

SROVNÁNÍ VYBRANÝCH MARKERŮ DENDRITICKÝCH BUNĚK U ZDRAVÝCH DÁRCŮ A PACIENTŮ S MONOKLONÁLNÍ GAMAPATÍ NEJASNÉHO VÝZNAMU ČI MNOHOČETNÝM MYELOMEM

COMPARISON OF DENDRITIC CELLS ANTIGENS IN HEALTHY VOLUNTEERS AND MONOCLONAL GAMMOPATHY OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE AND/OR MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

KOVÁŘOVÁ L¹, MICHÁLEK J^{1,2}, KÝR M. ^{1,2}, PENKA M¹, HÁJEK R^{1,3}

¹ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE – LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), FN BRNO, PMDV, JIHLAVSKÁ 20, 625 00 BRNO

² I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM, ČERNOPOLNÍ 9, 625 00 BRNO

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO, PMDV, JIHLAVSKÁ 20, 625 00 BRNO

Souhrn:

Východiska: Dendritické buňky DB jsou účinné antigen-prezentující buňky s možným uplatněním na poli imunoterapie, kdy je ovšem zásadní jejich funkční stav – tedy schopnost vyvolat protinádorovou odpověď. Typ studie a soubor: V *in vitro* studii byla na souboru 10 zdravých dárců, 14 pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu a 14 pacientů s mnohočetným myelomem sledována schopnost vyzrání dendritických buněk. **Metody a výsledky:** Po kultivaci adherentních monocytárních prekurzorů DB periferní krve s IL-4 a GM-CSF v bezsérových či autologních podmínkách a stimulaci pomocí lidského CD40Ligandu byly srovnány rozdíly v expresi významných povrchových znaků, chemokininových receptorů a produkce IL-12p70. Bylo zjištěno, že hodnoty sledovaných markerů jsou v bezsérových podmínkách srovnatelné u všech 3 skupin bez i po stimulaci CD40L. Autologní sérum, v kontrastu se zdravými kontrolami, negativně ovlivňuje DB pacientů, kdy dochází ke snížení exprese vybraných povrchových markerů. Produkce IL-12p70 byla ve všech případech nízká. Srovnáním hladiny IL-6 v séru pacientů a zdravých dárců nebyly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými skupinami. **Závěry:** Kultivace DB v bezsérových podmínkách má srovnatelné výsledky u kontrol i pacientů, přestože stimulace CD40L nestačí k plnému vyzrání DB. Předběžně ukazujeme negativní působení autologního séra pacientů na expresi vybraných markerů, které není jednoznačně závislé na hladině IL-6.

Klíčová slova: dendritické buňky, monoklonální gamapatie nejasného významu, mnohočetný myelom, flowcytometrie.

Summary:

Backgrounds: Dendritic cells (DCs) are highly specialized antigen-presenting cells, which can be used for immunotherapy trials. Functionally normal DCs play a critical role in the activation and potentiation of antitumor antigen-specific responses. **Design and Subjects:** Maturation of DCs from 10 healthy donors, 14 monoclonal gammopathy of undetermined significance patients and 14 multiple myeloma patients was tested in an *in vitro* study. **Methods and Results:** DCs were generated from adherent mononuclear precursors of peripheral blood and cultured in presence of IL-4 and GM-CSF with human CD40Ligand stimulation. Serum-free or autologous serum conditions were used and expression of significant surface antigens, chemokines receptors and production of IL-12p70, were compared. We found no difference between groups under serum-free conditions with or without CD40L stimulation. Under autologous conditions we found negative effect on patients DCs manifested by reduction of some markers. The production of IL-12p70 was low and no difference in serum IL-6 levels between individual groups was found. **Conclusion:** Under serum free conditions there was no difference between healthy volunteers, MGUS and patients, but CD40L stimulation did not lead to the full maturation of DCs. Autologous patient serum had negative influence on DCs, with no definite dependence on the IL-6 level.

