

MONITOROVÁNÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK A JEJICH PODTYPŮ V PRŮBĚHU LÉČBY NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

MONITORING OF DENDRITIC CELLS AND THEIR SUBSETS DURING TREATMENT IN MULTIPLE MYELOMA

KOVÁŘOVÁ, L.¹; SVOBODNÍK, A.³; BÜCHLER, T.²; MUSILOVÁ, R.²; VÁNOVÁ, P.²; KLABUSAY, M.¹; KREJČÍ, M.¹; ADAM, Z.¹; HÁJEK, R.^{1,2}

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

² ODD. KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

³ CENTRUM BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, PRF A LF MU BRNO

Souhrn : Východiska : V této studii bylo hodnoceno zastoupení subtypů dendritických buněk (DB) - DB1, DB2 - pacientů s mnohočetným myelomem (MM) před počátkem léčby a v jejím průběhu. Metody a výsledky : Flowcytometrické stanovení počtu DB periferní krve bylo prováděno na základě pozitivní exprese povrchových antigenů - CD83 společně s HLA-DR, CD11c a CD123. Kontrolní skupina zdravých jedinců (n = 15; průměr 0,62±0,06% CD83+ buněk; poměr DB1/DB2 = 2,5) nevykazovala statisticky významný rozdíl při srovnání se vstupním hodnocením pacientů před léčbou (n = 15; 0,59±0,13% CD83+ buněk; DB1/DB2 = 2,17). U léčených pacientů (n = 10) došlo po indukční léčbě VAD (vincristin + adriamycin + dexamethazon) k nárůstu celkového počtu DB (0,84±0,4%; DB1/DB2 = 1,59) ve srovnání s počátečními hodnotami, po aplikaci G-CSF počet DB poklesl (0,66±0,6%; DB1/DB2 = 3,71). Nejnižších hodnot celkového počtu DB bylo dosaženo v aferézním produktu (0,36±0,2%; DB1/DB2 = 4,75). Aplikace GM-CSF vyvolala zvýšení počtu DB (0,56±0,3%; DB1/DB2 = 1,59) a v 6. měsíci po transplantaci se obnovila předléčebná hladina DB (0,83±0,6%; DB1/DB2 = 3,92). Závěr : Nejvyšší počty DB byly zjištěny po indukční léčbě a v šestém měsíci po transplantaci. Poměr DB1/DB2 vyzněl pro relativní převahu typu DB1, nejvyšší byl v aferézním produktu a v periferní krvi šestého měsíce po transplantaci.

Klíčová slova : dendritické buňky, mnohočetný myelom, imunoterapie

Summary : Background : In this study was evaluated the proportion of dendritic cells (DC) subsets – DC1, DC2 – in peripheral blood of patients with multiple myeloma (MM) before and during treatment. Methods and results: Flowcytometric determination of DC in the peripheral blood was based on the positive expression of surface antigens - CD83 in combination with HLA-DR, CD11c and CD123. No significant differences were found in initial values between the group of healthy volunteers (n = 15; mean count of CD83+ cells was 0,62±0,06%; ratio DC1/DC2 = 2,5) and the group of patients before treatment (n = 15; 0,59±0,13% CD83+; DC1/DC2 = 2,17). In the group of patients (n = 10), after induction treatment with VAD regimen (vincristin, adriamycin, dexamethason), mean percentage of DC (0,84±0,4% CD83+ cells; DC1/DC2 = 1,59) was higher than initial values. Administration of the G-CSF reduced the total DC numbers (0,66±0,6%; DC1/DC2 = 3,71). The lowest total DC counts were in the apheresis products (0,36±0,2%; DC1/DC2 = 4,75). Administration of the GM-CSF increased DC numbers (0,56±0,3%; DC1/DC2 = 1,59). Pre-treatment DC values were reached in the six months after transplantation (0,83±0,6%; DC1/DC2 = 3,92). Conclusions : The highest number of total DC was found after induction treatment and in the six months after transplantation. Ratio DC1/DC2 showed the relative predominance of DC1 subtype, the highest ratio was found in the apheresis products and in peripheral blood six months after transplantation.

