and duration of neutropenia and the use of prophylactic antibiotics. The use of systemic antibiotic prophylaxis reduces the incidence of febrile episodes, clinically or microbiologically documented infection and bacteraemia, but has no significant effect on all-cause mortality or infection-related mortality. Moreover, patients with systemic antibiotic prophylaxis have a greater incidence of adverse events¹⁹.

The use of myeloid growth factors after transplant has become a standard of care as they accelerate myeloid recovery and shorten the duration of hospital stay. The growth factors, however, do not have any major impact on clinical variables such as febrile days or septic episodes^{20,22}.

Given the fact that neither growth factors nor antibiotics ensure safe outcome of myeloid aplasia, it is rational to search for additional factors that could prevent infection and thus reduce morbidity and mortality in this period of ASCT. It seems intuitive to turn the attention to lymphoid lineage given its unique developmental pathway, drug sensitivity, etc. Lee and colleagues, for example, described a correlation between early treatment-related complications and lymphocyte populations of infused autografts or peripheral blood. A lower ratio of infused CD4⁺ to CD8⁺ cells was an independent factor for severe mucositis²³ and low proportion of CD3⁺CD4⁺CD161⁺ cells in peripheral blood was an independent predictor of mucositis (\geq grade 3), infection before engraftment and CMV activation²⁴.

Here we showed that a certain anti-infective potential during myeloid aplasia is also provided by MAIT cells. We could only assume that MAIT cells survive the conditioning in the tissues, as any confirmatory invasive procedure is contraindicated due to the deep neutropenia and thrombopenia.

The data suggest that MAIT cells may survive the conditioning as they are resistant to cytotoxic treatment involving anthracyclines⁸. Note that these drugs are usually not part of conditioning regimens prior to the ASCT. On the other hand, MAIT cells exhibit a proapoptotic

propensity suggesting their higher sensitivity and dying upon treatment²⁵.

The clinical data provide similarly conflicting findings. Not even two observations in autologous transplants provided concordant results. While Abrahamsson and colleagues reported dramatic reduction of MAIT cells lasting at least 2 years after the transplant²⁶, our study showed relatively early reconstitution of MAIT cells after the ASCT (ref.¹²).

The main difference between Abrahamsson et al. and Novak et al. was the conditioning regimen used. While the immunoablative regimen induced global lymphodepletion lasting 1 year after the transplant²⁶ myeloablative regimens examined in our study led to only transitory lymphopenia with lymphoid recovery observed as early as twenty days after the transplant.

Similarly heterogenous results are observed in allogeneous settings. Bhattacharyya and colleagues²⁷ reported early increase in MAIT cells as early as day 30 after allo-SCT. In contrast, other investigators reported severe depletion of MAIT cells lasting years after allogeneous transplant^{28,30}.

Another important question is the origin of MAIT cells. They might be either the tissue-resident survivors of cytotoxic treatment or cells re-infused in the graft. The advantage of allogeneous settings is that it makes it possible to identify the source of reconstituted MAIT cells by chimerism analysis. Indeed, chimerism studies showed that MAIT cells are nearly exclusively of donor origin²⁷. The donor origin of MAIT cells is also suggested in a study Youssef et al.²⁸.

The graft could be the source of MAIT reconstitution in autologous settings as well. In fact, the three parameters are closely related in autologous settings. Pretransplant peripheral blood MAIT cell count influences both their amounts in the graft and their amount in the blood post transfer^{12,27}.

One could argue that better clinical course in patients with high amount of MAIT cells might not be the direct effect of MAIT cells. Instead, the MAIT cell count might represent a surrogate marker of general immune competence given by the age, the time from the last cytotoxic therapy to conditioning, the number of pretransplant regimens or the current status of the underlying hematologic malignancy^{9,31}.

None of these parameters correlated with MAIT cell count. No correlation between age and MAIT cell count reported here seems to contradict our previous study that showed strong correlation between age and MAIT cell count³². We hypothesize the MAIT cell count might be influenced by other factors such as interaction with tumor cells, previous cytotoxic treatments and possibly other factors. The interactions among tumor cells, drugs and MAIT cells are currently under investigation in our laboratory.

Various research groups have reported an association between absolute lymphocyte count (either pretransplant in the peripheral blood or as a content of the graft) and long-term prognosis of the underlying malignancy. There is a suggestion that immunocompetent lymphocytes con-

tribute to the surveillance of the malignancy^{17,31}. Since MAIT cells are well equipped to control the tumor growth too³³, it would be interesting to research the impact of MAIT cell count on the long-term prognosis and survival. Our study, however, was not designed to follow long-term prognosis, as it included a broad spectrum of diseases with strikingly different biological origins and prognoses and also different conditioning regimens. Nevertheless, this hypothesis is under examination in our laboratory.

Overall, this study work showed that patients with a high amount of MAIT cells pretransplant have a more favorable course of aplasia as measured by peak CRP levels, amount of red blood cell transfusion units and earlier hospital discharge.

CONCLUSION

The patients with high amount of MAIT cells pretransplant have a more favorable course of aplasia as measured by peak CRP levels, amount of red blood cell transfusion units and earlier hospital discharge.

Abbreviations:

ALT, Alanine Aminotransferase; ANC, Absolute Neutrophil Count; ASCT, Autologous Stem Cell Transplantation; AST, Aspartate Aminotransferase; BEAM, BiCNU/Carmustine, etoposide, Ara-C, melphalan; BuMel, Busulphan and melphalan; CR, Complete Remission; CRP, C-reactive Protein; G-CSF, Granulocyte Colony Stimulating Factor; HD-Mel, High-dose melphalan; HL, Hodgkin Lymphoma; ICU, Intensive Care Unit; MAIT, Mucosal Associated Invariant T; MHC, Major Histocompatibility Complex; MRI, MHC-related Molecule 1; NHL, Non-Hodgkin Lymphoma; PD, Progressive Disease; PR, Partial Remission; R/R, Relapsed/refractory; RBC, Red Blood Cell; SD, Stable Disease; TCR, T-cell Receptor.

