

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. Lékařská fakulta**

Ústav imunologie

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Dendritické buňky a jejich význam v imunitní odpovědi**

Vypracovala:

Vedoucí bakalářské práce:

Studijní program:

Studijní obor:

Jitka Vávrová

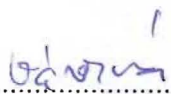
Mgr. Daniela Rožková, Ph.D.

Specializace ve zdravotnictví

Zdravotní laborant

Prohlašuji, že jsem v předložené práci použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 18.4. 2008

  
.....  
podpis

## SOUHRN

Dendritické buňky (DC) jsou nejúčinnějšími antigen prezentujícími buňkami v lidském organismu. Hrají významnou úlohu v imunitních dějích tím, že stimulují naivní T-lymfocyty. Této vlastnosti se proto hojně využívá v imunoterapii nádorových onemocnění.

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace výrobního protokolu při výrobě vakcíny dendritických buněk pro nemocné s karcinomem ovárií. Zkoumali jsme jednotlivé fáze přípravy vakcíny a jejich případný dopad na výsledek celého procesu přípravy vakcíny.

Zajímá nás vliv použitého plastiku, ze kterého jsou vyrobeny kultivační nádoby, na výsledek maturace dendritických buněk. Dále pak fakt zda při použití stejného druhu maturačního činidla typu poly I:C od jiného výrobce budou dendritické buňky maturovány stejnou měrou. Jelikož jsou vakcíny po vyrobení zamrazovány na  $-80^{\circ}\text{C}$  pro uchování svých imunosupresivních vlastností, zkoumali jsme také jestli nedochází ke změně těchto vlastností po rozmražení. A v neposlední řadě jsme také zkoumali vliv druhu zamrazovacího média na fenotyp a výtěžek DC.

## SUMMARY

Dendritic cell (DC) is the most effective antigen presenting cell in human organism. Dendritic cells plays important role in immunity response because they stimulate naive T-lymfocytes. This property is very useful in immunotherapy of tumor diseases.

The general aim of this work was to optimalize operating protocol for preparation vaccine containing dendritic cells for patients with ovarian carcinoma. We examined single parts of process of preparation and their impact on result of whole process.

We were interested in used plastic, from which are culture bottle made, and its impact to maturation of dendritic cells. Next thing that we examined was if we use the same kind of maturation reagent, type poly I:C, from different producers, will be dendritic cells matured in the same way. After made vaccines are freezed to  $-80^{\circ}\text{C}$  to keep their immunosupresive properties. We examined if DCs after defrosting have the same properties like before. We also examined diferent types of medium used for freezing and their impact to fenotype and service life of DCs.

## Poděkování

Na předložené bakalářské práci jsem pracovala na Ústavu imunologie 2.lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Motole.

Chtěla bych tímto poděkovat Mgr. Daniele Rožkové za trpělivost, vedení a odbornou pomoc při psaní bakalářské práce, dále pak celému kolektivu Ústavu imunologie FN Motol za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za ochotu.



## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	1
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	2
2.1 Imunitní systém	2
2.2 Antigen prezentující buňky	3
2.3 Dendritické buňky	3
2.4 Receptory přítomné na APC	6
2.4.1 Toll-like receptory	7
2.5 Dendritické buňky a nádorové bujení	8
2.5.1 Vznik nádorového bujení	8
2.5.2 Odolnost nádorů vůči imunitnímu systému	9
2.5.3 Dendritické buňky a jejich význam v imunoterapii nádorů	9
2.6 Prostředí vhodné pro přípravu vakcín z DC	10
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	14
3.1 Cíle práce	14
3.2 Protokol pro výrobu dendritických buněk pro protinádorové vakcíny	15
3.3 Průtoková cytometrie	19
3.4 Analýza dat v průtokové cytometrii	20
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	22
4.1 Porovnání vlivu různých poly I:C na fenotyp DC	22
4.2 Vliv zamrazování a rozmrazování na fenotyp životnost DC	23
4.3 Vliv různých druhů zamrazovacích médií na fenotyp a životnost DC	25
4.4 Vliv plastiku použitého při maturaci na fenotyp DC	26
<b>5. ZÁVĚR</b>	29
<b>6. LITERATURA</b>	31
<b>7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBLŮ A ZKRATEK</b>	32

# 1. ÚVOD

Dendritické buňky jsou v současné době pokládány za klíčové buňky regulující imunitní odpověď. Svoji funkci vykonávají v celém těle, ale rozhodující je jejich úloha hlavně na kůži a sliznicích. Podle současných znalostí dokonce na počátku každé imunitní reakce stojí dendritické buňky. Specifické vlastnosti dendritických buněk jsou proto přímo ideálně využitelné v imunoterapii nádorů.

