

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Postgraduální doktorské studium biomediciny

Obor: Biofyzika

Imunomodulační účinky hypertermie v léčbě nádorů

Dizertační práce

MUDr. Jiří Kubeš

Pracoviště: Ústav radiční onkologie Fakultní Nemocnice Bulovka

Školitel: Doc. MUDr. Jozef Rosina

Praha 2007

Abstrakt

Disertační práce „Imunomodulační účinky hypertermie v léčbě nádorů“ se obecně zabývá využitím termoterapie jako slibně se rozvíjející metody léčby nádorových onemocnění. První část práce se zabývá hypertermií obecně a popisuje fyzikální principy ohřevu, společně s technikami používanými při klinickém provádění hypertermie, jejími základními mechanismy účinku a klinickými indikacemi a výsledky. Druhá část je věnována stručnému přehledu mechanismů protinádorové imunitní reakce, s důrazem na problematiku antigenicity nádorových buněk a efektorových buněk protinádorové imunity.

Významná část práce se zabývá vlivem hypertermie na imunologickou odpověď. Je uveden přehled dosavadních znalostí pocházejících z pokusů in vitro a klinických aplikací celotělové hypertermie. Současné hypotézy předpokládají zvýšení antigenicity nádorových buněk s následnou stimulací NK (natural killer) buněk a dendritických buněk (DC). Aktivované DC stimulují tvorbu protinádorových specifických cytotoxických T-lymfocytů (CTL). Dosud však nebylo jasné, k jakým změnám dochází po lokálním ohřevu nádorového ložiska in vivo. Ve vlastním experimentu jsme na myším modelu maligního melanomu hodnotili aktivaci imunitního systému po lokální hypertermii implantovaného nádoru. Tyto pokusy prokázaly zvýšenou aktivaci buněk prezentujících antigen v nádoru po hypertermii, zvýšení počtu CTL a NK buněk ve slezinách pokusných zvířat, které bylo provázeno zvýšením jejich cytotoxické aktivity proti buňkám primárního nádoru v pokusech in vitro. Pokusy in vitro prokázali, že hypertermie stimuluje aktivitu CTL pouze při jejich předchozím kontaktu s nádorovými buňkami. Konečným výsledkem je průkaz systémové aktivace imunitního systému po lokální hypertermii nádorového ložiska.

Abstract

The dissertation thesis „Immunomodulation effects of the hyperthermia in cancer treatment“ relates on the hyperthermia as evolving method of the cancer treatment. The first part describes hyperthermia in general, especially physical principles of the heating, the equipment necessary for clinical practice of the hyperthermia, basic effects in biological tissues, clinical indications and results. The second part is brief review of mechanisms antitumor immunological response, with emphasis on antigenicity of tumor cells and effector cells in antitumor response.

The main part of the thesis relates to effects of hyperthermia on immunological response. Previous results from experiments in vitro and clinical applications of whole-body hyperthermia are described. Current hypothesis suggests, that hyperthermia enhances the antigenicity of tumor cells with consequent stimulation NK (natural killer)-cells and dendritic cells (DC). Activated DC stimulate production cytotoxic T-cells (CTL) with antitumor specificity. Changes in immunological response after local hyperthermia of tumors were not investigated until now. We investigated the activation of the immune system after local microwave hyperthermia of implanted tumors on the mouse melanoma model. These experiments demonstrated, that hyperthermia enhanced activation of antigen presenting cells in the tumor, increased the number of CTL and NK cells in the spleen of experimental animals, and increased cytotoxic activity of these cells against cells from primary tumor in vitro. Experiments in vitro demonstrated, that hyperthermia stimulated the activity of CTL only after previous contact these cells with tumor cells. In summary, we demonstrated the activation of the immune system after local hyperthermia of implanted tumors.

Poděkování

Disertační práce by v této podobě nevznikla, nebýt pomoci školitele, kolegů a přátel z Ústavu radiační onkologie FN Bulovka, 3. LF UK, Mikrobiologického ústavu AV ČR a katedry elektromagnetického pole FEL ČVUT.

Jmenovitě bych na tomto místě poděkoval:

Doc. MUDr. Jozefu Rosinovi za cenné podněty při volbě tématu a provedení pokusů;

MUDr. Anně Fišerové, PhD., za laboratorní zpracování výsledků a pomoc při jejich interpretaci;

MUDr. Miroslavu Starcovi, CSc., za pomoc při zpracování a prezentaci dat;

MUDr. Ing. Jakubu Cvekovi, PhD, za pomoc s přípravou hypertermické soupravy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci „**Imunomodulační účinky hypertermie v léčbě nádorů**“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém v disertační práci.

Nemám námitky proti půjčování, zveřejnění a dalšímu využití práce, pokud s tím bude souhlasit 3.LF UK.

Obsah.....	6
1. Úvod.....	8
2. Hypertermie.....	9
2.1. Typy hypertermie.....	10
2.2. Technické principy ohřevu.....	13
2.3. Termometrie.....	14
2.4. Mechanismy účinku hypertermie.....	14
2.4.1. Teplo a mikrocirkulace.....	15
2.4.2. Teplo a oxygenace tkání.....	16
2.4.3. Metabolické účinky hypertermie.....	16
2.4.4. Proteiny a jejich struktura.....	18
2.4.5. Kritické struktury – buněčné jádro.....	18
2.5. Klinické použití hypertermie.....	20
2.5.1. Kombinace hypertermie s radioterapií.....	20
2.5.2. Kombinace hypertermie s chemoterapií.....	20
2.5.3. Indikace hypertermie.....	20
3. Imunitní systém a nádorová onemocnění.....	22
3.1. Antigeny asociované s nádory (tumor associated antigens – TAA).....	22
3.2. Poruchy prezentace antigenů v nádorech.....	24
3.3. Buňky prezentující antigen.....	24
3.4. Úloha T-lymfocytů v rozpoznání nádoru.....	25
3.5. Funkce zralých protinádorových T-lymfocytů.....	25
3.6. Protinádorová imunitní reakce – shrnutí.....	26
4. Hypertermie a imunitní reakce.....	27
4.1. Ovlivnění imunitního systému in vitro.....	28
4.2. Celotělová hypertermie (WBH).....	30
4.3. Regionální hypertermie a ovlivnění imunitního systému.....	31
5. Imunologická odpověď na lokální mikrovlnou hypertermii	
 v myším melanomovém modelu.....	32
5.1. Materiál a metody.....	33
5.1.1. Pokusná zvířata.....	33
5.1.2. Hypertermie.....	33
5.1.3. Izolace buněk z myší sleziny (SC) a leukocytů infiltrujících nádor (TIL).....	35

5.1.4.. Buněčné kultury a pokusy in vitro.....	35
5.1.5. Průtoková cytometrie.....	35
5.1.6.. Testy cytotoxicity	36
5.1.7. Statistická analýza.....	37
5.2. Výsledky.....	37
5.2.1. Lokální hypertermie vyvolává změny v mikroprostředí nádoru.....	37
5.2.2. Membránová exprese Hsp70 v nádorové tkáni.....	38
5.2.3. Efekt lokální hypertermie na distribuci imunitních buněk ve slezině.....	39
5.2.4. Testy cytotoxicity	39
5.2.5. Přímý účinek tepla na melanomové nebo efektorové buňky in vitro.....	40
5.3. Diskuse.....	42
6. Závěr.....	44
Literatura.....	45

1. Úvod

Nádorová onemocnění představují v rozvinutých zemích významný zdravotnický a socioekonomický problém. V roce 2004 onemocnělo zhoubným nádorem v ČR 68 600 obyvatel. Incidence činila 387 případů na 100 000 obyvatel, což znamená mírný vzestup oproti roku 2003. Mortalita na nádorová onemocnění stagnuje u žen (113 na 100 000 obyvatel) a velmi slabě klesá u mužů (206 na 100 000 obyvatel). Léčba těchto onemocnění v současnosti spočívá ve využití chirurgických přístupů, radioterapie a chemoterapie. Přes nesporné pokroky, kterých bylo v jednotlivých modalitách protinádorové léčby dosaženo, odráží stagnace léčebných výsledků omezení současné terapie. Jednou z cest ke zlepšení péče o pacienty s nádorovým onemocněním je vývoj nových metod léčby, které účinkují na zcela odlišných principech. Takovou metodou je hypertermie (ohřev tkání na teploty 40 - 44 °C) a předkládaná práce popisuje současný stav technického vybavení, znalostí o mechanismech účinku a klinických zkušenostech s touto metodou.

Jedním z diskutovaných témat v onkologii je úloha imunologického dohledu při vzniku nádorů. Hypertermie má jako jeden ze svých mechanismů účinku potenciální stimulaci protinádorové imunitní reakce. Tyto mechanismy využívají evolučních mechanismů febrilních stavů u savců, které se vyvinuly jako obrana hostitele před infekčními agens. Zdá se, že takovýchto dějů lze využít i pro uměle vytvořenou stimulaci protinádorové imunitní reakce. Ve druhé části se proto práce zabývá ovlivněním a stimulací imunitní protinádorové reakce hypertermií.

2. Hypertermie

Hypertermii (HT) definujeme jako zvýšení teploty tkáně, v léčbě nádorů tímto pojmem označujeme ohřev biologické tkáně na teploty mezi 40 - 44 °C. Teploty nad tímto rozmezím mají destruktivní účinky i na zdravé tkáně, nižší teploty pak mají minimální léčebnou účinnost. Ač první dochované zmínky o příznivém léčebném efektu tepla v léčbě různých onemocnění pocházejí již se starověkého Řecka, považuje se za počátek léčebného využití zvýšení tělesné teploty práce Coleyho⁽¹⁾, který si povšiml regrese sarkomu měkkých tkání při septickém stavu doprovázejícím erysipel. Tuto situaci se potom Coley snažil napodobit a pacientům aplikoval bakteriální lyzát, známý jako Coley toxin, který měl vyvolávat febrilní

reakce. V začátcích 20. století se s rozvojem techniky hledaly nástroje umožňující lokalizovaný ohřev tkání. Tak se experimentovalo s ohřevem ve vodní lázni, diatermií, infračerveným ohřevem. Současně se tato léčba nádorů kombinovala s dalšími modalitami, nejčastěji s radioterapií. Po 1. světové válce došlo k útlumu vývoje v důsledku technických obtíží a renesance hypertermie probíhá od 70. let 20. století, kdy byly uspokojivě vyřešeny technické aspekty ohřevu a postupně se objasňují mechanismy účinku hypertermie a její klinické indikace.

2.1. Typy hypertermie

Hypertermie se dělí podle lokality a objemu ohřevu na povrchovou, regionální, intrakavitární, intersticiální a celotělovou. Dalšími dvěma metodami využívajícími teploty v uvedeném rozmezí je hypertermická laváž a hypertermická perfuse. Pro každý typ je vhodný jiný technický princip a má jiný okruh indikací.

Při povrchové hypertermii dochází k ohřevu tkání uložených přibližně do 4 cm pod povrchem těla. V této aplikaci se využívá nejčastěji mikrovlnného ohřevu, případně ohřevu pomocí ultrazvuku. Z indikačních okruhů jsou nejvýznamnější karcinom prsu, nádory hlavy a krku a maligní melanom.

Regionální hypertermie je určena pro ohřev hluboce uložených tkání (pánve, retroperitoneum), pomocí sestav mikrovlnných aplikátorů, případně za použití kapacitního ohřevu. V klinických situacích je indikována pro zhoubné nádory čípku děložního, konečníku, sarkomů retroperitonea.

Intrakavitární hypertermie označuje metodu, při které je aplikátor zaveden do dutého orgánu. Tato metoda využívá mikrovlnných aplikátorů a jedinou popsanou indikací jsou nádory močového měchýře.⁽²⁾

Při intersticiální hypertermii jsou mikrovlnné aplikátory zaváděny přímo do tkání (například do mozkové tkáně při léčbě zhoubných nádorů mozku).

Celotělová hypertermie je zatím experimentálním přístupem zkoušeným v léčbě diseminovaných maligních onemocnění. Využívá se dvou technik ohřevu: pomocí infračerveného záření a ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli.

Při hypertermické laváži se provádí aplikace fyziologického roztoku s rozpuštěným léčivem, například cytostatikem, do dutiny břišní. Indikací k použití této techniky je peritoneální rozsev maligního nádoru.

2.2. Technické principy ohřevu

Pro ohřev tkání lze využít různých fyzikálních principů, které jsou popsány v následujícím oddíle, společně s popisem přístrojů používaných pro danou metodu. V současné době je nejvyužívanější mikrovlnná hypertermie, proto je jí věnována největší pozornost.

Mikrovlny

Při mikrovlnném ohřevu se využívá střídavého elektromagnetického pole o frekvencích 0,3 - 2,4 MHz.. Fyzikální interakce elektromagnetického pole s biologickou tkání (dielektrikem) je založena na reakci částic s elektrickým nábojem (atomů i molekul biologické tkáně) na působení vnějšího elektromagnetického pole. Posun či deformace těchto nabitých částic z jejich ustálené neutrální polohy dává vznik elektrickým dipólům. Mezi děje způsobující vznik dipólů patří:

- elektronová polarizace (posun elektronů vůči jádru atomu)
- atomová polarizace (posun celých jader atomů v důsledku nerovnoměrného rozložení náboje v molekule)
- orientovaná polarizace (polární dielektrika obsahují permanentní dipóly vzniklé asymetrickým rozložením opačných nábojů v molekulách látky)
- Maxwell-Wagnerova polarizace (náboj nahromaděný na rozhraní mezi různými oblastmi heterogenního prostředí)

Při působení střídavého pole se kmitající elektrické částice opozdí za budící složkou elektrického pole a dielektrikum tedy ohřívá ztrátový proud. Hloubka průniku mikrovln do tkání závisí na jejich frekvenci a pro použití v lékařství jsou přiděleny vlnové frekvence uvedené v tabulce 1.

f [MHz]	léčba
27,20	hloubková
433,92	podpovrchová
915	podpovrchová
2450	povrchová

Tab.1. Frekvence používané při termoterapii.

Souprava pro mikrovlnnou hypertermii:

Soupravy pro mikrovlnnou hypertermii jsou tvořeny následujícími základními složkami:

- 1) výkonovým generátorem;
- 2) aplikátorem;
- 3) řídicí jednotkou;
- 4) termometrickou soupravou.

Ad 1) Ke generování výkonu řádově stovek wattů je potřeba použít některé z mikrovlnných elektronek. Všechny typy pro svou činnost využívají interakci mezi svazkem elektronů a vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem, i když se liší konstrukční geometrií i principem činnosti. Elektrony jsou emitovány z rozžhavené katody, která je pokryta oxidem baria nebo tungstenem. Proud elektronů je fokusován do úzkého svazku a přitahován anodou s vysokým napětím, nebo je použit solenoidální elektromagnet. Výstup vysokofrekvenční energie zpravidla umožňuje koaxiální sonda nebo smyčka. Tyto generátory mají obvykle výkon 100 až 300 W.

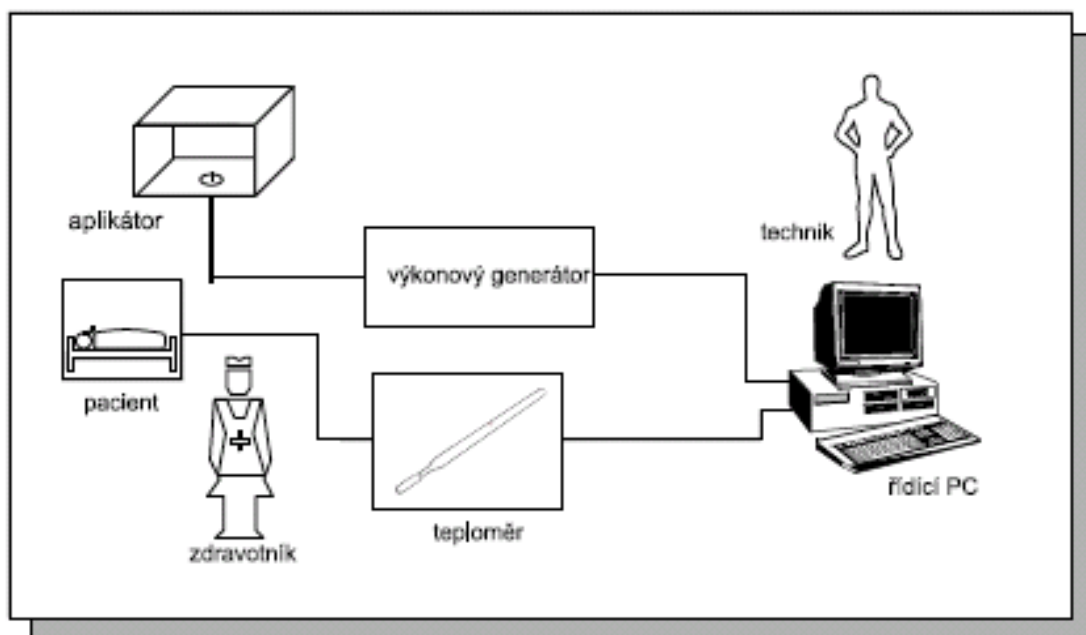
Ad 2) Aplikátory představují základní prvek všech hypertermických zařízení, protože právě ony rozhodují o účinnosti převodu vysokofrekvenční energie z generátoru do biologické tkáně a zejména také o tvaru a rozměrech ohřívané oblasti. Podle charakteru léčby je možno rozlišit aplikátory pro termoterapii na lokální (povrchovou, podpovrchovou, hloubkovou), intrakavitární, regionální, celotělovou a intersticiální. Na základě technického provedení pak na aplikátory vlnododové, tvořené úsekem vedení, kapacitní a induktivní. V klinické praxi jsou pro povrchovou hypertermii nejčastěji používány aplikátory vlnododové, ze kterých se elektromagnetická vlna šíří coby hloubková vlna od místa vniku do hlouběji uložené tkáně. Nejčastěji používanou frekvencí pro povrchové aplikace je 434 MHz Společnou vlastností regionálních aplikátorů je to, že využívají elektromagnetických vln válcových sbíhavých. Taková vlna se šíří z povrchu těla dovnitř. Po volbě vhodné frekvence je při zadaných dielektrických vlastnostech tkáně možno zajistit teplotní nárůst směrem ke středu. Nižší

frekvence (27 MHz) umožňují dosažení hypertermické teploty ve větší oblasti, při použití frekvencí vyšších (100 MHz) lze energii fokusovat do menšího objemu biologické tkáně.