Acknowledgement: We would like to thank Nicholas J. McRae, PhD, for editing and correcting the English text. The research has been performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by local ethical authorities (Ethical committee of 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic, dated 16 Nov 2016). The work has not been published previously and it is not under consideration for publication elsewhere.

The work was supported by the Research project Q28-PROGRES awarded by 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic. The funding body did not have any role in the design of the study, the collection, analysis, and interpretation of data, nor in writing the manuscript.

Author contributions: JN: study conception and design; IKZ, JSB, BB: acquisition of data; IKZ, JSB, BB, TK, JN: analysis and interpretation of data; TK: statistical analysis; JN: drafting of manuscript; All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

- Godfrey DI, Koay HF, McCluskey J, Gherardin NA. The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat Immunol* 2019;20(9):1110-28. doi: 10.1038/s41590-019-0444-8
- Provine NM, Klenerman P. MAIT Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* 2020;38:203-28. doi: 10.1146/annurev-immunol-080719-015428
- Lantz O, Legoux F. MAIT cells: an historical and evolutionary perspective. *Immunol Cell Biol* 2018;96(6):564-72. doi: 10.1111/imcb.1034
- Kjer-Nielsen L, Patel Q, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 2012;491(7426):717-23. doi: 10.1038/nature11605
- Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003;422(6928):164-9. doi: 10.1038/nature01433 Erratum in: *Nature* 2003 Jun 26;423(6943):1018
- Porcellis S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4⁺ alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 1993;178(1):1-16. doi: 10.1084/jem.178.1.1
- Tilloy F, Treiner E, Park SH, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, Bendelac A, Bonneville M, Lantz O. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class II-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189(12):1907-21. doi: 10.1084/jem.189.12.1907
- Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguyillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 2011;117(4):1250-9. doi: 10.1182/blood-2010-08-303339
- Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delapine J, Winata E, Swarbrick GM, Chua WJ, Yu YY, Lantz O, Cook MS, Null MD, Jacoby DB, Harriif MJ, Lewinsohn DA, Hansen TH, Lewinsohn DM. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* 2010;8(6):e1000407. doi: 10.1371/journal.pbio.1000407
- Le Bourhis L, Martin E, Péguyillet I, Guihot A, Froux N, Coë M, Lévy E, Dusseaux M, Meyssonier V, Premel V, Ngo C, Riteau B, Duban L, Robert D, Huang S, Rottman M, Soudais C, Lantz O. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010;11(8):701-8. doi: 10.1038/ni.1890. Erratum in: *Nat Immunol* 2010;11(10):969. Huang, Xhouxiang [added]
- Grimaldi D, Le Bourhis L, Saunef B, Dechartrés A, Rousseau C, Ouaz F, Milder M, Louis D, Chiche JD, Mira JP, Lantz O, Pène F. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med* 2014;49(2):192-201. doi: 10.1007/s00134-013-3163-x
- Novak J, Dobrovolsky J, Brozova J, Novakova L, Kozak T. Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Exp Med* 2016;16(4):529-37. doi: 10.1007/s10238-015-0384-z
- Gherardin NA, Loh L, Admojo L, Davenport AJ, Richardson K, Rogers A, Darcy PK, Jenkins MR, Prince HM, Harrison SJ, Quach H, Fairlie DP, Kedzierska K, McCluskey J, Uldrich AP, Neeson PJ, Ritchie DS, Godfrey DI. Enumeration, functional responses and cytotoxic capacity of MAIT cells in newly diagnosed and relapsed multiple myeloma. *Sci Rep* 2018;8(1):4159. doi: 10.1038/s41598-018-22130-1
- Mitchell J, Kvedasaitė E, von Bahr Greenwood T, Henter JI, Pellicci DG, Berzins SP, Kannourakis G. Altered Populations of Unconventional T Cell Lineages in Patients with Langerhans Cell Histiocytosis. *Sci Rep* 2018;8(1):6506. doi: 10.1038/s41598-018-34873-y
- Basile D, Di Nardo P, Corvaja C, Garattini SK, Pelizzari G, Lisanti C, Bortol L, Da Ros L, Baroletti M, Borghi M, Gerrata L, Lombardi D, Puglisi F. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):857. doi: 10.3390/cancers11060857
- Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):201-13. doi: 10.1038/nri3169
- Holtan SG, Pomata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Litzow MR, Gastineau DA, Markovic SN. Timing of a utologous stem cell transplantation from last chemotherapy affects lymphocyte collection and survival in non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2006;133(6):628-33. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06088.x
- Chihara D, Izutsu K, Kondo E, Sakai R, Mizuta S, Yokoyama K, Kaneko H, Kato K, Hasegawa Y, Chou T, Sugahara H, Henzan H, Sakamaki H, Suzuki R, Suzumiya J. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for elderly patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma: a nationwide retrospective study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(5):684-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.025
- Kimura S, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Nakasone H, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Antibiotic prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Infect* 2014;69(1):13-25. doi: 10.1016/j.jinf.2014.02.013
- Linch DC, Milligan DW, Winfield DA, Kelsey SM, Johnson SA, Littlewood TJ, Smith GM, Hutchinson RM, Goldstone AH, Fielding AK, Vaughan Hudson G. G-CSF after peripheral blood stem cell transplantation in lymphoma patients significantly accelerated neutrophil recovery and shortened time in hospital: results of a randomized BNLI trial. *Br J Haematol* 1997;99(4):933-8. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4703274.x
- Klump TR, Mangan KF, Goldberg SL, Pearlman ES, Macdonald JS. Granulocyte colony-stimulating factor accelerates neutrophil engraftment following peripheral-blood stem-cell transplantation: a prospective, randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13(6):1323-7. doi: 10.1200/JCO.1995.13.6.1323
- Spitzer G, Adkins DR, Spencer V, Dunphy FR, Petruska PJ, Velasquez WS, Bowers CE, Wronmueller N, Niemeyer R, McIntyre W. Randomized study of growth factors post-peripheral-blood stem-cell transplant: neutrophil recovery is improved with modest clinical benefit. *J Clin Oncol* 1994;12(4):661-70. doi: 10.1200/JCO.1994.12.4.661
- Lee SE, Yang SA, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW, Min CK. Lymphocyte subset analysis for the assessment of treatment-related complications after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Cytotherapy* 2012;14(4):505-12. doi: 10.3109/14653249.2012.655421
- Lee SE, Lim JY, Ryu DB, Kim TW, Jeon YW, Yoon JH, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Min CK. Circulating CD3⁺CD4⁺CD161⁺ Cells Are Associated with Early Complications after Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int* 2018;2018:5097325. doi: 10.1155/2018/5097325
- Gérart S, Sibéil S, Martin E, Lenoir C, Aguilar C, Picard C, Lantz O, Fischer A, Latour S. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* 2013;121(4):614-23. doi: 10.1182/blood-2012-09-456095
- Abrahamson SV, Angelini DF, Dubinsky AN, Moele E, Oh U, Jones JL, Carassiti D, Reynolds R, Salvetti M, Calabresi PA, Coles AJ, Battistini L, Martin R, Burt RK, Muraro PA. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2013;136(Pt 9):2888-903. doi: 10.1093/brain/awt182
- Bhattacharyya A, Hanafi LA, Sheikh A, Golob JL, Srinivasan S, Boeckh MJ, Pergam SA, Mahmood S, Baker KK, Gooley TA, Milano F, Fredricks DN, Riddell SR, Turtle CJ. Graft-Derived Reconstitution of Mucosal-Associated Invariant T Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24(2):242-51. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.10.003
- Ben Youssef G, Turret M, Salou M, Ghazarian L, Houdouin V, Mondot S, Mburu Y, Lambert M, Azamouh S, Diana JS, Virlovet AL, Peuchmaur M, Schmitz T, Dalle JH, Lantz O, Bisan V, Caillaud-Zucman S. Ontogeny of human mucosal-associated invariant T cells and related T cell subsets. *J Exp Med* 2018;215(2):459-79. doi: 10.1084/jem.20171739
- Kawaguchi K, Umeda K, Hiejima E, Iwai A, Mikami M, Nodomi S, Saida S, Kato I, Hiramatsu H, Yasumi T, Nishikomori R, Kondo T, Takaori-Kondo A, Heike T, Adachi S. Influence of post-transplant mucosal-associated invariant T cell recovery on the development of acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 2018;108(1):66-75. doi: 10.1007/s12185-018-2442-2.