Key words: dendritic cells, monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, flow cytometry

Úvod

Dendritické buňky (DB) jsou účinné antigen-prezentující buňky vyznačující se schopností stimulovat naivní T-lymfocyty a iniciovat tak imunitní odpověď prostřednictvím cytotoxických T lymfocytů (Banchereau 1998). DB jsou stále intenzivně zkoumány právě pro tuto svou funkci, s cílem využití v oblasti imunoterapie, kdy zralé DB slouží jako součást vakcín v klinických studiích

(Brossart 2001). Limitací účinku takovýchto vakcín je funkčnost DB, a to zejména u mnohočetného myelomu (MM), kde existují kontroverzní tvrzení o možných defektech v imunitním systému nemocných (Brown 2001, Hayashi 2003). Nevýrazná odpověď na imunoterapii u pacientů ukazuje na nutnost porozumění možným defektům tak, aby bylo následně dosaženo efektivní léčby. DB vznikají z různých hematopoetických pre-

kurzorů diferencujících do myeloidního či lymfoidního typu DB, ale mohou vznikat také z monocytů (Romani 1994). V kulturách s IL-4 a GM-CSF jsou monocyty schopny diferenciace do nezralých myeloidních (DB CD11c⁺ typ), které mají vysokou schopnost pohltit a zpracovat endogenní Ag a naopak nízkou schopnost aktivovat T-lymfocyty. Pohlcení Ag však nestačí k úplnému vyžrání DB, jsou nutny ještě přídatné signály (Barton 2002). DB jsou schopny rozpoznávat signály nebezpečí také skrze Toll-like receptory (TLR) (Medzhitov 2001). Odpovědi na rozdílné maturační stimuly jako jsou bakteriální a virové částice, zánětlivé cytokiny či specifické interakce T lymfocytů je diferenciální proces vedoucí k množství změn morfologických, fenotypických a funkčních. V průběhu maturace se postupně snižuje exprese zánětlivých chemokinů a jejich receptorů (např. CCR6), naopak roste produkce konstitutivních chemokinů a exprese CCR7 receptoru (Brossart 2001). Zralé DB se vyznačují vysokou mírou exprese MHC třídy I/II (zejména HLA-DR), kostimulačních molekul (CD40, CD80, CD86) a produkují bioaktivní IL-12p70, klíčový cytokin pro indukci cytotoxických T lymfocytů a tedy pro vznik protinádorové imunitní odpovědi typu Th1. Proces maturace je zakončen interakcí a ligací membránového markeru CD40 na aktivovaných DB s CD40Ligandem exprimovaným T lymfocyty (Rosenzweig 2002). Aktivace nezralých DB rozpustným CD40 ligandem (CD40L) vede k jejich diferenciaci a vzniku zralých CD83⁺ DB se sníženým počtem molekul účastnících se pohlcení Ag. Signalizace přes CD40L u DB vede také k produkci cytokinů, chemokinů a stupňuje jejich migraci a přežívání. Prekurzory DB, u kterých je z jakýchkoliv příčin inhibováno vyžrávání, mohou pohltit Ag, nicméně je narušena řada dalších interakcí, zejména s T-lymfocyty, které v konečné fázi vedou k neschopnosti DB vyvolat silnou imunitní odpověď. Bylo zjištěno, že % exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu efektorových buněk periferní krve pacientů s MM se neliší počtem od zdravých kontrol. Tyto molekuly jsou nezbytným „druhým signálem“ pro aktivaci T-lymfocytů, účastní se také při signalizaci přežití, apoptózy, anergie a mohou být ovlivněny celou řadou cytokinů. Snížení jejich exprese je připisováno TNF-β1 a IL-10 a za zvýšení odpovídá CD40L a IFNγ (Schultz 1996). Mnohočetný myelom je malignita charakterizovaná expanzí plazmocytů produkujících specifický Id protein, využitelný jako antigen asociovaný s nádorem. Naopak monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je prekanceróza s nízkým zastoupením patologických plazmocytů, která není léčena, nýbrž pouze monitorována pro možný přechod onemocnění do MM. Srovnání těchto dvou nemocí, na základě profilu povrchových markerů dendritických buněk zatím nebylo publikováno a může přinést další informaci o vlastnostech DB v závislosti na diagnóze. IL-6 je jedním z cytokinů účastnících se proliferace a diferenciace myelomových buněk, zatímco TNFβ a IL-10 jsou přímo produkovány maligními plazmocyty, a jeho vysoké sérové hladiny korelují s agresivní nemocí a špatnou prognózou pacientů (Ratta 2002, Brown 2004). Proto jsme v této práci, kromě

základních markerů DB, monitorovali také hladinu sérového IL-6 u všech tří skupin, abychom zjistili jakou úlohu hraje jeho možná přítomnost v kultuře DB.

