

Transplantace kmenových buněk krvetvorby u dětí ve FN v Motole

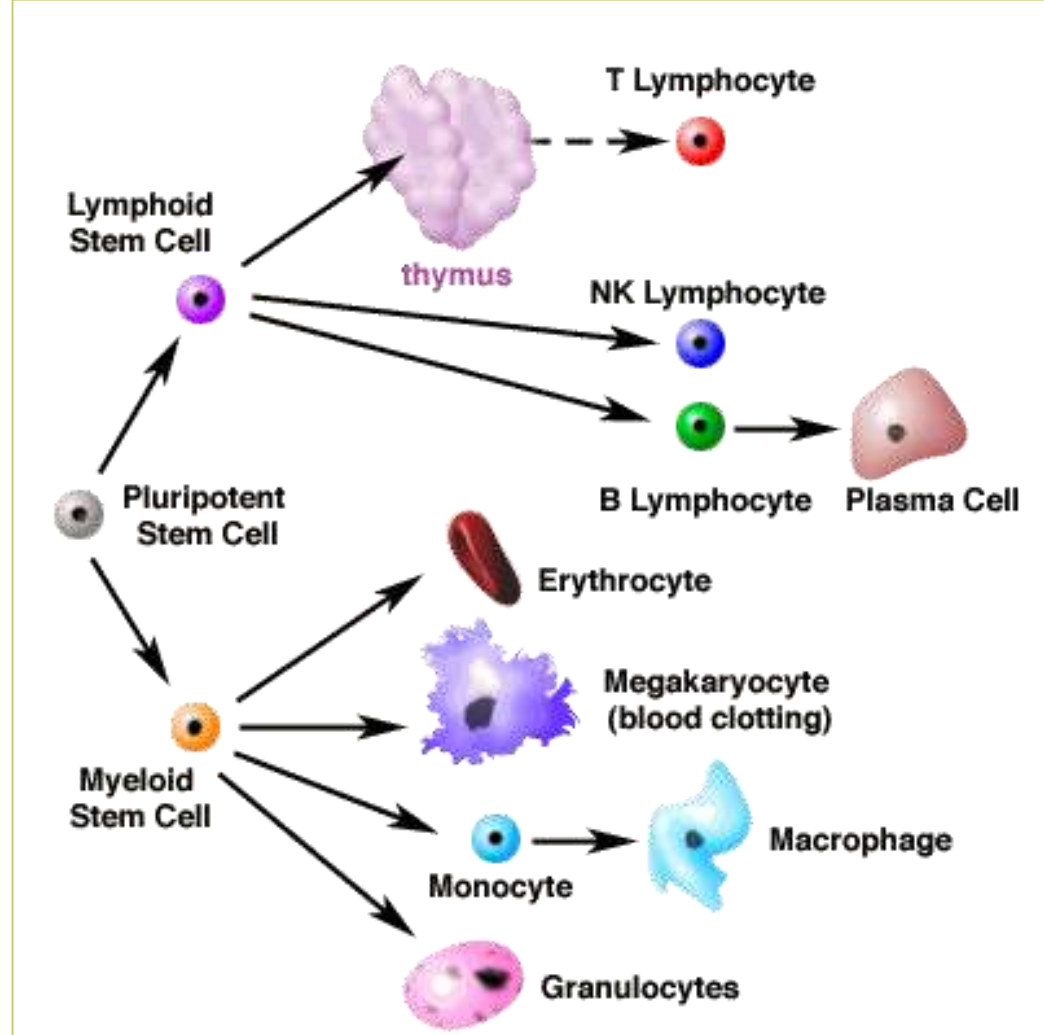
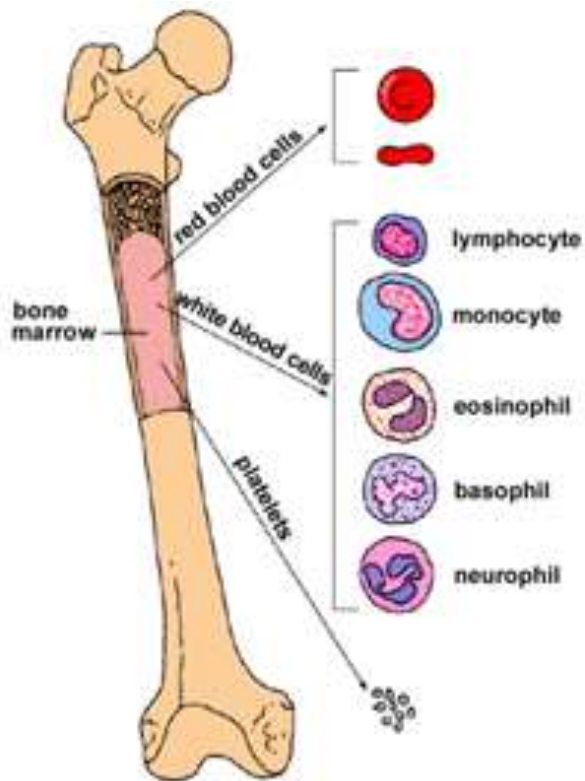
Petr Sedláček

Klinika dětské hematologie a
onkologie
2. LF UK a FN v Motole



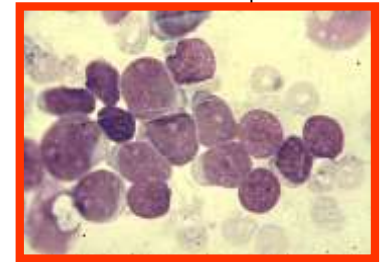
Kmenové buňky krvetvorby jsou zdrojem

**erytrocytů
trombocytů
granulocytů
lymfocytů
monocytů / makrofágů**



.....a díky tomu je
transplantace kmenových buněk krvetvorby
léčebnou metodou u:

- leukémií/lymfomů, kde selhává chemoterapie nebo chemoterapie není schopna eliminovat maligní klon
(ALL, AML, CML, MDS,...)
- závažných život ohrožujících (vrozených či získaných) poruch krvetvorby nebo imunity
(SCID, SAA, Thalasémie,...)
- některých metabolických vad - dodává buňky schopné produkovat chybějící enzymy
(MPS, adrenoleukodystrofie,...)