Ad 3) Řídící jednotkou pro hypertermické soupravy je výkonný PC počítač.

Ad 4) Termometrická souprava je podrobněji popsána v oddíle 2.3.

Obrázky 1 a 2 ukazují schéma a příklad soupravy pro HT.



Obr. 1: Schématické znázornění hypertermické soupravy



Obr.2: Souprava Lund Hyperthermia System pro povrchovou mikrovlnou HT (Ústav radiační onkologie FN Bulovka). Ukázka aplikace při nádoru ORL oblasti.

Kapacitní ohřev

Kapacitní aplikátory vytvářejí elektromagnetické pole kolmé k povrchu těla, konkrétně k elektrickému rozhraní mezi tukovou a svalovou tkání. Tato orientace elektromagnetického pole není optimální a těchto aplikátorů lze použít pouze u velmi hubených pacientů a ve specifických anatomických oblastech. Fyzikální princip ohřevu je stejný jako u výše uvedených mikrovlnných aplikátorů.

Ultrazvukový ohřev

Ultrazvuk (mechanické vlnění s frekvencí vyšší než 20 000 Hz) byl pro své některé výhody shledán jako vhodný způsob ohřevu biologické tkáně. Mechanická vlna při průniku do biologické tkáně způsobuje zahuštění a zředění prostředí a šíří se tedy za pomoci částic, které kmitají kolem rovnovážné polohy. Zároveň dochází k absorpci ultrazvukové vlny a přeměně mechanické energie v tepelnou. Útlum ultrazvukové vlny je exponenciální a velmi úzce souvisí s frekvencí. Zatímco při frekvencích okolo 10 MHz bude prohřívána vrstva do 1 cm, v případě frekvence 0,5 MHz je možno docílit ohřevu až do hloubky 10 cm. Ultrazvukové systémy rovněž umožňují ohřev lokální, regionální, intrakavitární či intersticiální.

Nevýhodou ultrazvukového systému je vysoká absorpce v kostech a pohlcování v plynném prostředí (střevo) a proto použití pro regionální ohřev oblasti malé pánve je velmi problematické. Naopak velmi výhodné je použití pro intrakavitární a intersticiální ohřev.

Ohřev pomocí magnetických nanočástic

Tato technika je nejnovějším pokrokem v oblasti hypertermie a využívá cílené aplikace roztoku magnetických nanočástic do nádorové tkáně. V publikovaných pracích se využívá nanočástic na bázi aminosilanu⁽³⁾, které jsou přednostně vychytávány nádorovými buňkami. Po aplikaci tekutiny do cílového místa je pacient umístěn do aplikátoru, ve kterém se indukuje střídavé magnetické pole. Změna polarit magnetického pole způsobuje pohyb částic a jejich mechanická energie se ve tkáních mění na energii tepelnou. Metoda byla dosud experimentálně aplikována u nádorů mozku a nádorů prostaty.

Infračervené záření

K celotělové hypertermii lze využít infračerveného záření. K absorpci tohoto záření dochází v povrchových vrstvách kůže, kde se jeho energie mění na energii tepelnou. Při vhodné době ohřevu a minimalizaci tepelných ztrát lze dosáhnout při celotělové hypertermii teplot až 42 °C. Metoda má zásadní nevýhodu v nehomogenitě ohřevu, kdy se dříve ohřívají povrchové vrstvy těla s vysokým počtem nervových zakončení, což může vést k závažným nežádoucím účinkům.

2.3. Termometrie

Měření teploty v biologických systémech je v současnosti největším úskalím hypertermie. Toto měření je komplikováno zejména nehomogenitou biologické tkáně, která se zahřívá nerovnoměrně, a variabilitou průtoku krve danou oblastí (různá rychlost ochlazování regionu). Standardně se používá měření bodového, ve více místech prohřívané oblasti. Informace o dosažené teplotě je však pouze omezená a je zatížena poměrně významnou nejistotou. Nově se experimentálně využívá měření teploty pomocí magnetické rezonance, kterou je možné měřit teplotu s vysokým rozlišením v celé ohřívané oblasti⁽⁴⁾.

Pro bodové měření se využívá termistorů nebo optických detektorů. Termistory se řadí mezi polovodičové odporové senzory, které využívají teplotní závislosti odporu na teplotě. U polovodičů je dominantní teplotní závislost koncentrace nosičů náboje. Optické senzory teploty mají na vstupu zdroj světla (LED, polovodičový laser), který vysílá optický signál do

optického vlákna. Na výstupu je fotodetektor (PIN dioda, případně struktura PIN - FET), který přijímá senzorem modulovaný optický signál. Vlastní sensor je elektricky pasivní prvek, jehož podstatou je snímanou veličinou vyvolaný fyzikální (optický) jev, který mezi zdrojem a detektorem způsobí změnu (modulaci) optického signálu. Obecně optické senzory teploty využívají teplotní změny indexu lomu, teplotní změny absorpčních vlastností, fluorescenci nebo termoluminiscenci. Příkladem může být fluorescenční teploměr firmy Luxtron Corp. Optické vlákno je opatřeno koncovkou [fosfor, $(\text{Gd}_{0,99}\text{Eu}_{0,01})\text{O}_2\text{S}$ - gadolinium europium oxid sulfát], která je excitována po ozáření UV zářením ($\lambda = 300 \text{ nm}$). Na frekvencích okolo 500 až 600 nm lze pozorovat dvě ostrá maxima emise. Poměr těchto maxim je po detekci (dva silikonové diodové detektory) vyhodnocován, což umožňuje určit teplotu v intervalu -50 až $300 \text{ }^\circ\text{C}$ s rozlišením $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro zajištění této rozlišovací schopnosti je však zapotřebí použít časového průměrování. Velkou předností optických senzorů teploty je nepřítomnost kovových součástí, které mohou ovlivnit rozložení elektromagnetického pole, nebo mohou být, při nesprávném uložení (jiném než kolmém ke směru vektoru elektrického pole), zatíženy chybou v důsledku indukujících se vysokofrekvenčních proudů, které čidlo zahřívají.

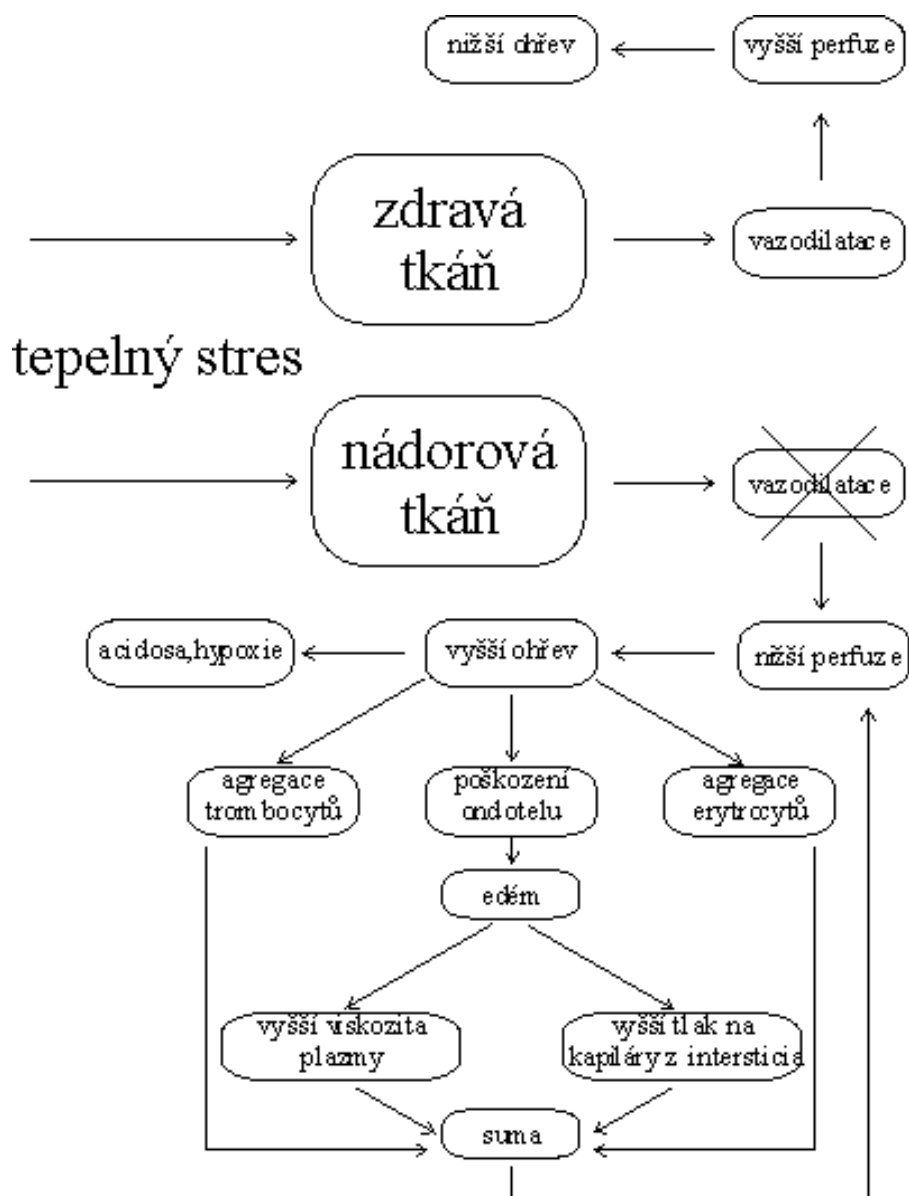
2.4. Mechanismy účinku hypertermie

Účinky tepla na buňky v organismu lze pro názornost rozdělit na přímé a nepřímé. Nepřímé účinky primárně souvisí s mikrocirkulací v nádoru a v okolních zdravých tkáních a vedou v důsledku ke zpomalení průtoku krve nádorem, relativně vyššímu nárůstu teploty v nádorové tkáni a s tím spojené hypoxii, acidose a vyšším energetickým nárokům na nádorové buňky. Přímé účinky spočívají v ovlivnění terciární a kvarterní struktury proteinů v buňkách a s tím spojenými funkčními poruchami těchto proteinů. Poslední kategorií účinků hypertermie je její ovlivnění imunitního systému, které je podrobněji popsáno v následujících oddílech.

2.4.1. Teplota a mikrocirkulace:

Reakcí normálního cévního řečiště na zvýšení teploty je vasodilatace. V nádorové tkáni jsou novotvořené cévy defektní, postrádají svalovinu a proto nejsou vasodilatace schopné. Na tepelné podněty tedy významněji nereagují. Kombinace vasodilatace v okolní zdravé tkáni s nezměněným průsvitem cév v nádoru vede k relativnímu snížení průtoku krve nádorem

(zvyšuje se poměr průsvitu cév v normální tkáni/průsvitu cév v nádoru). Tento jev se někdy v literatuře označuje jako „steal“ fenomén a jeho důsledkem je relativně vyšší ohřev nádoru než okolní zdravé tkáně. Tento děj spouští pozitivní zpětnou vazbu, neboť vyšší teplota v nádoru znamená vyšší míru poškození endotelu, s tím spojenou agregaci erytrocytů a trombocytů, což vede k dalšímu snížení průtoku krve. Poškození endotelu je rovněž doprovázeno únikem tekutiny do intersticiálního prostoru, což vede ke zvýšení tlaku na mikrokapiláry a zároveň k zvýšení viskozity krve. Všechny tyto jevy přispívají pozitivní zpětnou vazbou k nárůstu teploty v nádorové tkáni a jsou schematicky znázorněny na obrázku 3.



Obr.3: Schématické znázornění vlivu hypertermie na průtok krve normální a nádorovou tkání

Je nutno uvést, že tento dříve přijímaný model indukovaných změn v průtoku krve během hypertermie má v poslední době řadu odpůrců. Nověji publikované práce prokázali přesně opačný efekt hypertermie na nádorovou tkáň. Song a kol. a další autoři prokázali zvýšení průtoku krve v nádorech u pokusných zvířat při použití 40 - 42 °C^(5,6).

S jistotou lze říci pouze to, že hypertermie ovlivňuje průtok krve nádorovou tkání. V závislosti na primárních charakteristikách průtoku krve nádorem se patrně pozitivní zpětnou vazbou buď prohlubuje nádorová hypoxie (v případě nádoru již před HT

hypoxického), nebo naopak zlepšuje oxygenace nádoru (v případě nádoru primárně dobře perfundovaného). Významným faktorem může být použitá teplota a trvání aplikace.

2.4.2. Teplo a oxygenace tkání

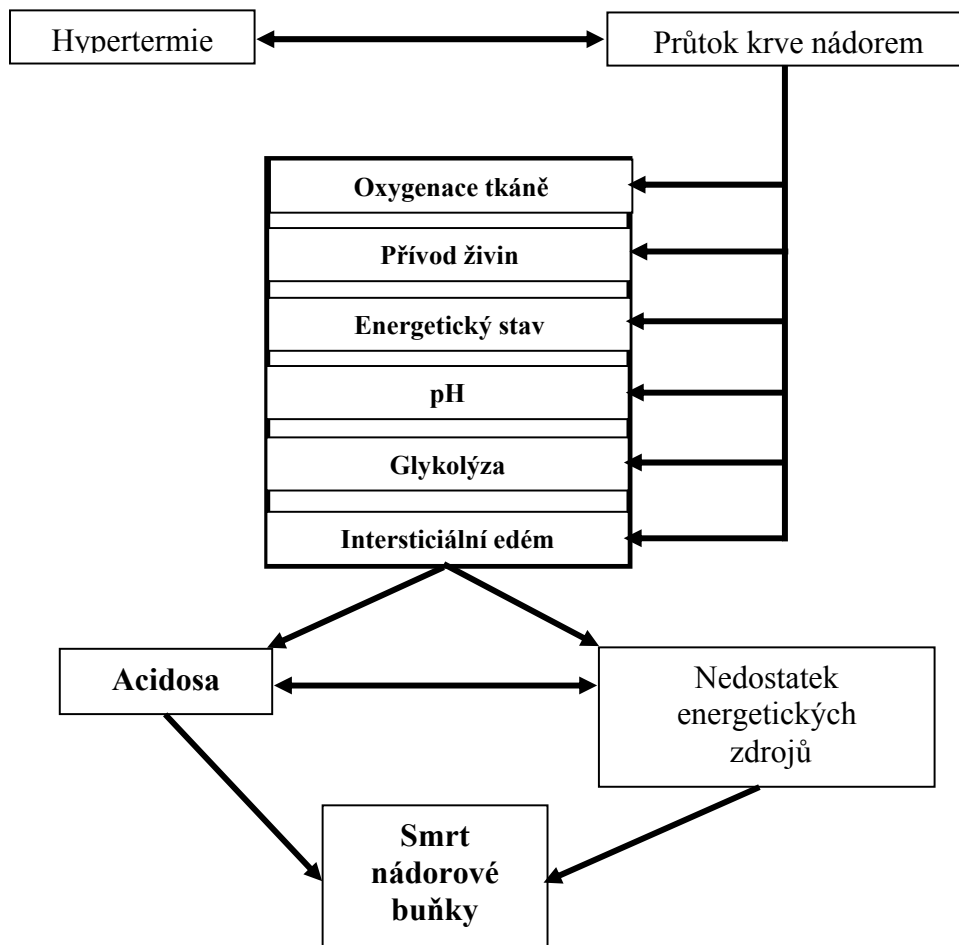
Zatímco ve zdravých tkáních hypertermie způsobuje zvýšení průtoku krve a tím zvýšení pO_2 , v nádorové tkáni je situace nejasná. Teoretické předpoklady naznačují, že by hypertermie měla snižovat průtok krve tkáněmi a tím snižovat oxygenaci tkání. Studie týkající se této problematiky mají však nejednoznačné výsledky a ukazuje se, že odezva tkání bude významně závislá na době ohřevu, dosažené teplotě, velikosti nádoru, jeho prokrvení před terapií. Některé studie popisují zvýšení průtoku krve v průběhu HT a v následujících 24 hodinách^(7,8), jiní popisují bifázický průběh oxygenace po provedení hypertermie s iničiálním vzestupem a následným poklesem pod počáteční hodnotu⁽⁹⁾ Pro oxygenaci nádorové tkáně tedy platí stejná úvaha, jako pro perfusi nádorové tkáně po HT.

