

BIOLOGIE DENDRITICKÝCH BUNĚK A JEJICH PŘÍPRAVA PRO KLINICKÉ UŽITÍ (PŘEHLED A PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY)

DENDRITIC CELL BIOLOGY AND PREPARATION FOR CLINICAL APPLICATIONS (REVIEW AND PRELIMINARY RESULTS)

^{1,2}HÁJEK R., ¹KRIVANOVÁ A., ²BOURKOVÁ L., ¹DOUBEK M., ²FÍŠEROVÁ A., ¹KOVÁŘOVÁ L., ²MUSILOVÁ R., ¹BÜCHLER T., ²PENKA M., ¹VORLÍČEK J.

¹INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

²ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

Souhrn: Dendritické buňky (DB) jsou buňky předcházející antigen, které jsou silnými stimulatory imunitní odpovědi B i T lymfocytů. Ačkoliv jsou DB normálně přítomny v cirkulaci ve velmi malých počtech, jsme dnes schopni je namnožit v buněčných kulturách. DB mohou být in vitro získány z různých zdrojů jako je kostní dřeň, pupečnicková a periferní krev. Většina protokolů používá ke kultivaci DB cytokiny GM-CSF, IL-4 a TNF-alpha. Přidání dalších růstových faktorů jako je SCF a Flt-3 ligand a CD 40 může jejich počet ještě zvýšit. DB lze získat v různých stadiích zralosti v závislosti na době kultivace kultury. Pro klinické užití mohou být DB množeny v bezsérových médiích a pro budoucí využití zamrazeny. V prvních experimentech jsme použili dvoukrokovou metodu kultivace DB z CD34+ buněk s dosažením 15násobné expanze DB během 12denní kultivace. Imunoterapie založená na využití dendritických buněk je středem zájmu v léčbě různých nádorových onemocnění a zafandila se mezi nejperspektivnější a nejintenzivněji zkoušené experimentální léčebné postupy v onkologii.

Klíčová slova: Dendritické buňky - Vakcinace - Imunoterapie

Summary: Dendritic cells (DCs) are extremely efficient antigen-presenting cells that are potent stimulators of both B and T cell immune responses. Although DCs are normally present in extremely small numbers in the circulation, recent advances in DC biology have made it possible to generate DCs in culture. DCs can be generated in vitro from various cellular sources including bone marrow, cord blood and peripheral blood. Although culture conditions are extremely diverse, the majority of protocols grow DCs in GM-CSF and either TNF-alpha and/or IL-4. The addition of other growth factors such as SCF and Flt-3 ligand and CD 40 can dramatically enhance DC recovery. Thus, DC at different stages of maturation, based on phenotype and capacity to capture antigen, can be obtained depending on culture conditions. For clinical applications, DCs can be generated in serum-free media and cryopreserved for future clinical applications. In our first experiments two-stage culture system was used for CD34+ precursors and 15-fold increase in DC yield was observed after 12 days of cultivation. The ability to obtain DCs in numbers suitable for manipulating immune responses has pushed DC-based immunotherapies into the spotlight for treatment of various malignancies. Today is dendritic cell vaccination strategy one of the most frequent experimental therapies evaluated in the clinical setting, with promising results.

Key words: Dendritic Cells - Vaccination - Immunotherapy

Úvod

Studie zkoumající roli buněčné imunity v protinádorovém účinku se soustřeďují na rozpoznávání nádorových antigenů T-buňkami (1). Nádorová imunita a aktivace cytotoxických T-lymfocytů (CTL) úzce souvisí s prezentací nádorového antigenu ve spojení s antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (HLA). Aktivace CTL vyžaduje spolupráci mezi několika elementy intaktního imunitního systému. Zásadní roli v protinádorové imunitní odpovědi mají buňky předkládající antigen a efektorové buňky (CD4+ a CD8+ T- buňky). Dendritické buňky (DB) jsou unikátní podskupinou buněk předkládajících antigen, které hrají důležitou roli v rozvoji protinádorové buněčné odpovědi. DB jsou extrémně výkonné v zachycení, zpracování a předkládání antigenů T buňkám (2). Možnost získání velkého množství DB „ex vivo“ (3,4), zvýšila zájem o imunoterapeutické postupy založené na jejich užití v léčbě řady nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že DB mohou být derivovány jak z proliferujících tak neproliferujících prekurzorů v kulturách, užitím kombinace granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) s IL-4

v kombinaci s TNF alfa či bez něj (3,4). Přidání dalších cytokinů jako například Flt-3 ligandu, CD 40 a SCF může značně zvýšit počet DB množných in vitro (5). Dva odlišné prekurzory DB dávají vznik myeloidním nebo lymfoidním DB, které mají různou schopnost kontroly diferenciaci pomocných T-buněk (6).

V tomto článku diskutujeme obecné charakteristiky DB a následně metody jejich kultivace a expanze ex vivo z různých buněčných zdrojů pro užití v klinických studiích.