Materiál a metody

Soubor vzorků: Za účelem získání prekurzorů DB byly využity jednak buffy-coaty zdravých dárců krve (kontroly - K) získaných na Transfuzní stanici FN Brno (10 vzorků, průměrný věk 32,7 let) a dále 20 ml heparinizované periferní krve neléčených pacientů s MGUS (14 pacientů, průměrný věk 55let) či nově diagnostikovaných neléčených pacientů s MM (14 pacientů, průměrný věk 54,9 let), která byla po získání informovaného souhlasu pacienta odebrána na ambulanci Interní hematologické kliniky FN Brno. Dále byly od zdravých dárců a pacientů získány vzorky sér periferní krve, které byly zamrazeny jednak pro pozdější pro analýzu hladiny sérového IL-6 (celkem 21 zdravých kontrol, 14 pacientů s MGUS, 19 pacientů s MM) či po inaktivaci jako přídavek do kultur DB.

Separace mononukleárních buněk periferní krve (MNBPK): MNBPK byly izolovány z buffy-coatu nebo periferní krve gradientovou centrifugací na Histopaque a poté byly několikrát omyty studeným PBS při nízkých otáčkách, aby došlo k odstranění trombocytů. Ve světelném mikroskopu byla zanalyzována vitalita a buněčnost pomocí trypanové modře.

Kultivace DB: DB byly generovány dle schématu běžně užívaného na našem pracovišti. MNBPK v Xvivo-10 obohaceném o DNase (80 U/ml) a glutamin (0,06 %) byly nasazeny na desky s buněčností 3,3x10⁶ bb/ml. Po 2h kultivaci v atmosféře 5 % CO₂ a 37°C byly odstraněny neadherentní prekurzory opatrným dvojím omytím teplým PBS. Adherentní buňky byly dále kultivovány v Xvivo-10 s IL-4 (1000 U/ml) a GM-CSF (800 U/ml) po dobu 6 dnů, přičemž 3. den kultivace byla vyměněna ½ média za čerstvé s plnou koncentrací cytokinů a 6. den bylo přidáno maturační činidlo - lidský CD40Ligand (huCD40L, Sigma) v koncentraci 1 μg/ml. Kultivace byla prováděna v bezsérových podmínkách, pouze u experimentů sledujících vliv autologního séra na maturaci DB bylo použito přídavku inaktivovaného autologního séra (10 %).

Výtěžní DB: Po 24h stimulaci byly DB uvolněny z destiček pomocí studeného PBS, propláchnuty a dále uchovávány v chladu do další analýzy.

Imunofenotypizace: Vzorky MNBPK a výtěžných DB byly analyzovány s využitím následujících monoklonálních protilátek: mouse IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5, CD1a-PE, CD3-FITC, CD11c-PE, CD14-FITC, CD80-PE, CD83-PC5, CD86-PE, HLA-DR-FITC (Immunotech, Marseille, France), CCR6-PE (R&D, Minneapolis, USA), CD123-PE, CCR7-PE (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Po 30 min. inkubaci v chladu byly buňky promyty a resuspendovány ve studeném PBS, zafixovány 1 % paraformaldehydem a analyzovány. Mrtvé buňky a debris byly vyděleny z analýzy na základě rozptylu světla a kontrola gate byla provedena pomocí propidium jodidu (PI). Analýza byla provedena na přístroji FC500 Cytomics (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA).

Stanovení sérových hladin IL-6 a hladin IL-12p70

v supernatantu kultur pomocí ELISA: K analýze IL-6 byla využita zamražená séra zdravých dárců a pacientů, která byla uchovávána při -30°C do doby analýzy, kdy byla dle návodu zpracována prostřednictvím kitu HuIL-6 ELISA (Biosource, California, USA). Supernatanty kultur DB byly nejprve zbaveny centrifugací buněčné příměsi, poté zamrazeny a uchovávány do doby analýzy při -30°C. Pro zhodnocení bioaktivního IL-12p70 byl použit kit HuIL-12p70 ELISA (Biosource, California, USA).

Statistické hodnocení: Cílem analýzy bylo srovnání hodnot vybraných znaků dendritických buněk u zdravých jedinců a u pacientů s MGUS či MM. Pro deskriptivní účely byly v analýze použity základní statistické grafy (kategorizované sloupcové diagramy) a statistické tabulky. U spojených parametrů byly vypočteny základní statistické ukazatele (průměr, medián, SD a příslušné kvantily). Rozdíly mezi všemi 3 skupinami současně („overall“) byly testovány neparametrickou anovou (pro nepárové - Kruskal-Wallis, pro párové - Friedman). Pokud byl rozdíl mezi skupinami signifikantní, testoval se rozdíl mezi jednotlivými dvojicemi skupin (pro nepárové - Mann-Whitney, pro párové - Wilcoxon). Tam kde „overall“ rozdíl nebyl signifikantní není další testování opodstatněné. Všechny testy byly neparametrické vzhledem k nestejným rozptylům a odlehkým hodnotám, hladina významnosti $\alpha=0,05$.