2.4.3. Metabolické účinky hypertermie

Změny v oxygenaci a v průtoku krve v nádorech se odráží v metabolickém stavu nádorových buněk. Zjištěné metabolické změny zapadají do teoretického rámce, ve kterém hypertermie způsobuje zpomalení průtoku krve nádorem (v důsledku kolapsu cév nebo v důsledku relativního snížení průtoku („steal“ fenomén), které má za následek hypoxii a prohloubení anaerobního metabolismu. Statisticky významně stoupá hladina laktátu během hypertermie, jako prokázali Streffer a kol. na modelu DS - sarkomů⁽¹⁰⁾. Tato akumulace laktátu během hypertermie je důsledkem anaerobní glykolýzy glukosy, která má ovšem výrazně nižší výtěžnost ATP. Důsledkem vzestupu hladin laktátu je zvýšení pH po hypertermické léčbě. Měření pH pomocí ^{31}P -NMR spektroskopie prokázala, že hodnoty pH v nádorech (tato metoda měří intracelulární pH) jsou velmi podobné hodnotám zdravých tkání. Po aplikaci hypertermie byl však prokázán významný pokles pH⁽¹¹⁾. Tato acidifikace se kromě laktátu přičítá též intenzifikované hydrolýze ATP, zvýšení parciálního tlaku CO_2 a inhibici funkce Na^+/H^+ kanálu na buněčné membráně. Posledním publikovaným závažným metabolickým důsledkem hypertermie jsou změny v metabolismu ATP. Schaefer a kol. srovnávali koncentrace ATP v nádorech před a po hypertermické léčbě a zjistili, že po hypertermii statisticky významně klesá hladina ATP v nádorech. Toto snížení autoři vysvětlují zvýšenými nároky buněk při stresové situaci, horším výtěžkem ATP v důsledku

anaerobní glykolýzy, restrikcí mikrocirkulace a tím nižší dostupností substrátů pro energetický metabolismus, a případě inhibicí adenylát-kinasy acidosou ⁽¹²⁾.

Hypertermie prokazatelně způsobuje významné změny v metabolismu nádorové tkáně, které mohou sami o sobě vést ke smrti maligních buněk. Obrázek 4 shrnuje změny působené hypertermií.



Obr. 4: Metabolické změny indukované v nádorové tkáni.

2.4.4. Proteiny a jejich struktura

Proteiny se skládají z řetězců aminokyselin vázaných peptidovými vazbami. Pořadí aminokyselin určuje primární strukturu, sekundární struktura je dána vodíkovými můstky a vytváří pravidelně se opakující regiony (α -šroubovice nebo β -skládaný list), terciární struktura je dána zejména hydrofobními interakcemi a disulfidovými vazbami a kvarterní struktura je dána interakcemi mezi jednotlivými proteiny. Teplo – tedy přenos energie – konkrétně přeměna tepelné energie na kinetickou energii – znamená větší rozkmitání molekul ve vazbách, což má za následek menší stabilitu a narušení vazeb (zejména těch, které jsou slabé (elektrostatických, hydrofobních/filních, vodíkových můstků) – tj. vazeb vytvářejících sekundární a terciární strukturu proteinů. Změny pH, ke kterým dochází během HT, způsobují změny v rozložení elektrostatického náboje a tím ovlivňují elektrostatické interakce mezi proteiny. Narušení vodíkových vazeb, hydrofobních a elektrostatických interakcí znamená změnu konformace proteinů. Vzhledem k tomu, že funkce makromolekul (proteinů) je optimální při konkrétní konformaci, znamená změna konformace změnu aktivity molekuly nebo úplnou inhibici její funkce. Změny terciární struktury proteinů se označují jako denaturace proteinů a dochází k nim již při teplotách od 40 - 41 °C.

Základním mechanismem účinku hypertermie je denaturace proteinů. Teploty, které je možno v hypertermii bezpečně použít, však způsobují denaturaci pouze určitých kritických buněčných struktur a buňky zdravých tkání a tkání nepostižených jinou terapeutickou metodou jsou schopny tyto účinky tolerovat.

2.4.5. Kritické struktury – buněčné jádro

Na úrovni jednotlivých buněk se za kritické struktury považují zejména proteiny buněčných membrán a buněčné enzymy. Jak již bylo uvedeno, mění se v důsledku působení tepla aktivita proteinových molekul, stejně jako jejich afinita k různým substrátům. Změny v aktivitě proteinů buněčných membrán se projevují narušením membránových potenciálů a to vést ke smrti buněk způsobené tepelnou složkou samotnou. Tento mechanismus není patrně v klinické praxi hlavním mechanismem, neboť by se projevoval nekrosou nádorových buněk, která není pozorována. Navíc by zřejmě postrádal selektivitu. Hlavní mechanismy účinku hypertermie tedy budou účinky více selektivní.

Za hlavní mechanismus účinku hypertermie je považována inhibice schopností opravovat poškození DNA způsobená ionizujícím zářením. Toto poškození vzniká působením volných radikálů a projevuje se dvojitými zlomy v DNA (DSB – double strand breaks), zlomy jednoho

řetězce DNA (SSB – single strand breaks) a poškození bází v DNA. Tato poškození jsou v normálních buňkách detekována a z 95 – 99 % reparována v rozmezí několika hodin po působení ionizujícího záření. Neopravená poškození (klíčové jsou DSB) vedou ke spuštění signální kaskády vedoucí k apoptose nebo k takovému poškození DNA, které znemožňuje průchod buňky kontrolními body buněčného cyklu či mitosou. Konkrétními mechanismy reparujícími poškození jsou:

NHEJ – non homologous end joining – mechanismus odpovědný za reparaci DSB

HR – homologous recombination – alternativní mechanismus odpovědný za reparaci DSB

BER – base exchange repair - mechanismus odpovědný za opravu poškozených bází

NER – mechanismus odpovědný za opravu poškozených nukleotidů

Každý z těchto mechanismů v sobě zahrnuje několik typů proteinů a enzymů, které detekují poškození DNA a různými mechanismy provádějí opravu tohoto poškození.

Z experimentů je prokázáno, že hypertermie v kombinaci s radioterapií zvyšuje počet nereparovaných lézí v DNA. Například El-Awady a kol. prokázali, že po ozáření buněčných kultur v kombinaci s hypertermií došlo k vzestupu počtu nespojených dvojitých zlomů (DSB) v DNA z 5 % na 14 % a k vzestupu chybně spojených DSB z 13 % na 51 %⁽¹³⁾. V současnosti však není známo, který mechanismus je nejvíce citlivý na zvýšení teplot. Kampigna a kol. prokázali na zvířecích modelech s vyřazenými dráhami reparace DNA, že k radiosensitizaci hypertermií docházelo bez ohledu na funkčnost dráhy NHEJ a obdobným způsobem vyloučili ovlivnění HR. Nejpravděpodobnějším kandidátem na kritickou strukturu je podle těchto autorů proces BER⁽¹⁴⁾. Dalším, donedávna přehlíženým jevem, ke kterému dochází působením tepla na úrovni jaderných struktur buňky, je agregace jaderných proteinů. Podle Lepocka jsou non-histonové jaderné proteiny tvořící jadernou matrix termolabilní. Teploty 42 °C způsobí degradaci těchto proteinů s obnažením hydrofobních zbytků, což má za následek zvýšení počtu interakcí protein-protein s jejich následnou agregací. Konečným důsledkem je inaktivace proteinů a maskování poškozených míst v DNA⁽¹⁵⁾.

Ačkoliv není přesný mechanismus známý, považuje se inhibice reparace DNA za hlavní mechanismus, kterým potencuje hypertermie účinnost radioterapie. Selektivní modalita léčby (RT) je tak potencována mnohem méně selektivní metodou (HT).

2.5. *Klinické použití hypertermie*

Hypertermie jako samostatná modalita nedosahuje významnějších léčebných úspěchů. Proto se tato metoda vždy kombinuje s jiným typem protinádorové léčby.

2.5.1. Kombinace hypertermie s radioterapií

Hypertermie v současné době není metodou, kterou by bylo možné selektivně prohřívát přesněji lokalizované oblasti organismu a z fyzikálních a biologických principů zřejmě ani tohoto cíle nemůže být dosaženo. Určité selektivity je však možné dosáhnout kombinací s jinou, selektivní modalitou protinádorové léčby. Takovou modalitou je radioterapie a hypertermie se v klinické praxi s radioterapií téměř vždy kombinuje. Obvyklým postupem je aplikace HT 1x týdně v průběhu radioterapie, ihned po frakci záření. HT se aplikuje po frakci radioterapie za prvé proto, aby se potencovaly účinky ionizujícího záření na úrovni DNA, a druhým důvodem je možná indukce hypoxie nádorové tkáně, která je pro léčbu zářením nežádoucí.

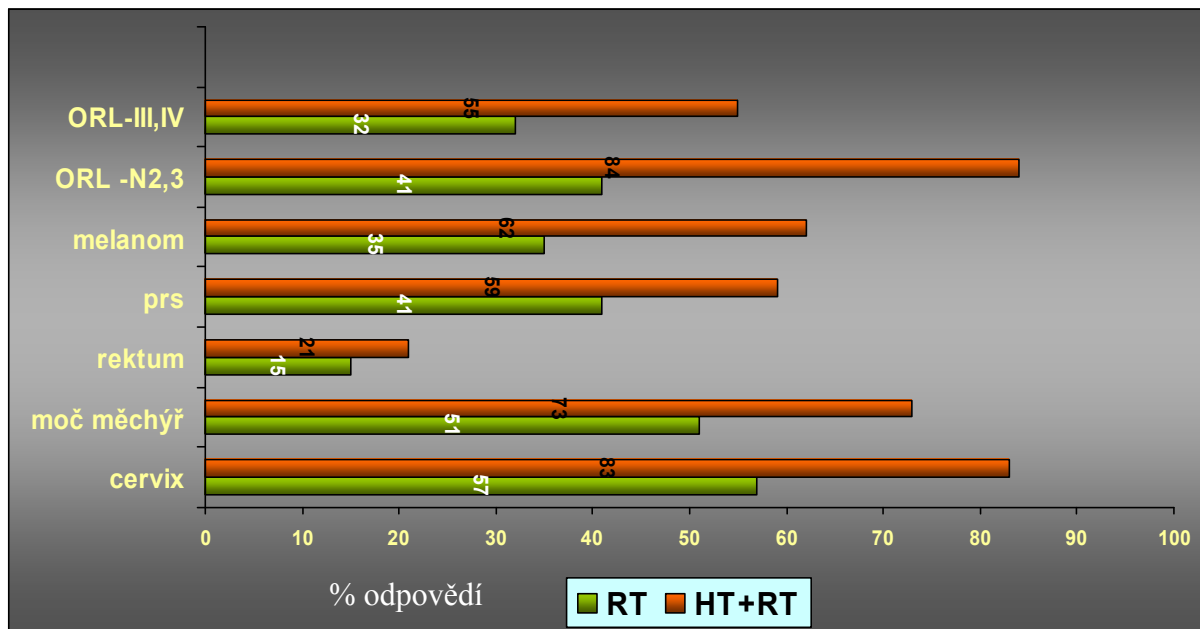
2.5.2. Kombinace hypertermie s chemoterapií

Hypertermie významně ovlivňuje působení chemoterapeutických léků. Způsobuje změny v jejich farmakokinetice, zvyšuje jejich (selektivní) absorpci v nádorovém ložisku při jeho lokálním ohřevu a ovlivňuje průnik farmak buněčnými membránami. Stejně jako při interakci s ionizujícím zářením inhibuje reparační pochody na úrovni buněčného jádra, zejména na úrovni DNA⁽¹⁶⁾.

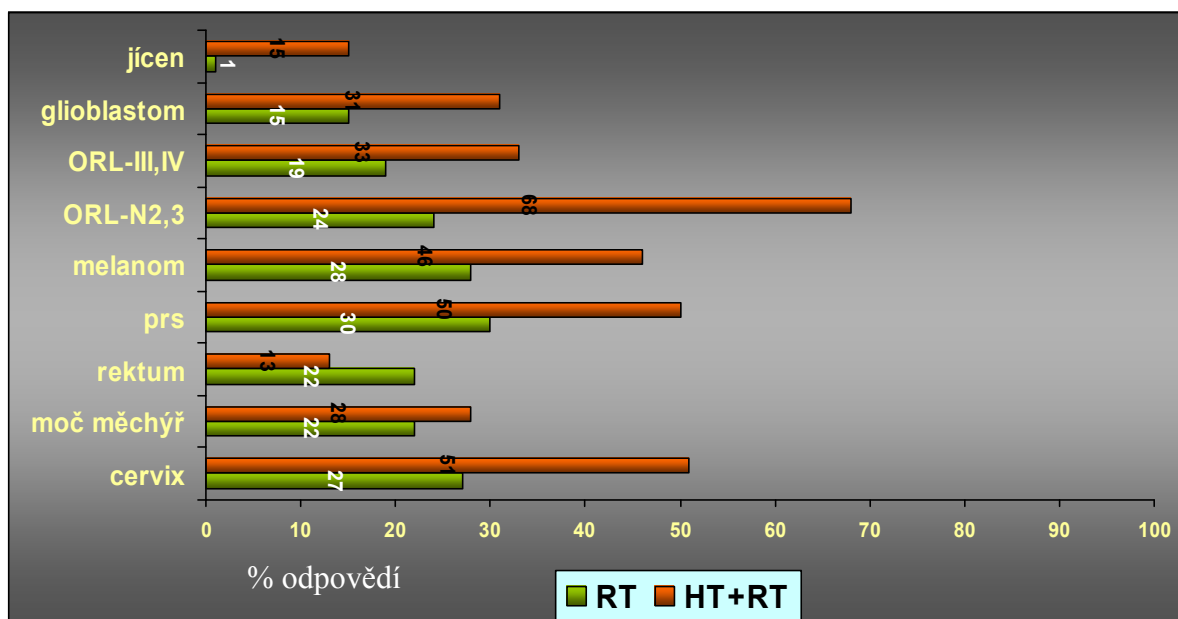
2.5.3. Indikace hypertermie

Přes teoretické nejasnosti týkající se mechanismů účinku je HT metodou zavedenou v klinické praxi a její účinnost byla potvrzena v řadě klinických studií fáze III. Její účinnost není omezena na určité typy nádorových onemocnění a indikace vycházejí spíše z technických limitací daných přístrojovým vybavením. Pro povrchovou HT jsou nejčastějšími indikacemi lokální recidivy nádorů prsu a maligní melanom, pro regionální HT malignity v oblasti pánve, zejména karcinom čípku děložního a rekta. Klinické studie však prokázali její účinnost i u tak resistantních nádorů, jako jsou glioblastomy (intersticiální HT) nebo sarkomy měkkých tkání. Obrázky 5,6 shrnují randomizované studie hodnotící účinnost

přidání hypertermie k radioterapii z hlediska dosažení kompletní odpovědi na léčbu a celkového přežívání⁽¹⁷⁻²³⁾.



Obr.5: Studie fáze III srovnávající procento dosažených kompletních odpovědí na léčbu u různých nádorových onemocnění (RT = radioterapie samotná; RT+HT = radioterapie se současnou hypertermií)



Obr.6: Studie fáze III srovnávající celkové přežívání pacientů po léčbě různých nádorových onemocnění (RT = radioterapie samotná; RT+HT = radioterapie se současnou hypertermií)

3. Imunitní systém a nádorová onemocnění

Imunitní systém se v průběhu evoluce vyvinul tak, aby byl schopen rozlišovat mezi molekulami tělu vlastními a tělu cizími. Takto vytvořený systém je zásadní pro přežití organismů, jelikož poskytuje obranný mechanismus před cizorodými patogeny (viry, bakteriemi). Na této obraně před vnějšími patogeny se podílejí obě složky imunitního systému, vrozená i získaná. Některé prvky systému vrozené imunitní reakce reagují na obecné a společné antigeny patogenů s následnou aktivací vrozené i získané imunitní reakce. Adaptivní imunitní reakce díky „imunologické paměti“ potom umožňuje specifickou reakci na patogeny, s nimiž se v minulosti imunitní systém organismu setkal.

Imunitní odpověď proti nádorům se odlišuje od tohoto konceptu cizí/vlastní, jelikož nádor není exogenním patogenem, ale patologií vznikající z vlastních buněk. Imunitní systém je však během vývoje nastaven tak, aby toleroval „vlastní“ antigeny. Tak je v průběhu časného vývoje v thymu zničeno přibližně 90 % nezralých T-lymfocytů s TCR (T-cell receptor) s vysokou afinitou k vlastním antigenům. I přes tuto přísnou selekci v organismu přetrvávají zralé, „self-reaktivní“ T-lymfocyty s TCR s relativně nízkou afinitou k vlastním antigenům. Tyto slabé antigeny nejsou sami o sobě schopny indukovat imunitní odpověď, mohou však být určitým způsobem aktivovány. Uvedené T-lymfocyty tvoří jednu z hlavních složek imunitní reakce proti maligním nádorům.

Reakce imunitního systému proti nádorové tkáni obecně spočívá v rozpoznání nádorových buněk a jejich účinném zničení. Tento proces má dvě klíčová úskalí:

1. rozpoznání slabě antigenních nádorových buněk;
2. aktivaci efektorových buněk imunitního systému.

3.1. Antigeny asociované s nádory (*tumor associated antigens – TAA*)

Jak bylo uvedeno výše, pocházejí nádory z vlastních buněk organismu a s tím je spojena určitá tolerance imunitního systému. Genetické změny probíhající během kancerogeneze však vedou k expresi pozměněných proteinů (antigenů) nebo normálních proteinů v jiné kvantitě či ontogenetickém kontextu, které již imunitní systém rozpoznat může. Jedním typem těchto antigenů jsou ty, které jsou rozpoznávatelné protilátkami (obvykle membránové proteiny – her2-neu, EGFR, CD20). Proti těmto antigenům lze připravit monoklonální protilátky, které se používají již i v klinické praxi. Druhým typem TAA jsou antigeny rozpoznávané T-lymfocyty. Tyto antigeny nejsou rozpoznávány přímo, ale vždy v komplexu s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. nebo II. třídy. MHC molekuly jsou receptory pro peptidové antigeny⁽²⁴⁾. Dvě třídy MHC receptorů se odlišují v typu jimi indukované imunitní reakce, mají jinou tkáňovou distribuci a prezentují navázané peptidy jiným subpopulacím nádorových buněk.