V současnosti je využití DB v léčbě různých nádorových onemocnění ověřováno řadou klinických studií u různých nádorových onemocnění. Preklinické výsledky i první výsledky klinických studií byly natolik povzbudivé, že zařadily tento typ experimentální terapie mezi nejperspektivnější postupy současnosti. Použití vakcín připravených z dendritických buněk je výjimečné i svojí obecnou použitelností pro všechna nádorová onemocnění, neboť jde o stimulaci vlastního imunitního systému organismu s cílem „naučit efektorové imunitní buňky rozpoznat nádor“. Podmínkou je přítomnost nádorového antigenu, což je v řadě případů limitací použití dendritických

buněk. Optimální nádorový antigen a jeho získání se staly velkým výzkumným tématem současnosti.

Charakteristika dendritických buněk

DB byly poprvé popsány Langerhansem v r. 1868. V roce 1973 je identifikoval Steinman jako slabě adhezní buněčnou populaci v myši slezině (7). Lidské intersticiální DB byly popsány později v r. 1981 (8). V lidské kostní dřeni byla identifikována malá fenotypicky odlišná podskupina hematopoetických progenitorů (CD34, Lin-, CD45RA, CD38, Thy-1, c-kit-), ze kterých vznikají T- buňky, B- buňky, NK buňky a DB. nedávají však vznik myeloidním a erytroidním buňkám (9). DB sídlí v lymfatických i nelymfatických tkáních a odlišují se funkcí i fenotypem v závislosti na stadiu jejich aktivace (10, 11, 12). Poznání, že jsou DB extrémně výkonné v prezentaci antigenů nezadaným T- buňkám, je zařadilo do centra zájmu jako významný typ antigen prezentujících buněk, jež jsou schopny vést k vyvolání tumor-antigen specifické cytotoxické odpovědi T- buněk. Ačkoliv jsou DB velice rozmanité v závislosti na stadiu jejich diferenciaci a aktivace, mají některé vlastnosti společné: a) schopnost stimulovat odpověď primárních T- buněk, b) spontánní a rychlé shlukování s T- buňkami, c) buněčný pohyb a schopnost migrace do míst výskytu T- buněk včetně lymfatických tkání (12), d) fagocytární aktivitu a navázání na antigeny pomocí receptorů a makropinocytózy (13), e) fenotyp odlišný od ostatních buněčných typů. Například kultivované dendritické buňky (aktivované a diferencované) neexprimují klasické markery T- buněk, B- buněk či monocytů a makrofágů (14), ale mají DB specifické molekuly (CMRF-44, CMRF-56, CD83, S100), stimulační molekuly (CD40, CD80, CD86), adhezní molekuly (CD11a, CD11c, CD44, CD50, CD54, CD58, CD102), společné leukocytární antigeny (CD45RA, CD45RO), HLA antigeny (HLA-ABC, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) a aktivací markery jako je CD 25. DB jsou dále odlišné od monocytů a makrofágů, jelikož nemají myeloperoxidasovou aktivitu a mají jen nízkou expresi 5-nukleotidázy, dipeptidyl-peptidázy, CD 26 a cathepsin B aktivity. Ačkoliv byly DB pojmenovány podle jejich zvláštní morfologie, není tato dostatečná k jejich odlišení od ostatních buněk jako jsou B- buňky a fibroblasty, které mohou vypadat velmi podobně (11).

Aktivační stav a migrační kapacita in vivo jsou základními vlastnostmi DB, které musí být zohledněny při zlepšování protinádorových vakcín a imunoterapeutických protokolů užívajících DB. DB progenitory vznikají v kostní dřeni a krevní cestou se dostávají do různých nelymfatických tkání, jako jsou například epidermis či plíce. DB migrují do jednotlivých tkání a v cirkulaci jsou přítomny v extrémně malých množstvích (0,1 % všech mononukleárních buněk periferní krve). DB izolované z krve a nelymfatických tkání jsou nazývány „nezralými“ a jsou velmi výkonné v zachycení a zpracování antigenů (15). Zánětlivé mediátory jako je TNFalfa, IL-1 a LPS indukují vyzrání DB a jejich migraci do míst výskytu T- buněk (parafolikulární oblasti) sekundárních lymfatických tkání (16). Vyzrání DB vede ke snížení schopnosti endocytózy antigenů a naopak zvyšuje množství adhezních a aktivujících molekul, potřebných k prezentaci peptid-HLA komplexů T buňkám (17). Pro účinnost DB je důležité to, zda si ponechají in vitro expandované DB schopnost migrace a schopnost nalezení místa výskytu T- buněk po zpětném přenosu do organismu. Nedávná studie Barratova-Boyesova a spol. zkoumala migrační kapacitu in vitro množených DB po adoptivním přenosu na šimpanzovi (18). Objeví, že fluorescenčně značené DB migrovaly po podkožní injekci do míst výskytu T- buněk v lymfatických uzlinách. V parafolikulárních zónách obklopujících folikuly B- buněk zůstávaly DB po dobu 5 dnů a vyvolaly expresi velkého počtu molekul CD86, CD40 a HLA II. třídy. Naopak nebylo možno pozorovat DB v lymfatických uzlinách po intravenózní injekci (18). Tato data společně s výsledky pozorování

užívajících myši modely (19, 20) dokazují, že cesta podání hraje zásadní roli v usídlování in vitro množených DB.