Výsledky

Kultivace DB v bezsérových podmínkách

Po 7-denní kultivaci mononukleárních prekurzorů v bezsérových podmínkách bez přidavku stimulans, jsme dle očekávání zjistili, že získané buňky oproti vstupnímu hodnocení snížily expresi monocytárního znaku CD14, exprimovaly znak myeloidních DB CD11c (vzestup průměrně z 5,8 % při vstupním hodnocení na 84,8 %) a naopak nebyla prokázána exprese znaku lymfoidních DB CD123 (při vstupu průměrně 0,3 % a pokles na 0,1 %). V kultuře byly objeveny také zbytkové lymfocyty (CD3⁺ průměrně poklesly ze vstupních 55,4 % na 12,1 %) a průměrně 10 % buněk snížilo FS a bylo PI⁺. Hodnoceny byly buňky s vyšší granularitou a velikostí než lymfocyty, tyto exprimovaly ve vysoké míře kostimulační molekulu CD86 a antigen prezentující molekulu HLA-DR. Dále buňky exprimovaly kostimulační molekulu CD80, exprese chemokininových receptorů CCR6 pro nezralé DB a CCR7 pro zralé DB byla nízká. Expres markeru nezralosti DB CD1a vzrostla oproti vstupnímu hodnocení (obr. č.1), nicméně nedosáhla hodnot očekávaných u nezralých DB. Po 7-denní kultivaci nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v expresi povrchových markerů mezi jednotlivými skupinami. Rozdíly v expresi markerů mezi jednotlivými skupinami (K, MGUS, MM) při vstupním hodnocení jsou zdůvodnitelné prováděnou separací MNBPK, při které může dojít ke kontaminaci erytrocyty a tedy k relativnímu snížení exprese markerů. Je také nutno připomenout, že variabilita výsledků je do značné míry dána variabilitou DB jednotlivých osob, a to bez přihlédnutí k jejich zdravotnímu stavu.

Kultivace DB v bezsérových podmínkách se stimulací CD40L

U DB kultivovaných 24h s CD40L byla exprese znaku CD14 opět snížena oproti vstupnímu hodnocení, zastoupení buněk s nižším FS a pozitivitou na PI se zvýšilo na průměrně 15 % všech buněk, také zde byly přítomny zbytkové T lymfocyty (průměrně 9,4 % CD3⁺). Expres CD11c na populaci předpokládaných DB byla opět vysoká (průměrně 86,9 %) a CD123⁺ bb téměř nepřítomny (průměrně 0,1 %). Expres markerů CD86 a HLA-DR byla obdobně vysoká jako u nestimulovaných DB. Vzrostla exprese CD80 i CD83, také exprese CCR6, CCR7 a CD1a (obr. č.1). Mezi jednotlivými skupinami (K, MGUS, MM) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi zmiňovaných markerů, pouze znak CD1a v overall analýze vykazoval statisticky významný rozdíl ($p=0,041$), nicméně v následné analýze nebyl prokázán významný rozdíl. Oproti nestimulovaným DB u kontrol byly nalezeny statisticky významné změny v expresi markerů CD83 ($p=0,03$), CD86 ($p=0,03$) a CD1a ($p=0,02$). Pro MGUS byly nalezeny významné změny u markerů CD83 ($p=0,001$), CD80 ($p=0,001$), CCR6 ($p=0,018$) a CCR7 ($p=0,008$). Pro MM u markerů CD83 ($p=0,001$), CD80 ($p=0,001$), CD86 ($p=0,008$) a CCR7 ($p=0,009$).

Kultivace DB v autologních podmínkách se stimulací CD40L

Samostatnou skupinu tvoří DB kultivované s přidavkem autologního séra, u nichž byl srovnán vliv CD40L na maturaci DB. Takto byli zhodnoceni 3 zdraví dárce a po 3 pacientech s MGUS a MM - statistická analýza tedy nebyla na tak malém souboru provedena. Nicméně na obr. č. 1 je zřejmé, že autologní sérum zdravých dárců a pacientů neovlivnilo expresi HLA-DR ani CD86. Expres znaků CD80, CD83, CD1a, CCR6 a CCR7 byly v autologních podmínkách u zdravých dárců vyšší než v bezsérových podmínkách a naopak u pacientů došlo ke snížení exprese těchto znaků.