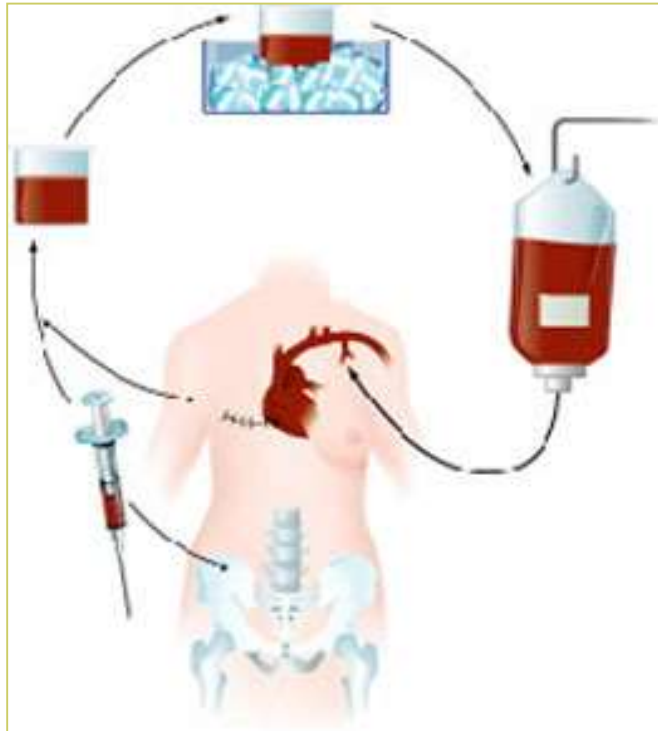


**Zdrojem
kmenových buněk krvetvorby je:**

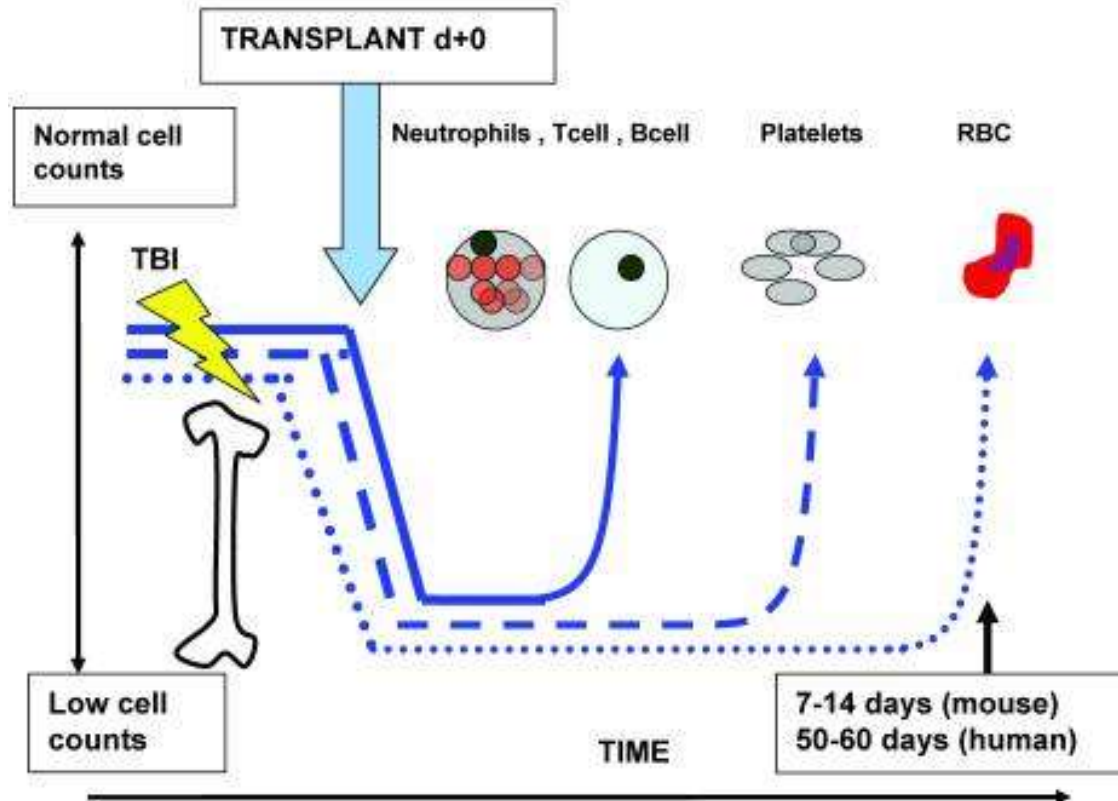
kostní dřeň

**periferní krev stimulovaná
růstovým faktorem**

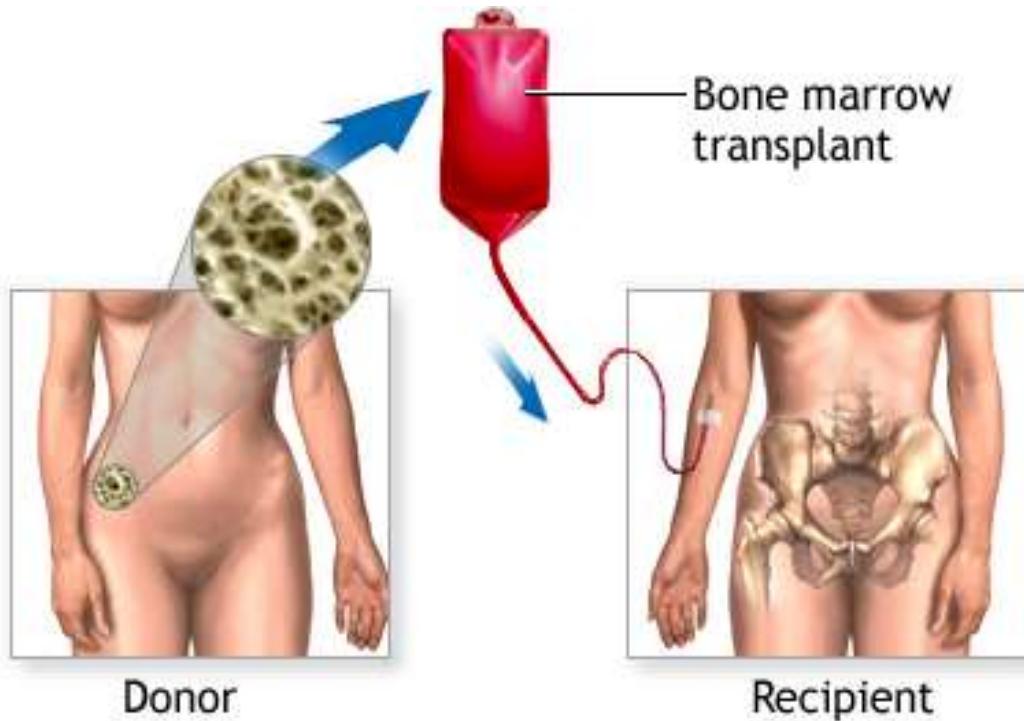
pupečnická krev novorozence.



princip HSCT



princip HSCT



Donor bone marrow cells repopulate recipient bone marrow

V 60. letech byly vyřešeny dva velké problémy komplikující rozvoj TKD

□ Nepřihojení/rejekce štěpu

- **Mathé G 1965 (Blood):** „*Je nezbytné nejdříve eliminovat příjemcovu imunitní odpověď (celotělové ozáření)*“

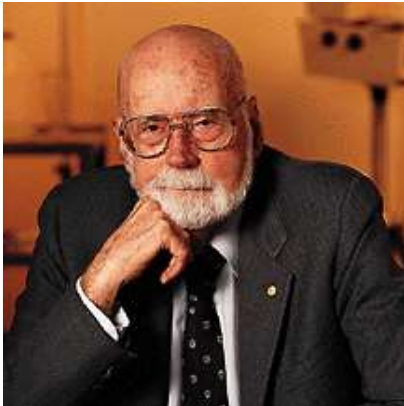
□ Problematika GVHD

- **Bach FH, Amos DB (Science 1967)**
- **Rood JJ (Sem Hemat 1968):**
 - ✓ *HLA lze vyšetřit MLC a typizací lymfocytů*
 - ✓ *25% sourozenců je HLA identických*

JM 1939 From: TRANSBIO
 EDI # 15 1977
OFFICE COPY DO NOT REMOVE
 INTRAVENOUS INFUSION OF BONE MARROW IN PATIENTS RECEIVING
 RADIATION AND CHEMOTHERAPY* -
 E. DONNALL THOMAS, M.D.,† HARRY L. LOCHTE, JR., M.D.,‡ WAN CHUNG LU, PH.D.,§
 AND JOSEPH W. FERREBEE, M.D.¶
 COOPERSTOWN, NEW YORK, AND BOSTON, MASSACHUSETTS

1. Transplantace USA; E.D. Thomas

1957



Human Marrow Grafts 1958-68

Diseases	# Patients			
	Total	Graft Failure	GVHD	Alive
Aplastic anemia	73	66	5	0
Hematologic malignancies	115	56	33	0
Immunodeficiencies	15	3	9	3
Total	203	125	47	3

Bortin, *Transpl* 9: 571, 1970

HLA systém

- hlavní histokompatibilní systém leukocytárních antigenů

- Imunitní systém rozpoznává přes molekuly HLA cizorodé antigeny, které by měl eliminovat.
- Systém byl objeven v 50. letech.
- Neshoda dárce s příjemcem v HLA antigenech je překážkou úspěšné transplantace.

SHORT COMMUNICATION

Histocompatibility and Transplantation

E. F. POTWOROWSKI, Ph.D.* and G. LAMOUREUX, M.D., Ph.D.,†
Montreal

HISTOCOMPATIBILITY testing is the determination of the degree of alloantigenic similarity between the tissues of two individuals. Its use in organ transplantation need not be emphasized here, as a voluminous literature already exists on this subject.^{1,2} This paper will be limited to a review of the most widely employed methods of histocompatibility testing and to an outline of some of the work being done in laboratories in different countries and particularly in Canada.

be clearly demonstrated. While matching provides an overall impression of antigenic differences between two individuals, typing gives a more detailed though incomplete idea of the antigenic profiles. This is at present a serious shortcoming of typing. However, typing has the great advantage over matching that it can be done in a few hours, while matching by leukocyte culture takes several days. Matching, using antisera of unknown specificity, is a compromise, but it carries the same disadvantage as typing.

TABLE I.—OCCURRENCE OF TRANSPLANTATION ANTIGENS IN A RANDOM DUTCH POPULATION AND IN THE MONTREAL PANEL, EXPRESSED AS PERCENTAGE OF DONORS POSSESSING EACH ANTIGEN. NOTE THE SIMILAR DISTRIBUTION FOR THE TWO GROUPS

Antigen	4a	4b	5b	6a	6b	7b	7c	7d	8a
Dutch	66	90	97	90	56	74	37	23	61
Canadian	73	89	93	82	54	74	39	23	66

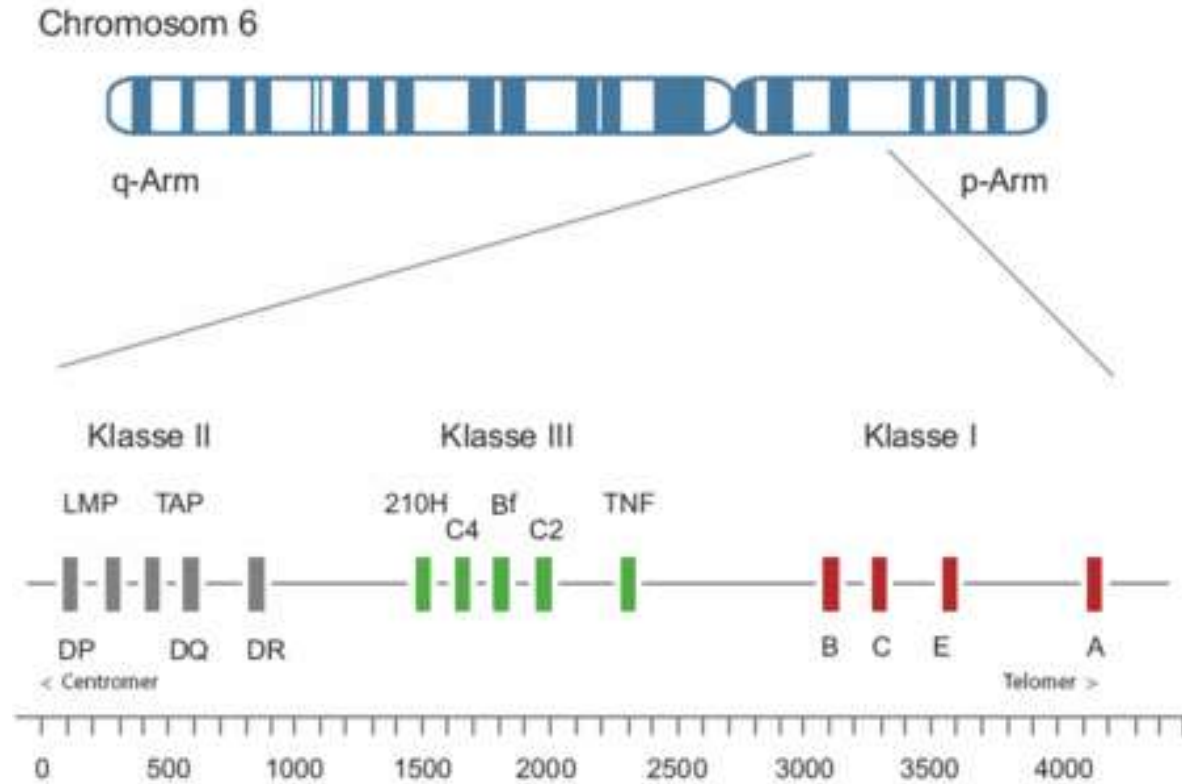
Postupný proces
poznávání diverzity
HLA systému u lidí