Kultivace dendritických buněk in vitro

Byla popsána řada protokolů kultivace lidských DB in vitro, užívajících různé buněčné zdroje jako například kostní dřeň (21, 22, 23), pupečnickovou krev (22, 24, 25), periferní progenitorové (kmenové) buňky (26 - 30) a mononukleární buňky periferní krve (3, 4, 31 - 33). Z CD 34 + progenitorových buněk vznikají dva různé typy DB prekurzorů lišící se expresí CD1 a CD14. CD1a +, CD 14- podtyp se diferencují v kulturách do epidermálních DB, zatímco CD1a-, CD14 + podtyp produkuje makrofágy nebo intersticiálně-dermální DB, což závisí na stimulačních podmínkách (10, 34). Lidské CD14 + monocytů mohou být také užity jako výchozí populace a diferencují se v DB za příslušných stimulačních podmínek (34). Jak je patrné z tabulky 1, byly popsány různé protokoly kultivace DB za různých stimulačních podmínek užívajících buňky získané z anatomicky různých tkání.

Tab. 1. Podmínky pro kultivaci dendritických buněk z různých buněčných zdrojů

Buněčný zdroj	Podmínky kultivace	Medium/Aditivum	Reference
Kostní dřeň	SCF, GM-CSF, TNF α SCF, GM-CSF, TNF α	IMDM IMDM/20% FTS	Saraya et al ²² Szabolet et al ²³
Pupečnicková krev	SCF, GM-CSF, TNF α	IMDM	Saraya et al ²²
PRSC	GM-CSF, TNF α SCF, GM-CSF, IL-4, IL-3, IL-6	RPMI/10% FTS RPMI/10% FTS	Bernhard et al ²⁶ Herbst et al ²⁷
MBPK	GM-CSF, IL-4 GM-CSF, IL-4, TNF α GM-CSF, IL-4, MCM	RPMI/10% FCS RPMI/10% FCS RPMI/1% plasma	Sallusto et al ¹³ Zhou et al ¹⁶ Bender et al ¹

PRSC-periferní kmenové buňky; MBPK-mononukleární buňky periferní krve
IMDM, RPMI - kultivační média

Také podmínky kultivace DB se značně různí, růstový faktor GM-CSF se však jeví pro expanzi dendritických buněk jako nutný, bez ohledu na typ výchozí buněčné populace. GM-CSF indukuje expanzi DB progenitorů (35), jejich diferenciaci a přežití po dobu delší než šest týdnů (32). Ke kultivaci DB je společně s GM-CSF užíván často IL-4, obzvláště když jsou buněčným zdrojem neadherentní mononukleární buňky a monocytů periferní krve. IL-4 inhibuje růst populace makrofágů a indukuje růst a vyzrání DB (35).

Jestliže je užito kostní dřene či pupečnickové krve (CD34+ progenitorové buňky), je ke kultivaci DB společně s GM-CSF namísto IL-4 užíván často i TNFalfa (30, 35, 36). TNFalfa pravděpodobně působí redukcí granulocytární produkce a zvyšuje expresi beta řetězců receptoru GM-CSF na progenitorových buňkách, čímž zvyšuje jejich odpověď na cytokiny (25, 37). Chen a spol. zkoumali roli TNF alfa v kultivaci DB z periferní krve v bezsérových médiích a objevili, že přidání TNF alfa ke kulturám v 7. dni vede ke zdvojnásobení populace DB a znatelně tak zvyšuje kapacitu buněk prezentujících solubilní antigeny T- buňkám (38).

Z dalších cytokinů je užíváno kombinace IL-3 a TNF alfa (24), CD40 ligand (CD40L) (39), IL-13 (28), stem cell faktor (SCF) (23, 40), TGF beta (41), Flt-3 ligand (42). Užití kontinuálního průtokového perfuzního systému ještě dále zvyšuje expanzi DB z CD 34 + buněk při kultivaci s výše uvedenými cytokiny (43). K urychlení diferenciaci DB je užíván IL-10. Tato skutečnost může být důležitá v léčbě autoimunitních a alergických onemocnění (44). Jiná strategie kultivace DB zahrnuje stupňový systém, který dovoluje buňky vystavovat působení různých cytokinů v různých časových obdobích během kultivace. Ye a spol. kultivovali CD34+ buňky kostní dřene po dobu 5 dnů s GM-CSF, SCF a TNFalfa a následně s výměnou CD40L za TNFalfa po dobu dalších 5 dnů ke zvýšení počtu DB (45).

Výchozí populace, výběr cytokinů a podmínky kultivace značně ovlivňují počet, fenotyp a funkci DB. Vzhledem k rozdílu ve schopnosti endocytózy, zpracování a prezentaci antigenu, závislé na stupni jejich diferenciaci, jsou DB extrémně heterogenní skupinou. Tato skutečnost hraje velmi významnou roli v užití DB jako imunoterapie u pacientu s nádorovým onemocněním. Navíc byla nedávnými studiemi zjištěna existence dvou různých podtypů DB, které se liší schopností různé stimulace pomocných T-lymfocytů v imunitní odpovědi (6). Jeden podtyp je derivován z monocytů periferní krve a vede k vyžívání myeloidních DB (nazývaných DB1), za přítomnosti GM-CSF a IL-4 (17). Druhý podtyp je derivován z plasmocytoidních buněk CD4+, CD3- a CD11c- krve či buněk tonsilárních a pokud je kultivován s IL-3 dává vznik lymfoidním DB (označovaným jako DB2) (15). DB1 indukují diferenciaci T-pomocných lymfocytů (CD4+), které se diferencují v subpopulaci TH 1 buněk, zatímco DB2 mohou indukovat diferenciaci v buňky TH 2 (6). Toto může vést ke zcela odlišné odpovědi na antigen.