Key words : dendritic cells, multiple myeloma, immunotherapy

Úvod

Dendritické buňky jsou účinné antigen-prezentující buňky, jež jsou schopny pohltit cizorodý antigen (Ag) a opracovaný jej následně nabídnout T lymfocytům, čímž může dojít k vyvolání primární T buněčné odpovědi (Hart, Blood 1997). Ve spojení s vhodným nádorovým antigenem lze indukovat protinádorovou imunitu u pacientů s MM (Kwak, Seminar Hematol 1999). DB se tak jeví vhodnými buňkami pro imunizační protokoly a pro přípravu protinádorových vakcín.

Vlastnosti, fenotyp a funkční stav DB jsou závislé na typu prekurzoru a stupni zralosti. Nezralé dendritické buňky periferní krve exprimují pouze omezenou řadu antigenů, přičemž aktivací se jejich repertoár rozšiřuje a exprese sílí. DB nesou na svém povrchu specifické znaky pro DB linii (CMRF-44, CMRF-56, CD83, S100), znaky makrofágů (CD68), znaky lymfoidních a myeloidních linií (CD4, CD5, CD13, CD33), Fc receptory (CD64, CD32), kostimulační molekuly (CD40, CD80, CD86), adhezní molekuly (CD11a, CD11c, CD50,

CD54, CD58, CD102), běžné leukocytární antigeny (CD45, CD45) a antigeny hlavních histokompatibilních tříd (HLA-ABC, -DP, -DQ, -DR) (Hart, Blood 1997). Jelikož prozatím neexistuje specifická metoda pro určení počtu DB v periferní krvi, bývají tyto často stanovovány jako buňky negativní z hlediska liniových znaků (lin⁻) a zároveň silně HLA-DR pozitivní, případně pozitivní z hlediska znaku CMRF44 a negativní v rámci znaků CD19 (exprimován B-lymfocyty) a CD14 (exprimován monocyty) (Fearnley, Blood 1999). Exprese povrchového markeru CD83 - liniového znaku DB - je přičítána zejména aktivovaným či zralým DB. CD83 je 45kD transmembránový protein, člen imunoglobulinové (Ig) rodiny, skládá se z jednoduchého typu Ig extracelulární domény a C-terminálního cytoplasmatického konce. Antigen CD83 se nachází zejména na folikulárních dendritických buňkách, cirkulujících dendritických buňkách, interdigitujících DB v lymfatických tkáních, na *in vitro* generovaných DB a thymových dendritických buňkách. Jeho exprese však není omezena jen

na DB, CD83 je také exprimován v některých germinálních centrech B buněk a u některých lymfoblastoidních buněčných liniích. Ačkoliv jeho funkce dosud není známa, může hrát roli v mezibuněčných interakcích při prezentaci Ag (Lechmann, J Exp Med 2001).

Nezralé DB periferní krve a nelymfatických tkání vykazují vysokou fagocytární aktivitu a slabou schopnost stimulovat T lymfocyty. Po setkání s Ag a jeho zpracování (fagocytóza Ag, makropinocytóza extracelulární tekutiny nebo receptorem zprostředkovaná endocytóza) (Sallusto, J Exp Med 1995), dochází k jejich maturaci a diferenciaci, což je provázeno snížením schopnosti pohltit Ag, zvýšenou expresí kostimulačních a adhezivních molekul (Banchereau, Nature 1998) a migrací DB do sekundárních lymfatických orgánů, kde se uplatňuje zvýšený stimulační potenciál pro aktivaci a následnou proliferaci T buněk (Hart, Blood 1997). Proces vyzrávání je kontrolován signály v mikroprostředí DB, může též být indukován zánětlivými faktory, cytokiny atd. Je zřejmé, že přítomnost různých vývojových stádií DB je důležitá pro komplexní imunitní odpověď organismu (Hájek, Medical Oncology 1999).