1968

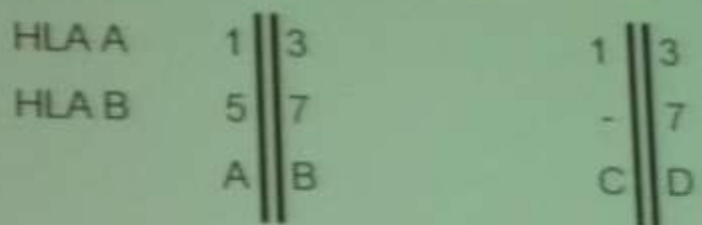
TABLE I.—OCCURRENCE OF TRANSPLANTATION ANTIGENS IN A RANDOM DUTCH POPULATION AND IN THE MONTREAL PANEL, EXPRESSED AS PERCENTAGE OF DONORS POSSESSING EACH ANTIGEN. NOTE THE SIMILAR DISTRIBUTION FOR THE TWO GROUPS

Antigen	4a	4b	5b	6a	6b	7b	7c	7d	8a
Dutch	66	90	97	90	56	74	37	23	61
Canadian	73	89	93	82	54	74	39	23	66

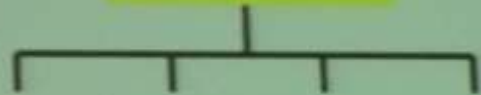
HLA systém



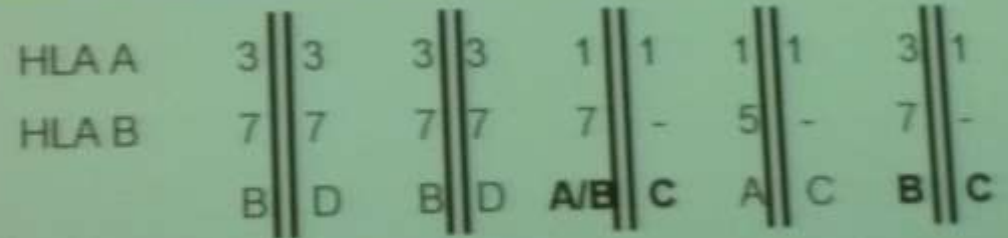
How many HLA loci?



1,3,5,7 x 1,3,7



	Sib1	Sib2	Sib3	Sib4	Patient
MLC vs patient	++++	++++	+?	++++	
HLA phenotypes	3,7	3,7	1,7	1,5	1,3,7





Srpen 1968 - Ostrava

Srpen 1968 - Minneapolis

prof. Richard A. Gatti



THE LANCET

[Close]

The Lancet, Volume 292, Issue 7583, Pages 1366 - 1369, 28 December 1968
doi:10.1016/50140-6736(68)92673-1

IMMUNOLOGICAL RECONSTITUTION OF SEX-LINKED LYPHOPENIC IMMUNOLOGICAL DEFICIENCY

[Richard A. Gatti](#) M.D. St. Louis, [Hilare J. Meuwissen](#) M.D. Nymegen, [Hugh D. Allen](#) M.D. Cincinnati, [Richard Hong](#) M.D. Illinois, [Robert A. Good](#) M.D., Ph.D. Minneapolis

Abstract

Treatment of a 5-month-old male with sex-linked lymphopenic immunological deficiency utilising immunologically competent cells from peripheral blood buffy coat and bone-marrow of a sibling donor resulted in reconstitution of both cellular and humoral immunity. Fatal graft-versus-host disease was circumvented by using donor cells which were histo compatible with the patient's cells with respect to the HL-A locus, as determined by both mixed lymphocyte cultures and lymphocytotoxic assay. A mild graft-versus-host reaction appeared at 8 days post-implantation but resolved spontaneously. Biopsies of rectal mucosa and skin indicate a continuing round-cell infiltration of host tissue 2 months post-implantation; the patient, however, remains clinically well.

From the Department of Pediatrics and the Pediatric Research Laboratories, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455, United States

BONE-MARROW TRANSPLANTATION IN A PATIENT WITH THE WISKOTT-ALDRICH SYNDROME

FritzH. Bach, M.D. Harvard (ASSISTANT PROFESSOR OF MEDICAL GENETICS AND MEDICINE), RichardJ. Albertini, M.D. Wisconsin (POST-DOCTORAL FELLOW IN MEDICAL GENETICS), Patricia Joo, M.D. Wisconsin (ASSISTANT CLINICAL PROFESSOR OF PEDIATRICS), JamesL. Anderson, M.D. Wisconsin (CHIEF RESIDENT IN PEDIATRICS), MortimerM. Bortin, M.D. Marquette (ASSOCIATE CLINICAL PROFESSOR OF MEDICINE)

[Show all authors](#)

Published: 28 December 1968



DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92672-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92672-X)

Please go to [ScienceDirect](#) to view the PDF



Article Info

Summary

Abstract

A 2-year-old boy with the Wiskott-Aldrich syndrome has been treated by bone-marrow transplantation. An initial attempt to transplantation without extensive preparation of the recipient failed. Subsequently the recipient was prepared with a 4-day course of cyclophosphamide followed by bone-marrow transplantation from a sister identical at HL-A— the major histocompatibility locus in man. 6 weeks after transplantation the patient is chimeric and has shown no evidence of graft-versus-host disease.



ORIGINAL ARTICLES

TRANSPLANTATION OF BONE-MARROW CELLS AND FETAL THYMUS IN AN INFANT WITH LYMPHOPENIC IMMUNOLOGICAL DEFICIENCY

J. De Koning, D.W. Van Bekkum, K.A. Dicke, L.J. Dooren, J.J. Van Rood, J. Rádl

[Show more](#)

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)92112-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)92112-6)

[Get rights and content](#)

Abstract

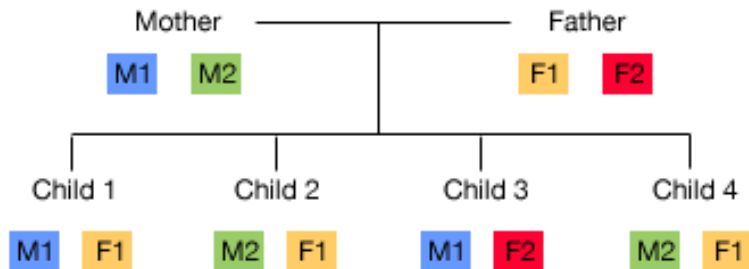
A 5-month-old male infant with lymphopenic immunological deficiency (Swiss-type agammaglobulinæmia) was treated by transplantation of a fetal thymus, and of bone-marrow-derived cells from his 7-year-old sister. The bone-marrow donor was selected for histocompatibility by leucocyte typing at the HLA locus and by mixed lymphocyte culture. Nucleated bone-marrow cells were centrifuged on an albumin gradient and a small number (5×10^6 /kg. body-weight) from the fraction assumed to contain concentrated hæmopoietic stem cells, were transplanted. 3 months after the transplantation the boy resumed normal development, and the cellular and humoral immunity were restored. There was an increase in the three major classes of immunoglobulins to a level that exceeded normal adult values. In addition a homogenous IgG-L and an IgA-K band were detected in the serum. A temporary mild exanthema was taken to be a sign of graft-versus-host reaction. Nursing in a laminar-flow cabinet appeared to be relatively simple and highly effective for protection against contamination with microorganisms from the environment.

Dárcelem může být ...