Zralé či terminálně diferencované DB mají velkou stimulační aktivitu a jsou nejsilnějšími induktory odpovědi nezadaných T-buněk (4, 11). Zralé DB mohou být identifikovány fenotypicky díky expresi CD83 antigenu (4, 11). Jak TNFalfa tak LPS či CD40L mohou být užity k indukci diferenciaci DB při použití mononukleárních buněk periferní krve kultivovaných s GM-CSF a IL4 v mediích obsahujících 10 % fetálního telecího séra (FTS) (46). CD40 hraje také pravděpodobně zásadní roli ve vyžívání DB in situ, jelikož interakce s CD40 vede k produkci vysokých hladin IL-12 dendritickými buňkami a zvyšuje tak stimulační aktivitu T-buněk (47). Tyto skutečnosti ukazují, že optimální vyžívání DB je složitý proces zahrnující množství růstových faktorů s vzájemnými složitými vazbami, které doposud neznáme.

Kultivace dendritických buněk pro klinické užití

Buněčné zdroje a výtěžek DB: Periferní krev může být odebrána v dosti velkém množství k získání dostatečného počtu DC pro klinické užití. Jelikož je však počet DB prekurzorů v periferní krvi relativně velmi malý (36), byla vyvinuta řada procedur pozitivní či negativní selekce, které zvyšují počet CD34+, CD34- nebo CD14+ DB prekurzorů před in vitro stimulací, využívajících rozdílných densních gradientů (12). Alternativní cestou je přímá izolace prekurzorových buněk pozitivní selekcí za použití protilátek, které rozpoznávají antigen CD34 či CD 14. Pozitivní selekce CD34 buněk byla užita i při získávání DB ze vzorků kostní dřeně. Bohužel jsou tyto techniky velice pracné a nákladné pro klinické využití. Výtěžek DB z mononukleárních buněk periferní krve může být zvýšen šest až třicetkrát při užití G-CSF nebo Flt-3 ligandu (4, 5). Produkty leukaferezý z pacientů po protinádorové léčbě obsahují více CD34+ buněk a mohou být tedy užity k získání většího počtu DB v kultuře (mobilizované mononukleární buňky periferní krve - MBPK - tab.2).

Zjednodušený způsob navýšení DB prekurzorů zahrnuje selekci adherujících buněk odstraněním neadherujících buněk po

Tab. 2. Výnos dendritických buněk z prekurzorů periferní krve a kostní dřeně

Buněčný zdroj	Množství výchozího materiálu	Množství DB	Poměr DB k výchozím buňkám	Reference
MBPK (E-rosette neg)	40 ml. krve	1,5 - 3,8 x 10 ⁶	74 - 96%	Bender et al ¹
MBPK (CD3 ⁺ , DR ⁺)	40 ml. krve	4 - 8 x 10 ⁶	60 - 80%	Romani ³⁵
MBPK (CD2 ⁺ , CD19 ⁻)	40 ml. krve	0,8 - 3,3 x 10 ⁶	30 - 80%	Romani ³
MBPK (CD14 ⁺)	100 ml. krve	1,2 - 1,5 x 10 ⁷	70%	Herbst et al ²⁷
Mobilizované MBPK (leukafereza)	2 x 10 ⁵ CD34+	8 x 10 ⁶	40-x vyšší	Siena et al ³⁶
Kostní dřeň (CD34 ⁺)	1 ml.	1,7 x 10 ⁶	75 x vyšší	Szaboies et al ²⁵

MBPK - mononukleární buňky periferní krve

Tab. 3. Výsledky kultivace dendritických buněk u nemocných s mnohočetným myelomem s využitím autologního štěpu jako zdroje DB

Parametr	hod +2	den +7	den +12
CD 11 c	55,7 (51,2-58)	31,9 (30,4 - 32,7)	67,7 (59,4-73,6)
CD 50+	88,2 (84,2-96,4)	73,7 (66,2 - 83,7)	69,0 (51,6 - 85,6)
CD 54+	17,6 (14,2-19,3)	44,4 (32,3 - 66,3)	74,6 (66,9-86,2)
CD 80+	2,5 (2,1 - 3,2)	27,1 (22,3 - 33,7)	64,4 (51,0-83,5)
CD 86+	4,7 (3,9 - 5,2)	28,4 (25,9-29,8)	63,9 (47,7-86,2)
CD 83+	3,7 (2,6-4,3)	27,0 (26,7 - 27,4)	61,2 (48,7-79,2)
HLA DR+	36,0 (21,8-43,1)	56,3 (28,0 - 72,0)	71,5 (69,8-73,8)

Přibližné hodnocení expanze a aktivace DB (průměry ze 3 pokusu)

dvou hodinách kultivace. Kultivaci adherujících buněk v GM-CSF a IL-4 může být získáno 3-8x10⁶ DB ze 40 ml krve (35). Tato metoda je jednoduchá svým provedením a může být užita k získání velkého množství DB, problémem je jen obtížnost standardizace odstranění neadherujících buněk a také kontaminace lymfocyty. Dle našich zkušeností je tato metoda získání DB buněk z PBSC dostatečná k získání adekvátního počtu DB pro klinické studie.