V periferní krvi se dendritické buňky vyskytují ve velmi nízkém počtu 0,1-1% všech mononukleárních buněk (McCarthy, Immunology 1997). U lidí byly charakterizovány prozatím minimálně tři podtypy DB: CD14+CD11c+ monocyty, CD14-CD11c-IL3Rα+ plazmatocytoidní buňky, CD14-CD11c+ cirkulující DB (Brossart, Exp. Hematology 2001). Donedávna byly DB děleny dle svého původu, funkce a lokalizace do 2 populací – myeloidní a lymfoidní – navzájem se lišících v expresi CD8α (Banchereau, Nature 1998). Soudilo se, že myši splenické CD8α⁺ DB (myeloidní) mohou indukovat T buněčnou proliferaci a iniciovat imunitní odpověď zatímco CD8α⁺ DB (lymfoidní) inhibují T proliferaci a naopak indukují Fas/FasL-mediovanou apoptózu CD4⁺ lymfocytů, a tedy hrají roli v periferní toleranci a negativní selekci v thymu (Suss, J Exp Med 1996). Tyto 2 subpopulace se také liší ve schopnosti prezentace antigenu T lymfocytům a *in vivo* studie navíc ukázaly, že antigenem ovlivněné CD8α⁺ DB řídí rozvoj T helper 1 (Th1) podtypu imunitní odpovědi a CD8α⁺ DB se uplatňují v T helper 2 (Th2) podtypu imunitní odpovědi (Maldonado-Lopez, J Exp Med 1999). Bylo zjištěno, že CD8α není markerem lymfoidního původu, oba subtypy u myši pocházejí z běžných myeloidních prekurzorů sleziny a thymu. Lze tedy předpokládat, že rozdíl ve funkci a fenotypu rozdílných subtypů DB je podmíněn mikroprostředím tkáně a maturationálním stavem DB (Traver, Science 2000).

V této práci byly identifikovány a enumerovány dva níže uvedené podtypy dendritických buněk. Buňky DB1 s expresí CD14-CD11c+CD13+CD33+ vyžadují pro své přežívání GM-CSF a po stimulaci mají schopnost sekrece IL-12. Tyto DB aktivují nezadané T lymfocyty, řídí jejich diferenciaci směrem k Th1 imunitní odpovědi a generují tak protinádorovou imunitu. Podtyp DB2 s expresí CD14-CD11c-CD4+CD123+ vyžaduje pro dozrání IL-3 a v reakci na viry se jeví zdrojem INF typu I (Arpinati, Blood 2000; Brossart, Exp. Hematology 2001). Může vyvolat diferenciaci T buněk do Th2 imunitní odpovědi a modulovat rozvoj akutní „graft versus host disease“ (aGvHD) po allogenní transplantaci periferních kmenových buněk (PBSC) (Böck, ASH 2001), případně indukovat toleranci (Pullarkat, ASH 2001). Arpinati předpokládá, že ztráta cirkulujících DB2 může být spojena s rozvojem akutní či chronické GvHD (EBMT, 2002). Vyhodnocením počtu těchto podtypů a poměru D1/D2 byl získán údaj o množství dendritických buněk v různých fázích léčby pacientů s mnohočetným myelomem. Tato data budou následně využita k určení nejuhodnější doby sběru DB pro možnou expanzi dendritických buněk za účelem výroby nádorových vakcín.

Materiál a metody

Pacienti: Vzorky periferní krve byly získány od pacientů s MM naší kliniky (n = 10), kteří podstoupili vysokodávkovanou che-

moterapii s autologní transplantací periferních kmenových buněk. Odběry byly prováděny do EDTA v těchto daných časových intervalech, se současným stanovením krevního obrazu pacientů pro určení absolutního počtu DB : 1) po ukončení indukční chemoterapie (4 x VAD), 2) po stimulaci cyklofosfamidem CFA (5 mg/m²) a G-CSF (5 - 10 µg/kg) - při leu > 5x10⁹/l, 3) ve štěpu periferních kmenových buněk (PBSC), 4) po provedení autologní transplantace (s přípravným režimem - jednorázovou dávkou melfalanu 200 mg/m²) následované aplikací GM-CSF (5 µg/kg, od 7. dne po transplantaci) - při leu > 5x10⁹/l a 6. měsíc po transplantaci. Hodnocení počtu DB před léčbou bylo provedeno na odlišném vzorku neléčených pacientů při jejich vstupním vyšetření (n = 15). Jako kontrola vstupního hodnocení pacientů byla analyzována také periferní krev zdravých jedinců (n = 15).

Metodika: 50 µl periferní krve (případně 10 µl PBSC) bylo 20 minut inkubováno s 3x3 µl monoklonálních protilátek. Použity byly tyto trojkombinace protilátek : antiCD83-TC/antiHLA-DR-FITC/antiCD11c-PE (vše Caltag, Burlingame, CA, USA) nebo antiCD83-TC/antiHLA-DR-FITC/antiCD123-PE (Caltag a Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Pro nastavení přístroje byla použita negativní izotypová kontrola - mouse IgG3-FITC/IgG2a-PE/IgG1-TC (Caltag, USA). Erytrocyty byly odstraněny lyzáci kyselinou mravenčí a vzorek byl fixován paraformaldehydem. Flowcytometrická analýza byla provedena na přístroji Epics XL (Beckman Coulter, Florida, USA), kde byla metodou třífarební imunofluorescence sledována současná leukocytární exprese výše uvedených znaků charakterizujících daný podtyp dendritických buněk.