- „HLA identický“
sourozenec
- dědičnost „mendelovská“



One example of the inheritance of HLA haplotypes

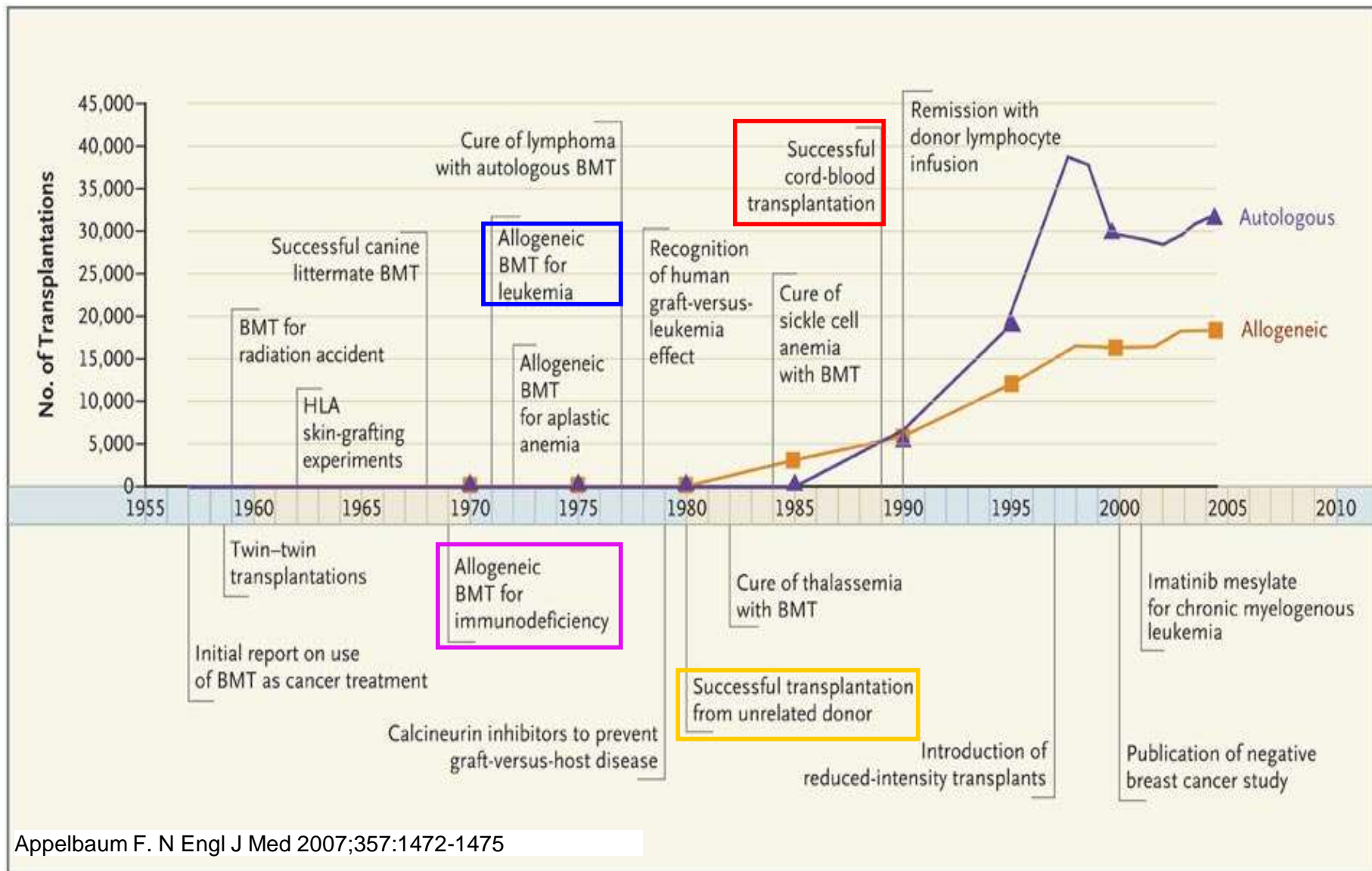


první úspěšné transplantace

3 vrozené imunodeficience (Minnesota, Wisconsin, Leiden) *1968



.... a tak začala nová – úspěšnější - etapa
alogenických transplantací kmenových buněk krve tvorby



1. Transplantace ve FN v Motole
* 28.11.1989
dárce identický sourozenec
příjemcem chlapec s akutní leukémií

1989

Generální stávka
27.11.1989



Allogeneic transplantation of bone marrow in childhood

Starý J, Kobyłka P, Kavan P, Komrska V, Syrůčková Z, Vávra V, Sedláček P, Hrubá A, Frýdl J, Mráček J

Čas Lék Česk. 1995 Dec 13;134(24):779-84.

Provedena analýza prvních 40 alogenních transplantací kostní dřeně u dětí v období 1989-1994.

Transplantace je účinnou léčebnou metodou u pacientů s maligním onemocněním krvetvorby či poruchou imunity.

Předpokladem úspěšné transplantace je správná indikace, volba dárce, prevence a léčba akutní reakce štěpu proti hostiteli a infekčních komplikací.

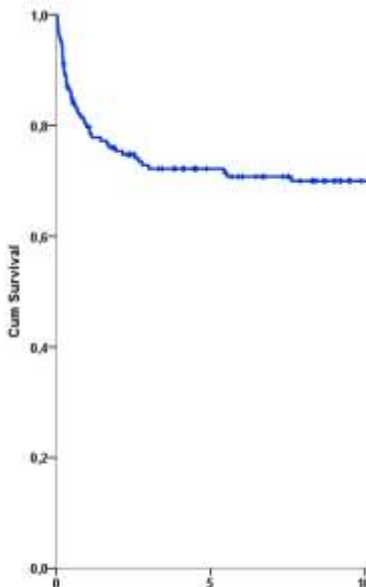
Life-island - „stan“ laminární proudění vzduchu



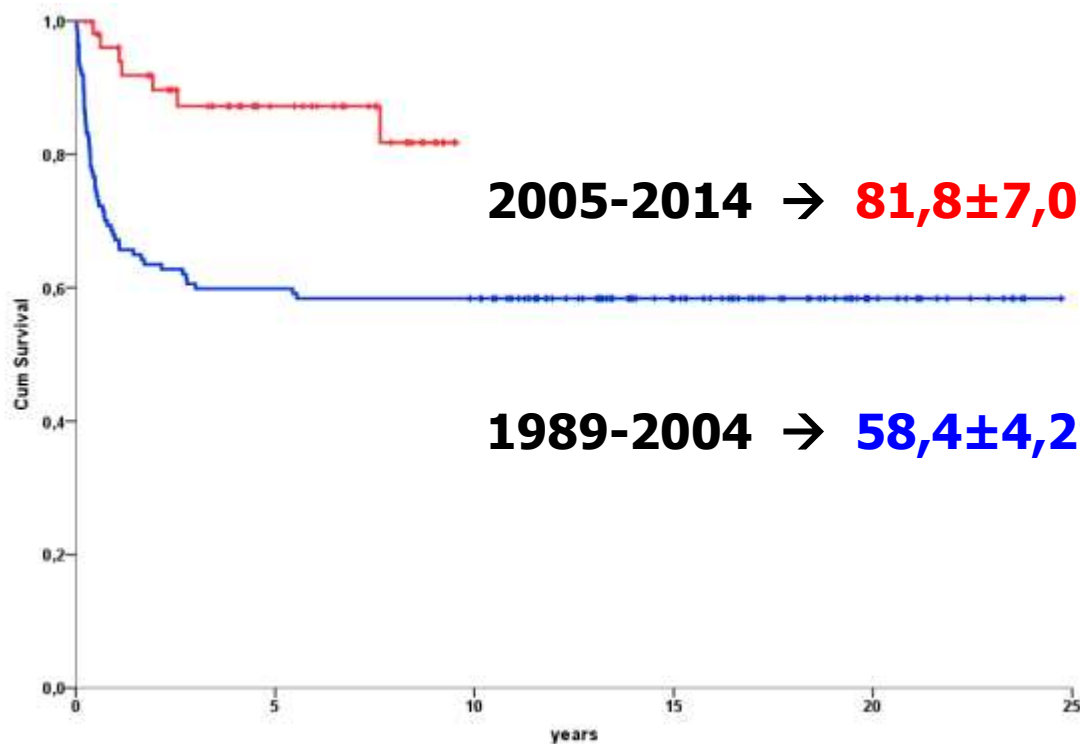
V březnu 2003 byla po 14 letech od zahájení programu otevřena nová transplantační jednotka s deseti jednolůžkovými pokoji s HEPA filtrací a pozitivním přetlakem



Přežití po transplantaci od identických rodinných dárců 1989-2014



— **70,0±3,6%** (n=169;e=49)



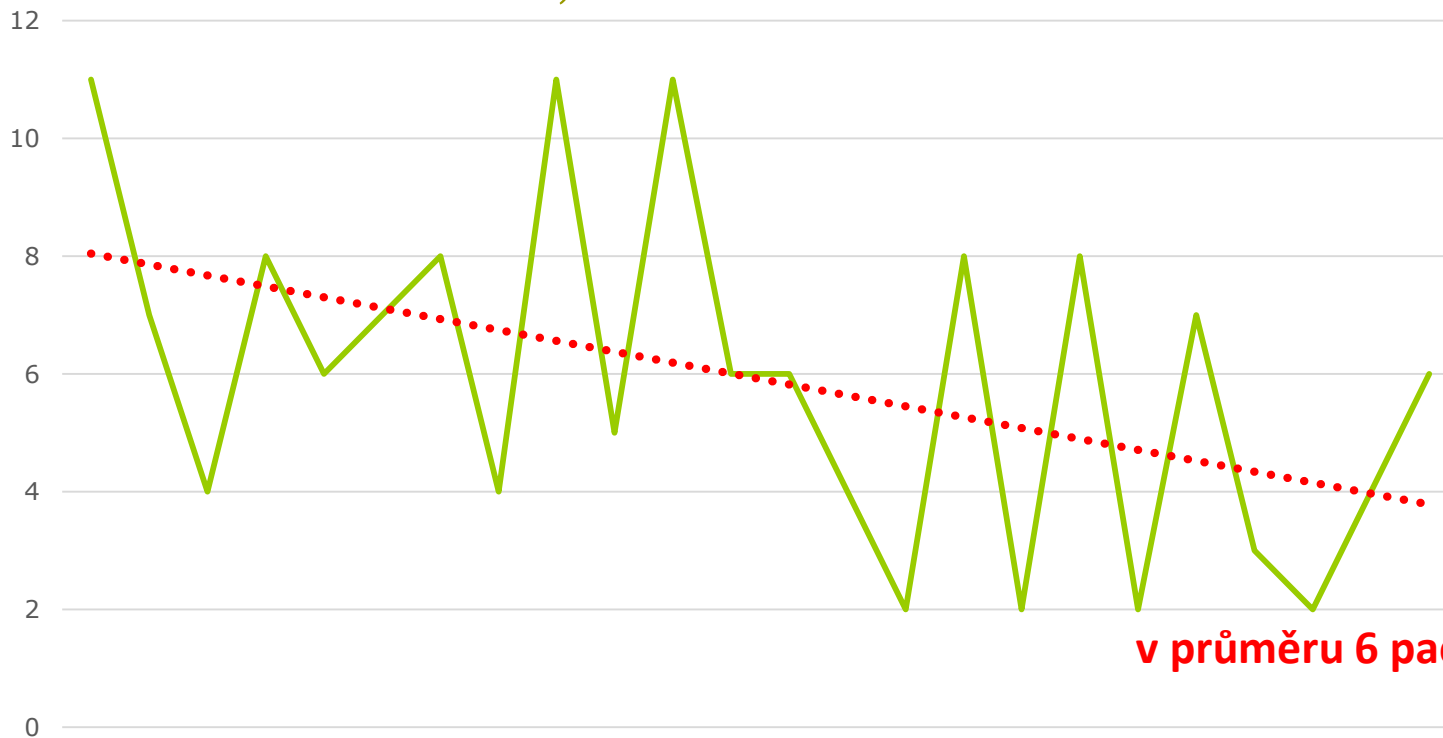
2005-2014 → 81,8±7,0% (n=53;e=7)