Výběr media: k růstu lidských DB byla zkoušena různá media jako např. RPMI-1640, AIM-V, X-VIVO 10/15/20, Hybricare a Iscovo. Bylo testováno i lidské sérum a plasma namísto fetálního telecího séra (FTS) pro vyloučení možnosti prezentace xenogenních antigenů DB. I když media X-VIVO 20 a AIM-V s obsahem 1 % autologní plasmy mohou být užita ke vzniku a vyžívání DB z periferní krve, užití RPMI-1640 vede k získání většího množství DB (3, 4). Největší výnos DB byl získán použitím RPMI-1640 s dodatkem 10 % FTS. Kultivace DB v neséroových mediích je dostatečná, i když přidání FTS vede k výnosu většímu (3). Pokud je to možné, měly by být v klinických studiích zvířecí séra při kultivaci DB vynechána, abychom předešli nechtěným imunitním reakcím proti cizorodým proteinům.

Zamrazení DB a jejich prekurzorů: DB mohou být získány z mononukleárních buněk periferní krve v dimethyl sulfoxidu (DMSO) obsahujícím buď humánní sérový albumin nebo FTS (4, 48). Stimulovaná krev obohacená o CD34+ buňky i mononukleární buňky izolované z plné krve (rutinní odběr krve) mohou být zmrazeny a později užity ke kultivaci DB. Makino a Baba srovnávali užití rozmrazených a čerstvých mononukleárních buněk periferní krve od stejných dárců, výsledky byly podobné (4, 48). Optimální je zřejmě zamrazení prekurzorů DB s 12 % dimethylsulfoxidem obsahujícím 2-30 % FTS (48). Přestože jsou DB velmi citlivé ke zmrazovacím a rozpouštěcím procedurám, dochází při nich k minimální ztrátě normální životaschopnosti buněk, která je větší než 90 % (48).

Presentace antigenu a aktivace lymfocytů T: Jak jsme se již zmínili, nezralé DB jsou extrémně výkonné v zachycení antigenů různými mechanismy zahrnujícími fagocytózu částic a mikrobů, extracelulární makropinocytósu, a receptory řízenou endocytózu zahrnující lektin a Fc receptor imunoglobulinu (13). Nezralé DB jsou bohaté na endosomální struktury obsahující velké množství molekul HLA třídy II, které vážou adekvátní peptidy. Tyto komplexy se pak dostávají na buněčnou membránu, kde zůstávají několik dnů. Odhaduje se, že jen několik stovek těchto komplexů v milionu povrchových molekul na DB je schopno vyvolat odpověď T-buněk (49). Nezralé DB potřebují pravděpodobně jen velmi krátkou expozici antigenu in vitro, aby byly schopny stimulace antigen-specifické T-buněčné odpovědi. Tento fakt je také podporován studiemi zkoumajícími zachycení FITC-značených IgG a IgA idiotypových (Id) proteinů dendritickými buňkami, jejichž výsledky ukazují, že DB jsou schopny zachycení přibližně 2x10⁵ molekul Id-proteinů v jedné hodině (*Butch a spol., nepublikovaná data*). Studie prováděné na myších modelech

ukazují, že *in vivo* nádorem aktivovaná imunitní odpověď může být vyvolána smísením DB s peptidy, lysáty nádorových buněk nebo izolovanými částmi membrán (11). Nádorově specifické cytotoxické T-buněčné odpovědi byly vyvolány také prostým přenosem DB na myši nemocné nádorem, i když výraznější odpověď byla pozorována při přenosu DB po aktivaci nádorovými antigeny (49). Zitvogel a spol. demonstrovali, že DB secernují antigen prezentující měchýřky, nazývané exosomy, které jsou derivovány z endosomů obsahujících antigenní peptidy vázané na molekuly (glykoproteiny) HLA I a II. Adoptivní transfer exosomů izolovaných z kultur DB indukovaných nádorovými peptidy vedl ke kompletní regresi či redukci růstu několika myších tumorů *in vivo* (50).