Stanovení sérových hladin IL-6

Jelikož byly analyzovány DB získané z periferní krve, zhodnotili jsme pomocí ELISA hladiny IL-6 v séru periferní krve, abychom zjistili, zda-li tento cytokin patří mezi hlavní inhibitory vyžívání DB. Zjištěné hodnoty (medián) byly velice variabilní (K 1,7 pg/ml; MGUS 3,1 pg/ml; MM 1,9 pg/ml) a skupiny mezi sebou nevykazovaly statisticky významný rozdíl.

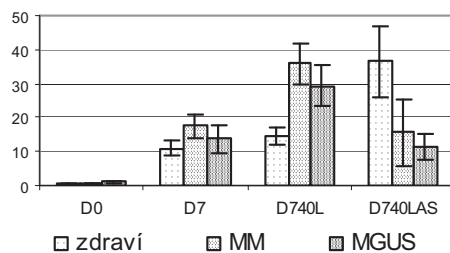
Stanovení hladin IL-12p70 v supernatantech kultur

Hodnoceny byly supernatanty kultur DB a to vstupně (po 2h adherenci, den 0), při výměně média ve 3. den kultivace a dále při ukončení pokusu. Hodnocením supernatantů ze dne 0 a 3 jsme zjistili, že se hladiny IL-12p70 pohybovaly v naprosté většině případů pod detekčním limitem testu. Nicméně také při hodnocení supernatantů ze 7 dne byly hladiny IL-12p70 nízké a často pod detekčním limitem testu: bez přihlédnutí k typu sledované skupiny bylo zjištěno pro nestimulované DB průměrně 0,24 pg/ml IL-12p70; pro stimulaci CD40L v bezsérových podmínkách 0,57 pg/ml; pro stimulaci CD40L v autologních podmínkách 0,57 pg/ml. Tyto výsledky bereme pouze jako předběžné s nutností opakování testu pomocí ELISA kitu jiné firmy.

Obrázek č. 1: Relativní exprese jednotlivých markerů u studovaných skupin v závislosti na dni kultivace (%). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty markerů se směrodatnou odchylkou. D0 – počátek kultivace, D7 – 7. den kultivace bez stimulace, D7 40L – 7. den kultivace po stimulaci CD40L, D7 40L AS – 7. den kultivace po stimulaci CD40L v autologních podmínkách. K- zdravé kontroly, MGUS - pacienti s monoklonální gamapatií nejasného významu, MM - pacienti s mnohočetným myelomem.

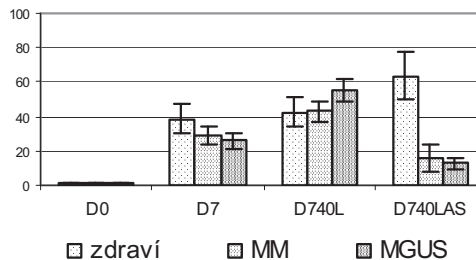
A.

Rel. exprese CD83 %



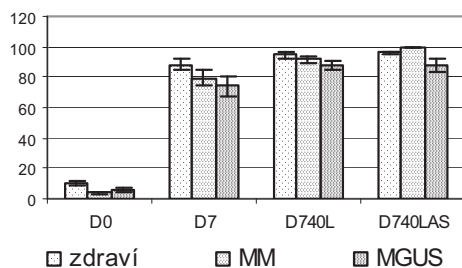
B.

Rel. exprese CD80 %



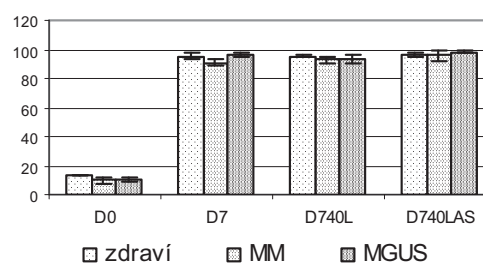
C.

Rel. exprese CD86 %



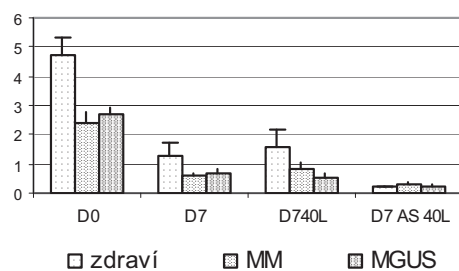
D.