1989-2004 → 58,4±4,2% (n=137;e=57)

**Logrank
p = 0,15**

Transplantace od identického sourozence

(FN Motol; 1/1997- 9/2018)



v průměru 6 pac /rok



10.6 mil obyvatel
pod 2 mil dětí (0-17,99 let)
cca 120 000 porodů/rok

Šance na HLA identického sourozence

1.1.2001 – 1.10.2004

**100 dětí s nově dg malignitou
potenciálně indik. k aloSCT**

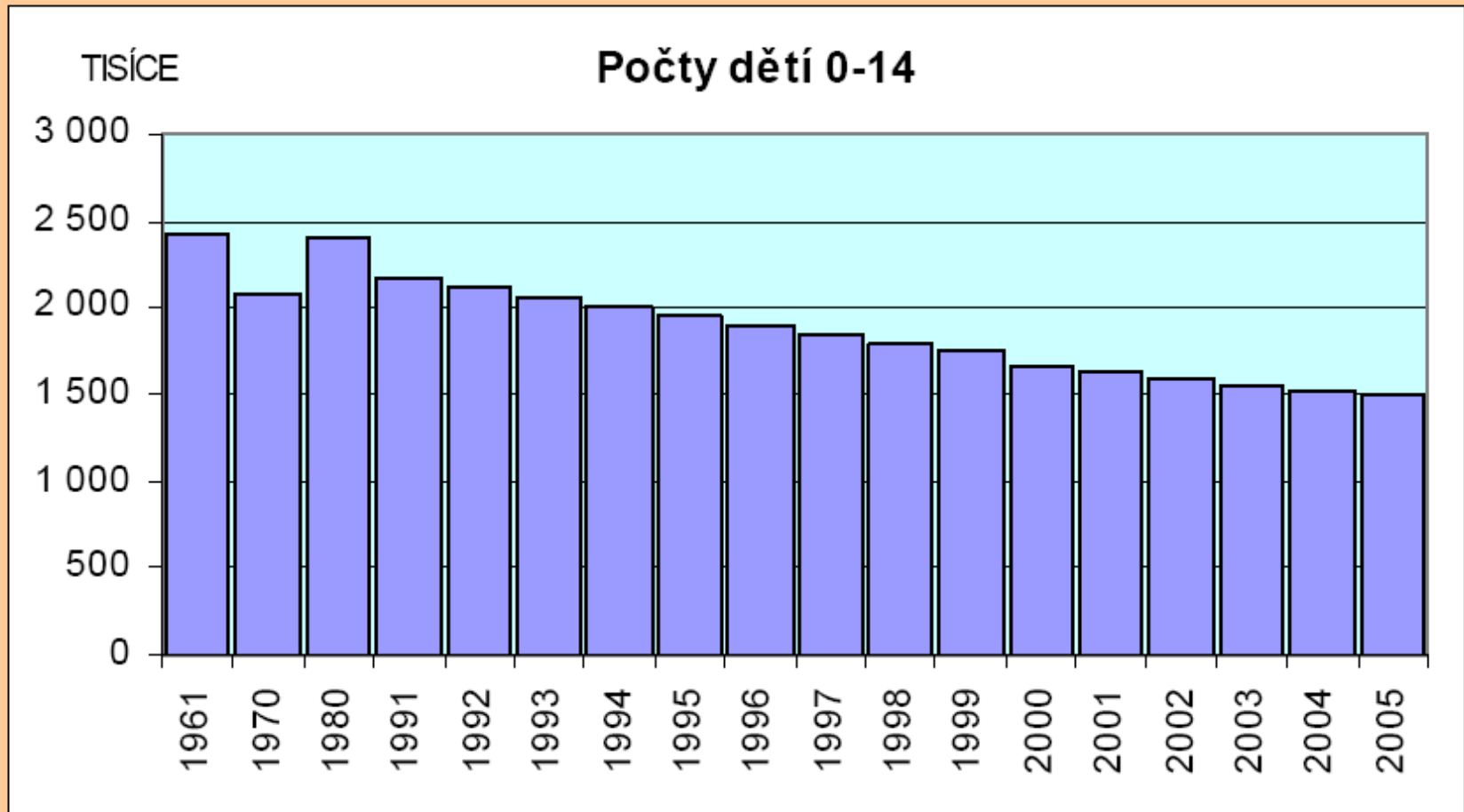
- Akutní lymfatická leukémie 71
 - Akutní myeloidní leukémie 24
 - Myelodysplastický syndrom 5
-
- **vlastní sourozenec : 59%**
 - **jen nevlastní sourozenec : 13%**
 - **bez sourozence : 28%**

Pravděpodobnost (25% sour.) :

~ 15% dětí s HLA identickým sourozcem



Dostupnost identického sourozence



Alternativní dárce

- 1. jiný fenotypicky shodný dárce z rodiny ~ 2% rodiče, sourozenec**
2. haploidentický rodinný dárce
T deplece štěpu
3. nepříbuzenský dárce z registru
4. pupečnicková krev z registru/banky

Haploidentický dárce

Lymfo-deplece

Imunologická bariéra zabraňuje transplantovat neupraveným štěpem HLA neshodných dárců

CliniMACS[®] Technology

The CliniMACS[®] Plus instrument is an automated cell separation system based on cell surface technology. It works on the principle of paramagnetic bead separation. Attachment of target cells to depletion of unwanted cells is based on magnetic separation.

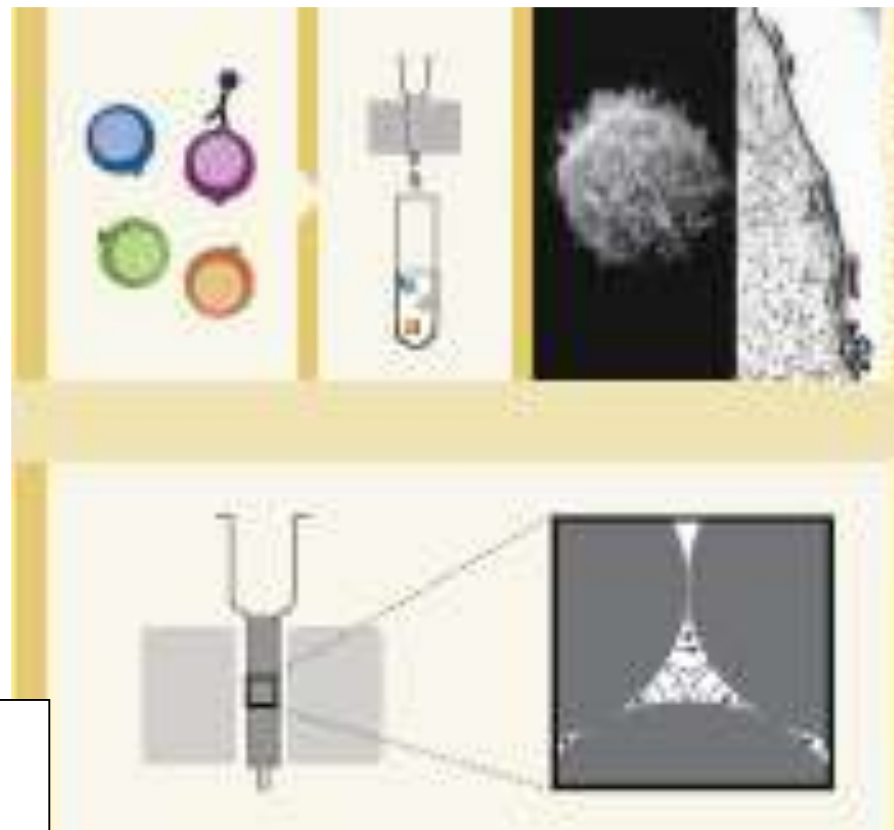
The cells are first magnetically attached to the Cell Separation Bag using an antibody-specific reagent. After labeling, the cells are washed to remove excess reagent. Then the Cell Separation Bag containing the labeled cells is connected to the tubing set, which is then connected to the CliniMACS[®] Plus and Cell Collection Bag. After mixing to ensure the antibody coating, the system automatically applies the cell sample onto the selection column. The sample application is followed by a series of washing steps depending on the chosen workflow program. Finally, the target cells are washed from the column. The CliniMACS[®] Plus is an easy-to-use instrument with the CliniMACS[®] Plus system separates large numbers of cells per second with high purity and viability. A range of tubing sets approved for different applications is available.

The CliniMACS[®] System (CliniMACS[®] Plus instrument, CliniMACS[®] tubing sets, CliniMACS[®] reagents, and CliniMACS[®] collection bags) offers a flexible platform enabling the separation of many cell types as well as automated separation of peripheral stem cells to supply sample requirements. Easy reagents and tubing sets allow for the flexibility of processing research applications in a research cell therapy concept.



Figure 1: Cell Collection Tube placed in the CliniMACS[®] Plus instrument separation bag.

Figure 2: The CliniMACS[®] Plus instrument with an active CliniMACS[®] tubing set.



Odstranění lymfocytů ze štěpu umožní toleranci cizorodé krvetvorby

Co jsme zjistili ?