Molekuly I. třídy se vyskytují zejména na somatických a nádorových buňkách, zatímco molekuly II. třídy se vyskytují zejména na nádorových buňkách, B-lymfocytech, makrofágách a dendritických buňkách (DC). MHC molekuly I. třídy prezentují antigeny CD8+ T-lymfocytům, zatímco MHC molekuly II. třídy CD4+ T-lymfocytům.

Významným rozdílem je typ vázaného antigenu. MHC molekuly I. třídy váží kratší peptidy, obvykle pocházející z intracelulárních cytosolových proteinů, jako jsou vlastní proteiny a produkty intracelulárních virů a bakterií. Peptidy vážící se na MHC molekuly II. třídy jsou větší, jejich původ je obvykle extracelulární a do buněk se dostávají endocytosou⁽²⁵⁾. Peptidové fragmenty z intracelulárních proteinů jsou pro MHC-I prezentaci připraveny v sérii navazujících kroků⁽²⁶⁾. Na tomto zpracování se podílí štěpení v proteasomu, zpracování chaperony a vazba na složky MHC I komplexu. Potom jsou komplexy transportovány přes Golgiho komplex na povrch buněk. Toto zpracování je často narušeno v nádorových buňkách.

MHC molekuly I. třídy mohou také prezentovat za určitých okolností extracelulární peptidové fragmenty. Toto se děje cestou dendritických buněk a jedná se o mechanismus významný zejména pro aktivaci naivních CD8+ T-lymfocytů označovaný jako „cross-priming“. Jedním z navržených mechanismů pro „cross-priming“ je intracelulární tvorba komplexů s proteiny tepelného šoku (Hsp – heat shock proteins), které se po uvolnění z buněk váží na DC cestou receptorů pro Hsp umístěných na membráně těchto buněk.

Peptidy prezentované s MHC molekulami II. třídy jsou buňkou obvykle pohlceny endocytosou, dále jsou zpracovány v endosomu a transportovány na buněčnou membránu. Zde komplexy peptidový fragment-MHC molekula II. třídy interagují s CD4+ T-lymfocyty.

3.2. Poruchy prezentace antigenů v nádorech

První problém prezentace antigenů nádorovými buňkami spočívá v nedostatku antigenů v nádorových buňkách nebo v jejich slabé antigenicitě. Druhý problém souvisí s poruchami MHC systému, zejména MHC molekul I. třídy. Mnohé lidské nádory (karcinomy čípku děložního, plicní karcinom, kolorektální karcinom) mají významně redukovanou povrchovou expresi MHC molekul třídy I, a některé nádory (renální karcinom) neexprimují tyto molekuly vůbec⁽²⁷⁾.

3.3. Buňky prezentující antigen

Mnoho nádorů exprimuje jak antigeny, tak MHC molekuly I. třídy, přesto však nedochází k přímé aktivaci CTL. Důvodem je to, že neexprimují kostimulační molekuly nutné pro tuto aktivaci. V takových situacích mohou protinádorovou imunitní reakci iniciovat specializované pomocné buňky označované jako buňky prezentující antigen. Nejvýznamnějším reprezentantem skupiny APC jsou dendritické buňky (DC). DC jsou buňkami myeloidního původu, které jsou rovnoměrně rozptýleny po tkáních, kde endocytosou pohlcují antigeny a následně je zpracovávají. Po aktivaci dozrávají a migrují do T-lymfocytárních oblastí lymfatických uzlin, kde se dostávají do kontaktu s T-lymfocyty nesoucími vhodný receptor a aktivují je. Cross-priming popsán výše je in vivo zprostředkován zejména DC⁽²⁸⁾. Kromě aktivace mohou mít v lymfatické uzlině podle specifických okolností též inhibiční funkce. Kromě DC patří mezi APC B-lymfocyty a makrofágy. Tkáňové makrofágy fagocytují patogeny, bakteriální produkty a nekrotické buněčné složky, dochází k jejich aktivaci spojené se zvýšením exprese MHC molekul I. i II. třídy a stávají se výkonnými APC. Zdá se, že makrofágy se nepodílejí na cross-primingu antigenů v komplexu s MHC I molekulami a fagocytosa apoptotických buněk inhibuje APC aktivitu makrofágů⁽²⁹⁾. V mikroprostředí nádoru jsou APC zastoupeny jak DC, tak makrofágy. Zdá se však, že makrofágy ve vitálním nádoru často produkují IL-10, což inhibuje prezentaci antigenů. Aktivace DC buněk v nádoru

je též inhibována cytokiny v mikroprostředí nádoru (například IL-10, PGE₂ a TGF-β), což značně narušuje imunitní reakci proti nádoru.

3.4. Úloha T-lymfocytů v rozpoznání nádoru

Protinádorové T-lymfocyty jsou stimulovány po interakci s nádorovými buňkami nebo s APC. Na stimulaci se podílí mnoho mezibuněčných interakcí, z nichž nejdůležitější je interakce receptoru T-lymfocytů (TCR) s komplexem MHC molekula-antigen. TCR obsahuje variabilní doménu odpovědnou za specifitu k antigenu. V průběhu zrání T-lymfocytů v thymu dochází k jejich negativní selekci, kdy jsou eliminovány klony neexprimující TCR, exprimující TCR nerozpoznávající MHC molekuly a – což je z pohledu protinádorové imunity nejvýznamnější – klony silně reaktivní s vlastními antigeny.

Po vyžrání a selekci T-lymfocytů v thymu může za určitých okolností dojít k jejich aktivaci. Pro tuto aktivaci je nutný kontakt TCR s komplexem antigen-MHC molekula na buňce prezentující antigen. Relativně slabá vazba TCR na antigeny vyžaduje ko-stimulační signály, které jsou dodávány molekulami jako je CD4 a CD8, adhesními molekulami, které zesilují vazbu T-lymfocytů na APC. Tyto molekuly vytvářejí během několika minut od iniciální vazby TCR na APC jakousi molekulovou „synapsi“, která zřejmě zesiluje signál vzniklý z vazby TCR na APC. Dalším významným faktorem pro stimulaci naivních T-lymfocytů je IL-2, bez jehož přítomnosti se T-lymfocyty stávají anergními.

Aktivované, zralé periferní T-lymfocyty mohou být deletovány apoptosou. Tento proces se označuje jako „aktivací-indukovaná buněčná smrt (AICD)“ a může postihovat CD4⁺ a CD8⁺ lymfocyty. Je zprostředkován zejména Fas ligandem, ale podílí se na něm též „TNF-like“ ligandy, jejichž receptory jsou zvýšeně exprimovány na aktivovaných lymfocytech. Tento mechanismus slouží především k regulování nadměrné imunitní reakce, ale z hlediska nádorové imunity může být příčinou jejího selhání ⁽³⁰⁾.

3.5. Funkce zralých protinádorových T-lymfocytů

CD4+ T-lymfocyty (Th lymfocyty)

Hlavní úlohou Th lymfocytů v protinádorové imunitní reakci je poskytnutí ko-stimulačních signálů pro navázané naivní CTL a aktivace APC. Toto se děje prostřednictvím sekrece IL2 a dalších aktivačních molekul. Podle typu aktivačních signálu a jeho kvantity dochází k aktivaci Th1 nebo Th2 CD4+ lymfocytů (což určuje typ imunitní reakce), nebo naopak k utlumení aktivity efektorových buněk (CD4+ CD25+ subpopulace T-lymfocytů).

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL)

Tyto buňky jsou nejvýznamnější buněčnou populací v protinádorové imunitní reakci a skládají se ze dvou typů – CTL a NK buněk.

CTL lymfocyty jsou CD8+ a rozpoznávají antigeny v komplexu s MHC molekulami I. třídy⁽³¹⁾. CTL se obvykle naváží přes svůj TCR na antigen na nádorové buňce, adhesní molekuly a další kostimulační molekuly aktivují CTL a dojde k indukci apoptosy nádorových buněk. Apoptosa je indukována buď exocytosou granulí obsahujících perforin a granzym, nebo prostřednictvím ligandů indukujících apoptosu, jako je Fas ligand nebo TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)⁽³²⁾.

NK buňky mají společnou progenitorovou buněčnou linii s CTL, ale nenesou na svém povrchu TCR/CD3 komplex. Jsou hlavním zdrojem protinádorové cytotoxické aktivity, která nevyžaduje specifické rozpoznání antigenu. Na svém povrchu mají různé receptory umožňující rozpoznání nádorových buněk, které potom zabíjejí mechanismem podobným jako CTL, tedy uvolněním granulí a cestou Fas ligandu⁽³³⁾.

3.6. Protinádorová imunitní reakce - shrnutí

Imunitní systém nejlépe rozpoznává antigeny významně odlišné od vlastních molekul (jako jsou antigeny virů a bakterií). Nádorové buňky jsou z důvodu podobnosti s vlastními antigeny špatně rozpoznatelné. Hlavním důvodem je slabá exprese antigenů s významnou afinitou k receptorům T-lymfocytů, nedostatečná exprese MHC molekul (zejména třídy I), poruchy exprese adhesních kostimulačních molekul, případně exprese molekul inhibujících CTL nebo způsobujících jejich apoptosu.

Hlavními efektorovými buňkami v protinádorové imunitní reakci jsou CTL a NK buňky, kde první rozpoznávají specifické antigeny a druhé jsou buňkami nespecifickými. Aktivace

CTL může být přímá (samotnými nádorovými buňkami), ale nejčastěji je zprostředkována profesionálními buňkami prezentujícími antigen (DC buňkami a makrofágy). CD4+ T-lymfocyty poskytují ko-stimulační signály nutné pro správný rozvoj a udržení protinádorové imunitní reakce.

4. Hypertermie a imunitní reakce

Zvýšení tělesné teploty je fyziologickou obranou reakcí, která se patrně vyvinula jako obranná reakce proti mikroorganismům a virům. Příčinou je to, že některé mikroorganismy mají optimální teploty pro přežití v rozmezí od 35 do 37 °C a netolerují zvýšení teplot nad tyto hodnoty⁽³⁴⁾. Přímé cytotoxické účinky tepla však nejsou obvykle sami o sobě schopny eliminovat mikroorganismy. Důležitější jsou interakce mezi hostitelem (jeho imunitním systémem) a patogenem, které jsou zvýšenou teplotou ovlivněny. Tento jev byl prokázán u infekčních onemocnění⁽³⁵⁾.

S febrilními teplotami je spojena aktivace různých složek imunitního systému, jejichž výčet je uveden v tabulce 2⁽³⁶⁾. Ne všechny tyto změny jsou ve smyslu posílení imunity; například je popsáno snížení aktivity NK buněk při febrilních teplotách⁽³⁷⁾.

Zvýšená motilita neutrofilů a monocytů
Zesílení fagocytosy
Zvýšená produkce kyslíkových radikálů fagocytujícími buňkami
Vyšší produkce interferonu
Vyšší exprese Fc receptorů
Aktivace pomocných T-lymfocytů
Vyšší produkce protilátek
Zesílená proliferativní odpověď T-lymfocytů na nespecifické mitogeny, IL1 a 2
Lepší zabíjení intracelulárních bakterií
Indukce proteinů tepelného šoku (Hsp) u hostitele
Indukce proteinů tepelného šoku (Hsp) u patogenu

Tab. 2: Některé příznivé imunologické účinky tepla/febrilních stavů

Hypertermie v léčbě nádorových onemocnění využívá umělého zvýšení teploty nádorů nebo celého těla pomocí různých metod, které byly popsány výše. Všem hypertermickým metodám je společné zvýšení teploty na 41 - 45 °C. Předpokládá se, že tyto teploty jsou schopné navodit stimulaci imunitního systému. V literatuře existují práce popisující vliv HT na imunitní systém *in vitro*, ovlivnění imunity po celotělové hypertermii (whole body hyperthermia, WBH) a sporadické práce zkoumající vztah lokální hypertermie a imunity *in vivo*.

4.1. Ovlivnění imunitního systému *in vitro*

Expres a prezentace antigenů na nádorových buňkách

Zprávy o účinku hypertermie na antigenicitu nádorových buněk jsou protichůdné. Davies a kol. prokázali, že hypertermie snižuje antigenicitu nádorových buněk v důsledku ztráty a maskování melanomových povrchových antigenů⁽³⁸⁾. Jiná práce popisuje snížení schopnosti prezentace antigenů v kontextu MHC molekul II. třídy⁽³⁹⁾. Kuperberg a kol. prokázali snížení funkce buněk prezentujících antigen ve slezině v důsledku hypertermie⁽⁴⁰⁾. Tyto práce tedy poukazují na zhoršení antigenních vlastností a prezentace antigenů v důsledku hypertermie. Oproti tomu stojí práce novější, s protichůdnými výsledky. Michalek a kol. prokázali lepší prezentaci antigenu v komplexu s MHC molekulami II. třídy⁽⁴¹⁾ a Ito a kol. prokázali zvýšení exprese MHC antigenů I. třídy po hypertermii a toto zvýšení korelovalo s indukci proteinu tepelného šoku 70 (Hsp70)⁽⁴²⁾. Výsledky jsou tedy kontroverzní a není zřejmé, zda hypertermie způsobuje imuno-resistenci nebo zesílení imunogenicity nádorových buněk. Milani a kol. naznačují, že efekt hypertermie velmi silně závisí na použitém buněčném modelu a na velikosti a trvání tepelného stresu⁽⁴³⁾.

Monocyty/makrofágy

Monocyty a makrofágy jsou významnou subpopulací profesionálních buněk prezentujících antigen. Jejich primární úlohou je pohlcení antigenu v časných stádiích expozice antigenu, jeho zpracování a následná prezentace T-lymfocytům spojená s jejich selekcí a expanzí. Vliv teploty na aktivitu těchto buněk byl zkoumán na myším modelu a zjistilo se, že expozice peritoneálních makrofágů teplotám do 40 °C zvyšuje jejich fagocytosu o přibližně 40 % ve srovnání s kontrolami kultivovanými při teplotách 37 °C⁽⁴⁴⁾. Tato zjištění naznačují, že hypertermie má potenciál zvyšovat vychytávání antigenů makrofágy.

Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou považovány za centrální buněčnou populaci v generování protinádorové imunitní reakce. Mají potenciál aktivovat, selektovat a expandovat T-lymfocyty v lymfatických orgánech a patrně též v místě nádoru. Jsou též subpopulací nejintenzivněji studovanou z hlediska účinku hypertermie. Bylo zjištěno, že termální stres zvyšuje migraci DC z epidermis⁽⁴⁵⁾. Několik týmů prokázalo též maturaci DC buněk, která se projevila zvýšením exprese MHC antigenů třídy I a II, CD40, CD80 a CD86^(46,47). Hypertermie stimulovala produkci IL-12 (cytokinu odpovědného za stimulaci NK buněk a T-lymfocytů) aktivovanými DC⁽⁴⁸⁾. Vzhledem k tomu, že DC jsou nejúčinnějšími APC pro stimulaci naivních T lymfocytů, jsou klinicky nejvýznamnější studie hodnotící efekt teplem ovlivněných DC na stimulaci T-lymfocytů. Dendritické buňky stimulované ovalbuminem a následně ošetřené hypertermií lépe stimulovali produkci IFN-gamma v T-lymfocytech⁽⁴⁶⁾, stejně jako lépe stimulovaly proliferaci T-lymfocytů- specifických pro antigen⁽⁴⁷⁾. Podobné výsledky byly získány v myším modelu in vivo, kde byly DC od myši po celotělové hypertermii 4-krát účinnější ve stimulaci T-lymfocytů⁽⁴⁸⁾. V literatuře však lze nalézt i práce provedené na modelech in vivo, které ukazují na inhibici aktivity DC po aplikaci celotělové hypertermie⁽⁴⁹⁾. Předpokládá se tedy, že zvýšení teploty může aktivovat DC tak, že jsou lépe schopny iniciovat a regulovat imunitní reakci. Fyziologické zvýšení teploty může být exogenním signálem napomáhajícím dozrávání DC s následnou aktivací antigen specifických T-lymfocytů⁽⁵⁰⁾. Podrobnosti tohoto procesu však nejsou jasné a v literatuře existují protichůdné zprávy o účincích hypertermie in vivo.

Cytotoxické T-lymfocyty

Přímé ovlivnění CTL hypertermií není v literatuře popisováno. Řada prací se však zabývá aktivitou CTL stimulovanou DC nebo jinými APC buňkami (viz výše), případně aktivací CTL v důsledku zvýšení antigenicity nádorových buněk a exprese proteinů tepelného šoku.

NK buňky

Mechanismy regulující aktivitu NK buněk nejsou zatím zcela přesně známy. Nejčastěji citovanou hypotézou je „missing – self“ hypotéza, která předpokládá, že MHC antigeny I. třídy jsou kritickými inhibitory aktivity NK buněk. Chybění MHC molekul I. třídy však samo o sobě NK buňky neaktivuje a k aktivaci dochází v situaci, kdy cílové buňky exprimují aktivační ligandy. Mezi tyto ligandy patří některé molekuly indukované stresem, jako jsou MICA/B⁽⁵¹⁾ a proteiny tepelného šoku⁽⁵²⁾. Stejná skupina prokázala, že hypertermie indukuje

zvýšenou expresi Hsp70 na nádorových buňkách, která koreluje se zvýšenou lýzou způsobenou NK buňkami⁽⁵³⁾.