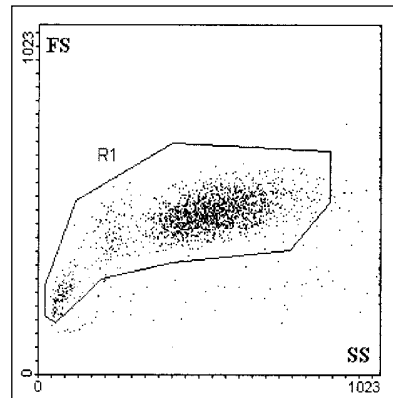
Statistika: Cílem analýzy bylo srovnání hodnot vybraných znaků dendritických buněk u zdravých jedinců a u pacientů s mnohočetným myelomem, u pacientů byly dále analyzovány časové změny v hodnotách povrchových markerů v průběhu léčby. Pro deskriptivní účely byly v analýze použity základní statistické grafy (Box-Whisker ploty, kategorizované sloupcové a korelační diagramy) a statistické tabulky. U spojitých parametrů byly vypočteny základní statistické ukazatele (průměr, medián, SD a příslušné kvantily). Při analýze korelačních vztahů byl využit neparametrický Spearmanův korelační koeficient RS, při srovnání kontrolní skupiny a vstupních hodnot pacientů byl aplikován Mann-Whitney U test a při srovnání hodnot markerů v průběhu léčby Wilcoxonův párový test. Statistické testy byly hodnoceny na hladině významnosti α = 0,05.

Výsledky

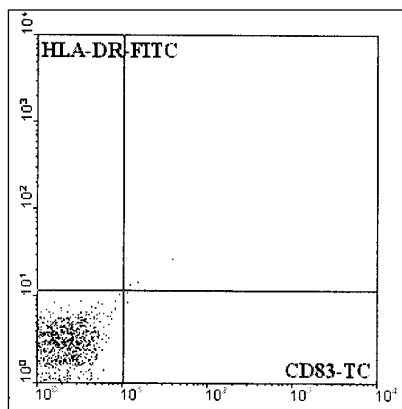
Jako hlavní antigen charakterizující dendritické buňky byl zvolen aktivizační povrchový znak CD83, který společně s podskupinou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) – HLA-DR slouží k identifikaci dendritických buněk (Fearnley, Blood 1999). Stanovení procenta DB jednotlivých subpopulací z leukocytů plné periferní krve (obr. A) bylo provedeno po nastavení parametrů přístroje dle negativní izotypové kontroly (obr. B). Analyzována byla populace předpokládaných dendritických buněk CD83+HLA-DR+ (obr. C), na kterých

Obr. A, B, C, D:

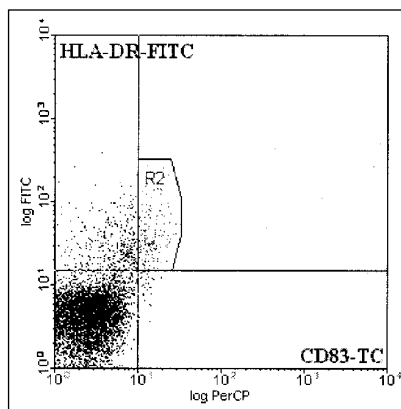
Flowcytometrická analýza: (A) leukocytární gate R1 = side scatter vs. forward scatter, (B) negativní izotypová kontrola (C) exprese CD83-TC/HLA-DR-FITC - předpokládané dendritické buňky se nacházejí v gate R2, (D) exprese znaku CD11c-PE na populaci CD83+HLA-DR+



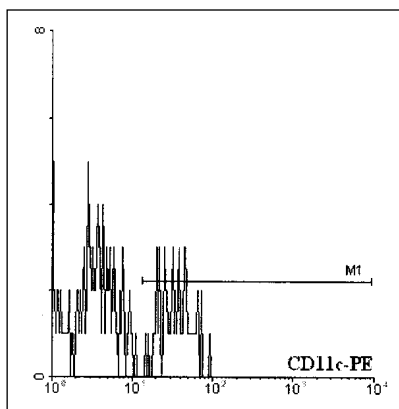
B



C



D



Tab. 1: Zastoupení srovnávaných markerů u kontrolní skupiny zdravých osob (n=15) a kontrolní skupiny pacientů před léčbou (n=15) – (A) – procenta, (B) – absolutní počty.

