

VYUŽITÍ DETEKCE CYTOKINŮ PŘI PŘÍPRAVĚ VAKCÍN PROTI MNOHOČETNÉMU MYELOMU

ROLE OF CYTOKINE QUANTIFICATION IN PREPARATION OF CELLULAR VACCINE AGAINST MULTIPLE MYELOMA

JELÍNEK J.¹, OČADLÍKOVÁ D.^{1,2}, HROTEKOVÁ Z.^{1,2,5}, HÁJEK R.^{2,4,6}, MICHÁLEK J.^{1,3,4,7}

¹ UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, (UCBI), LF MU, BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

⁴ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU

⁵ ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

⁶ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

⁷ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

Souhrn

Cytokiny zprostředkují buněčné interakce a jejich kvantifikace představuje důležitý nástroj moderní imunologie a buněčné biologie při sledování mezibuněčné komunikace včetně imunitní odpovědi. Na příkladu přípravy protinádorové vakcíny pro pacienty s mnohočetným myelomem na bázi dendritických buněk ukazujeme dva přístupy měření heterodimerické podjednotky p70 interleukinu 12 (IL-12p70) a IL-10 pomocí klasické metody ELISA a nové citlivější metody Cytometric Bead Array.

Klíčová slova: dendritické buňky, mnohočetný myelom, interleukin 12, interleukin 10, ELISA, Cytometric Bead Array.

Summary

Cytokines mediate intercellular interactions and their quantification represents an important instrument of modern immunology and cell biology used for studies of cell-to-cell communication, including an immune response. This study demonstrates two ways of heterodimeric p70 interleukin 12 (IL-12p70) and IL-10 measurement using conventional ELISA and the novel and highly sensitive Cytometric Bead Array method during the preparation of clinical grade dendritic cell-based vaccine for patients with multiple myeloma.

Keywords: dendritic cells, multiple myeloma, interleukine 12, interleukine 10, ELISA, Cytometric Bead Array.

Úvod

Jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu (MM) je vakcinace pomocí dendritických buněk (DB) pacienta, které jsou naloženy nádorovými antigeny (5, 8, 4, 7, 3). DB jsou zpravidla připravovány z monocytů z periferní krve v průběhu krátkodobé kultivace *in vitro* v přítomnosti růstových faktorů (interleukin 4 a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]). Vznikají tak nezralé DB se schopností pohltit a zpracovat antigen. Účinkem maturačních stimulů (tumory nekrotizující faktor alfa, prostaglandin E2, lipopolysacharid, ligand receptoru CD40, interleukin 1 beta, interferon gama, toll like receptor) se nezralé DB diferencují ve zralé DB s vysokou schopností prezentovat antigen klidovým T lymfocytům, které by měly navodit intenzivní protinádorovou imunitní odpověď proti myelomovým buňkám (1). DB přitom produkují cytokiny, přičemž klíčovou roli sehrává heterodimerická podjednotka p70 interleukinu 12 (IL-12p70). Jejím působením dochází k polarizaci imunitní odpovědi ve prospěch Th1 s produkcí interferonu gama (IFN-γ) a dalších aktivačních cytokinů. DB však produkují rovněž určité množství interleukinu 10 (IL-10), který působí imu-

nosupresivně. Poměr mezi IL-12p70 a IL-10 tak hraje klíčovou roli při konečném efektu DB naložených antigenem a je rozhodující pro aktivaci či supresi T lymfocytů (2). Produkci cytokinů lze kvantifikovat metodou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). V poslední době je používána také vysoce citlivá metoda Cytometric Bead Array (CBA) založená na fluorescenci a měření pomocí průtokového cytometru. Následující příklad ukazuje srovnání obou metod při měření produkce IL-12p70 a IL-10, které jsou produkovány zralými DB používanými klinicky při vakcinaci pacientů s MM.

Materiál a metody

Schéma vlastní studie

Pro porovnání citlivosti metody ELISA a CBA byla měřena produkce IL-12p70 a IL-10 v supernatantu odebíraném v den D0 a v den D9 v průběhu *in vitro* kultivace DB (6). Ve stručnosti, prekursor DB byly nasazeny do kompletního kultivačního média v D0, po 5 dnech byl přidán nádorový antigen (Id protein) a v D6 maturační koktejl cytokinů. Pro detekci IL-10 byl použit ELISA kit Bender MedSystem human IL-10 BMS215INSTCE a pro detekci

IL-12p70 byl použit ELISA kit Bender MedSystem human IL-12 BMS238CE. Pro analýzu IL-10 a IL-12p70 pomocí CBA byl použit BD™ (Becton Dickinson) CBA Human IL-12p70 Flex Set a BD™ CBA Human IL-10 Flex Set. Princip této metody je založen na vzniku komplexů primární protilátka - cytokin - sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem na fluorescenčně značených mikropartikulích v analyzovaném roztoku. Mikropartikule se stejnou „capture“ protilátkou mají shodnou intenzitu fluorescence odlišnou od ostatních mikropartikulí, což umožňuje analýzu více cytokinů najednou v jednom vzorku.