Protinádorová imunoterapie je léčebná strategie zaměřená na vyvolání a udržení imunitních odpovědí proti nádorovým buňkám. Ve snaze zvýšit účinnost protinádorových vakcín se v posledním desetiletí zkoušejí buněčné vakcíny, které obsahují antigen prezentující buňky. Nejlepší výsledky ale mají imunoterapeutické protokoly, které využívají hlavně dendritické buňky (DC), které jsou schopné prezentovat antigeny klidovým T lymfocytům a indukovat tak protinádorovou odpověď jak *in vitro*, tak *in vivo*.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Imunitní systém

Imunitní systém (IS) můžeme označit jako souhrn dějů, které zajišťují ochranu organismu. Pomocí různých mechanismů dokáží buňky imunitního systému rozeznat vlastní (nepatogenní) od cizích (potenciálně patogenních) struktur. Tuto hlavní funkci můžeme dále rozdělit na schopnost imunitního dohledu, obranyschopnosti a autotolerance vůči vlastním buňkám. Pod pojmem imunitní dohled rozumíme schopnost IS rozpoznávat vnitřní škodliviny (staré, poškozené a mutované buňky). Obranyschopnost je schopnost rozpoznávat vnější škodliviny (patogenní mikroorganismy a jejich toxické produkty) a autotolerance schopnost udržovat toleranci vůči vlastním tkáním.<sup>1</sup>

Imunitní systém člověka se skládá z mnoha částí, mezi něž patří rozpustné tzv. humorální složky a také různé typy buněk, především leukocytů. Každá z těchto složek plní určitou, pro něj specifickou, funkci. Pro správné fungování imunitního systému je důležité, aby fungovali všechny jeho složky. V lidském těle je proto celý systém několikrát jištěný. V případě porušené funkce jedné ze složek dokáže jiná část imunitního systému částečně zastat jeho funkci.<sup>1,2</sup>

Správnost funkce IS je založena na spolupráci dvou jejích složek – imunity přirozené (nespecifické) a imunity adaptivní (specifické, získané). Mezi těmito dvěma složkami existuje několik spojovacích článků, které označujeme jako antigen prezentující buňky (APC).

Přirozená imunita je vývojově starší složka imunity, která je nezávislá na předchozím setkání s antigenem. Projevuje se okamžitě po rozpoznání cizorodé látky a postrádá „imunitní paměť“. Mezi nespecifické imunitní mechanismy patří: bariéry (kůže), což je keratinizovaný epitel, který slouží jako první linie ochrany před cizorodými organismy. Další linii tvoří mechanické a chemické děje, jako například pohyb řasinek na sliznicích, vylučování močovými cestami, lysozym ve slinách, slzách a potu, antibakteriální peptidy (defensiny) atd. Neadaptivní část imunitního systému je založena hlavně na několika typech fagocytů a komplementu.

Adaptivní imunita je vývojově mladší složka imunity, která je stále zdokonalována. Součástí získané imunity jsou B lymfocyty, ze kterých se po stimulaci stávají buňky plazmatické, schopné produkce protilátek a T lymfocyty. Každý B nebo T lymfocyt je



vybaven unikátními specifickými receptory, které nazýváme B-buněčný receptor nebo T-buněčný receptor podle jejich umístění na jednotlivých lymfocytech. Jednotlivé receptory se od sebe strukturně liší. V organismu pak nacházíme různé druhy lymfocytů, s různou strukturou vazebných míst na svém povrchu, které dokážou vázat specifické antigeny. Princip specifické části imunity spočívá v tom, že setká-li se lymfocyt s antigenem, který dokáže vázat, naklonuje se a antigen jednoduše zneškodní. Pro adaptivní imunitu je také charakteristická schopnost uložit si „zkušenost“ s mikroorganismem do imunologické paměti, a při dalším kontaktu s tímž typem mikroorganismu zprostředkovávat mnohem rychlejší imunitní reakci.<sup>1,3</sup>