Význam proteinů- tepelného šoku (Hsp)

Proteiny tepelného šoku jsou jednou třídou stresových proteinů. Jejich název odráží stresový podnět, při kterém byly objeveny; jsou však exprimovány v buňkách po různých stresových stimulech jiných než je teplo a jejich konstitutivní varianty jsou exprimovány i za normálního stavu. Hlavními hsp savčích buněk jsou hsp25, hsp70, hsp90 a hsp110. Těmto proteinům se přisuzují dvě hlavní funkce:

- 1) účinkují jako molekulární chaperony; a
- 2) jsou signalizačními proteiny imunitního systému.

Při své chaperonové funkci se váží na syntetizované peptidy a brání jejich nesprávnému skládání a reakcím v průběhu syntézy, stejně jako regulují jejich aktivitu⁽⁵⁴⁾. Hsp se váží na určité konkrétní peptidové motivy a mohou mít tedy různou specifitu pro substráty⁽⁵⁵⁾. Funkcí těchto proteinů v signalizaci imunologické odpovědi se zabývá celá řada prací. Je známo, že APC mají na svém povrchu receptory specifické pro hsp⁽⁵⁶⁾. Tímto receptorem na monocytech je patrně CD14⁽⁵⁷⁾ a na makrofágách TLR4⁽⁵⁸⁾. Další prokázanou funkcí hsp je indukce maturace DC⁽⁵⁹⁾. V APC stimuluje hsp rovněž sekreci prozánětlivých cytokinů, jako je IL1 β , IL6, IL12 a TNF α ^(59,57,60).

Hsp se původně považovaly za intracelulární proteiny, ale v poslední době se množí zprávy o tom, že jsou za stresových situací lokalizovány na vnějším povrchu buněčné membrány nebo zcela mimo buňky. Například se prokázalo, že pokud nádorové buňky odumírají nekrosou, tak exprimují a uvolňují vysoké hladiny indukovatelného hsp70⁽⁶¹⁾. Pro hypertermii je navržena hypotéza, podle které teplo indukuje expresi hsp v buňkách, po jejich nekrose (způsobené obvykle kombinovanou léčbou) se hsp naváží na antigeny nádorových buněk a tyto komplexy se naváží na DC nebo jiné APC. Aktivované APC potom stimuluje naivní T-lymfocyty za indukce protinádorové imunitní reakce⁽⁶²⁾.

4.2. Celotělová hypertermie (WBH)

Při celotělové hypertermii se provádí ohřev celého organismu na teploty 41,8 °C (u člověka) po dobu nejméně 1 hodiny. Při samostatném použití poskytuje dobrý model pro výzkum změn imunologických parametrů. Vzhledem k slibným výsledkům se WBH používá i v klinické praxi u člověka a v literatuře jsou dostupné práce hodnotící změny v imunologických parametrech po WBH. Ahlers a kol. pozorovali po WBH krátkodobé snížení počtu periferních CD4+ a CD8+ T-lymfocytů a přechodné zvýšení počtu NK buněk⁽⁶³⁾. Jiná skupina prokázala významnou časovou závislost odpovědi. Bezprostředně po WBH došlo k dramatickému vzestupu periferních NK buněk a CTL, po 5 hodinách poklesly počty těchto populací k normě a ve třetí fázi odpovědi, za 48 hodin po WBH, došlo k významnému zvýšení periferních aktivovaných CTL⁽⁶⁴⁾. Zároveň dochází k poklesu CD4+ T-lymfocytů⁽⁶⁵⁾. Nejnověji publikovaná práce od autorů Atanackovic a kol. popisuje zvýšení NK a NKT buněk po WBH, společně s alterací T-lymfocytární populace ukazující na migraci naivních T-lymfocytů do lymfatických tkání a efektorových T-lymfocytů do periferních tkání⁽⁶⁶⁾. Existují tedy klinicky potvrzené důkazy o tom, že celotělová hypertermie ovlivňuje imunitní systém jedinců. Toto ovlivnění je pravděpodobně ve smyslu stimulačním, ač může přímý účinek tepla na buňky imunitního systému být i inhibiční, zejména je-li hodnocen bezprostředně po aplikaci.

4.3. Regionální hypertermie a ovlivnění imunitního systému

Nejméně popsanou situací je situace klinicky nejpoužívanější, tj. regionální léčba nádorového onemocnění a její systémové důsledky pro imunitní systém. Vzhledem k obtížím spojeným s výzkumem této situace na zvířecím modelu pocházejí literárně dostupné údaje z několika prací provedených na člověku. Ostapenko a kol. hodnotili u 11 pacientů s hepatocelulárním karcinomem imunologické změny indukované 7 aplikacemi lokální kapacitní hypertermie. Pozorovali snížení poměru CD4/CD8 lymfocytů a aktivaci NK buněk u pacientů, kteří měli nízkou nebo normální úroveň aktivace před léčbou. Když autoři hodnotili změny v průběhu hypertermie, zjistili významnou aktivaci NK buněk již po 20 minutách po zahájení léčby (léčba trvala 60 minut)⁽⁶⁷⁾. Lokální hypertermii a její efekt na imunitní systém hodnotili polští autoři. Autoři opět hodnotili poměr CD4/CD8 lymfocytů a aktivitu NK buněk. Po hypertermii došlo k nárůstu aktivity NK buněk na 120 – 130 % původních hladin. Jak uzavírají tito autoři, může mít takové zvýšení určitý klinický význam⁽⁶⁸⁾. Stejná skupina hodnotila v další práci aktivační imunologické parametry, které byly před provedením hypertermie v oblasti karcinomu prostaty snižené (PHA transformační

index, Noc-A indukovaná supresorová aktivita T-lymfocytů a další). Tyto parametry se po hypertermii významně zvýšily s maximem 2 měsíce po aplikaci⁽⁶⁹⁾.

V současnosti existují významné důkazy pro stimulaci imunitního systému hypertermií. Tyto důkazy pocházejí zejména z pokusů in vitro a částečně z prací hodnotících efekt celotělové hypertermie. Odpověď imunitního systému na hypertermii aplikovanou pouze lokálně na nádorové ložisko je nejasná, přestože se jedná o nejčastější klinicky používanou situaci.

5. Imunologická odpověď na lokální mikrovlnou hypertermii v myším melanomovém modelu

Cílem experimentální práce bylo objasnění změn, ke kterým dochází v mikroprostředí nádoru (lokální odpověď) a ve slezině (systémová odpověď) pokusných zvířat po mikrovlnné hypertermii aplikované lokálně na nádor. Paralelně jsme hodnotili efekt hypertermie in vitro na efektorové a melanomové buňky s cílem eliminovat nežádoucí účinky anestezie použité in vitro. Konkrétní otázkou bylo, zda lokálně provedená hypertermie nádorového onemocnění indukuje změny imunitního systému ve vzdálených/systémových lymfatických orgánech.

5.1. Materiál a metody:

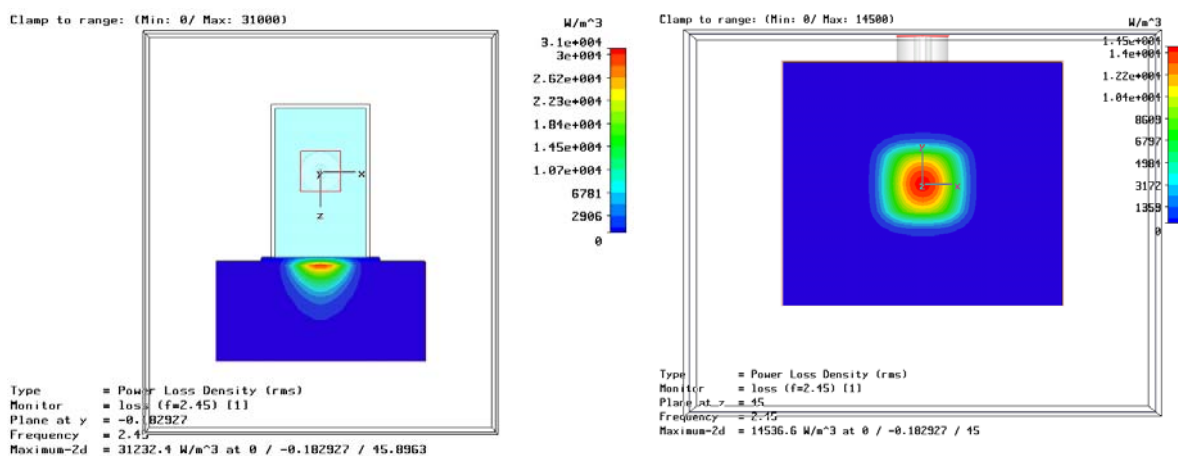
5.1.1. Pokusná zvířata: Inbrední samci myši C57/BL6 stáří 8 týdnů byli zakoupeni od Charles River (D). Myši byly chovány za přirozených podmínek se světelným cyklem den/noc (22 °C, 55% vlhkost vzduchu) a byly krmeny komerčně dostupnými peletami (Velaz - ST1) *ad libitum*. Pokusy se zahájily nejdříve dva týdny po převozu zvířat, aby se vyloučily imunologické změny způsobené stresem při transportu. Jako syngenní nádorový model jsme použili myši melanomovou buněčnou linii - B16F10 – odvozenou od C57/BL6 myši (získanou od Weizmann Institute, Rehovot, Israel). B16F10 buňky (10⁶/myš v 0,1ml PBS) se v den 0 naočkovaly podkožně (s.c.) do oblasti levého boku zvířat. Myši s nádory velikosti 1-2 cm v největším rozměru se náhodně rozdělily do tří skupin: 1) anestetizovaná zvířata léčená hypertermií (HT); 2) anestetizovaná zvířata bez aplikace hypertermie (anest); 3) neléčená zvířata (kontrola). Všechny postupy byly provedeny v souladu s Evropskou konvencí pro použití laboratorních zvířat.

5.1.2. Hypertermie

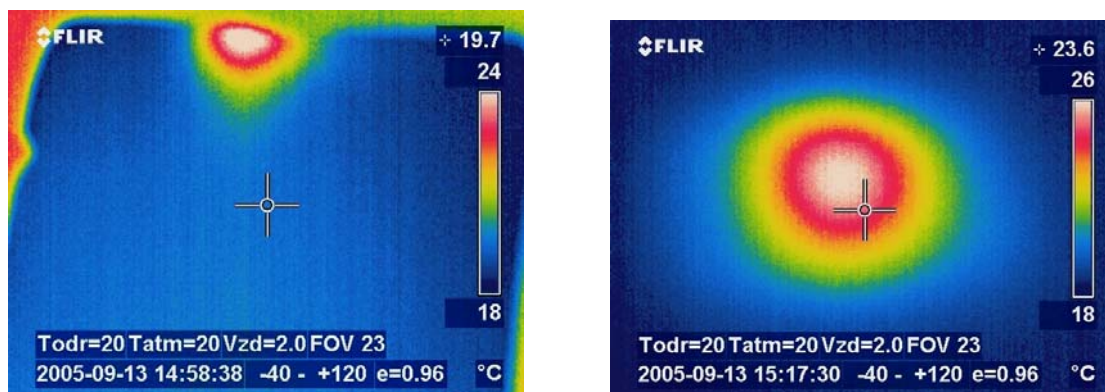
Lokální hypertermie se provedla v celkové anestezii pokusných zvířat (ketamin: 1,9mg/myš a

xylazin: 0,25mg/myš o hmotnosti 25-30g, *i.p.*). Pro ohřev nádoru se použil mikrovlnný generátor s pracovní frekvencí 2450 MHz a výkonem 10 W, na který byl napojen aplikátor na bázi konvenčního vlnovodu vyrobený na katedře elektromagnetického pole ČVUT. Tento aplikátor má efektivní aperturu 2x2 cm a vypočtenou a změřenou distribuci teploty ukazuje obrázek 7.

Počítačový model

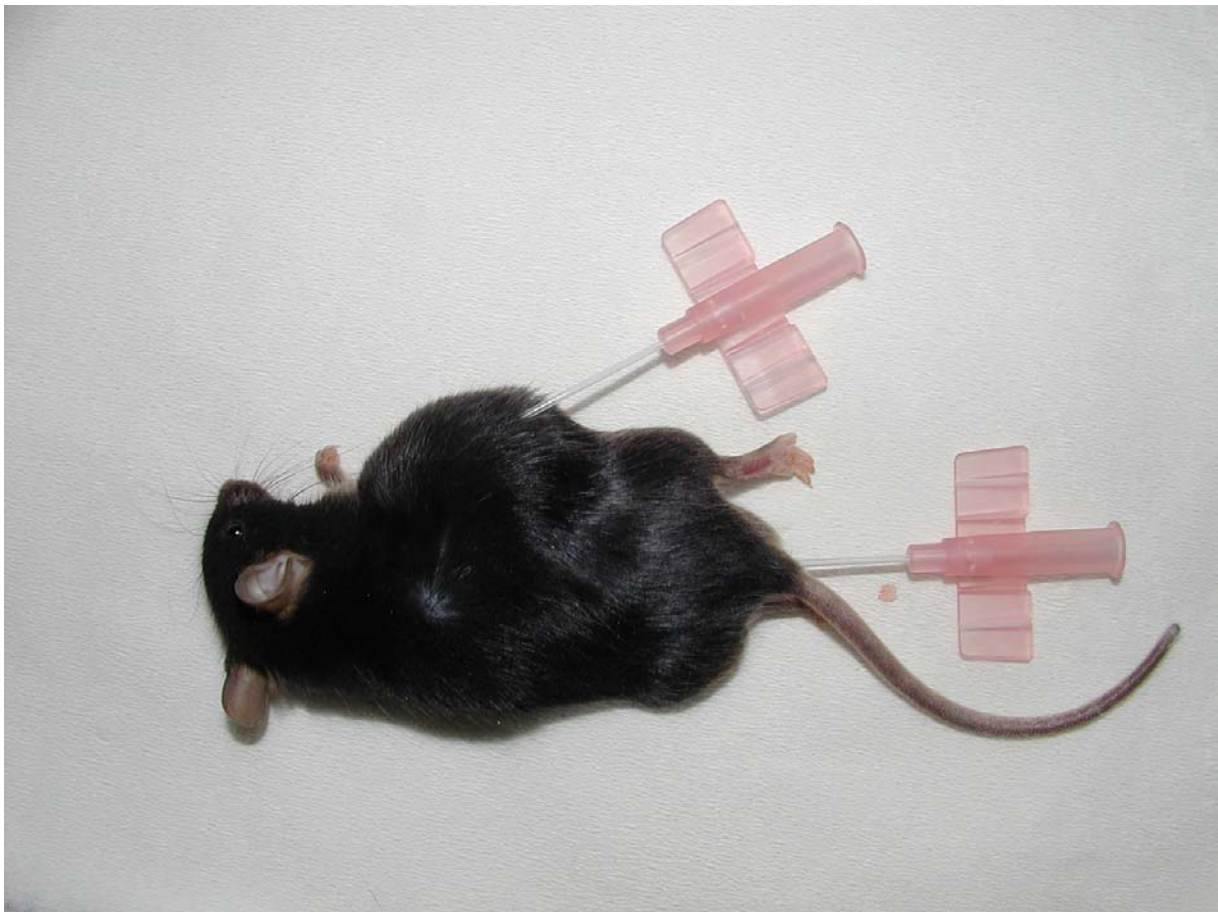


Měření provedená termokamerou



Obr. 7: Vypočítaný a změřený teplotní profil pro aplikátor na bázi konvenčního vlnovodu použitý pro lokální mikrovlnou hypertermii na myším modelu maligního melanomu (s laskavým svolením MUDr. Ing. J. Cveka, PhD).

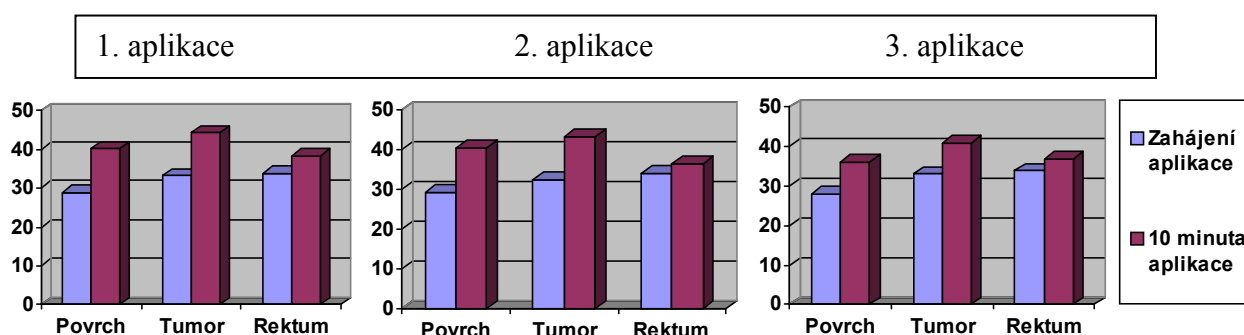
Během celé doby aplikace LHT se měřila teplota na povrchu nádoru, intratumorosně a v rektu pokusných zvířat, za použití fluorooptického teploměru (LUXTRON, Luxtron Corporation CA). Cílová teplota (42 °C) v nádoru byla dosažena během 1 minuty a byla udržována pulsy mikrovln po dobu 7 minut. Teplota v rektu pokusných zvířat nesměla překročit 38 °C. Obrázek 8 ukazuje pokusné zvíře s aplikovanými kanylami pro zavedení termometrických sond.



Obr. 8: C57/BL6 myš se syngenním melanomem v oblasti pravého boku se zavedenými kanylami pro termometrické sondy.