	Vakcína 1		Vakcína 2		Vakcína 3		Vakcína 4		Vakcína 5	
Dny	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array
0	< st.	15,22	< st.	14,06	< st.	9,84	< st.	11,17	< st.	10,06
9	< st.	10,9	< st.	7,78	< st.	7,55	< st.	10,13	< st.	9,03

Tabulka č. 1: Koncentrace IL-10 (pg/ml) v jednotlivých vzorcích. < st. = pod detekční hranici metody

	Vakcína 1		Vakcína 2		Vakcína 3		Vakcína 4		Vakcína 5	
Dny	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array
0	< st.	2,33	< st.	3,71	< st.	4,28	5,16	3,78	< st.	6,79
9	< st.	2,78	4,2	1,76	3,95	3,15	5,62	2,58	6,06	3,04

Tabulka č. 2: Koncentrace IL-12p70 (pg/ml) v jednotlivých vzorcích. < st. = pod detekční hranici metody

Výsledky

Produkce IL-12 a IL-10 u dendritických buněk v průběhu přípravy vakcín proti MM

Produkce IL-12 a IL-10 byla měřena v kultivačním mediu v den nasazení DB (D0) a 3 dny po přidání nádorového antigenu Id proteinu (D9). Tabulka č. 1 znázorňuje koncentraci IL-10 u všech pěti vakcín pacienta v den D0 a D9 měřené metodou ELISA a CBA. U všech vzorků měřených metodou ELISA zůstala hladina IL-10 pod detekční hranicí této metody. Na rozdíl od metody ELISA byly

všechny vzorky měřené metodou CBA v detekčních mezích. V žádném ze vzorků nebylo zjištěno zvýšení hladiny IL-10 ve dni D9 oproti D0. Podobně pak Tabulka č. 2 ukazuje koncentraci IL-12p70 naměřenou ve stejných vzorcích. Získané hodnoty ukazují, že u obou metod nebyla ani u jednoho vzorku detekována prokazatelně vyšší hladina IL-12p70 v den 9 oproti dnu 0. I zde pomocí metody CBA byla ve všech vzorcích detekována měřitelná koncentrace IL-12p70, zatímco u metody ELISA bylo 5 vzorků pod detekční hladinou.

Závěr

Pro přípravu protinádorových vakcín založených na DB naložených specifickým nádorovým antigenem se v poslední době zdá být velice důležitý poměr produkce IL-12p70 a IL-10 u použitých DB (2). Tato práce se pokusila zmapovat produkci těchto dvou cytokinů u DB při přípravě vakcín proti MM pomocí metody ELISA a CBA. Z výsledků je patrné, že sice ani u jednoho ze vzorků nebyl zaznamenán prokazatelný nárůst produkce IL-10, ale zároveň také ani u jednoho z vzorků nebyl zaznamenán žádoucí vzestup produkce IL-12p70. Tyto výsledky naznačují nutnost optimalizace postupu přípravy a maturace DB užívaných k přípravě vakcín proti MM, aby bylo dosaženo zvýšené produkce IL-12p70 u DB v průběhu kultivace. Zároveň tato studie potvrzuje nesporné výhody metody CBA v citlivosti měření při nízkých koncentracích stanovovaných cytokinů oproti standardně užívané metodě ELISA.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT NPVII 2B06058, MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura:

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767-811.
2. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001; 29:1247-1255.
3. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000; 96: 3102-3108.
4. Büchler T, Hanak L, Smejkalova J, et al. Využití monoklonálního imunoglobulinu k přípravě protinádorové vakcíny u nemocných s mnohočetným myelomem – první zkušenosti z klinické studie. *Klinická onkologie.* 2004; 17: 64-67.
5. Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC, et al. Ex vivo induction of

multiple myeloma-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Blood.* 2003; 4: 1435-1442.

6. Očadlíková D, Kovářová L, Michálek J, et al. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. *Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty 26.-28.května 2004.* 2004; 53: 113-116.
7. Vonderheide RH, Domchek SM, Chen D-Y, et al. Vaccination of Cancer Patients Against Telomerase Induces Functional Anti-tumor CD8+ T lymphocytes. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10: 828-839.
8. Wen YJ, Min R, Tricot G, et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood.* 2002; 99: 3280-3285.