30. Konuma T, Kohara C, Watanabe E, Takahashi S, Ozawa G, Suzuki K, Mizukami M, Nagai E, Jimbo K, Kaito Y, Isobe M, Kato S, Takahashi S, Chiba A, Miyake S, Tojo A. Reconstitution of Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Its Association with the Riboflavin Synthetic Pathway of Gut Microbiota in Cord Blood Transplant Recipients. *J Immunol* 2020;204(6):1462-73. doi: 10.4049/jimmunol.1900681
31. Hiwase DK, Hiwase S, Bailey M, Bollard G, Schwazer AP. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(1):116-24. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.051
32. Novak J, Dobrovolný J, Nováková L, Kozák T. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. *Scand J Immunol* 2014;80(4):271-5. doi: 10.1111/sji.12193
33. Lukasik Z, Elewaut D, Venken K. MAIT Cells Come to the Rescue in Cancer Immunotherapy? *Cancers (Basel)* 2020;12(2):413. doi: 10.3390/cancers12020413

Analysis of the Phenotype and Function of the Subpopulations of Mucosal-Associated Invariant T Cells

J. Brozova*, I. Karlova† & J. Novak*,†

*Department of Immunology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; and †Department of Internal Medicine and Haematology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Faculty Hospital Kralovské Vinohrady, Prague, Czech Republic

Received 12 March 2016; Accepted in revised form 25 July 2016

Correspondence to: J. Novak, MD, PhD, Department of Internal Medicine and Haematology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Faculty Hospital Kralovské Vinohrady, Srobarova 50, 100 34, Prague 10, Czech Republic. E-mail: novakjan@centrum.cz

The authors declare that the study is previously unpublished, and is not offered simultaneously elsewhere; all authors have read and approved the content, and all authors also declared that no competing interests exist; and that the work complies with Ethical Policies of the Journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Introduction

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are a recently discovered subpopulation of T cells. MAIT cells belong to the family of so-called innate lymphocytes, a term reflecting their similarities with cells of the innate immunity in terms of antigen recognition, activation or the speed of development of effector function [1]. MAIT cells are restricted and recognize antigens presented by the non-polymorphic MHC-related molecule 1 (MR1) [2]. The activating ligand of MAIT cells is formed from bacteria-derived riboflavin and host-derived small molecules, such as methylglyoxal and glyoxal [3, 4]. The antigen is recognized by a very restricted T cell receptor repertoire: TCR α -chain V α 7.2, joined to J α 33 (TRAV1-2-TRAJ33) paired with limited sets of β chains [5, 6]. Again, the level