Tab. 1A

hodnocené znaky	kontrolní skupiny - rel. počty [průměr±SD] - %		p-value
	zdraví (n=15)	pacienti (n=15)	
DB1	0,25±0,12	0,26±0,11	0,468
DB2	0,10±0,05	0,12±0,10	0,885
DB1/DB2	2,50	2,17	
CD 83+	0,62±0,06	0,59±0,13	0,191
DR+	11,01±2,15	10,34±4,01	0,983
11c	1,84±0,33	1,93±0,74	0,206
123	1,70±0,33	1,41±0,61	0,290

Tab. 1B

hodnocené znaky	kontrolní skupiny - abs. počty [průměr±SD] - (x10 ⁹ /l)		p-value
	zdraví (n=15)	pacienti (n=15)	
DB1	1,23±0,56	1,35±0,49	0,395
DB2	0,54±0,23	0,52±0,31	0,663
DB1/DB2	2,28	2,60	
CD 83+	3,26±0,57	3,22±1,15	0,724
DR+	58,21±18,03	54,41±29,03	0,254
11c	9,59±2,12	9,92±4,21	0,724
123	8,93±2,55	7,44±3,71	0,178

Tab. 2: Četnost markerů (%) u skupiny pacientů (n=10) v průběhu léčby, znak CD123 hodnocen u 7 osob, rozdílné apostrofy v rámci řádku značí statisticky významnou odlišnost (A se liší od B, ale neliší od AB apod.)

hodnocené znaky	časový průběh léčby - rel. počty [průměr±SD] - %				
	po indukci	po G-CSF	štěp	po GM-CSF	6 M po T
DB1	0,46±0,39 A	0,52±0,68 A	0,19±0,15 A	0,46±0,47 A	0,47±0,67 A
DB2	0,29±0,27 A	0,14±0,16 AB	0,04±0,06 B	0,29±0,32 A	0,12±0,11 AB
DB1/DB2	1,59	3,71	4,75	1,59	3,92
CD 83+	0,84±0,4 A	0,66±0,6 AB	0,36±0,2 B	0,56±0,3 AB	0,83±0,6 A
HLA DR+	8,45±4,15 A	3,42±2,16 B	6,03±5,29 ABC	14,19±12,66 AC	12,57±7,63 AC
CD11c+	3,42±1,99 A	0,96±0,48 B	2,19±3,89 AB	5,46±12,60 AB	2,19±1,10 A
CD123+	2,53±4,02 A	0,71±0,60 BC	0,43±0,22 C	3,72±5,04 A	1,43±0,29 AB

byl dále sledován výskyt antigenu CD11c nebo CD123 (obr. D). Sledování znaku CD123 bylo započato až v průběhu této studie, jeho hodnocení bylo provedeno u 7 pacientů. Absolutní hodnoty DB byly přepočteny dle množství leukocytů. Hodnocení exprese znaku CD83 na leukocytech se ukázalo jako komplikované, neboť hranice mezi autofluorescencí negativních buněk a specifickou fluorescencí pozitivních buněk byla často neztetelná.

Referenční vzorky 15 zdravých jedinců se pohybovaly v rozmezí 0,41-0,83 % CD83+ buněk (průměrně 0,62%) - (absolutní počty v rozmezí 2,10-5,04x10⁹/l) a nelišily se statisticky významně od kontrolních vstupních dat 15 pacientů 0,37-0,94 % CD83+ buněk (průměrně 0,59%) - (1,62-7,52x10⁹/l) (tab. 1A, 1B). Počty DB v rámci jednotlivců vykazovaly velké intraindividuální rozdíly, což může být způsobeno jednak fluktuacemi v širším rozmezí normálních hodnot či cyklickými variacemi DB periferní krve (Fearney, Blood 1999).