Ve skupině zvířat léčených hypertermií jsme provedli tři ohřevy ve dnech 10, 14 a 17 po naočkování nádorových buněk. Zvířata v kontrolní skupině se samotnou anestesií

byla uvedena do anestezie ve stejné dny. Kontrolní myši byly ponechány bez léčby. Průměrné teploty dosažené v prvních dvou sériích experimentu ukazuje obrázek 9.



Obr. 9: Teplotní profily v průběhu lokální mikrovlnné hypertermie u experimentálních zvířat. Teplota měřená na povrchu nádoru, intratumorosně a rektálně. N=24.

Dvanáct hodin po poslední hypertermii byla všechna zvířata usmrcena a pro další laboratorní zpracování se odebraly nádory, sleziny a periferní krev.

5.1.3. Izolace buněk z myší sleziny (SC) a leukocytů infiltrujících nádor (TIL)

Sleziny se disociovaly pomocí nylonové sítky, opakovaně se promyly a ihned se použily pro analýzu průtokovou cytometrií (FACS) nebo pro pokusy *in vitro*. Leukocyty infiltrující nádor (TIL) se připravily z jednotlivých melanomů rozdrcených nůžkami, buňky se propláchly opakovaným pipetováním a mononukleární buňky se separovaly na Ficoll-Hypaque gradientu (1,086). Čerstvě separované mononukleární buňky se použily pro následnou fenotypizaci a pro funkční testy.

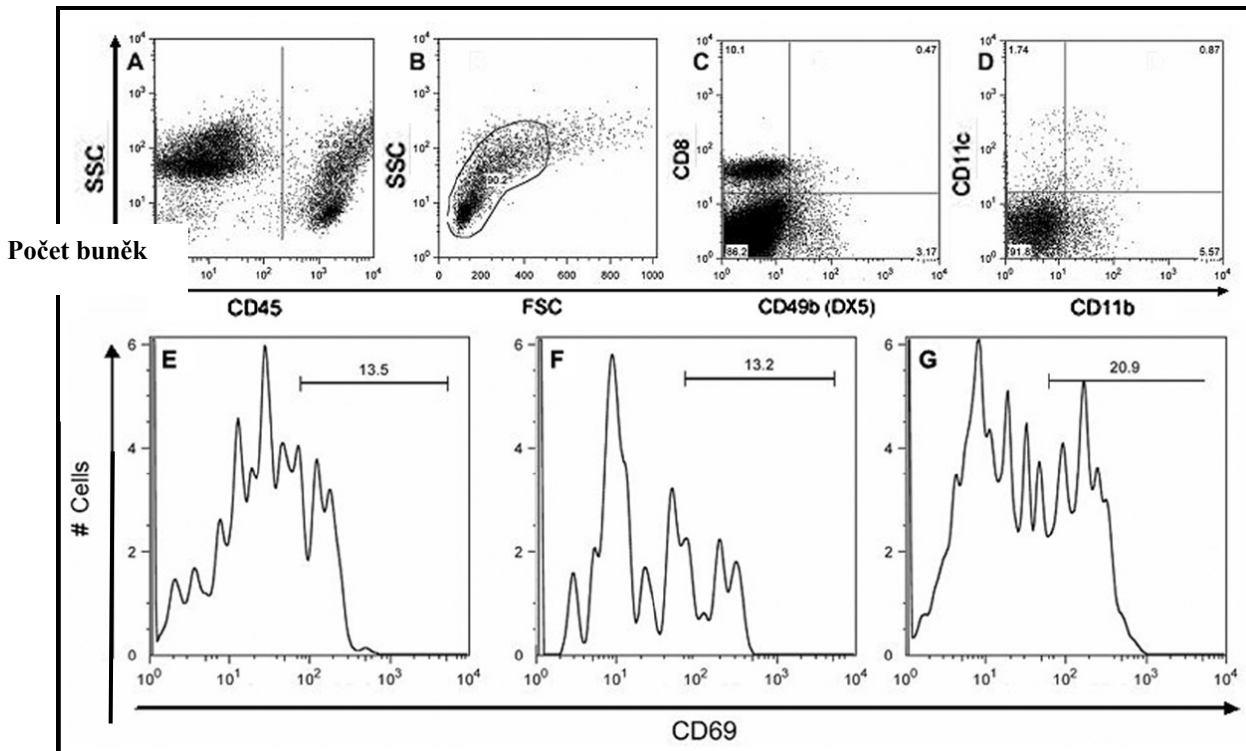
5.1.4. Buněčné kultury a pokusy *in vitro*

Buněčné linie YAC-1 (myší NK-senzitivní T lymfom) a B16F10 (myší melanom) se kultivovaly v RPMI-1640 mediu doplněném 2 mM L-glutaminu, 1 mM pyruvátu sodného, 0,05 mM 2-merkaptoethanolu, antibiotiky (0,05 mg/ml gentamycinu, 25 mg/ml amfotericinu B) a 10% teplem inaktivovaným fetálním telecím sérem - FCS

(Gibco, Grand Island, NY, USA). Testy cytotoxické aktivity buněk izolovaných z myších slezin se provedly v RPMI 1640 mediu doplněném L-glutaminem, gentamycinem a 5% FCS. Inkubace se provedla při 37 °C ve zvlhčované atmosféře obsahující 5% CO₂ v CO₂ inkubátoru (Jouan, France). Pro *in vitro* modifikaci hypertermie se B16F10 buněčná linie (jako cílové buňky) a splenocyty (jako efektorové buňky) kultivovaly při 37 °C nebo 42 °C, ve zvlhčované atmosféře a 5% CO₂. Efektorové nebo cílové buňky se při hypertermii přenesly do předem zahřátého kultivačního media a provedla se inkubace při 42 °C po dobu 10 minut, buď jedenkrát, nebo třikrát podle stejného protokolu jako při pokusech *in vivo*. Buňky se potom odebraly a použily se jako efektorové nebo cílové buňky v testech cytotoxicity.

5.1.5. Průtoková cytometrie

Suspenze jednotlivých buněk připravených z nádorů a slezin se resuspendovaly v PBS s 0,1% želatinou (Sigma) a 0,01% azidem sodným. Fenotypy buněk se stanovily pomocí povrchových markerů pro T-lymfocyty - CD3-PECy5 (17A2), CD4-FITC (H129.19), CD8-PE (53-6.7), B-lymfocyty – CD45R/B220-Alexa405 (RA3-6B2), monocyty, APC - CD11b-Pacific Blue (M1/70.15), CD11c-FITC (HL3), NK buňky – CD49b-FITC (DX5), aktivační antigeny NK1.1-PECy7 (PK136), CD69-PECy5 (H1.2F3) a analýza se provedla pomocí FACS LSR II (Becton-Dickinson, USA). Barvení za použití pěti nebo šesti barev se provedlo podle návodu výrobce. Barvení na CD45-PECy7 (30-F11) společný leukocytární antigen (LCA) se provedlo za účelem odlišení leukocytů od residuálních melanomových buněk v TIL frakci. Dále se separovaly PI negativní (živé) CD45 pozitivní (leukocyty, obrázek 10) buňky s lymfocytární a monocytární morfologií (hlavní „lymfomono-gate“, SSC vs FSC, obrázek 10) a tato populace se analyzovala na expresi povrchových markerů (obrázek 10C, 10D). Postup separování ilustrativně ukazuje obrázek 10. Monoklonální protilátky byly zakoupeny buď od Pharmingen (San Diego, CA, USA), nebo od Caltag (San Francisco, CA). Data byla vyhodnocena za použití FlowJo verze 6.1.1 softwaru (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).



Obr. 10: FACS analýza exprese povrchových markerů. PI negativní (není uvedeno) a CD45 pozitivní buňky (A), s lymfocytární/monocytární morfologií (B), se analyzovaly na expresi povrchových markerů NK/CTL buněk (C) a monocytů/DC subpopulace (D). Tyto subpopulace se dále analyzovaly na expresi CD69 (E, F, G), která se měnila statisticky významně při srovnání hypertermovaných zvířat (G), kontrol (E) a anestetizovaných zvířat (F) pouze v případě CD45+/CD49b-CD8-/CD11b+CD11c- buněk (monocytů). Histogramy (E, F, G) reprezentují procento CD69 pozitivních buněk z původní populace (CD45+, CD49b-/CD8-/CD11b+/CD11c-). Obrázek ukazuje ilustrativní výsledky pro čtyři pokusy provedené se stejnými výsledky.

Testy cytotoxicity

Buňkami zprostředkovaná cytotoxicita se hodnotila za použití standardního testu uvolňování ^{51}Cr za použití splenocytů od pokusných zvířat jako efektorových buněk. Jako cílové buňky se použily YAC-1, myší NK-senzitivní buněčná linie, a B16F10 melanomová buněčná linie, a tyto buňky se značily 60-minutovou inkubací s $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ v 96-jamkových mikrotitračních plotnách (NUNC), při 37°C ve zvlhčované atmosféře obsahující 5% CO_2 . Zhodnocení lytické aktivity efektorových buněk proti 10^4 cílových buněk se provedlo po 4 hodinách inkubace způsobem

popsaným dříve⁽⁷⁰⁾. Potom se odebraly supernatanty neobsahující buňky (0,025 ml/vzorek), přidalo se 0,1 ml scintilační směsi (SuperMix, Wallac, Finland) a změřila se radioaktivita za použití scintilačního měřícího přístroje Microbeta Trilux (Wallac, Finland).

5.1.6. Statistická analýza

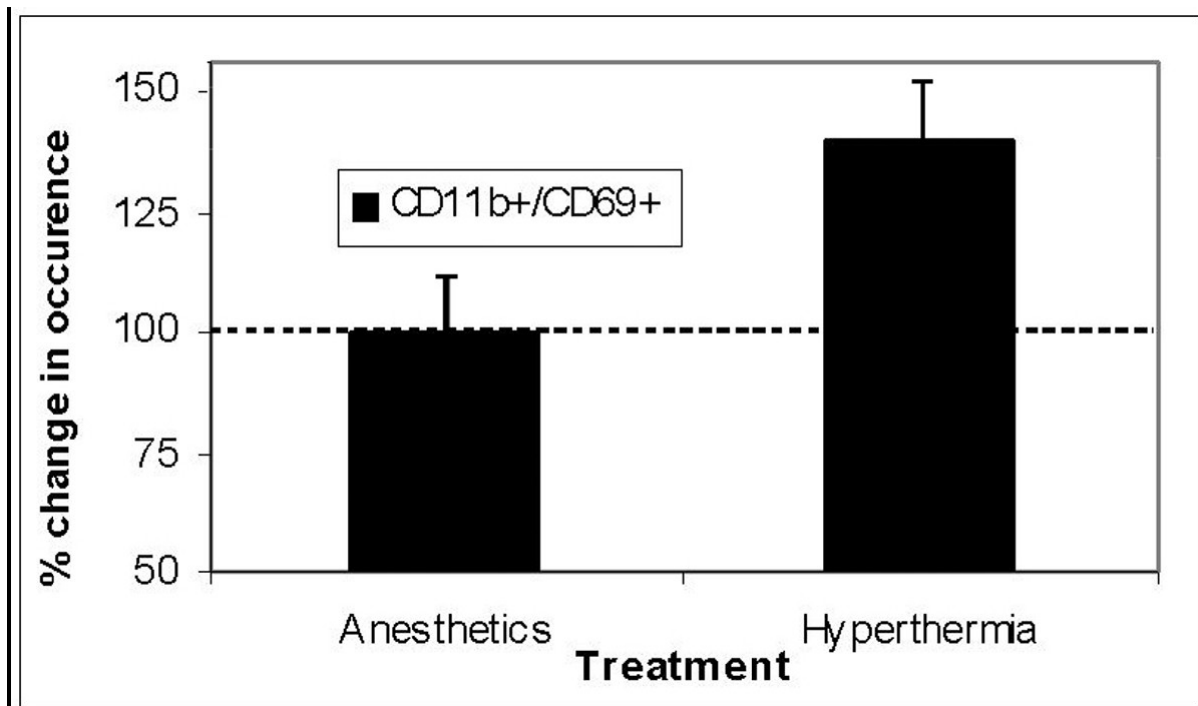
Získané výsledky se analyzovaly jednocestnou analýzou variance (ANOVA), hodnoty $p \leq 0,05$ se považovaly za statisticky významné ($P \leq 0,05$ - *, $P \leq 0,01$ - **).

5.2. Výsledky:

Provedli jsme 4 série pokusů s 22 zvířaty ve skupině léčené hypertermií (HT), 17 v kontrolní skupině s anestesií (anest) a 16 zvířaty ve skupině bez léčby (kontrola), ve kterých jsme hodnotili efekt lokální hypertermie na imunologickou odpověď zvířat s nádory a na distribuci leukocytů v různých kompartmentech (slezině, nádorech). Pro stanovení vlivu lokální hypertermie na aktivaci a poměrné zastoupení imunitních buněk se použila polychromatická FACS analýza s markery specifickými pro jednotlivé subpopulace a pro jejich aktivaci. Funkční aktivity cytotoxických buněk (NK, CTL) se měřily standardním testem uvolňování ⁵¹Cr jak *in vivo*, tak *in vitro*.

5.2.1. Lokální hypertermie vyvolává změny v mikroprostředí nádoru

V experimentech jsme pomocí FACS stanovili distribuci lymfocytů infiltrujících nádor (TIL) v maligních melanomech. V zastoupení CTL, NK buněk a APC v mikroprostředí nádoru jsme nezjistili žádný rozdíl mezi kontrolní, anestetizovanou a hypertermovanou skupinou zvířat. Dále jsme zkoumali změny v zastoupení časného aktivačního antigenu CD69 v různých TIL subpopulacích – NK, CTL, APC, DC (obrázek 10 E, F, G). Výsledky uvedené na obrázku 11 prokazují zvýšenou expresi CD69 pouze na monocytární populaci (CD8-/CD49b-/CD11b+/CD11c-). Počty aktivovaných monocytů (CD11b+/CD69+) u kontrolních a anestetizovaných myší byly podobné, $12 \pm 1,7$ %, zatímco ve skupině léčené lokální hypertermií bylo pozorováno 40% zvýšení ($17 \pm 2,6$ %) těchto buněk v TIL frakci.



Obr. 11: Procento výskytu aktivovaných monocyťů (CD11b+/CD69+) v TIL frakci. Počty aktivovaných monocyťů (CD11b+/CD69+) u kontrolních a anestezovaných myší byly podobné, $12 \pm 1,7$ %, zatímco ve skupině léčené lokální hypertermií bylo pozorováno 40% zvýšení ($17 \pm 2,6$ %). Procentuální zastoupení bylo počítáno z CD45 pozitivních buněk v TIL frakci a je uvedeno jako procentuální změna ve vztahu ke kontrole považované za 100 % (přerušovaná čára).