Abstract

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells contain two main subpopulations, CD8⁺ and double-negative (DN) cells. The first reports suggested that subpopulations of MAIT cells have similar phenotype and function. Recent works, however, demonstrate that the subpopulations have different ontogenesis and are differentially affected by xenobiotic treatment. In this work, we re-examined the possible differences between subpopulations of MAIT cells. We demonstrate that the main subpopulations of MAIT cells (CD8 and DN) are relatively uniform in terms of both phenotype and function. Both populations are memory/activated, tissue-homing and pro-inflammatory. CD8⁺ MAIT cells are better equipped for pro-inflammatory functions as they express higher levels of CD16 and NKG2D, produce more pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ) and have higher cytotoxic potential (contain more granzyme B and express higher levels of CD107A upon stimulation). Our study contributes to the understanding of the heterogeneity of MAIT cell population.

of restriction suggests an important selective evolutionary pressure to express high amounts of invariant sequences in the immune repertoire. Functionally, MAIT cells are tissue-homing, pro-inflammatory cells that express a memory/effector-like phenotype and produce rapidly pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-17 [7, 8].

Although the recent work using human MR1 tetramers, loaded with the potent MAIT cell ligand, identified a very small subset of CD4⁺ MAIT cells [6], the dominant subpopulations can be divided based on CD8 expression – CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ DN (double-negative) subsets. The CD8⁺ subset of MAIT cells (predominantly expressing CD8 $\alpha\alpha$ homodimers in contrast to MHC-restricted CD8⁺ T cells expressing heterodimer CD8 $\alpha\beta$) are more abundant, comprising up to 95% of the MAIT cell pool [6, 7, 9, 10].

Apart from CD8 discrimination, an additional heterogeneity of MAIT cell population is determined by TCR α chains. Majority of MAIT cells express almost invariant V α 7.2-J α 33 (TRAV1-2-TRAJ33) rearrangement. Two smaller subpopulations of MAIT cells are defined by the expression of TRAV1-2-TRAJ12 and TRAV1-2-TRAJ20, respectively [6]. The experiments with *E. coli*-infected THP-1 cells suggest that TRAJ33 and TRAJ12 are functionally similar, that is release comparable pattern of cytokines, both efficiently kill *E. coli* and promote killing of intracellular mycobacteria [11]. Moreover, a discrete subset of MAIT cells exhibits autoreactivity and folate-derived reactivity and is restricted by MR1, but is TRAV1-2⁻ [12].

In this work, we asked whether a phenotypical or functional heterogeneity between CD8⁺ and DN subpopulations exists. The hypothesis took into account the differences between subpopulations of other innate lymphocytes, such as invariant natural killer T (iNKT) or natural killer (NK) cells. Indeed, iNKT cells contain two main subpopulations, CD4⁺ and DN, that are strikingly different. DN iNKT cells predominantly express NK markers. Whereas the secretion of pro-inflammatory cytokines is equally distributed in both populations, CD4⁺ iNKT cells are the unique source of anti-inflammatory and Th2 cytokines such as IL-4 or IL-10. It is hypothesized that DN iNKT cells are pro-inflammatory, whereas the CD4⁺ population is oriented towards B cell help and is probably regulatory [13, 14]. NK cells can be divided based on the degree of CD56 expression into CD56^{dim} and CD56^{bright}. The CD56^{dim} NK cell subset is naturally more cytotoxic and expresses higher levels of Ig-like NK receptors and FC-gamma receptor III (CD16) than the CD56^{bright} NK cell subset. In contrast, the CD56^{bright} subset has the capacity to produce abundant cytokines following activation, but has a low natural cytotoxicity and is CD16^{dim} or CD16⁻ [15].

Using a relatively broad panel of antibodies against surface markers and intracytoplasmic cytokines, we tested the possible dichotomy of MAIT cell subpopulations.

Material and methods

Subjects. Peripheral blood samples of 10 healthy subjects were examined (six females and four males). The average age was 34.3 years (25–46). The study was approved by local ethical authorities.

Surface staining. Peripheral blood was analysed by flow cytometry. The antibodies were purchased from BD Pharmingen™: anti-CD3 (UCHT1), anti-CD8 (HIT8a), anti-TCR- γ/δ -1 (11F2), anti-CD16 (3G8), anti-CD25 (MA251), anti-CD27 (M-T271), anti-CD28 (CD28.8), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD56 (MY31), anti-CD62L (DREG-56), anti-CD95 (DX2), anti-CD158b (CH-L), anti-CD184 (12G5), anti-CD195 (3A9), anti-CD244 (2-69) and anti-CD107a (H4A3); from Biolegend: CD8 (RPA-T8), anti-V α 7.2⁺ (3C10) anti-CD26 (BA5b),

anti-CD94 (DX22), anti-CD122 (TU27), anti-CD127 (A019D5), anti-CD150 (A12 (7D4), anti-CD158a (HP-MA4), anti-CD161 (HP-3G10), anti-TCRV α 7.2 (3C10), anti-CD186 (K041E5), anti-CD192 (K036C2), anti-CD196 (G034E3), anti-NKp80 (5D12) and anti-CD314 (1D11); and from R&D Systems: anti-NKG2A (131411). Cells were acquired with a FACSCanto II (BD Bioscience) and analysed using FlowJo software (Tree Star).

Isolation and stimulation of human peripheral mononuclear cells (PBMCs). PBMCs were isolated from whole heparinized blood by Histopaque[®]-1077 density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich). Isolated PBMCs were resuspended overnight in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) with 10% FBS in 37 °C. The next day, the cells were stimulated with PMA (phorbol myristate acetate) and ionomycin in the presence of brefeldin A (BD Pharmingen™: Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™) in RPMI-1640 medium with 10% FBS for 5 h at 37 °C.