1. Pokud máme k dispozici technické vybavení a zkušený tým laboratorních pracovníků, lze ze štěpu odstranit T lymfocyty a tím snížit riziko fatální GVHD.
2. Dárce je prakticky vždy k dispozici, lze překročit bariéru HLA !

ano, ale

Vysoké riziko:

1. nepřihojení či odhojení štěpu s nutností opakovat transplantaci.
2. relapsu leukémie.
3. mortality v důsledku infekce (virové, mykotické) při velmi špatné a pomalé rekonstituci imunity.

1. Starý J, Sedláček P, Vodvářková S, et al., Cas Lek Cesk. 2002 Mar 29;141(6):176-81.
2. Sedláček P, Starý J, Vodvářková S, et al., Neoplasma. 2001;48(4):302-6.
3. Poloucková A, Vodvářková A, Sedláček P et al., Neoplasma. 2001;48(5):374-81.

Selekční kritéria nepříbuzenských dárců

HLA :

typizace alel A*, B*, Cw*, DRB1* a DQB1*

Štěp :

kostní dřeň, periferní kmenové buňky, pupečnicková krev

Sex / gravidity :

muž > žena > žena po graviditě

Věk :

mladší (dekády) > starší (19-55; median 33 let)

Krevní skupina :

kompatibilní > malá > velká neshoda

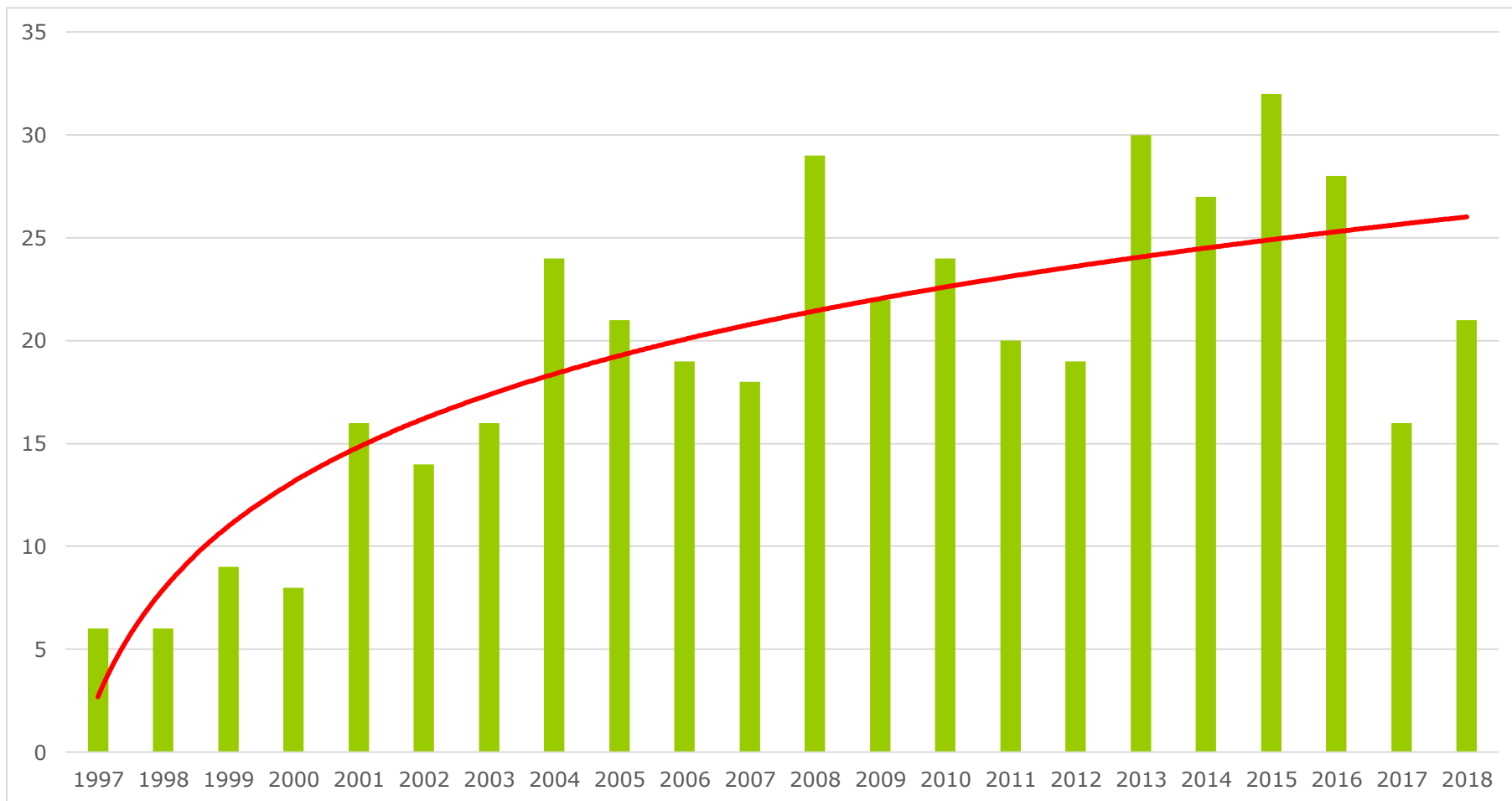
Registr :

CZ > SRN > EU > USA > ...

Čas :

dostupnost (ochota) dárce, možnost druhého darování

Transplantace od vhodného nepříbuzenského dárce (FN Motol; 1/1997- 9/2018))



v průměru 25 pac/rok

Co jsme zjistili ?

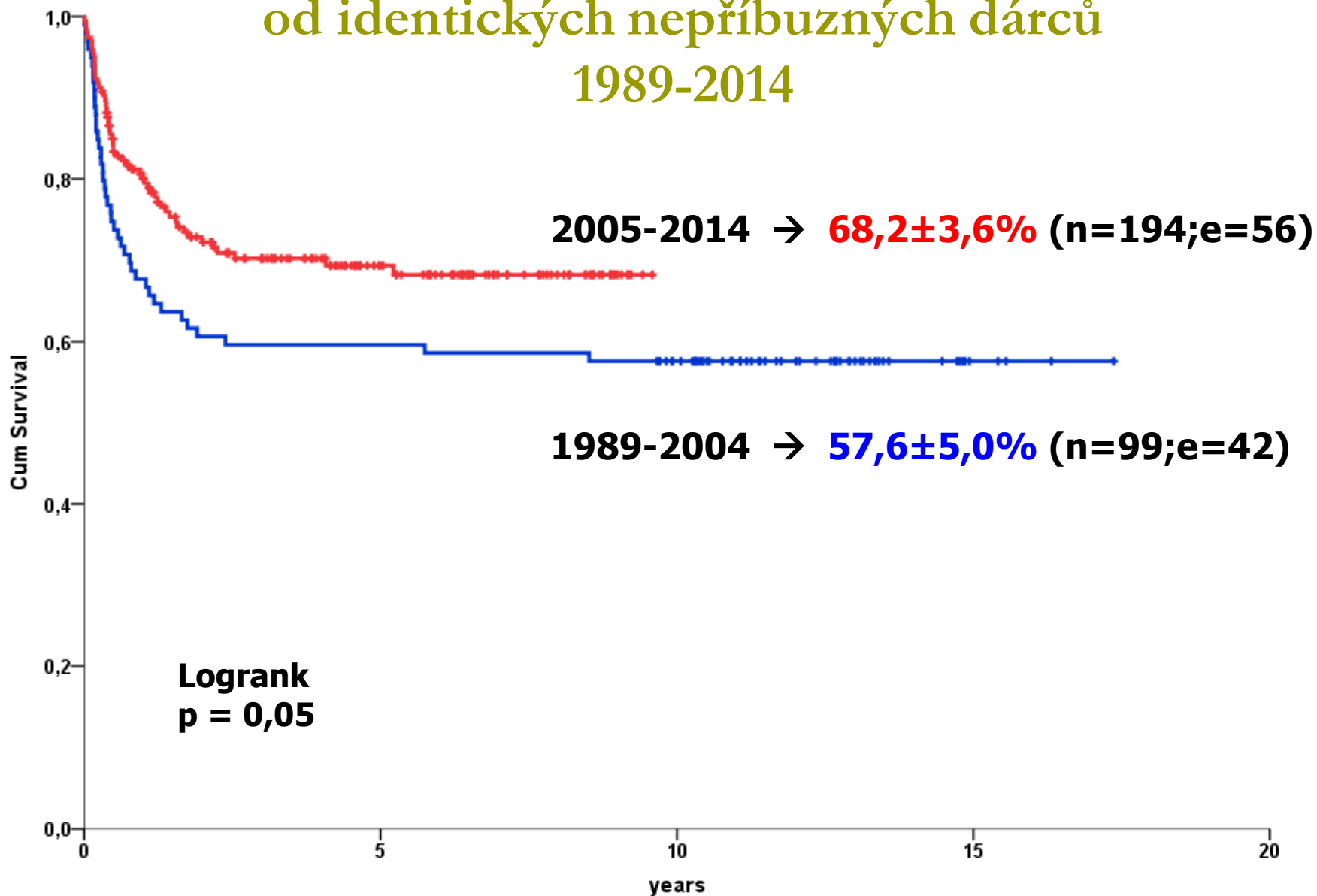
1. Pro většinu pacientů lze najít v registru dárců (33mil./2018) vhodného dárce 7-10/10 HLA identického.
2. Neshoda v HLA je lépe tolerována, pokud je mimo hlavní antigeny/alely HLA (A, DRB1, B).
3. Riziko silné GVHD lze snížit použitím protilátek proti T lymfocytům (antithymocytárního globulinu).

ano, ale

1. Vysoké riziko akutní a chronické reakce štěpu proti hostiteli.
2. Vysoké riziko opakovaných reaktivací virových infekcí (CMV, ADV, BKV, EBV,...).
3. Vyšší riziko pozdních nežádoucích účinků (pneumopatie, endokrinopatie, sterilita,...).