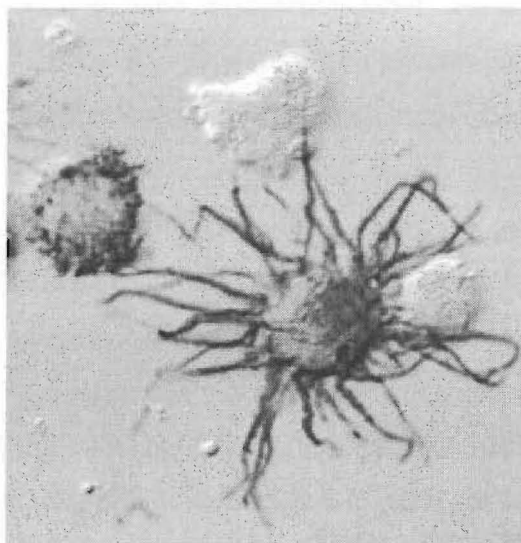
## 2.2 Antigen prezentující buňky

Jsou to buňky které mají velmi důležitou úlohu v regulaci imunitního systému. Fungují jako spojovací článek mezi oběma částmi imunitního systému člověka. Mezi APC řadíme buňky, které jsou schopné pohlcovat antigen a následně ho prezentovat. Na svém povrchu mají molekuly HLA I. nebo II. třídy, na kterých jsou prezentovány peptidy z pohlcených částic. Pomocí TCR jsou pak T lymfocyty schopny tyto peptidy rozpoznávat, což vede k jejich proliferaci a diferenciaci. Za nejdůležitějšího zástupce APC můžeme označit buňky dendritické, ale patří sem i makrofágy a zralé B lymfocyty. Jednotlivé typy APC se pak od sebe liší v rozdílné schopnosti stimulovat imunitní odpověď u naivních a paměťových buněk, tkáňovou lokalizací a typem antigenních podnětů, které jednotlivé buňky zpracovávají.<sup>3,4,5</sup>

## 2.3 Dendritické buňky

Kožní dendritické buňky (DC) byly poprvé popsány v roce 1868 jako nervové buňky kůže nacházející se v bazální vrstvě epidermis. Ale teprve v roce 1973 pánové Steinman a Cohn, objevili dendritické buňky ve slezině a dospěli k názoru, že jsou to buňky specializovaná ke stimulaci naivních T lymfocytů, exprimující molekuly MHC II. třídy na svém povrchu.

Dendritické buňky pravděpodobně dostali jméno podle svého tvaru. Mají na svém povrchu velké množství cytoplazmatických výběžků (dendritů), které výrazně zvětšují povrch buňky.<sup>4</sup>



**Obr. č.1** Maturovaná dendritická buňka (mikrosnímek z konfokálního mikroskopu)<sup>A</sup>

Díky těmto výběžkům se také výrazně zjednodušuje možnost kontaktu s více buňkami, nacházejícími se v těsné blízkosti dendritických buněk. Bylo prokázáno, že jedna dendritická buňka dokáže stimulovat až 3000 T lymfocytů.<sup>5,6</sup>

Podle buněčného původu můžeme rozlišit různé druhy DC. Langerhansovy buňky jsou odvozeny od myeloidní vývojové řady leukocytů, kam patří také monocyty a makrofágy. Jsou to nezralé dendritické buňky, které se nachází v hlubší vrstvě pokožky (epidermis). Na svém povrchu exprimují molekuly CD1a, CD207 a Lag. Zvláštním druhem migrujících Langerhansových buněk jsou závojové dendritické buňky,

nacházejí se v aferentní lymfě. Dalším DC odvozené od myeloidní vývojové větve jsou intersticiální dendritické buňky, které se někdy označují také jako kožní dendritické buňky. Nacházejí se v kůži a ve většině orgánů. Na povrchu exprimují koagulační faktor VIIIa a molekuly CD14, CD68. Od lymfoidních prekurzorů jsou odvozeny lymfoidní dendritické buňky. Nacházejí se v krvi a sekundárních lymfatických orgánech a na svém povrchu nesou molekuly CD4 a CD123.<sup>1,3</sup>