Rel. exprese HLA-DR %



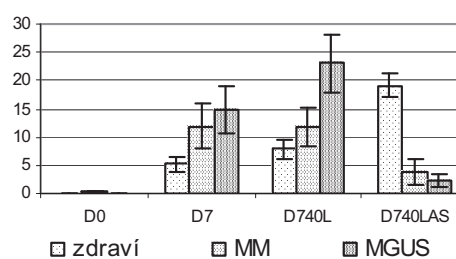
E.

Relativní exprese CD14 %



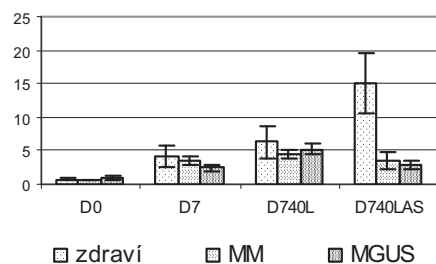
F.

Expresa CD1a %



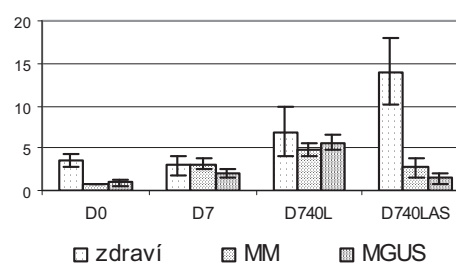
G.

Rel. exprese CCR6 %



H.

Rel. exprese CCR7 %



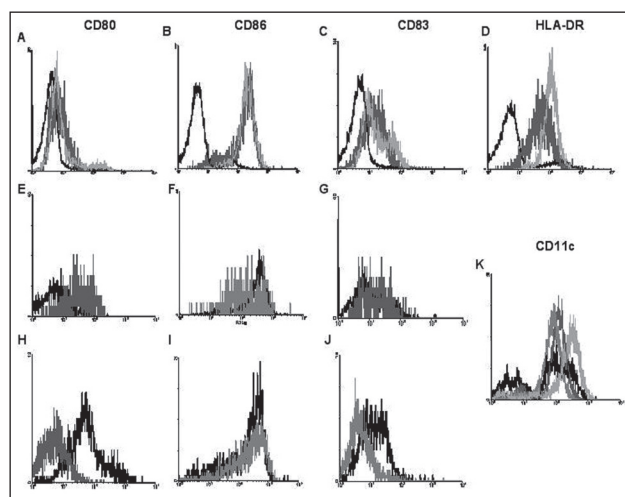
Diskuse

Zprávy o úplné funkčnosti DB u MM jsou poněkud rozporuplné. Monoklonální gamapatie nejasného významu, předcházející ve většině případů MM, z tohoto hlediska zatím nebyla sledována. U myelomových pacientů se stabilní nemocí však po stimulaci trimerickým lidským ligandem huCD40LT v podmínkách 10 % fetálního séra nedocházelo ke zvýšení exprese kostimulační molekuly CD80 na DB, a to v důsledku inhibice přítomnými TGF- β 1 a IL-10 (Brown 2001). Podobnou inhibici DB zprostředkovávají také VEGF a IL-6, kdy u DB kultivovaných se sérem pacientů s MM následně docházelo pouze ke slabé aktivaci T-lymfocytární imunitní odpovědi, naopak přidání neutralizujících protilátek tento inhibiční efekt odstranilo (Hyayashi 2003). Další pracovní skupina srovnávala DB kultivované z CD14⁺ monocytů s DB purifikovanými z periferní krve pacientů s MM a zjistila, že pouze DB periferní krve vykazují nižší expresi HLA-DR, CD80 a i nižší schopnost stimulace T lymfocytů ve srovnání se zdravými dárči (Ratta 2002).

Pro prvotní zjištění rozdílu v expresi povrchových markerů DB jsme využili záměrně bezsérové podmínky, jelikož standardně používané AB sérum může vést k inhibici diferenciaci DB, jak zjistila Lyakh a kol., která sledovala expresi monocytárního markeru CD14 a znaku zralých DB CD83 po stimulaci různými cytokiny (2000). V nepřítomnosti autologního séra jsme neočekávali rozdíl mezi zdravými dárči a pacienty, poněvadž prekursor DB se vyvíjely bez přítomnosti možných inhibičních faktorů, což se potvrdilo. Námi získané nezralé DB exprimovaly většinu markerů popisovaných v literatuře (vysoká exprese CD86