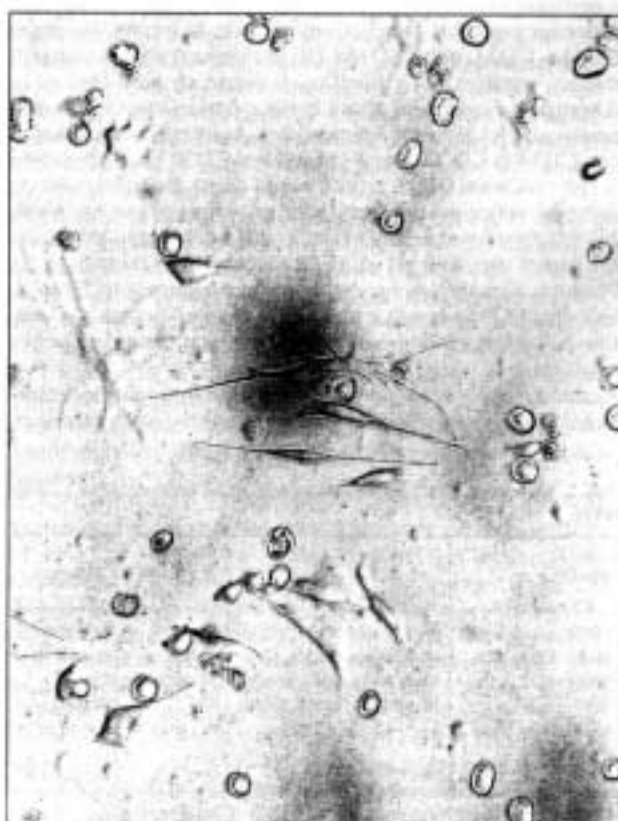
DB vakcinace: Optimální cesta podání dendritických buněk s antigenním materiálem pacientům s nádorovým onemocněním je stále nejasná. Cílem je podání DB do těla cestou, která dovolí jejich usídlení v místě nádorových buněk. Optimální cesta podání může být závislá i na typu nádorového onemocnění. Pro solidní tumory je patrně nejvýhodnější vakcinace podkožní cestou, jak ukazuje nedávná studie demonstrující, že po podkožní aplikaci DB šimpanzům jsou tyto lokalizovány v regionálních lymfatických uzlinách (18). Stejně nejasná je optimální cesta pro metastatický proces a hematologické malignity. V současnosti je pro hematologické malignity užívána k podání DB cesta intravenózní a subkutánní (51). Jiná skutečnost, která může mít vliv na lokalizaci DB *in vivo*, je exprese různých povrchových molekul ovlivňujících tkáňové interakce, jako například integrinů, ICAM1, ICAM2, CD31, CD44 a CD68 (11).

Také nezbytný počet DB, které mají být podány, aby vyvolaly potřebnou odpověď T-buněk *in vivo* je nejasný. Ve smíšených lymfocytárních kulturách mohou DB vyvolávat proliferaci alogenních T-buněk ve velmi malém poměru (2). V klinických studiích opakovaně zvyšující se dávky DB z 1×10^6 do 3×10^7 podávané intravenózně, subkutánně nebo přímo do nepozižených lymfatických uzlin, nevyvolávaly žádné nežádoucí účinky (51).

Dalším důležitým faktorem při užívání vakcinačních protokolů je, že interakce mezi DB a T-buňkami jsou obousměrné a mohou být ovlivňovány faktory mikroprostředí, ve kterém se buňky setkávají. Bylo pozorováno, že DB z různých tkání indukují T-buňky produkující různé cytokiny, které mohou vést k odlišnostem ve vyžívání DB. Byla prokázána produkce IL-12 dendritickými buňkami, cytokinu, který je důležitý pro vznik pomocných T-lymfocytů a následnou produkci Th1 cytokinů, jako například IFN gama. V závislosti na podmínkách mikroprostředí tak mohou DB stimulovat určité subtypy T-buněk, sloužící k různým typům imunitní odpovědi, pravděpodobně včetně vzniku tolerance (52).

Vlastní zkušenosti s kultivací a přípravou dendritických buněk jsou limitované a jsou založeny na spolupráci s výzkumníky s Little Rocku (53). Příprava protokolu pro klinické použití u mnohočetného myelomu je ve fázi preklinických experimentů probíhajících ve spolupráci Oddělení klinické hematologie a Interní hematologické kliniky FN Brno. Ve vstupních experimentech jsme použili část autologního štěpu po stimulaci G-CSF, který byl po rozmražení a promytí kultivován podle základního dvoukrokového systému kultur (GM-CSF + IL4 + Flt3 den 1-6; GM-CSF + TNF alfa den 7-12) s následným morfologickým a flowcytometrickým hodnocením. Vývoj sledovaných znaků ze tří reprezentativních pokusů je obsahem tabulky. Velikost výchozí buněčné populace CD 34+ byla přibližně $97,5 \times 10^6$ CD34+/ml. Koncentrace použitých cytokinů byly následující: GM-CSF 800 U/ml, IL-4 50 ng/ml, TNF-alfa 40 ng/ml a FLT 3 25 ng/ml. Expanze DB (15x) byla hodnocena pomocí specifického znaku CD83+ [z 3,7 % (2,6 - 4,3 %) na 61 % (48,2 - 79,2 %)], s korelujícím vzestupem dalších znaků: antigenů HLA-DR, markerů kostimulačních molekul (CD80, CD86) a adhezivních molekul (CD54, CD11c). Na obrázku 1 jsou zralé DB charakteristické morfologie (zvětšení 200x). Tyto experimenty ověřili možnosti a podmínky kultivace a expanze DB v našich laboratorních podmínkách. Preklinické testování pokračuje. Cílem

Obr. 1. Zralé dendritické buňky s charakteristickou morfologií (zvětšení 200x)



je příprava klinického protokolu s podáním DB nemocným s mnohočetným myelomem (54).