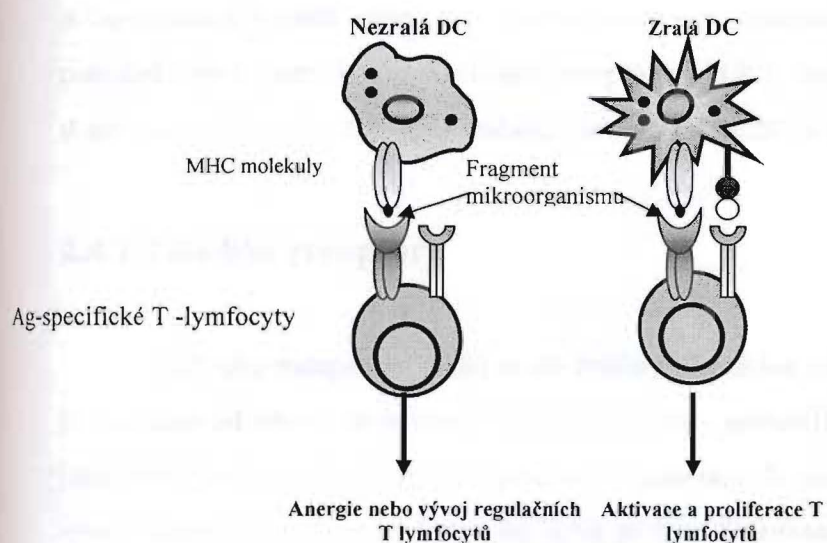
Dendritické buňky nacházejí se v organismu ve dvou formách, zralé nebo nezralé. Nezralé DC jsou přítomny ve všech periferních tkáních. Je to z důvodu zvýšení rychlosti jejich setkání s mikroorganismy, jenž se do organismu dostanou. Pokud v organismu není žádná infekce, pak je její hlavní funkcí pohlcování odumřelých buněk zdravých tkání. Pohlcené buňky zpracují a jejich části zpřístupní na svém povrchu T-lymfocytům. Nedojde ale ke stimulaci T-lymfocytů, ale naopak k potlačení imunitní reakce vůči těmto antigenům, které vlastně pro tělo nejsou nijak patogenní. Za normálních okolností díky této vlastnosti nedochází k poškozování vlastních struktur organismu. V opačném případě dochází ke vzniku imunopatologických reakcí a rozvoji autoimunitních onemocnění. Může ale nastat stav, kdy DC narazí v organismu na něco co je pro organismus patogenní. To že je patogenní pozná



díky receptorům (TLR, lektinové receptory, receptory stresových hormonů), které jsou umístěny uvnitř i na povrchu dendritických buněk. Tyto receptory dokáží rozpoznat buď virovou nebo bakteriální DNA, různé specifické součásti bakteriální buněčné stěny nebo bičíku, tento způsob označujeme jako rozpoznávání tzv. exogenních signálů nebezpečí. Popřípadě dokáží rozpoznat stresové hormony, které jsou uvolňovány při nekróze buněk, což je rozpoznávání tzv. endogenních signálů nebezpečí. Po rozpoznání antigenů nezralými dendritickými buňkami, dochází k jejich migraci lymfatickými cévami do sekundárních lymfatických orgánů (slezina, lymfatické uzliny). Zde se z nich stanou zralé, profesionální antigen prezentující buňky.<sup>7</sup>

Proces maturace se děje současně s migrací dendritických buněk z periferní tkáně do lymfatického orgánu. Během maturace se DC mění jak fenotypově tak i funkčně. Z prosté buňky pohlcující antigen se stane profesionální antigen prezentující buňka. Při maturaci ztrácí DC svoji fagocytující schopnost, dochází ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD40, CD58, CD80 a CD86. Zároveň se mění morfologie buňky, reorganizuje se cytoskelet.<sup>4,8</sup>