a HLA-DR, proměnlivá exprese CD80, snížená exprese CD14). Neočekávaně nízká exprese znaku CD1a byla popsána také u nezralých DB zdravých dárců a pacientů s rakovinou plic (Pedersen 2005) a možná souvisí s druhem prekursorů použitých pro kultivaci (monocyty vs. MNBPK), kdy monocyty mohou zřejmě časněji tvořit nezralé DB a tedy exprimovat ve vyšší míře znak CD1a. Případně by mohlo v kulturách docházet ke spontánní maturaci DB bez zvýšení exprese CD83 současně provázené snížením exprese CD1a. Exprese chemokinových receptorů CCR6 a CCR7 byla nízká, což odpovídalo nízké expresi CD1a a CD83. Také produkce IL-12p70 byla nízká, nicméně toto přičítáme spíše neadekvátně vybranému testu, poněvadž literárně uváděná produkce cytokinu IL-12p70 je prokazatelná již v kulturách nezralých DB (Pedersen 2005) a také v předchozích experimentech naší skupiny byla prokázána zvýšená produkce tohoto cytokinu při srovnávání různých maturačních směsí (Büchler 2003). Jak bylo zjištěno, stimulace CD40L vede spíše k diferenciaci monocytů do zralých DB než k indukci nezralých či aktivovaných DB do zralých (Rosenzwajg 2002). V souladu s tímto tvrzením jsme našim případem zjistili, že samotný CD40L ve zvolených podmínkách nestačí k plné maturaci, neboť nebylo dosažené vysoké exprese markeru zralých DB CD83 ani chemokinového receptoru CCR7, který je zodpovědný za migraci DB do lymfatických tkání. Stimulací se ovšem exprese těchto markerů zvýšila, stejně jako se zvýšila exprese kostimulační molekuly CD80, která je spolu s CD86 zásadní v aktivaci T lymfocytů. Exprese CCR6 rovněž nevýrazně stoupla, což je v souladu s dostupnou literaturou (Rosenzwajg 2002). Exprese CD1a byla nejvyšší u MM, což by odpovídalo snížené schopnosti myelomových buněk vyžít. Produkce IL-12p70 byla mírně zvýšena, přesto však platí nutnost opakování ELISA s jiným kitem, ačkoliv nízké hladiny mohou vypovídat o nedostatečné stimulaci DB pomocí CD40L. Studium dalších stimulans či případně jejich směsí předpokládáme možnost dosažení vyššího % zralých DB, přičemž je publikováno, že různé směsi stimulans mohou vyvolávat rozdílnou (navzájem nekorelující) expresi markerů široce využívaných ke stanovení zralých DB (např. CCR7 vs. IL-12p70) (Pedersen 2005).

Kultivace DB v autologních podmínkách, tedy s přidavkem vlastního inaktivovaného séra, se u zdravých dárců projevila výrazným nárůstem exprese markerů nezralých i zralých DB (zejména exprese CD83), což by mohlo vypovídat o nezbytnosti autologního séra pro získání kvalitních DB, ovšem pouze u zdravých dárců. Při srovnání s DB pacientů s MM či MGUS, nalezený výrazný pokles vybraných markerů vypovídá o přítomnosti sérových inhibičních faktorů, které zásadním způsobem ovlivňují kvalitu DB, zejména expresi kostimulační molekuly CD80. Je zajímavé, že tato inhibice byla nalezena již na úrovni MGUS, která není řazena do hematologických onemocnění. V literatuře je popsáno ovlivnění inhibičních vlastností séra pomocí protilátek, což by ovšem vyžadovalo přesné stanovení obsahu a druhu inhibitorů v séru pacientů. Např. Brown a kol. zjistili, že pro klinické použití nevhodný neutralizující anti-TGF β by mohl



Obrázek č. 2: Charakterizace kultivovaných DB v závislosti na dni či typu kultury - změna exprese vybraných markerů. (A-D) Pacient s MGUS v bezsérových podmínkách: černá linie - vstupní histogram, tmavě šedá linie - 7. den kultivace, světle šedá linie, 7. den kultivace po stimulaci CD40L. (E-F) Zdravý dárce: černá linie - stimulace CD40L v bezsérových podmínkách, šedá linie - stimulace CD40L v autologních podmínkách. (H-J) Pacient s MM: černá linie - stimulace CD40L v bezsérových podmínkách, šedá linie - stimulace CD40L v autologních podmínkách. (K) Nárůst exprese CD11c v průběhu kultivace v bezsérových podmínkách: černá linie - vstup, tmavě šedá linie - 3. den kultivace, světle šedá linie - 7. den kultivace, velmi světlá šedá linie - 7. den kultivace po stimulaci CD40L.