Závěr

Z našich znalostí o DB vyplývá, že se jedná o extrémně různorodé buňky. Pro klinické užití lze DB získat z různých zdrojů zahrnujících kostní dřeň, pupečnickovou a periferní krev. Ke kultivaci je užíváno řady cytokinů a růstových faktorů, které mohou významně zvýšit výsledný počet DB. Jejich podání zesiluje T-buněčnou odpověď proti různým patogenům a především nádorovým antigenům. Využití DB ve formě vakcín je novou možností při léčbě řady nevléčitelných nádorových onemocnění (55). Rozbor účinnosti experimentální imunoterapie využívající DB u jednotlivých nádorových onemocnění nebyl předmětem tohoto sdělení. V této době jsou

dendritické buňky zkoumány v klinických studiích fáze I/II u řady nádorových onemocnění. První zkušenosti s využitím vakcinace DB ukazují, že je pozorována léčebná odpověď u části nemocných. Na dlouhodobé výsledky a podrobné zhodnocení této perspektivní léčebné metody budeme několik let ještě počkat.

(Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 6152, GAČR 301/00/0405, IGF 4/99, MŠMT VZ J07/98-141100003, MŠMT J07/98-6700008 a výzkumným záměrem MZ ČR 0065269705)

Poděkování: Děkujeme prof. MUDr. Jindřichovi Lokajovi, CSC., z Ústavu klinické imunologie a alergologie FN USA, za užitečnou diskusi při sepsání této práce.

Literatura:

1. Österborg A, Masucci M, Bergenbrant S, Holm G, Lefvert AK, et al. Generation of T cell clones binding F(ab')₂ fragments of the idiotypic immunoglobulin in patients with monoclonal gammopathy. *Cancer Immunol Immunotherapy* 1991; **34**: 157-162.
2. Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996; **24**: 859-862.
3. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 121-135.
4. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 137-151.
5. Maraskovsky E, Roux E, Yeepe M et al. Dramatic increase in the numbers of dendritic cells in the peripheral blood of healthy volunteers treated with Flt3L. *Proceedings of 13th Eur Immunol Meeting* 1997: Amsterdam (ed H Wagner et al) Elsevier 202.
6. Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki A, Grouard G, Briere F, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**: 1183-1186.
7. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 1973; **137**: 1142-1161.
8. Hart DNJ, Newton MR, Reece-Smith H, Fabre JW, Ting A, et al. Localization of HLA-ABC and DR antigens in human kidney. *Transplantation* 1981; **31**: 428-433.
9. Galy A, Morel F, Hill B, Chen BP. Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells. *J Immunotherapy* 1998; **21**: 132-141.
10. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; **90**: 1458-1470.
11. Hart DNJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; **90**: 3245-3287.
12. Williams LA, Egener W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol* 1994; **153**: 41-103.
13. Sallusto F, Cella M, Daniel 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.
14. Melichar B, Savary C, Kudelka A P, Verschraegen C, Kavanagh J. Lineage-negative human leukocyte antigen-DR+ cells with the phenotype of undifferentiated dendritic cells in patients with carcinoma of the abdomen and pelvis. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 799-809.
15. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; **82**: 487-493.
16. Austyn JM, Larsen CP. Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 1990; **49**: 1-7.
17. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-252.
18. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* 1997; **158**: 4543-4547.
19. Fossus S. Lymph-borne dendritic leucocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become interdigitating cells. *Scand J Immunol* 1988; **27**: 97-105.
20. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988; **167**: 632-645.
21. Lardon F, Snoeck HW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, et al. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology* 1997; **91**: 553-559.
22. Saraya K, Reid CD. Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood. *Brit J Haematol* 1996; **93**: 258-264.
23. Szaboles P, Moore MA, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* 1995; **154**: 5851-5861.
24. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I, Banchereau J, et al. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**: 2376-2385.
25. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; **184**: 695-706.
26. Bernhard H, Disis M L, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, et al. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995; **55**: 1099-1104.
27. Herbst B, Kohler G, Mackensen A, Veelken H, Mertelsmann R, et al. CD34+ peripheral blood progenitor cell and monocyte derived dendritic cells: a comparative analysis. *Brit J Haematol* 1997; **99**: 490-499.
28. Lopez M, Amorim L, Gane P, Cristoph A, Bardin D, et al. IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J Immunol Methods* 1997; **208**: 117-129.
29. Mackensen A, Herbst B, Kohler G, Wolff-Vorbeck G, Rosenthal FM, et al. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood* 1995; **86**: 2699-2707.
30. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**: 1292-1302.
31. Fearley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DN. Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* 1997; **89**: 3708-3716.
32. Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 1990; **85**: 955-961.
33. Pfeiffer S, Apperley JF, Goldschmidt H, Gooding RP. Ex vivo generation and function of dendritic cells in multiple myeloma. *Biochem Soc Transactions* 1997; **25**: 364.
34. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 431-441.
35. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; **180**: 83-93.
36. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; **360**: 258-261.
37. Santiago-Schwarz F, Divaris N, Kay C, Carsons SE. Mechanisms of tumor necrosis factor-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced dendritic cell development. *Blood* 1993; **82**: 3019-3028.
38. Chen BG, Shi Y, Smith JD, Geiger DCh, Mule JJ, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood* 1998; **91**: 4652-4661.
39. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R et al. Generation of human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; **92**, 11: 4238-4247.
40. Young JW, Szaboles P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that