Intracellular staining. Stimulated PBMCs were stained with surface antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD161, anti-TCRV α 7.2, anti-TCR- γ/δ -1) for 15 min at room temperature (RT) in the dark, then washed and fixed by BD Phosflow Lyse/Fix Buffer 5X (BD Bioscience) and permeabilized by BD Phosflow Perm Buffer II (BD Bioscience) according to the manufacturer's manual. Samples were then stained by anti-granzyme B (CLB-GB-11), anti-TNF- α (MAb11), anti-IFN- γ (4S.B3) (purchased from Exbio), anti-IL-17 (SCPL1362), anti-IL-4 (8D4-8) and IgG1 (MOPC-21) (purchased from BD Pharmingen™) and anti-IL-10 (JES319F1) (purchased from Biolegend), then washed and analysed by flow cytometry.

Statistical analysis. The data were analysed using the Mann-Whitney *U*-test.

Results

Detection and basic characteristics of MAIT cells

MAIT cells were detected within mononuclear fraction of PBMCs as CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁻ CD4⁻ V α 7.2⁺ CD161⁺ cells (Fig. 1A).

The average percentage of MAIT cells among CD3⁺ cells was 5.85% (Fig. 1B) (range 2.24–12.46%). The comparison of surface marker expression between MAIT cells and conventional CD3⁺ T cells shows that MAIT cells are CD25⁻ CD27⁺ CD28⁺ CD45RO⁺ CD62L⁻ CD95⁺ CD122⁺ CD127⁺ CCR6⁺ CXCR6⁺, that is activated/memory, tissue-targeted cells (Fig. 1D).

Comparison of the surface phenotype of the subpopulations of MAIT cells

The surface markers were then analysed separately on CD8⁺ and DN MAIT cells. In accordance with previous reports [6, 7, 9, 10], the majority of the MAIT cell pool expressed CD8 (75.8% in average; range 24.1–96.7%) (Fig. 1C).

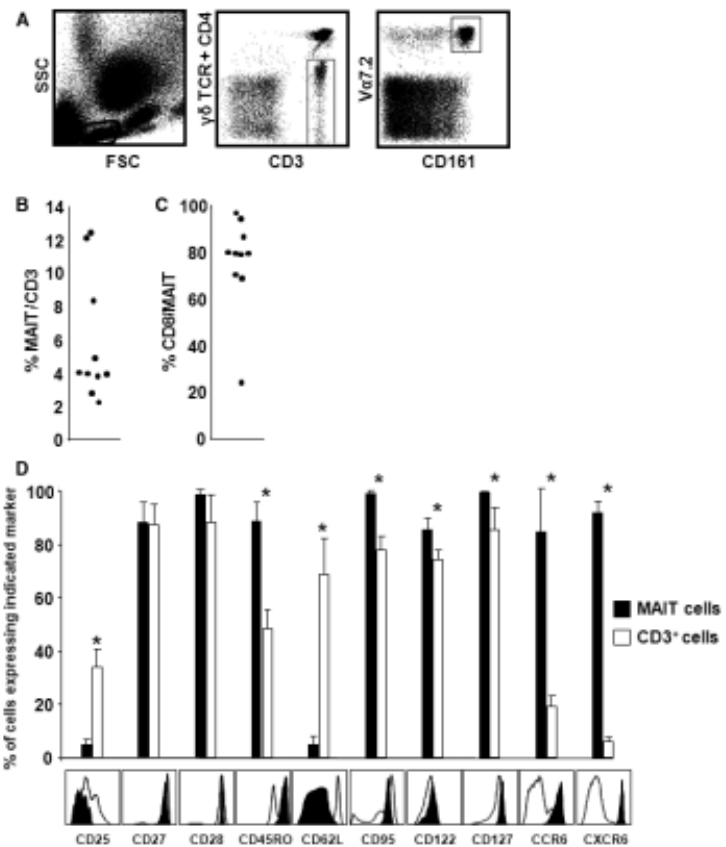


Figure 1 MAIT cell detection and basic characteristics. (A) Peripheral blood MAIT cells were detected within mononuclear fraction of the peripheral blood and defined as $CD3^+ \gamma\delta^- CD4^- V\alpha 7.2^+ CD161^{++}$ cells. (B) Frequency of MAIT cells among $CD3^+$ T cells and (C) percentage of CD8-expressing cells among MAIT cells. Each point corresponds to one subject. (D) Comparison of the expression of surface markers between MAIT cells (black bars) and conventional T cells (white bars). The data show the average percentage of positive cells, and the error bars show the standard deviation. *P*-values below 0.05 are considered statistically significant and are marked by asterisk (Mann–Whitney *U*-test). Representative histograms show the expression of indicated surface marker by MAIT cells (black histograms) and conventional T cells (black lines).

Higher proportion of $CD8^+$ than DN MAIT cells expressed CD16 (28% of positive $CD8^+$ versus 9% of positive DN MAIT cells; $P < 0.01$) and NKG2D (90.4% of positive $CD8^+$ versus 76% of positive DN MAIT cells; $P = 0.01$). Interestingly, a higher expression of both CD16 and NKG2D by $CD8^+$ rather than DN MAIT cells was observed in all of the 10 subjects tested. CD56, CD94, CD244, NKG2A and NKp80 were expressed in the same manner by $CD8^+$ and DN MAIT cells. MAIT cells expressed neither CD158a nor CD158b (Fig. 2A).

We did not detect a difference in the expression of T cell markers tested (CD25, CD26, CD27, CD28, CD45RO, CD95, CD122, CD127, CD150) (Fig. 2B).