být v budoucnu nahrazen IL-12 či IFN γ , které také dovedou neutralizovat nízkou expresi CD80 po stimulaci CD40L, navíc bez změny v zastoupení myeloidních a lymfoidních krevních DB (2004). Byl také sledován vliv přídatku IL-6 ke kultuře CD34⁺ prekurzorů, projevující se zvýšenou expresí CD14 a sníženou expresí CD1a. Neutralizací pomocí anti-IL-6 se obnovil původní fenotyp CD14⁺CD1a⁺ (Ratta 2002). Při analýze použitého séra jsme se zaměřili pouze na IL-6, který koreluje s agresivitou choroby a se špatnou prognózou pacientů, nicméně v séru periferní krve nebyl nalezen výrazný rozdíl v hladině IL-6 mezi jednotlivými hodnocenými skupinami, přestože se jednalo o neléčené pacienty. Což nás vede k domněnce, že tento cytokin není jediným inhibítozem vyžrávání DB, ale působí v komplexu s dalšími. Pro úplnost dodáváme, že hladina IL-6 nebyla sledována v séru kostní dřeně, neboť jsme se zabývali DB získanými z MNBPK a tedy ovlivněnými periferní krví.

Závěr

Kultivací DB jsme zjistili, že v bezsérových podmínkách jsou rozdíly v expresi povrchových markerů nezralých či CD40L stimulovaných DB mezi skupinou zdravých dárců a pacientů s MGUS a MM bez statisticky významných rozdílů, což je základní předpoklad pro terapeutické využití a funkčnost DB u pacientů. Předpokládáme, že samotný CD40L není dostatečný pro diferenciaci nezralých DB do plně zralých, jelikož nedošlo k výraznému zvýšení exprese markerů zralých DB. V podmínkách autologního séra lépe prospívají DB zdravých dárců, zatímco u pacientů se výrazně snižuje exprese CD80, CD83, CD1a, CCR6 a CCR7. IL-6 tvoří zřejmě jen jeden z komplexu mnoha inhibičních faktorů séra periferní krve, ne však zásadní, který se v tomto procesu uplatňuje.

Podporováno grantem MZČR NR/8081-3 a MŠMT LC 06027

Literatura:

1. Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252
2. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*. 2001; 29:1247-1255
3. Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin 10. *Blood*. 2001 Nov 15; 98(10): 2992-2998
4. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Raje N, Richardson P, Chauhan D, Anderson KC. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2003 Aug 15; 102(4):1435-1442.
5. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994 Jul 1; 180(1):83-93
6. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2002 Jun; 14(3):380-383
7. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov; 1(2):135-145
8. Rosenzweig M, Jourquin F, Tailleux L, Gluckman JC. CD40 ligation and phagocytosis differently affect the differentiation of monocytes into dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2002 Dec; 72(6):1180-1189
9. Schultz J, Nadler L, Gribben J. B7-mediated costimulation and immune response. *Blood Rev*. 1996; 10:111-127
10. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002 Jul 1; 100(1):230-237
11. Brown R, Murray A, Pope B, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor beta in patients with myeloma. *Br J Haematol*. 2004 Jun; 125(6):743-748
12. Lyakh LA, Koski GK, Telford W, Gress RE, Cohen PA, Rice NR. Bacterial lipopolysaccharide, TNF-alpha, and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14⁺ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B. *J Immunol*. 2000 Oct 1; 165(7):3647-3655
13. Pedersen AE, Thorn M, Gad M, Walter MR, Johnsen HE, Gaardsdal E, Nikolajsen K, Buus S, Claesson MH, Svane IM. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. *Scand J Immunol*. 2005 Feb; 61(2):147-156
14. Büchler T, Hájek R, Bourková L, Kovářová L, Musilová R, Bulíková A, Doubek M, Svobodník A, Mareschová I, Váňová P, Tůžová E, Vidláková P, Vorlíček J, Penka M. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine* 2003; 21:877-882

Korespondenční adresa:

Mgr. Lucie Kovářová,
OKH-LEHABI, FN Brno, PMDV, Jihlavská 20, 625 00 Brno
email: lkovarova@fnbrno.cz,
tel: 532232632, fax: 53223

Došlo / Submitted: 6. 9. 2007
Přijato / Accepted: 20. 11. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.