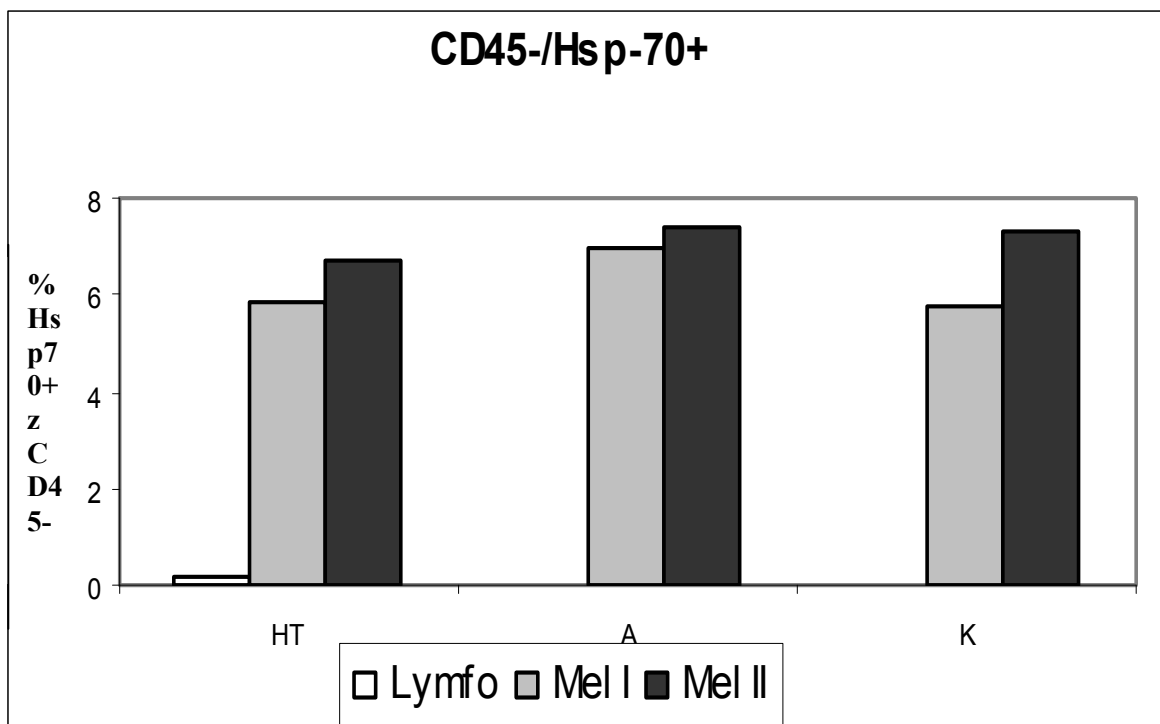
5.2.2. Membránová ϵ

Anestezie

Hypertermie

Léčba

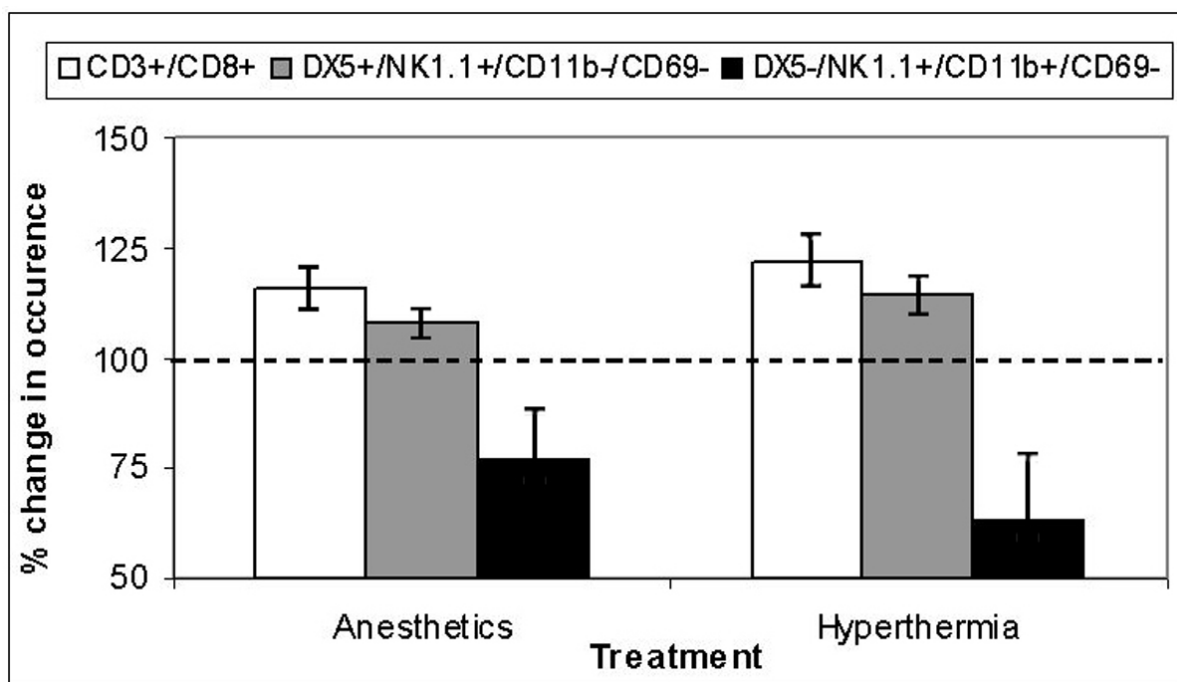
Dalším krokem bylo hodnocení membránové exprese hsp70 v nádorové tkáni. Nepodařilo se nám prokázat žádný rozdíl mezi skupinami léčenými hypertermií a kontrolními skupinami (anestezované myši a neléčené myši). Výsledky ukazuje obrázek 12.



Obr. 12. Membranová exprese Hs p70+ na nádorových buňkách.

5.2.3. Efekt lokální hypertermie na distribuci imunitních buněk ve slezině

Naše práce prokázala změny v zastoupení populací imunitních buněk v sekundárním lymfatickém orgánu, slezině, které následovaly po lokální hypertermii. Ve slezinách pokusných zvířat jsme sledovali podobné parametry jako v nádorech, bez barvení pro CD45. Výsledky ukázaly zvýšení počtu cytotoxických T lymfocytů (CD3+/CD8+) o 22 %, zvýšení počtu NK (CD49b-/NK1.1+) buněk o 14 % a snížení počtu subpopulace monocytů nesoucích znaky NK buněk (CD49b-/NK1.1+/CD11b+) o 37 %. Obrázek 13 ukazuje tyto detekované změny. Tyto změny byly podobné, ač ne tak výrazné, ve skupině ošetřené pouze anesthesií. Lokální hypertermie tedy zvýšila počet CTL a NK buněk ve slezině pokusných zvířat.



Obr. 13: Distribuce subpopulací imunitních buněk ve slezinách po lokální hypertermií. Uvedené hodnoty představují procentuální změnu vůči kontrolám. Kontrolní hodnoty (považované za 100 %) byly pro CTL – 55 % (CD8+ z CD3+); pro NK buňky – 36 % (NK1.1+ z CD49b+); pro NK1.1 pozitivní monocyty – 17,5 % (NK1.1+ z CD11b+). Data představují průměr ± s

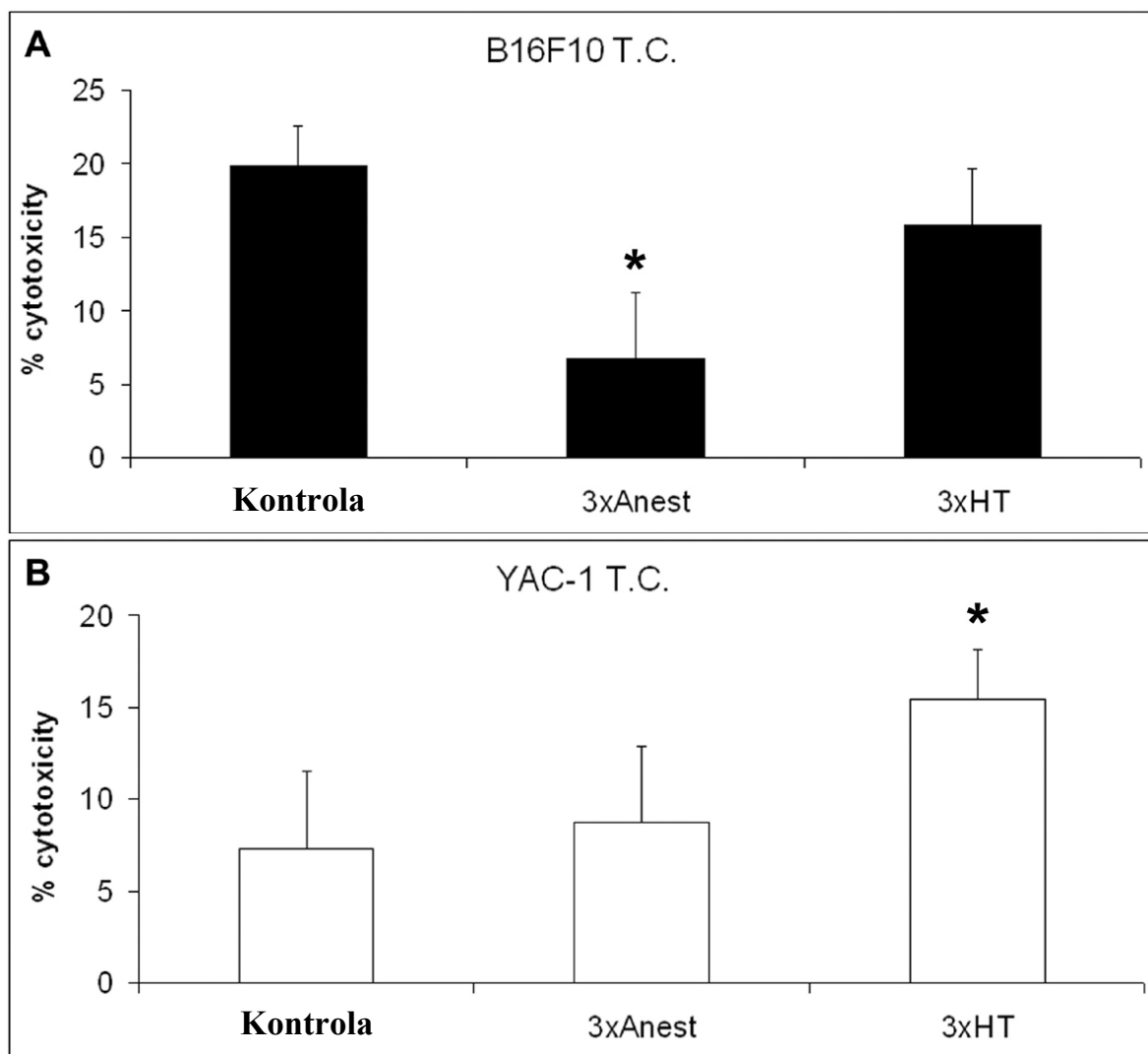
Anestésie

Hypertermie

Léčba

5.2.4. Testy cytotoxicity

Kromě hodnocení zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací ve slezinách pokusných zvířat je významnou otázkou, zda lokální hypertermie ovlivňuje funkci těchto buněk. Proto jsme provedli testy cytotoxicity proti NK-senzitivní (YAC-1) nebo syngenní (B16F10) melanomové buněčné linii jako cílovými buňkami ve standardním testu uvolňování ^{51}Cr . Výsledky ukázaly, že anestésie dramaticky snižuje cytotoxickou aktivitu efektorových buněk proti B16F10 melanomovým buňkám, ale lokální hypertermie rušila tento negativní efekt anestésie a navracela cytotoxicitu na původní úroveň. Pro NK-senzitivní YAC-1 buněčnou linii jsme nepozorovali toto zeslabení cytotoxicity a lokální hypertermie významně zvyšovala efektorovou funkci NK buněk. Dohromady tyto výsledky naznačují, že hypertermie stimuluje funkční aktivitu efektorových buněk ve specifické i přirozené cytotoxické reakci proti B16F10 a YAC-1 cílovým buňkám, při srovnání s anestetizovanou kontrolní skupinou. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 14.



Obr. 14: Specifická (A) a přirozená (B) cytotoxicita splenocytů proti syngenním B16F10 melanomovým nebo NK-senzitivním YAC-1 cílovým buňkám při E:T poměru 32:1 po lokální hypertermii aplikované *in vivo*. Specifická cytotoxicita proti B16F10 melanomu byla snížena v důsledku použití anestetik – tento efekt byl vyrušen hypertermií (A). Pro NK cytotoxicitu nebylo pozorováno snížení v důsledku anestezie (B) a hypertermie. Hvězdička označuje statisticky významnou změnu proti neléčené kontrole (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

5.2.5. Přímý účinek tepla na melanomové nebo efektorové buňky *in vitro*

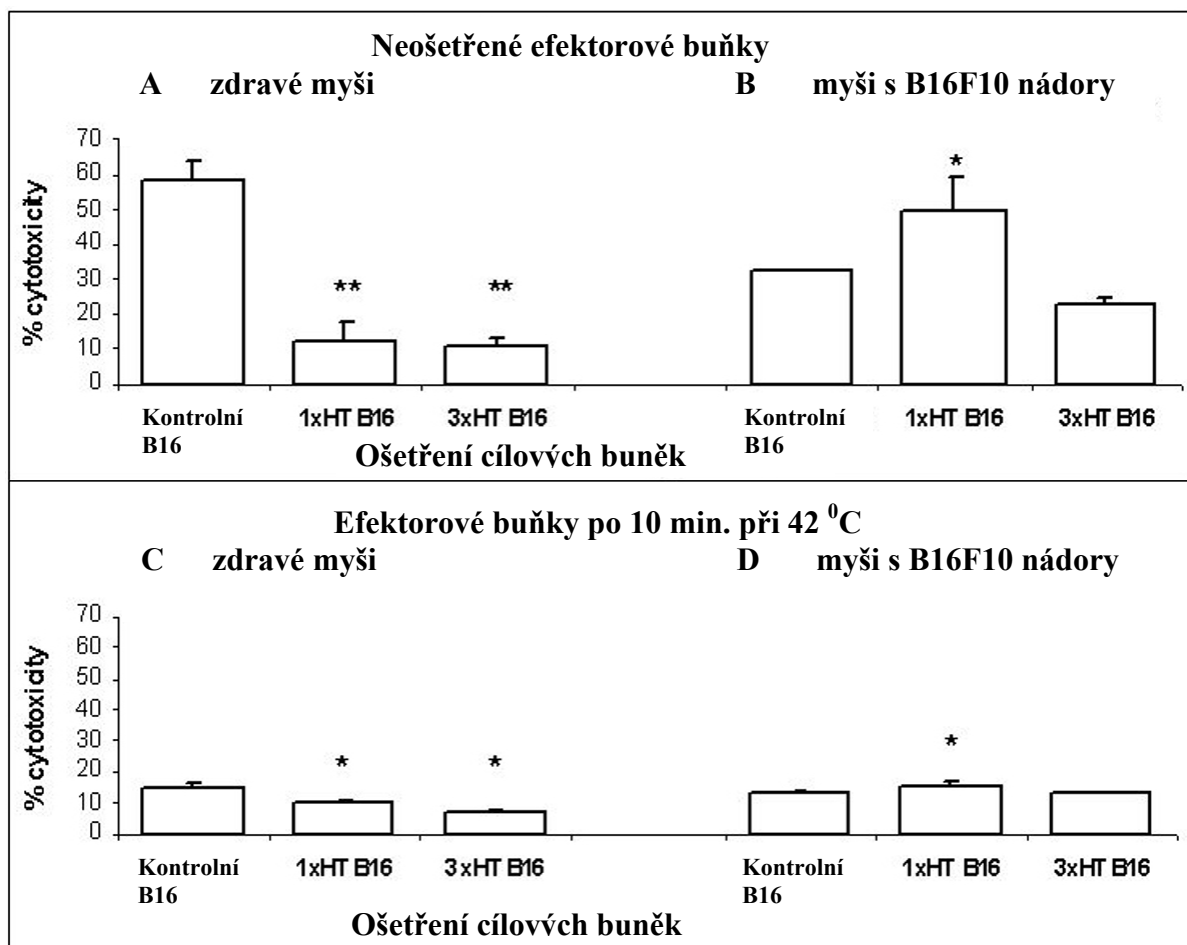
Pro eliminaci vlivu anestezie a pro zkoumání efektu hypertermie na nádorové buňky nebo na efektorové lymfoidní buňky jsme provedli *in vitro* modifikaci pokusů. V tomto pokusu jsme použily splenocyty buď od zdravých myší, nebo od myší s B16F10 melanomy jako efektorové buňky a B16F10 melanomové buňky jako cílové buňky.

Hypertermii jsme aplikovali na B16F10 buňky 1-3 krát, vždy po dobu 10 minut, inkubací při 42 °C, v atmosféře 5% CO₂, podle stejného protokolu jako při léčbě *in vivo* (3xHT ve dny 0, 4 a 7). Buňky neošetřené hypertermií byly kultivovány za stejných podmínek, pouze při teplotě 37 °C. Čerstvě izolované splenocyty od myší s nádory nebo od zdravých zvířat se zahřívaly po dobu 10 minut při 42 °C (Obrázek 15 C, D) bezprostředně před pokusem, zatímco neošetřené efektorové buňky se kultivovaly při 37 °C (obrázek 15 A, B) v 96-jamkové plotně. Cílové B16F10 melanomové buňky značené ⁵¹Cr po aplikaci HT (bez aplikace, 1xHT a 3xHT, jak ukazuje obr. 15) se potom promyly a provedl se test cytotoxicity se splenocyty v E:T poměru 32:1. Cytotoxicita se měřila ve standardním testu 4-hodinového uvolňování ⁵¹Cr.

Hypertermie efektorových buněk způsobila silnou inhibici cytotoxicity proti neošetřeným B16F10 cílovým buňkám, která byla výraznější u zdravých zvířat (pokles na 26 %, obr. 15

A proti C) než u zvířat s nádory (na 41 %, obrázek 15B proti D). Další významný pokles jsme pozorovali u cytotoxické aktivity zdravých splenocytů, když byly jako cílové buňky použity melanomové buňky ošetřené hypertermií (obrázek 15A). Nepozorovali jsme žádný rozdíl mezi 1 a 3 sériemi hypertermie. Naopak, cytotoxicita splenocytů od zvířat s nádory byla statisticky významně vyšší, když byla na B16F10 melanomové cílové buňky aplikována 1-krát hypertermie. Toto zvýšení již nebylo patrné po 3 sériích hypertermie cílových melanomových buněk (Obrázek 15B).

Prezentované výsledky demonstrují inhibiční vliv HT na efektorové buňky, který je dobře znám z prací jiných autorů při použití teplot v tumoricidním rozmezí (T≥42 °C). Cytotoxická odpověď efektorových buněk na hypertermií ošetřené melanomové buňky je však opačná v případě zdravých zvířat (kde zůstává inhibována – obrázek 15. A, C) a zvířat s nádory (kde jsme prokázali stimulaci – obrázek 15B,D). Lepších výsledků jsme dosáhli při použití jedné hypertermie.



Obr. 15: Cytotoxicita splenocytů proti B16F10 melanomovým cílovým buňkám po *in vitro* aplikované HT na efektorové nebo cílové buňky. Cytotoxicita splenocytů izolovaných od zdravých zvířat (A,C) nebo od zvířat s B16F10 melanomy (B,D) proti syngenní B16F10 buněčné linii: kontrola – neošetřeno, 1x HT B16 nebo 3x HT B16 - B16F10 buňky s jednou nebo třemi aplikovanými hypertermiemi (10 min. při 42 °C). Efektorové buňky se inkubovaly po dobu 10 minut buď při 37 °C (A, B) nebo 42 °C (C, D). Testy cytotoxicity se provedly při E:T poměru 32:1, data reprezentují průměr ±SD tří pokusů provedených pětkrát pro každý vzorek. Statisticky významné změny vzhledem k neléčeným myším jsou označeny hvězdičkou (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5.3. Diskuse:

Jednou z příčin progresu nádorových onemocnění je selhání rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem. V naší práci jsme prokázali zvýšení počtu aktivovaných monocytů v mikroprostředí B16F10 melanomu, který je primárně špatně rozpoznatelným nádorem pro imunitní systém. Tyto monocyty jsou účinnými

buňkami prezentujícími antigeny (APC) a proto usnadňují účinnou identifikaci nádorových buněk dalšími imunokompetentními buňkami. Souvislost se zvýšenou expresí hsp70 se v našem experimentu nepodařilo prokázat, práce jiných autorů však ukazují, že mohou existovat alternativní cesty zvýšení antigenicity nádorových buněk v důsledku hypertermie.