1. Sedláček P, Formánková R, Keslová P, et al., Bone Marrow Transplant. 2006 Dec;38(11):745-50
2. Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, et al., Pediatr Transplant. 2008 Feb;12(1):24-31
3. Sedlacek P, Mejstrikova E, Formankova R, et al., Bone Marrow Transplant. 2008 Oct;42 Suppl 2:S10-5.

Přežití po transplantaci od identických nepříbuzných dárců 1989-2014



Dárci z celého světa

Monica

Sue



Šárka

Ivo

Setkání dárců s příjemci
na kongresu amerického
registru dárců - NMDP



Pupečnicková krev nepříbuzenského dárce

- Pupečnicková krev je alternativním zdrojem zárodečných krvetvorných buněk, které jsou schopny rekonstituce krvetvorby u pacientů po transplantaci.
- Pupečnicková krev od nepříbuzenského dárce je vhodným alogenním štěpem pro pacienty, kteří nemají jiného vhodného HLA identického dárce.
- Dosud byla použita k transplantaci od rodinného či nepříbuzenského dárce u cca 40 000 příjemců. Je považována za srovnatelnou alternativu s kostní dření a to především u dětí, v posledních letech se zvyšuje počet transplantací i u dospělých.

Transplantace CB v Motole



1994 - 1. Transplantace CB v ČR
dárce sourozenec
LAD syndrom (vroz. imunodeficiencie)

1995 – 1. Transplantace CB
nepříbuzným dárce – Itálie
juvenilní myelomonocytární leukémie

2001 – 1. Transplantace CB
dárce z BPK - Praha
mukopolysacharidóza typ I (Hurler)

2007 – 1. Transplantace „double-cord“
Ph+ ALL

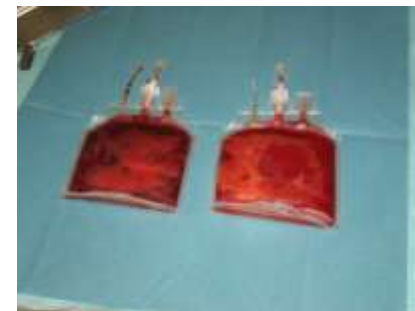


Co jsme zjistili ?

1. Pro většinu pacientů lze najít v registru pupečnickových kreví (770 tis./2018) vhodného dárce 4-6/6 HLA identického.
2. Důležitým dalším parametrem je kromě HLA také kvalita štěpu (jadernost, CD34+, viabilita).
3. U pacientů s vyšší hmotností lze kombinovat dvě různé pupečnickové krve.

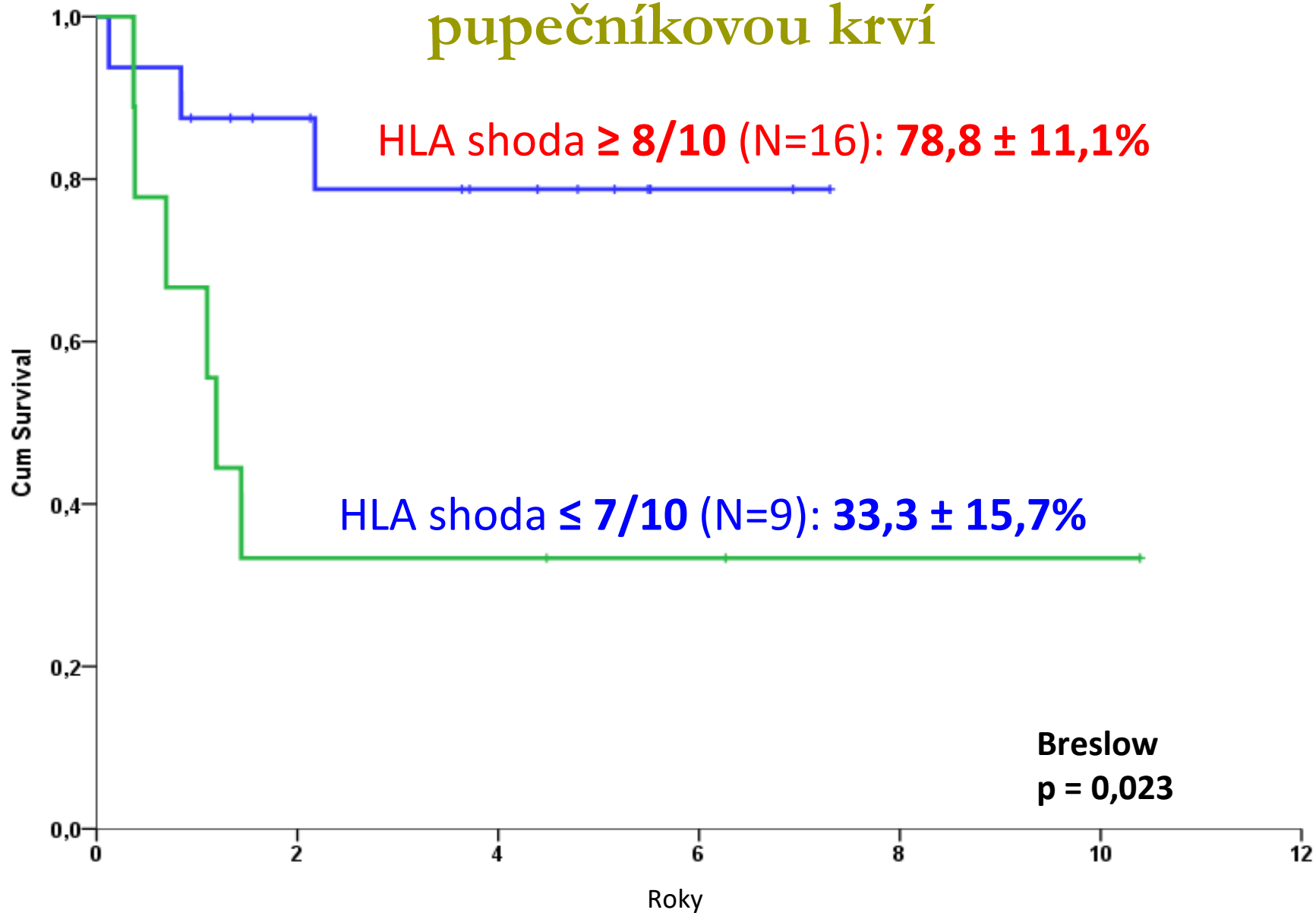
ano, ale

1. U pacientů s vyšší hmotností je vyšší riziko komplikací.
2. Transplantace je jednorázová, nelze opakovaně využít stejného dárce.
3. Přihojení štěpu je významně pomalejší.



1. Boelens JJ, Bierings M, Tilanus M, Lie J, Sedlacek P, Bone Marrow Transplant. 2009 Apr;43(8):655-7.
2. Sedlacek P, Formankova R., Keslova P, et al., Transf a Hemat. Dnes 2008 (14), 52-56.

Přežití po transplantaci pupečnickovou krví



Barbora *

D+42 (věku) zahájena terapie

Primární hemofagocytující lymfohistiocytózy

D+46 zahájeno hledání dárce

MUD 10/10 , žena, 22 let, registr ČR, kostní dřeň

D+80 zahájen přípravný režim

Převod plánován na 30.5.2012

24 hodin po zahájení přípravy
začaly u dárkyně **horečky**,
následně byla přijata na JIP
48 hodin po zahájení přípravy
odběr zrušen



24.5. 2012 žádost o štěp **CB 10/10 (Francie)**

Dodán 30.5.2012

Podán 31.5.2012

Victoria *



23.2.2012, ve věku **2 měsíců** CMV pneumonie, rotavirová enteritida
Diagnóza: **T-,B+,NK+** imunodeficit
(Cartilage Hair Hypoplasia)

29.2. výsledek typizace HLA

1.3. hledání dárce

6.3. zahájení transplantační přípravy

12.3. CBTx (10/10) 18 dní od přijetí



Ve 3 letech věku zjištěna preleukémie (MDS) na základě genetické dispozice.

Dárce v rodině nemá, zahájeno hledání dárce v registrech, neúspěšné.



Po 11 měsících objevena vhodná pupečnicková krev v krevní bance v New Yorku.

Rok po zjištění dg provedena úspěšná transplantace.



Chlapec, FHL

- RA: sestra 4 r, zdráva
- NO: **2,5 m života:**
 - **1. den** T 39 st, PNC
 - **5. den** přijat na DO, HSmegalie, FW 8/hod, trombocyty 30, hepatopatie
 - **7. den** přijat v Motole, trombocyty 10, koagulopatie, ferritin 91000 µg/l, hypertriglyceridemie, hemofagocyt. makrofágy v KD, léčba: kortikoidy, ATB
 - **10. den** ARK – UPV, MOF, krvácení do mozku
 - **14. den** exitus

Děvče, FHL, mutace PRF1 genu

- **RA: sestra 4 r, zdráva**
- **NO: 1 měsíc života:**
 - **1. den** T 39 st, přijata v DO, trombo 55
 - **2. den** trombo 31, HSmegalie, koagulopatie, trf ery + FFP
 - **3. den** FNM, trombo 10, DIK, hepatopatie, ferritin 40 000, HHV6 PCR+, CD3+CD8+DR+ 92%
 - **Perforin negat., cytotoxické testy patologické, mutace PRF1 genu**
 - **3. den** léčba HLH 2004 (kortikoidy, VP-16, CsA)



Děvče, FHL, mutace PRF1 genu

- **4. den ARK-UPV**
- **3,5 m života (2,5 od Dx): nepříbuzná SCT v klidové fázi nemoci, příprava BuCy+VP-16+ATG, GVHD 0, MC (35% autologní krvetvorby), žije vyléčena**

10 let po transplantaci



Karolína - MPS I. typu

- nar. 6/2001
- dg. MPS 8/2002



Karolína

- 13.11.2002 - ve věku 17 měs
- dárce: **nepříbuzný, kostní dřeň** (10/10, muž, ČR, 28 let)
- propuštěna z TJ: D+107