U léčených pacientů po indukční léčbě VAD vzrostl počet DB na 0,84% CD83+ (DB1 = 0,46%; DB2 = 0,29%), aplikace G-CSF způsobila snížení počtu CD83 pozitivních buněk na 0,66%, ale současně zvýšení počtu DB1 (DB1 = 0,52%; DB2 = 0,14%). V autologním štěpu jsme zaznamenali nejnížší množství DB (0,36% CD83+; DB1 = 0,19%; DB2 = 0,04%), jednalo se pravděpodobně o relativní snížení způsobené převahou PBSC. Po podání GM-CSF se počty DB opět zvyšovaly (0,56% CD83+, DB1 = 0,46%; DB2 = 0,29%), s převahou podtypu D1 nad D2. V době okolo 6. měsíce po transplantaci došlo k dalšímu vzestupu počtu DB (0,83% CD83+, DB1 = 0,47%; DB2 = 0,12%), pravděpodobně byla obnovena hladina odpovídající období před léčbou (viz tab. 2).

Bylo zjištěno vyšší zastoupení dendritických buněk podtypu DB1 (83+HLA-DR+11c+) ve srovnání s DB2 (83+HLA-DR+123+), a to u kontrolních vzorků (vstupní DB1/DB2 = 2,5) i nemocných (vstupní DB1/DB2 = 2,17; po indukci DB1/DB2 = 1,59; po G-CSF DB1/DB2 = 3,71; ve štěpu DB1/DB2 = 4,75; po GM-CSF DB1/DB2 = 1,59; 6M po trans-

plantaci DB1/DB2 = 3,92). Vzhledem k tomu, že skupina pacientů se vstupním hodnocením před léčbou není totožná se skupinou hodnocenou v průběhu léčby, nebyly tyto dvě skupiny směřovány pro určení statistické významnosti rozdílu počtu DB.

Diskuse

Identifikace DB periferní krve je ztížena absencí specifického povrchového markeru, který by umožnil jejich jednoznačné stanovení. Jelikož neaktivované DB periferní krve neexprimují ve vysoké míře žádné další leukocytární markery, v praxi se tedy využívá silné exprese HLA-DR molekul v kombinaci s negativitou na znaky buněčných linií (Hart, Blood 1997). Je však prokázáno, že populace lin⁺HLA-DR⁺ je velmi heterogenní a dává vzniknout rozdílným buněčným populacím – mezi jinými také non-DB fibrocytům (Chesney, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1997), tudíž se takovéto hodnocení počtu DB může stát zdrojem chyb (Fearnley, Blood 1999). Množství lin⁺HLA-DR⁺ buněk je také zvýšeno u některých nemocí, zejména při vyplavování hematopoetických prekurzorů do periferní krve, což opět svědčí proti použití této metodiky stanovení DB (Reid, J Immunol 1992).

Také námi zvolený povrchový znak CD83 se vyskytuje ve vyšší míře až na aktivovaných či diferencovaných dendritických buňkách (Hart, Blood 1997). Buňky nesoucí tento znak byly zaznamenány teprve po několikeré izolaci a krátké kultivaci mononukleárních buněk (MNC) periferní krve (Markowicz, Arch Immunol Ther Exp 2001; Luft, J Immunol 1998). Je tedy zřejmé, že hodnocení exprese aktivního znaku CD83 na leukocytech periferní krve je zatíženo vysokou chybou. Nelze však předpokládat, že se DB exprimující tento znak v periferní krvi nevyskytují, neboť proces maturace a s ním spojená exprese znaku CD83 by měly být zahájeny bezprostředně po setkání antigenem. Při svém putování z periferní krve do sekundárních lymfatických orgánů by takovéto dendritické buňky měly být odhaleny navzdory svému nízkému počtu. Určitou možnost skýtá hodnocení pouze přes populaci MNC či opakovaný odečet exprese znaků. Zmínit lze také zvýšení koncentrace MNC prostřednictvím separátorů, kdy - po odstranění lymfocytů z odseparovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) a následné kultivaci s vhodnými cytokiny - lze získat buňky vykazující morfologii DB (Rouard, ASH 2001). Hart provedl další purifikaci PBMC na základě magnetické separace prostřednictvím specifických protilátek CMRF-44, CMRF-56 a získal populaci DB v dostatečném množství a kvalitě pro imunoterapeutické účely (Hart, ASH 2001). Separace MNC by tedy mohla usnadnit hodnocení DB periferní krve v důsledku relativního zvýšení počtu buněk exprimujících hodnocený marker CD83.