Po aktivaci dendritických buněk se patogenní materiál rozštěpí a jednotlivé její části se vystaví na jejich povrchu. Jsou to molekuly MHC I. a II. třídy a několik adhezivních molekul. Komplexy obsahující molekuly MHC I. třídy podporují aktivaci cytotoxických lymfocytů a komplexy obsahující MHC II. třídy aktivují pomocné Th lymfocyty. Samotný kontakt MHC molekul, na dendritických buňkách, s TCR, na povrchu T-lymfocytů, nestačí. Mluvíme pouze o „prvním signálu“. Pokud T-lymfocyt obdrží pouze první signál, je anergizován, popřípadě apoptizován. Proto ke správné aktivaci T-lymfocytů je potřeba ještě druhý signál. Jako druhý signál označujeme interakci mezi kostimulačními molekulami (CD80, CD86) na dendritických buňkách a jejich ligandy na T-lymfocytech. Různé druhy dendritických buněk mohou více či méně efektivně stimulovat různé typy pomocných, cytotoxických a regulačních T-lymfocytů a tak rozhodovat o tom, jaký charakter bude mít imunitní odpověď proti určitému patogenu, resp. dojde-li k ní vůbec.<sup>6</sup>



**Obr. č.2** Rozdíl v prezentaci antigenu naivním T lymfocytům u zralých a nezralých DC<sup>B</sup>

## 2.4 Receptory přítomné na APC

Schopnost APC identifikovat jednotlivé patogeny je zapříčiněná přítomností povrchových receptorů. Tyto receptory se označují jako PPR (pathogen pattern receptor) nebo PRR (pathogen-recognition receptor).

Podle funkce lze receptory PPR rozdělit do 3 základních tříd:

Sekretované molekuly slouží jako opsoniny. Naváží se na stěnu mikroorganismu a zajistí tak rozpoznání mikroba fagocytujícími buňkami a komplementem. Mezi tyto PPR patří lektin vážící mannosu (MBL). Po jeho navázání na mikrobiální polysacharid se výsledkem aktivuje komplementová kaskáda (tzv. lektinová cesta).

PPR zprostředkovávající endocytózu jsou přímo na povrchu fagocytujících buněk. Pomocí nich dokážou buňky rozpoznat molekulární struktury, které jsou charakteristické pro určité druhy mikroorganismů, tzv. PAMP (pathogen-associated molecular patterns) - s patogenem asociované molekulové vzory. Po rozpoznání mikrobiálních PAMP zajistí jejich navázání na fagocytující buňky, a jejich následné pohlcení usmrcení a rozklad pomocí lysozomů.



Poslední třídou PPR receptorů jsou signální receptory, které dokáží po identifikaci nebezpečných PAMP, vyvolávat tvorbu některých prozánětlivých cytokinů a kostimulačních molekul. Sem patří i tzv. Toll-like receptory (TLR), mající důležitou funkci při aktivaci dendritických buněk, které pak zahajují antigenně specifickou fázi imunitní odpovědi.<sup>3,6</sup>

#### 2.4.1 Toll-like receptory

Toll-like receptors (TLR) se do češtiny překládají jako receptory podobné Toll. Název je odvozen od názvu receptoru známého u mušky octomilky (*Drosophila*), která často slouží jako modelový organismus při výzkumu v genetice. U octomilky působí tento receptor při vývoji larev a pokud je inaktivován larva se vyvíjí zmateně (německy – toll). Během 90. let 20. století se zjistilo že u člověka nacházíme 10 receptorů podobných Toll, které byli pojmenovány TLR1 – TLR10. Ukázalo se, že některé z nich navíc vytvářejí mezi sebou páry (heterodimery) a sdružují se do složitějších komplexů s několika dalšími extracelulárními i cytoplazmatickými proteiny. Ty pak fungují jako vlastní receptory. Toto tvrzení platí především u TLR1 a TLR6, které se samostatně nevyskytují. Jednotlivé receptory jsou důležité pro včasnou detekci různých druhů mikrobiálních produktů a slouží k vyvolání rychlé obranné reakce organismu. Mezi rozpoznávané PAMP řadíme např. lipopolysacharidy, lipoproteiny, bakteriální DNA, dvojvláknovou (jednovláknovou) RNA, úlomky bakteriálních bičičků (přesněji viz tabulka 1). U člověka jsou toll-like receptory exprimovány především na periferních krevních leukocytech (neutrofilů, monocytů, lymfocytů), tkáňových makrofázích, dendritických buňkách a buňkách, které přichází do styku s vnějším prostředím.<sup>9,10</sup>