The phenotype typical for tissue-homing inflammatory cells ($CD62L^- CXCR4^+ CXCR6^+ CCR2^+ CCR5^+ CCR6^+$) was found on both $CD8^+$ and DN MAIT cells without any difference between the subpopulations (Fig. 1C).

Function of MAIT cells

In accordance with a previous report [7], we did not detect the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 or IL-10 by MAIT cells after the stimulation with PMA

and ionomycin, but we did detect a robust production of pro-inflammatory and cytotoxic cytokines. As much as 82.4% of MAIT cells produced TNF- α and 85.9% produced IFN- γ .

The pro-inflammatory and cytotoxic cytokines were produced by more $CD8^+$ than DN MAIT cells (TNF- α : 87.8% versus 66.3%; $P = 0.048$; IFN- γ 89.9% versus 78.9%; $P = 0.03$; granzyme B: 23.2% versus 9.0%; $P < 0.001$) (Fig. 3A).

The surface expression of CD107A after PMA stimulation, a sensitive marker of the degranulation reflecting cytolytic potential [16], was higher on $CD8^+$ than DN MAIT cells in all tested subjects (12.4% versus 2.7%; $P < 0.001$).

Discussion

MAIT cells identified as both $V\alpha 7.2^+ CD161^{++}$ or MR1 tetramers $^+$ contain $CD8^+$, $CD4^+$ and $CD4^- CD8^-$ double-negative (DN) subpopulations. The $CD4^+$ cells form 0–5% [6, 9], which is similar to background levels in many experiments. That is why these cells are explicitly omitted from many analyses by defining MAIT cells as $V\alpha 7.2^+$

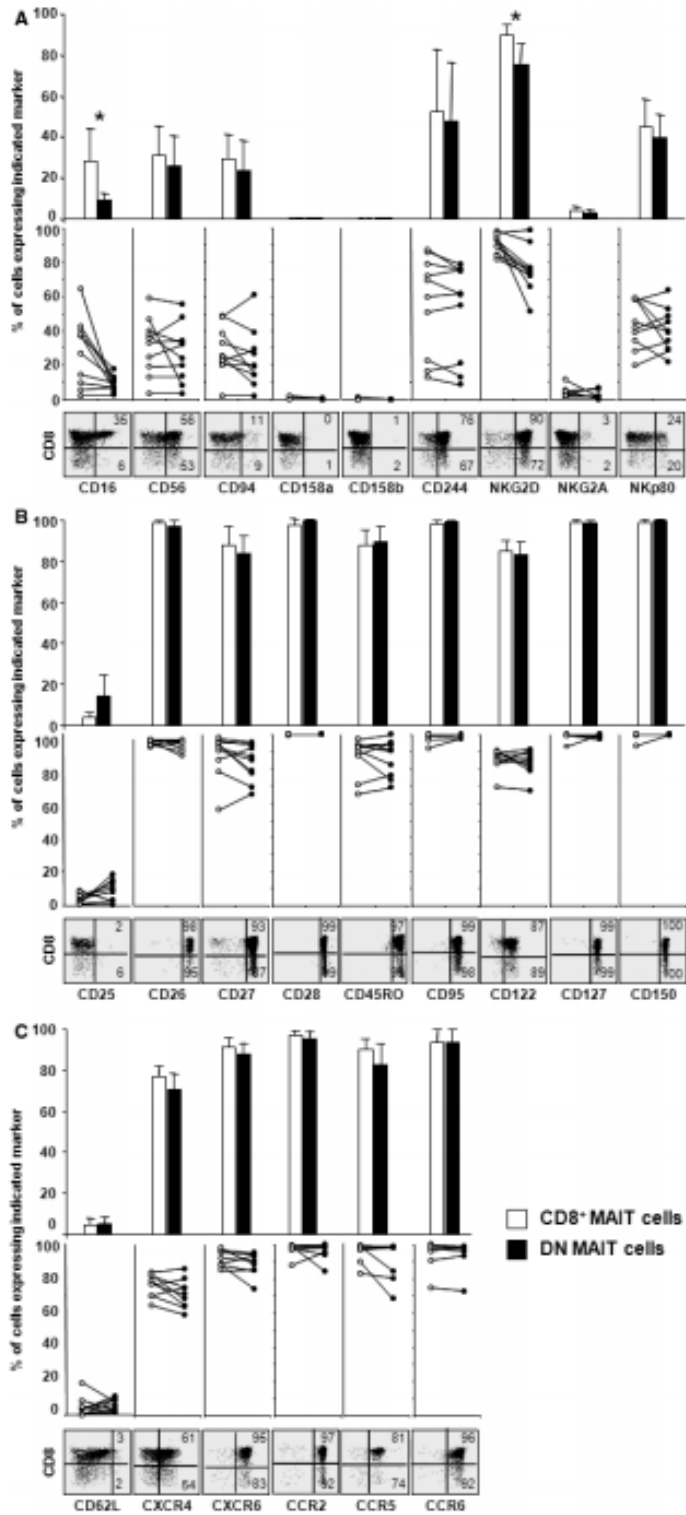


Figure 2 Analysis of the surface phenotype of the subpopulations of MAIT cells. Comparison of the expression of (A) NK cell markers, (B) T cell markers and (C) chemokine receptors between CD8⁺ MAIT cells (white bars) and double-negative (DN) MAIT cells (black bars). The data indicate the average values of positive cells, and the error bars indicate the standard deviation. *P*-values below 0.05 are considered statistically significant (Mann-Whitney *U*-test) and are marked by asterisk (first row). Each point corresponds to a subject (white points = CD8⁺ MAIT cells; and black points = double-negative MAIT cells), and the lines connect the values of one subject (second row). Representative dot plots are shown in the third row. Values indicate the percentage of CD8⁺ and DN MAIT cells expressing indicated marker.