V současné době se objevilo také několik nových monoklonálních protilátek k hodnocení zastoupení DB i jejich podtypů. Jsou to např. protilátka vůči znaku ILT3 exprimovanému všemi DB na různých úrovních maturace (Immunotech, Coulter Company) a protilátka proti BDCA2 antigenu specifickému pro DB2 (Miltenyi Biotec). Je zřejmé, že nalezení dalších specifických protilátek proti znakům exprimovaným dendritickými buňkami může velmi usnadnit jejich hodnocení, které bylo prozatím zatíženo chybami.

O kinetice dendritických buněk periferní krve prozatím není příliš mnoho známo. Naše výsledky však ukazují, že indukční léčba VAD vyvolala zvýšení počtu DB (DB1 i DB2) vzhledem k neléčeným pacientům a zdravým kontrolám. Nutno

podotknout, že jsou zde srovnávány odlišné skupiny pacientů, je tedy možné, že mezi těmito existuje posun v hodnocení exprese povrchových znaků.

Po aplikaci G-CSF jsme našli, při současném poklesu exprese CD83, snížení počtu DB2, zatímco počty DB1 vzrostly. Naopak Hart zjistil, že stimulace zdravých dárců pomocí G-CSF neměnila počet CD11+ DB, přičemž počty CD123+ DB se zvýšily a korelovaly se snížením CD62L-selektinu (ASH 2001). Také Bolwell popisuje zvýšený výskyt DB2 u G-CSF stimulovaných dárců ve srovnání se stimulací pomocí kombinace G-CSF + VP-16 (Etoposid) (ASH 2001). Je možné, že mobilizace PBSC způsobuje nižší stimulaci buněčných prekurzorů a tedy pozastavení tvorby DB, případně G-CSF přímo či nepřímo ovlivňuje produkci DB. Tomu by také odpovídalo postupné obnovování jejich počtu po transplantaci (Fearnley, Blood 1999), G-CSF pravděpodobně mění adhezivní fenotyp a migrační schopnosti DB periferní krve (Hart, ASH 2001).

Nejnižší počty DB byly nalezeny ve štěpu PBSC, což odpovídá relativní převaze kmenových buněk přednostně exprimujících znak CD34. Tyto kmenové sice buňky patří, spolu s monocytů, mezi zdrojové buňky pro expanzi DB *in vitro*, ale je zřejmé, že znaky DB vykazují až po kultivaci s určitými cytokiny. Nicméně tyto CD34+ buňky napomáhají obnově DB linie. Tzolas provedl studii s dárcovskými DB a zjistil, že vyšší počet DB1 v allogenním PBSC transplantátu je spojen s akutnější GVHD (ASH 2001). Reddy sledoval množství DB a jejich podtypů v době allogenní transplantace, kdy vyšší % cirkulujících DB bylo spojeno s pozdějším relapsem a tedy prodlouženým přežíváním (ASH 2001). Je tedy možné, že monitorováním počtu DB periferní krve po transplantaci a srovnáním s jejich předtransplantačními hodnotami, lze předpovědět relaps pacientů.

Stimulace prostřednictvím GM-CSF napomáhající obnově krevetvorby po transplantaci se projevila na vzrůstu počtu DB na přibližně normální hodnotu málo odlišnou od vstupních měření. Následné hodnocení v 6. měsíci po transplantaci se statisticky významně nelišilo od předchozího, pouze se zvýšil počet CD83+ buněk. Předpokládáme, že počty DB se vracejí k normálním předléčebným hodnotám již v několika dnech po aplikaci GM-CSF, což je v soulase se studií Fearnleye (Blood 1999).

Závěr

Hodnocení počtu dendritických buněk cirkulujících v periferní krvi bylo komplikováno nízkou expresí znaku CD83 na leukocytech. Buňky s pozitivní expresí tvoří menšinovou špatně hodnotitelnou populaci, proto by bylo vhodné provést srovnání hodnocení DB s některou z nových komerčně dostupných protilátek. Přesto se nám podařilo zhodnotit relativní počty obou podtypů dendritických buněk a prokázat změny v jejich poměru DB1/DB2 u pacientů s mnohočetným myelomem v průběhu léčby. Kontrolní vzorky zdravých jedinců nevykazovaly při srovnání se vstupním hodnocením nemocných statisticky významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů. Nejvyšší procento CD83+ buněk bylo odečteno v periferní krvi pacientů po indukční léčbě VAD a v 6. měsíci po transplantaci, nejvyšší poměr DB1/DB2 byl nalezen v autologním štěpu a v periferní krvi v 6. měsíci po transplantaci.