- are expanded by c-kit ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995; **182**: 1111-1119.
41. Strobl H, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996; **157**: 1499-1507.
 42. Maraskovsky E, Roux E, Tepee M, McKenna HJ, Brasel K et al. The effect of Flt3 ligand and/or c-kit ligand on the generation of dendritic cells from human CD34+ bone marrow. *Blood* 1996 **88**(Suppl):159(abstr).
 43. Soligo D, Deliliers GL, Servida F, Caneva L, Lamorte G, et al. Expansion of dendritic cells derived from human CD34+ cells in static and continuous perfusion cultures. *Brit J Haematol* 1998; **101**: 352-363.
 44. Steinbrink K, Woitl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; **159**: 4772-4780.
 45. Ye Z, Gee AP, Bowers WE, Lamb LS, Turner MW, et al. In vitro expansion and characterization of dendritic cells derived from human bone marrow CD34+ cells. *Bone Marrow Transplantation* 1996; **18**: 997-1008.
 46. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; **93**: 2588-2592.
 47. Mackey MF, Gunn JR, Maliszewski Ch, Kikutani H., Noelle RJ, et al. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 1998; **161**: 2094-2098.
 48. Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol* 1997; **45**: 618-622.
 49. Yang S, Darrow TL, Vervaert CE, Seigler HF. Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow. *Cellular Immunol* 1997; **179** 84-95.
 50. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; **4**: 594-600.
 51. Bohlen H, Titzer S, Christensen O, Manzke O. Dendritic cell based idiotype vaccination in multiple myeloma. *Blood* 1997; **90** (Suppl): 579 (abstr).
 52. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 659-668.
 53. Hájek R. Butch: Dendritic Cell Biology and the Application of Dendritic Cells to Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Medical Oncology* 2000, **17**, 2-15.
 54. Hájek R, Bourková L, Bulíková A, Vidláková P, IMareschová I et al.: Kultivace, aktivace a expanze dendritických buněk u mnohočetného myelomu. XII. český a transfuziologický sjezd s mezinárodní účastí. Olomouc 1999, abstr. 113.
 55. Bubenik J. Dendritic-cell-based cancer vaccines. *Folia Biol* 1999; **45** (3): 71-74
 56. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 1995; **23**: 1465-1473.

knihy

VÝŽIVA V ONKOLOGII.

Z. WILHELM A KOL.

Faktory výživy byly dosud v klinické onkologii zmiňovány spíše v souvislosti s kancerogenezou, mnohdy jako velmi obecná doporučení nebo jen se zaměřením na jednotlivosti (vláknina, tuk) bez vysvětlení hlubších souvislostí. Na výživu onkologicky nemocných je pak nezdědká pohlíženo jako na oblast periferního významu, přestože je kvantitativně zřejmě jedním z nejpodstatnějších faktorů celé podpůrné léčby a péče nemocné s nádory. V průběhu onkologické léčby a s progresí onkologického onemocnění také dochází ke změnám potřeb, tolerance a požadavků na výživu a substituci jejich jednotlivých složek, ať již v enterálním či přechodně parenterálním podání. Tato doporučení by mohlo být zavádějící podávat odtržně jen s ohledem na stav nebo diagnózu a bez kontextu s celým komplexem patofyziologických souvislostí. Onkologům a všem lékařům pečujícím o onkologicky nemocné se dostává do rukou stručná, a přitom velmi obsažná monografie kolektivu předních odborníků na výživu vedeného Z. Wilhelmem, která nesporně vyplní dosavadní mezeru moderně uspořádaných poznatků o výživě v souvislosti s nádorovými chodobami. V třinácti kapitolách je na 160 stranách pojednáno o fyziologii metabolismu substrátů a energetických zdrojů a změnách

navozených onkologickým onemocněním. Pozornost je dále věnována vyšetření nutričního stavu a stanovení energetické potřeby. Speciální problematiku představují malnutriční komplikace chemoterapie, radioterapie i důsledky nádorové kachexie. Obsáhlé kapitoly jsou věnovány zvláště enterální a parenterální výživě s ohledem na jednotlivé onkologické diagnózy a situace a zíměny jsou také zásady předoperační nutriční přípravy onkologicky nemocných. V souhrnu jsou základní poznatky uvedeny v kapitole o algoritmech nutriční péče. Zvláštní kapitoly jsou věnovány také nutričním antikancerogenům a významu vlákniny ve stravě. Monografii účelně doplňuje přehled referenčních hodnot laboratorních vyšetření. Brožované vydání práce Institutem pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně splňuje veškeré nároky také estetickým dojmem a přehledností zpracování. Útlou knížku Z. Wilhelma a kolektivu Výživa v onkologii lze doporučit jako pracovní příručku do knihovny každého onkologa a lékaře přicházejícího do styku s onkologickými pacienty, je srozumitelná také pro sestry a studující lékařství, vhodná pro specializované postgraduální kurzy. Lze bez pochyb očekávat, že velmi pozitivně ovlivní poněkud zanedbávaný stav informovanosti na tomto poli a posílí zájem o nutriční aspekty onkologické péče.

Jan Žaloudík