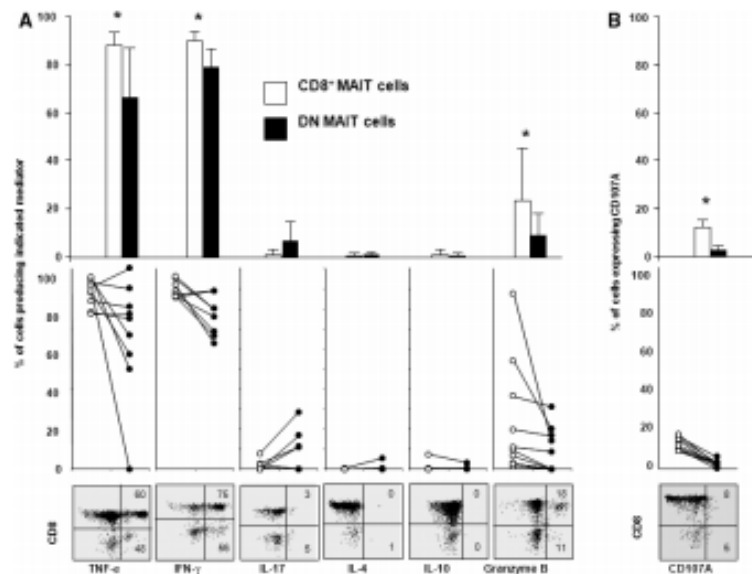


Figure 3 Function of MAIT cells. (A) Intracytoplasmic cytokine content in CD8⁺ MAIT cells (white bars) and double-negative (DN) MAIT cells (black bars) after *in vitro* stimulation with PMA and ionomycin. (B) Surface expression of CD107A after stimulation with PMA and ionomycin on CD8⁺ MAIT cells (white bars) and double-negative (DN) MAIT cells (black bars). The data indicate the average values of positive cells, and the error bars indicate the standard deviation. *P*-values below 0.05 are considered statistically significant (Mann–Whitney *U*-test) and are marked by asterisk (first row). Each point corresponds to a subject (white points = CD8⁺ MAIT cells; and black points = double-negative MAIT cells), and the lines connect the values of one subject (second row). Representative dot plots are shown in the third row. Values indicate the percentage of CD8⁺ and DN MAIT cells expressing indicated marker.

CD161⁺ $\gamma\delta$ ⁻ CD4⁻ CD3⁺ [7]. We adopted the same approach in this work.

Dusseaux and colleagues stated in one of the seminal papers on MAIT cells that no phenotypical or functional differences between the two main subpopulations of MAIT cells (CD8⁺ and DN) exist [7]. In addition, the CD8⁺ subpopulation of MAIT cells was the sole object of interest in many clinical papers including psoriasis [17], multiple sclerosis [18] or type 1 diabetes mellitus [19].

Contrary to the understanding of MAIT cells as a homogenous population, few examples of heterogeneity of MAIT cell biology exist. First of all, the ontogeny of both populations differs. The amount of DN MAIT cells increases relatively and remains absolutely stable with ageing, whereas CD8⁺ MAIT cells decline both relatively and absolutely with age [10].

Lee and colleagues [20] described subtle functional differences. CD8⁺ MAIT cells produced more IFN- γ and more IL-17 on per-cell basis than DN MAIT cells.

The subpopulations show different resistance/sensitivity to xenobiotic treatments. Whereas the absolute amounts of DN MAIT cells decrease after long-term treatment cART (combination anti-retroviral therapy) [21], the CD8⁺ MAIT cells are more vulnerable to myeloablative chemotherapy [22].

Gold and colleagues demonstrated that CD8 coreceptor engagement is required for the activation of MR1-restricted

CD8⁺ MtB (*Mycobacterium tuberculosis*)-reactive V α 7.2⁺ T cell clones and virtually all MtB-reactive MR1-restricted V α 7.2⁺ T cells express CD8 [23].

We here show that both populations are very similar; that is, we did not detect antagonism of the subpopulations described in iNKT cells. Both subpopulations of MAIT cells are memory/activated, tissue-homing and pro-inflammatory. Nevertheless, we detected quantitative differences between the subpopulations. In general, the CD8⁺ MAIT cells seem to be better equipped to exert inflammatory functions and cytotoxicity.

First, more CD8⁺ MAIT cells express CD16 and NKG2D than DN MAIT cells.

NKG2D is activating NK receptor that triggers cytotoxicity in NK cells [24].

CD16 binds Fc portion of IgG antibodies and induces a potent series of signals resulting in cytokine production and cytotoxic effector activity – ADCC. CD16 is expressed by only a small fraction of T cells. Clemenceau and colleagues showed that these cells express perforin and are capable of mediating ADCC *ex vivo* [25]. It has not been formally demonstrated that CD16⁺ fraction of MAIT cells mediate ADCC too. Nevertheless, if MAIT cells indeed recognize an Fc part of immunoglobulins and mediate ADCC, it would represent an additional mechanism of antigen recognition by MAIT cells in addition to the recognition by restricted TCR or TCR-independent

activation by IL-12 plus IL-18 [26]. This would enable MAIT cells to indirectly recognize any antigen and could promote their participation in the defence against broader spectrum of infections and inflammatory processes. It remains to be elucidated whether MAIT cells can be stimulated by these pathways *in vivo*.