Lepší prezentace antigenů se v našem pokusu odrazila ve zvýšení CTL a NK buněk ve slezinách pokusných zvířat. Toto kvantitativní zvýšení bylo doprovázeno zvýšením cytotoxicity proti melanomovým buňkám (obrázek 14), které jsme pozorovali též *in vitro* pro splenocyty od zvířat s melanomy (obrázek 15B). Předpokládáme, že příčinou snížení cytotoxicity v pokusech *in vitro*, kdy splenocyty od zdravých zvířat nebyly v předchozím kontaktu s melanomovými buňkami, je nedostačující antigenní stimulace efektorových imunitních buněk. Kromě toho může za určitých okolností hypertermie způsobovat shlukování a maskování povrchových antigenů⁽³⁸⁾ (obrázek 15A,C). Předchozí kontakt s melanomovými buňkami a následná aktivace imunitního systému jsou zřejmě zásadní podmínkou pro efektorové funkce cytotoxických buněk.

Funkční testy *ex vivo* za použití B16F10 buněčné linie jako cílových buněk prokázali zeslabení cytotoxicity anestetiky, ale toto zeslabení se po aplikaci lokální hypertermie vrátilo na kontrolní úroveň (obrázek 14A). Na druhou stranu, přirozená cytotoxicita proti YAC-1 cílovým buňkám nebyla při použití anestetik narušena (obrázek 14B). Pokud předpokládáme, že se na celkové cytotoxicitě proti B16F10 cílovým buňkám podílí přirozená a specifická složka imunitní reakce, tak je v usmrcování B16F10 melanomových buněk hlavní složkou specifická imunitní reakce. Anestetika potom ovlivňují specifickou imunitu samotnou nebo prezentaci antigenů, která je nutná pro správnou funkci složek imunitního systému. Podle literatury patří mezi změny indukované hypertermií zvýšení imunogenicity nádoru cestou indukce exprese hsp70⁽⁷¹⁾, MHC II-⁽⁴¹⁾ a MHC I-mediovaná prezentace antigenů⁽⁴²⁾. Naše výsledky, které prokazují zvýšení počtu aktivovaných monocytů v primárním hypertermovaném nádoru, následné zvýšení počtu CTL a NK buněk ve slezinách pokusných zvířat doprovázené stimulací specifické a přirozené cytotoxické aktivity, jsou příspěvkem k poznání mechanismů účinku hypertermické léčby v kontextu nádorových onemocnění. V souladu s již prezentovanými výsledky

předpokládáme, že hypertermie zvyšuje antigenicitu nádorových buněk, což vede k jejich lepšímu rozpoznání monocyty infiltrujícími nádor. Aktivované monocyty potom zřejmě prezentují antigeny dalším subpopulacím imunitního systému (Th, CTL) a aktivují je pro jejich efektorové funkce, což se v našem pokusu odráží ve zvýšeném počtu NK buněk a CTL ve slezinách a v jejich cytotoxické aktivitě. Pokusy in vitro doplňují naši práci o poznatek, že předchozí kontakt efektorových buněk s buňkami nádorovými je zásadní pro udržení této odpovědi. Podle našich znalostí se jedná o první práci, která prokazuje systémovou aktivaci imunitního systému v důsledku hypertermie lokálně aplikované na nádorové onemocnění.

6. Závěr

Hypertermie je relativně novou metodou protinádorové léčby, která se poměrně pomalu dostává do povědomí odborné veřejnosti. Tato práce si klade za cíl stručně shrnout současný stav techniky a znalostí o této terapeutické modalitě. V první části jsou popsány základní fyzikální principy ohřevu biologické tkáně, stejně jako přístrojové vybavení vyvinuté ke klinickému použití hypertermie. Dále práce shrnuje nejnovější poznatky o mechanismech účinku, z nichž je největší důraz kladen na synergní působení hypertermie a ionizujícího záření na úrovni buněčné DNA.

Druhá část práce se týká druhého základního působení hypertermie, tj. jejích imunostimulačních účinků. Jedním z prvních kroků při vzniku nádorového onemocnění je nedostatečné rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem. Jednou z příčin je nedostatečná antigenicita nádorových buněk, další je inhibice aktivace imunitních buněk nádorem samotným. Hypertermie má potenciál modulovat imunitní systém, jak prokázali jiní autoři v pokusech in vitro nebo v pozorováních in vivo. Publikované výsledky mají však rozporuplné závěry a ukazuje se, že v používaných modelech hraje roli značné množství faktorů, včetně konkrétních buněčných linií, teplotní expozice, doby provádění analýzy (vzhledem k ohřevu), předchozí aktivace imunitních buněk kontaktem s nádorem. Nejčastěji uváděnou hypotézou je zvýšení antigenicity nádorových buněk cestou proteinů tepelného šoku (hsp), s následnou stimulací dendritických buněk a NK buněk. Dendritické buňky potom stimulují cytotoxické T-lymfocyty specifické pro nádorové antigeny.

Naše práce, podle našich znalostí, poprvé používá zvířecí model pro průkaz imunostimulačních účinků lokální hypertermie nádorového ložiska. Podařilo se nám prokázat řetězec dějů, který začíná aktivací monocytů v nádorovém ložisku, následně se odráží ve zvýšení počtu CTL a NK buněk ve slezinách pokusných zvířat. Toto zvýšení počtu buněk bylo doprovázeno zvýšením cytotoxické aktivity těchto buněčných subpopulací proti nespecifickým cílovým buňkám i proti buňkám maligního melanomu (který byl nádorem použitým v modelu). Lze tedy uvést, že lokální hypertermie v našem modelu aktivuje protinádorovou imunitní reakci u pokusných zvířat. Práci jsme doplnili pokusy in vitro, které prokázali souvislost mezi předchozím kontaktem imunitních a nádorových buněk a jejich aktivací hypertermií. Pokud tento kontakt nebyl přítomen, působila HT inhibičně. Tento výsledek ukazuje na možná úskalí pokusů prováděných in vitro, které tak mohou vést k falešným závěrům.

Naše práce je zaměřena na oblast, která v současné době nabývá na významu. S rozvojem lokální protinádorové léčby, zejména chirurgických metod a radioterapeutických metod, je pravděpodobnější likvidace makroskopického nádorového ložiska. V současné době se k eradikaci subklinické reziduální choroby používá chemoterapie, se všemi negativními důsledky pro imunitní systém. Hypertermie má potenciál navodit specifickou imunostimulaci směřovanou na reziduální nádorové buňky, což může významně přispět ke zlepšení léčebných výsledků, a to bez destruktivních nežádoucích účinků, které jsou pro současnou léčbu typické.

Literatura:

- (1) Coley W (1897) Inoperable sarcoma cured by mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus. *Surg Gynecol Obstet.* 13: 174-190;
- (2) Colombo R, Da Pozzo LF, Salonia A, Rigatti P, Leib Z, Baniel J, Caldarera E, Pavone-Macaluso M. Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2003 Dec 1;21(23):4270-6.
- (3) Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K. (2001) Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225: 118-126;
- (4) van Rhoon GC, Wust P. (2005) Introduction: non-invasive thermometry for radiotherapy. *Int J Hyperthermia.* 21(6):489-95;
- (5) Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. (2005) Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia.* 21(8):761-767;
- (6) Shakil A, Osborn JL, Song CW. (1999) Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 43(4):859-65);
- (7) Shakil A, Osborn JL, Song CW. (1999) Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 43(4):859-65;
- (8) Roszinski S, Wiedemann G, Jiang SZ, Baretton G, Wagner T, Weiss C. (1991) Effects of hyperthermia and/or hyperglycemia on pH and pO₂ in well oxygenated xenotransplanted human sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 20(6):1273-80;
- (9) Stohrer M., Fleckenstein W, Vaupel P (1992) Effects of localized hyperthermia on tissue oxygen tension in superficial tumors. In: Ehrly AM, Fleckenstein W., Landgraf M (ed) *Clinical oxygen pressure measurement III.* Blackwell Wissenschaft, Berlin, pp 121-128;
- (10) Streffer C (1988) Aspects of metabolic change after hyperthermia. *Recent Results Cancer Res.* 107: 7-16;

-
- (11) Vaupel P, Okunieff P, Neuringer LJ. (1990) In vivo ³¹P-NMR spectroscopy of murine tumours before and after localized hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 6(1):15-31;
- (12) Schaefer C, Mayer WK, Kruger W, Vaupel P. (1993) Microregional distributions of glucose, lactate, ATP and tissue pH in experimental tumours upon local hyperthermia and/or hyperglycaemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 119(10):599-608;
- (13) El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J. (2001) Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic Acids Res*. 29(9):1960-6.
- (14) Kampinga HH, Dynlacht JR, Dikomey E. (2004) Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (> or = 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *Int J Hyperthermia*. 20(2):131-9.
- (15) Lepock JR. (2004) Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization. *Int J Hyperthermia*. 20(2):115-30.
- (16) Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 43(1):33-56).
- (17) Valdagni et al. (1994) Report of long-term follow up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymphonodes in stage IV head and neck patients. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys*, 28:163-169;
- (18) Datta et al. (1990) Head and neck cancers: results of thermoradiotherapy versus radiotherapy. *Int. J. Hypertherm*. 10: 457-483.
- (19) Vernon et al. (1996) Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys*, 35: 731-744.
- (20) Overgaard et al. (1995) Randomized trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. *The Lancet* 345: 540-543.
- (21) Van der Zee et al. (2000) Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch deep hyperthermia group. *The Lancet* 355: 1119-1125.
- (22) Sneed et al. (1998) Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost (hyperthermia for glioblastoma multiforme. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys*, 40: 287-295.

-
- (23) Kitamura K, Kuwano H, Watanabe M, et al.(1995) Prospective randomized study of hyperthermia combined with chemoradiotherapy for esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 60: 55–58;
- (24) Remmensee HG, Falk K, Rotzschke O. (1993) MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol* 5:35
- (25) Pieters J. (2000) MHCclass II restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol* 75: 159);
- (26) Rock KL, York IA, Saric T et al. (2002) Protein degradation and the generation of MHC class-I presented peptides. *Adv. Immunol.* 80:1)
- (27) Marincola FM, Jafee EM, Hicklin DJ, et al. (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *J. Immunol.* 74: 181;
- (28) Watts C, Amigorena S. (2001) Phagocytosis and antigen presentation. *Semin. Immunol.* 13: 373);
- (29) Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L. et al. (2001) Differential effects of apoptotic versus lytic cells on macrophage production of cytokines: role of of proteases. *J. Immunol* 166: 6847;
- (30) Green DR, Droin N, Pinkoski M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70.
- (31) Robbins PF, Wang RF. (2000) Tumor antigens recognized by cytotoxic lymphocytes. In: Sitkovsky MV, Henkart PA, eds. *Cytotoxic cells: basic mechanisms and medical applications*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: pp 363
- (32) Russell JH, Ley TJ. (2000) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323;
- (33) Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, et al. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188:2375;
- (34) Mackowiak et al, (1991) Direct effects of physiological variations in temperature on pathogenic microorganisms. In: Mackowiak, P.A. (Ed.), *Fever: Basic Mechanisms and Management*. Raven Press, New York, pp. 167-182.
- (35) Jiang Q, Cross AS, Singh IS, Chen TT, Viscardi RM, Hasday JD. (2000) Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis. *Infect. Imm.* 3:1265–1270;
- (36) Blatteis CM, (2003) Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? *Journal of Thermal Biology* 28: 1-13;

-
- (37) Hasday J.D. (1997) The influence of temperature on host defenses. In: Mackowiak, P.A. (Ed.), *Fever: Basic Mechanisms and Management*. Raven Press, New York, pp. 177-196;
- (38) Davies, CD, Lindmo T. (1990) Hyperthermia-induced shedding and masking of melanoma-associated antigen. *Int J Hyperthermia* 6: 1053;
- (39) Pepin E, Villiers CL, Gabert FM, Serra VA, Marche PN, Colomb MG. (1996) Heat shock increases antigenic peptide generation but decreases antigen presentation. *Eur J Immunol.* 26(12):2939-43;
- (40) Kuperberg G, Ellis J, Marcinkiewicz J, Chain BM. (1991) Temperature-induced stress abrogates co-stimulatory function in antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 21(11):2791-5;
- (41) Michalek MT, Benacerraf B, Rock KL (1992) The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing, and is up-regulated by heat shock *J Immunol.* 15;148(4):1016-24;
- (42) Ito A, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. (2001) Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother* 50: 515;
- (43) Milani V., Noessner E. (2006) Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 312-319;
- (44) van Bruggen, I, Robertson TA, Papadimitriou JM (1991) The effect of mild hyperthermia on morphology and function of murine resident peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Pathol.* 55: 119-134;
- (45) Ostberg JR, Patel R, Repasky EA (2000) Regulation of immune activity by mild (fever-range) whole body hyperthermia: effects on epidermal Langerhans cells. *Cell Stress Chaperones* 5: 458-461;
- (46) Basu S., Srivastava PK (2003) Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int. Immunol.* 15: 1053-1061;
- (47) Zheng H., Benjamin IJ, Basu S, Li Z (2003) Heat shock factor-1 independent activation of dendritic cells by heat shock: implication for the uncoupling of heat mediated immunoregulation from the heat-shock response. *Eur. J. Immunol.* 33: 1754-1762;
- (48) Tournier JN, Hellmann AQ, Lesca G, Jouan A, Drouet E et al. (2003) Fever-like thermal condition regulate the activation of maturing dendritic cells. *J. Leuk. Biology* 73: 493-501;
- (49) Ostberg JR, Gellin C., Patel R, Repasky EA (2001) Regulatory potential of fever-like whole body hyperthermia on Langerhans cells and lymphocytes in antigen-dependent cellular immune response. *J. Immunol.* 167: 2666-2670;

-
- (50) Ostberg JR, Repasky EA. Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother.* (2006) 55: 292-298;
- (51) Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727;
- (52) Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R (1997) Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.* 158: 4341;
- (53) Botzler C, Issels R, Multhoff G (1996) Heat shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol. Immunother* 43: 226- ;
- (54) Gething M, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, 355: 33-45;
- (55) Gragerov A, Gottesman M. (1994) Different peptide binding specificities of hsp70 family members. *J Mol. Biol.* 241: 133-5;
- (56) Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, Germain RN. (2000) Receptor-mediated uptake of antigen/hsp complexes results in major histocompatibility class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J. Exp. Med.* 191: 1957-64;
- (57) Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. (2000) Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6: 435-442;
- (58) Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4-complex. *J Immunol* 164: 558-561;
- (59) Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. (2000) The hsp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J Immunol.* 30: 2211-2215;
- (60) Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. (1999) Human 60 kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 162: 3212-3219;
- (61) Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG. (1994) Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of hsp expression. *Nat Med* 4: 581-587;
- (62) Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. (2002) Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia.* 18(6):563-75;

-
- (63) Ahlers O, Hildebrandt B, Loffel J, Boehnke T, Kerner T, Deja M, Keh D, Wust P, Gerlach H, Riess H (1999) Whole-body hyperthermia-induced stress reactions. *Onkologie* 22: 47;
- (64) Atanackovic D, Nierhaus A, Neumeier M, Hossfeld D, Hegewisch-Becker S. (2002) 41,8 C whole body hyperthermia as an adjunct to chemotherapy induces prolonged T cell activation in patients with various malignant diseases. *Cancer Immunol Immunother* 51: 603-613;
- (65) Ahlers O, Boehnke T, Kerner T, Deja M, Keh D, Loffel J, Hildebrandt B, Riess H, Wust P, Pappert D, Gerlach H. (1998) Induced hyperthermia causes significant changes in lymphocytes. *Crit. Care* 2: 02 (Abstract)
- (66) Atanackovic D, Pollok K, Faltz C, Boeters I, Jung R, Nierhaus A, Braumann KM, Hossfeld KH, Hegewisch-Becker S. (2006) Patients with solid tumors treated with high-temperature whole body hyperthermia show a redistribution of naive/memory T-cell subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol* 290: R585-R594;
- (67) Ostapenko VV, Tanaka H, Miyano M, Nishide T, Ueda H, Nishide I, Tanaka Y, Mune M, Yukawa S. (2005) Immune-related effects of local hyperthermia in patients with primary liver cancer. *Hepatogastroenterology*. ;52(65):1502-1506
- (68) Szmigielski S, Sobczynski J, Sokolska G, Stawarz B, Zielinski H, Petrovich Z. (1991) Effects of local prostatic hyperthermia on human NK and T cell function. *Int J Hyperthermia*. 7(6):869-880;
- (69) Stawarz B, Zielinski H, Szmigielski S, Rappaport E, Debicki P, Petrovich Z. (1993) Transrectal hyperthermia as palliative treatment for advanced adenocarcinoma of prostate and studies of cell-mediated immunity. *Urology*. 41(6):548-553;
- (70) Fišerová A, Kovařů H, Hajduová Z, Mareš V, Starec M, Křen V, Flieger M, Pospíšil M. (1997) Neuroimmunomodulation of natural killer (NK) cells by ergot alkaloid derivatives. *Physiol Research* 46:119-125;
- (71) Clark PR, Menoret A. (2001) The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. *Cell Stress Chaperones* 2:121-125;
- (72) Michalek MT, Benacerraf B, Rock KL. (1992) The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing and is up-regulated by heat shock. *J. Immunol* 148:1016-1024.