Tato práce je podpořena grantem GAČR 301/00/0405 a výzkumným záměrem MZČR 00065269705.

Literatura:

1. Hart DNJ: Dendritic cells: Unique leucocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, **90**: 3245-3587
2. Kwak LW, Thielemans K, Massaia M: Idiotypic vaccination as therapy for multiple myeloma. *Semin Hematol.* 1999, **36**: 34-7
3. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ: Monitoring

human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation, *Blood* 1999, **93**: 728-36

4. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A: The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells, *J Exp Med.* 2001, **194**: 1813-21

5. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med*. 1995, **182**:389-400
6. Banchereau J, Steinmann RM: Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 1998, **392**: 245-52
7. Hájek R, Butch AW: Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma, *Med Oncol*. 2000, **17**: 2-15
8. McCarthy DA, Macey MG, Bedford PA, Knight SC, Dumonde DC, Brown KA: Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood, *Immunology* 1997, **92**: 244-51
9. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L: Dendritic cells in cancer vaccines, *Exp Hematol*. 2001, **29**:1247-55
10. Suss G, Shortman K: A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis, *J Exp Med*. 1996, **183**:1789-96
11. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Maliszewski CR, Moser M: Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo, *J Leukoc Biol*. 1999, **66**: 242-6
12. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL: Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor, *Science* 2000, **290**: 2152-4
13. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C: Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells, *Blood* 2000, **95**: 2484-90
14. Böck SH, Pihusch M, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Diem H, Rolf B, Pihusch R, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ: Chimerism of Peripheral Blood Dendritic Cells in Patients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, *American Society of Hematology* 2001, abstract **789**
15. Pullarkat VA, Scotland R, Schultz WE, Chakrabarti D, Weber JS: Lymphoid Dendritic Cells Mobilized with Progenipointin Induce Th1 and Peptide-Specific Cytotoxic T Cell Responses, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1254**
16. Arpinati M, Chirumbolo G, Bandini M, Stanzani S, Falcioni B, Urbini V, Martelli FR, Baccarani M, Tura S, Rondelli D: Graft versus host disease affect DC-2 recovery after allogeneic transplantation, *EBMT* 2002, poster **661**
17. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R: The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**: 6307-12.
18. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J: Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow, *J Immunol*. 1992, **149**: 2681-8
19. Markowicz S, Skurzak HM, Walewski J: A method for directly determining the number of dendritic cells and for evaluation of their function in small amounts of human peripheral blood, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001, **49**: 51-7
20. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J: Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells, *J Immunol*. 1998, **161**: 1947-53.
21. Rouard H, Reys S, Taylor L, Beaujean F, Marquet J, Andreu G, Delfau-Larue MH, Farcet JP, Leon A: Highly Purified Monocytes for Dendritic Cells Differentiation Using the Closed Single Use Cobe Spectra CPS System, *American Society of Hematology* 2001, abstract **5127**
22. Hart DN, Bioley G, Ho CH, Turtle CJ, Vuckovic S, Crosbie GV, Munster D, Wright S, Taylor K, Rodwell R, Lopez JA: A Human Dendritic Cell Purification Platform for Clinical Applications, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1575**
23. Bolwell BJ, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Bell K, Bernhard L, Koennecke J, Serafino S, Ostendorf H, Kuczkowski E, Rybicki L, Jarvis J, Kalaycio M: Etoposide (VP-16) + G-CSF Mobilizes Different Dendritic Cells Subsets Than Does G-CSF Alone, *American Society of Hematology* 2001, abstract **756**
24. Tzolas AC, Devidas M, Iturraspe J, Boyette R, Sugrue M, Wingard JR, Reddy V: Type 1 Dendritic Cells (DC1) in Allogeneic Donor Peripheral Blood Stem Cell Product Are Associated with an Increase in Acute Graft-Versus-Host Disease, *American Society of Hematology* 2001, abstract **849**
25. Reddy V, Tzolas AC, Devidas M, Iturraspe J, Boyette R, Wingard JR: Circulating Dendritic Cells (DC1 and DC2) at Engraftment Correlate with Relapse and Survival after Allogeneic Stem Cell Transplantation, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1742**