Second, more CD8⁺ than DN MAIT cells contain pro-inflammatory/cytotoxic cytokines such as TNF- α or IFN- γ or granzyme B. MR1 may have the ability to bind CD8 $\alpha\beta$ and may accordingly play a role in augmenting the MAIT cell responses [27]. However, the PMA used in this study to induce the cytokines does not bind CD8 coreceptor indicating that the difference is rather intrinsic, independent of CD8 signalling [28].

Finally, the hypothesis of higher cytotoxic potential of CD8⁺ MAIT cells seems to be confirmed by the analysis of CD107A expression upon stimulation that is higher on CD8⁺ MAIT cells. Acquisition of cell surface CD107A is associated with the loss of intracellular perforin and is inhibited by colchicine, indicating that exposure of CD107A to the cell surface is dependent on degranulation. CD107A expression corresponds with cytolytic antigen-specific activity and IFN- γ production [16].

Magalhaes and colleagues [29] have recently shown that various MAIT cell parameters such as MAIT cell count or capacity to produce cytokines are influenced by the body mass index (BMI). We here asked whether the differences between CD8⁺ MAIT and DN MAIT are also influenced by the BMI. As all subjects in our original analysis were slim with BMI <25, we performed an additional analysis in two obese patients (BMI = 37 and 32, respectively). The differences between CD8⁺ and DN MAIT cells reported in slim subjects were observed in the obese subjects too.

In conclusion, we here demonstrate that the main subpopulations of MAIT cells (CD8 and DN) are relatively uniform in terms of phenotype and function. Both populations are memory/activated, tissue-homing and pro-inflammatory and are prone to mediate inflammatory processes such as multiple sclerosis, and to play an important role in the defence against pathogens.

CD8⁺ MAIT cells are theoretically better equipped for these functions as they express higher levels of CD16 and NKG2D, produce more pro-inflammatory cytokines (TNF- α or IFN- γ) and have higher cytotoxic potential (contain more granzyme B and express higher levels of CD107A upon stimulation).

The major question is the physiologic relevance of our results as they were achieved using PMA + ionomycin stimulation which is far from physiologic.

Acknowledgment

We would like to thank Marshall Byun-Andersen from the 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, for

editing and correcting the English text. We thank Vendula Sinkorova and personnel of the Department of Laboratory Methods FNKV for their help with flow cytometry. This study was supported by the Research project P 27/2012 awarded by Charles University in Prague, 3rd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic.

Author contributions

J.N. conceived and designed the study and drafted the manuscript; J.B. and I.K. acquired data; and J.N. and J.B. analysed and interpreted the data and critically revised the manuscript.

References

- Treiner E, Lantz O. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol* 2006;18:519–26.
- Treiner E, Duban L, Bahram S *et al*. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003;422:164–9.
- Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ *et al*. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 2012;491:17–23.
- Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW *et al*. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature* 2014;509:361–5.
- Tilloy F, Treiner E, Paik SH *et al*. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 1999;189:1907–21.
- Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala KG *et al*. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med* 2013;210:2305–20.
- Dusseaux M, Marin E, Serriari N *et al*. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 2011;117:1250–9.
- Walker LJ, Kang Y-H, Smith MO *et al*. Human MAIT and CD8 $\alpha\beta$ cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8⁺ T cells. *Blood* 2012;119:422–33.
- Martin E, Treiner E, Duban L *et al*. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol* 2009;7:e54.
- Novak J, Dobrovolny J, Novakova L, Kozak T. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. *Scand J Immunol* 2014;80:271–5.
- Lepore M, Kalinichenko A, Kalinichenko A *et al*. Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β repertoire. *Nat Commun* 2014;5:3866.
- Gherardin N, Keller A, Woolley R *et al*. Diversity of T cells restricted by the MHC class I-related molecule MR1 facilitates differential antigen recognition. *Immunity* 2016;44:32–45.
- Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625–36.
- Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V α 24 natural killer T cells. *J Exp Med* 2002;195:637–41.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA *et al*. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65–78.

- 17 Teunissen MBM, Yeremenko NG, Baeten DLP *et al.* The IL-17A-producing CD8⁺ T-cell population in psoriatic lesional skin comprises mucosa-associated invariant T cells and conventional T cells. *J Invest Dermatol* 2014;134:2898–907.
- 18 Willing A, Leach OA, Ufer F *et al.* CD8⁺ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2014;44:3119–28.
- 19 Harms RZ, Loewen KM, Corley KP, Cabrera MS, Sarvetnick NE. Altered CD161 bright CD8⁺ mucosal associated invariant T (MAIT)-like cell dynamics and increased differentiation states among juvenile type 1 diabetics. *PLoS ONE* 2015;10:e0117335.
- 20 Lee O-J, Cho Y-N, Kee S-J *et al.* Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp Gerontol* 2014;49:47–54.
- 21 Leeansyah E, Ganesh A, Quigley MF *et al.* Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. *Blood* 2013;121:1124–35.
- 22 Novak J, Dobrovolsky J, Brozova J, Novakova L, Kozak T. Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Exp Med* 2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409838>
- 23 Gold MC, Eid T, Smyk-Pearson S *et al.* Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunol* 2013;6:35–44.
- 24 Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495–502.
- 25 Clémenceau B, Vivien R, Berthomé M *et al.* Effector memory alpha T lymphocytes can express FcγRIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 2008;180:5327–34.
- 26 Ussher JE, Bilton M, Atwood E *et al.* CD161⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12 + IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol* 2014;44:195–203.
- 27 Gao GP, Tormo J, Gerth UC *et al.* Crystal structure of the complex between human CD8α(α) and HLA-A2. *Nature* 1997;387:650–4.
- 28 Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 1984;133:123–8.
- 29 Magalhães I, Pingris K, Poirou C *et al.* Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2015;125:1752–62.