11/2013 (ve věku 12,5 roku)



Karolína 11 let po HSCT

11/2013 (ve věku 12,5 roku)

- kompletní chimerismus
- aktivita enzymu v normě
- subklinická hypothyreóza
- ECHO srdce v normě
- sluch v normě, brýle pro strabismus
- výška pod 3.P., ale růstová rychlost nyní v širších mezích normy
- sledována na ortopedii, RHB (genua valga, pedes planovalgus, gibbus)
- PMV v normě, intelektové schopnosti v pásmu průměru
- 6. třída ZŠ, zájmové kroužky



Honzík

- ❖ chlapec, narozen v 9/2004
- ❖ Klinické projevy OP se rozvíjely od 5 měsíců věku, diagnóza stanovena až v 10 měsících v ÚDMP (3x hosp. na různých dětských odd)
- ❖ Anemie závislá na trf krve, trombocytopenie, HS-megalie, typický habitus, typický rtg skeletu
- ❖ **10 měs**



Honzík 8 let po HSCT

- ❖ 30.9.2005 - HSCT ve věku 12 měsíců
- ❖ dárce: nepříbuzný, HLA id. (9/10), PBSC

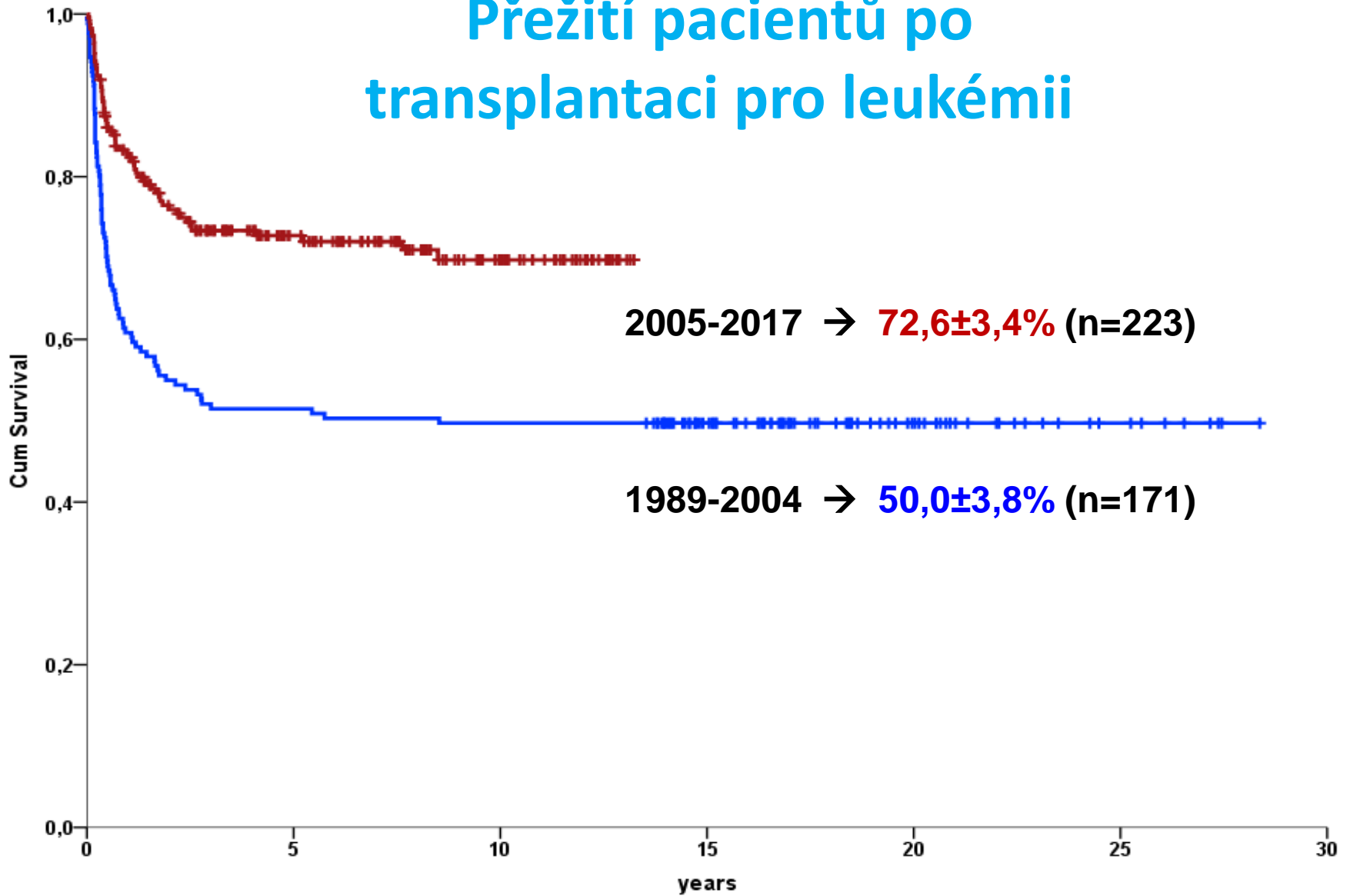
- ❖ PMV v normě, 3. třída ZŠ
- ❖ sledován v centru zrak. vad
 - atrophie pap. n. II bilat part.
 - zrak. ostrost - L oko v pásmu těžké slabozrakosti, P oko lehce snížena pod normu

- ❖ antropologie:
 - váha 37kg (1,1SD), výška 133cm (-0,6 SD)
 - OH střední

8 let po HSCT



Přežití pacientů po transplantaci pro leukémii

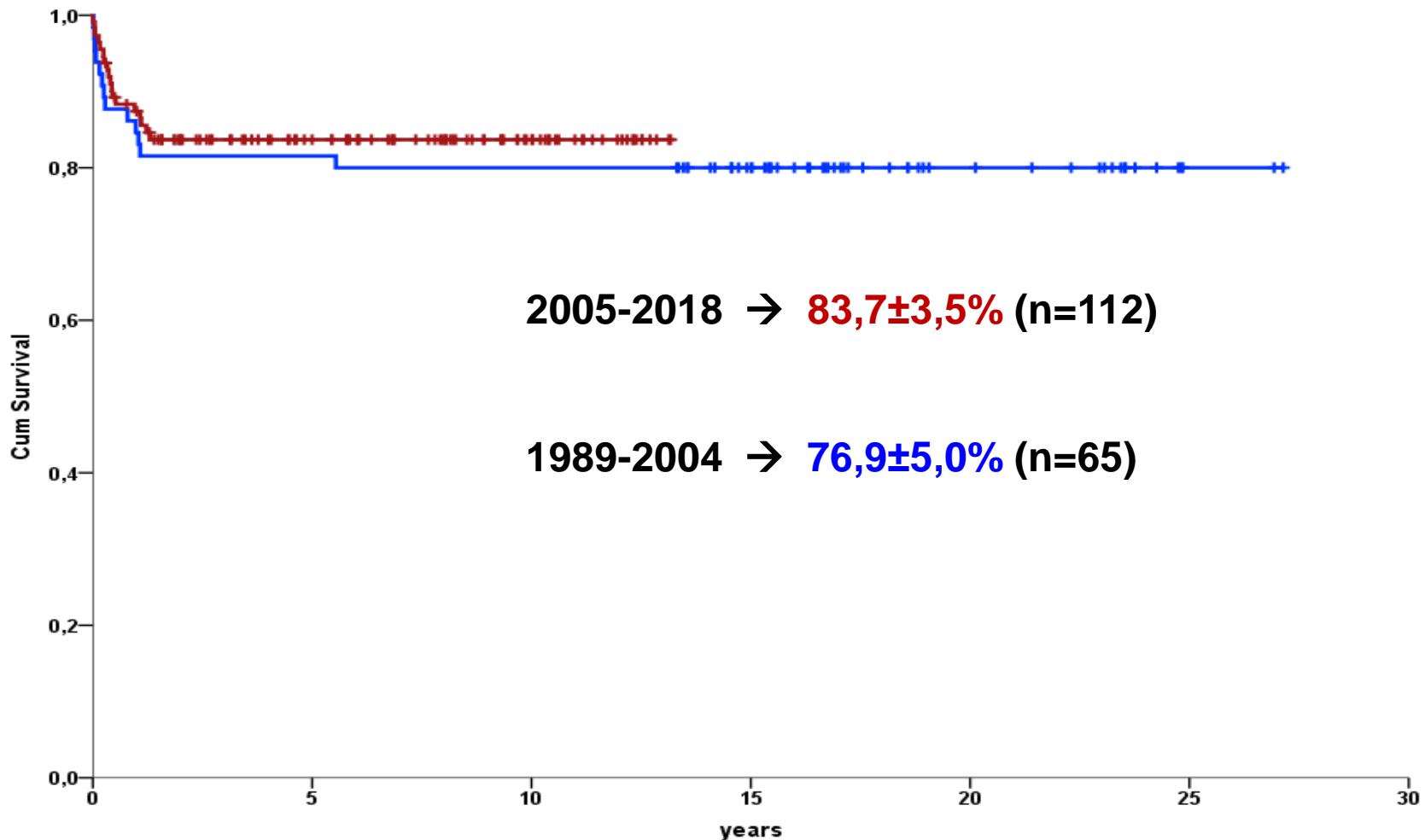


2005-2017 → **72,6±3,4%** (n=223)

1989-2004 → **50,0±3,8%** (n=171)

Logrank
p < 0,001

Přežití pacientů po transplantaci pro nenádorové onemocnění



2005-2018 → 83,7±3,5% (n=112)

1989-2004 → 76,9±5,0% (n=65)

Logrank
p = 0,54



setkání bývalých dětských pacientů
k 25. výročí programu - Praha, červen 2014



Děkuji za pozornost