Receptory jsou lokalizovány v té části buňky, kde je to pro ně nejvýhodnější. TLR1, TLR2 a TLR4, jsou umístěna na buněčném povrchu, protože jsou aktivovány povrchovými strukturami patogenů. TLR3, TLR7, TLR9 jsou umístěny intracelulárně v membránách, protože rozpoznávají RNA a DNA struktury.<sup>10</sup>

Receptor	PAMP	Patogen
TLR2 ( popř. TLR1/TLR2 nebo TLR2/TLR6 )	lipoproteiny, peptidoglykany, kys. lipoteichová a glykolipidy	G+ bakterie, mykobakterie, kvasinky, houby
TLR3	dvojvláknová RNA	RNA viry
TLR4	lipopolysacharidy, lipoproteiny, proteiny teplotního šoku	většina G- bakterií, prokaryota a eukaryota
TLR5	flagelín	bakteriální bičíky
TLR7 a TLR8	jednovláknová DNA	RNA viry
TLR9	nemetylované oligonukleotidy CpG	bakteriální DNA
TLR10	není dosud známý	-
TLR11	není dosud známý	uropatogenní bakterie

**Tabulka č.1** Rozdělení jednotlivých TLR receptorů , jednotlivé PAMP které rozeznávají a jejich umístění.

## 2.5 Dendritické buňky a nádorové bujení

### 2.5.1 Vznik nádorového bujení

V posledních letech se poměrně výrazně zvyšuje výskyt nádorových onemocnění v populaci. Můžeme ho zařadit mezi tři nejčastější příčiny smrti člověka. Nádorové bujení je definováno jako proces, který vede v buňce k akumulaci genetických poruch, které následně aktivují buněčné protoonkogény a inaktivují antionkogeny. Dochází tím k neregulovanému, abnormálnímu dělení buněk, při kterém postižené buňky postupně ztrácí svoji původní morfologii a stále intenzivněji se dělí. V horším případě u maligních nádorů dochází ještě k rozšíření po těle mimo primární nádor, což vede k poruchám činnosti ostatních orgánů.



Poškození DNA v buňkách může být způsobeno různými faktory. Rozdělujeme je na faktory endogenního původu, nebo exogenního původu. Mezi endogenní faktory vzniku nádorového bujení patří vrozené genetické poruchy a negativní působení kyslíkových radikálů. Za nejvýznamnější exogenní faktory považujeme ionizační záření, UV záření, a různé chemické sloučeniny, se kterými se často setkáváme, např. v cigaretovém kouři, v potravinách nebo v prostředí ve kterém žijeme.<sup>11</sup>

### **2.5.2 Odolnost nádorů vůči IS**

Nádorové buňky jsou od normálních odlišné a proto by logicky měly být imunitním systémem rozpoznány a zneškodněny. Existují však mechanismy, díky kterým se nádorová buňka imunitnímu dohledu vyhne. U různých typů nádorových buněk byly identifikovány odlišné mechanismy.

Může se stát, že nádorová buňka se od buňky normální odlišuje jen velice málo nebo hustota exprese nádorových antigenů je tak nízká, že je buňka imunitním systémem ignorována. Některé nádory mohou také produkovat faktory, které inaktivují T-lymfocyty. Jiné mají na své povrchu látky, vyvolávající u protinádorových T-lymfocytů apoptózu. Za důležitou vlastnost nádorových buněk považujeme to, že nefungují jako antigen prezentující buňky, protože na svém povrchu nemají kostimulační molekuly CD80 a CD86. Z toho vyplývá, že T-lymfocyty jsou po setkání s nádorovou buňkou utlumeny místo toho, aby byly aktivovány. Navíc některé nádory produkují faktory inhibující funkci a životnost dendritických buněk, nebo působí inhibičně již na prekurzory dendritických buněk v kostní dřeni.<sup>1</sup>

### **2.5.3 Dendritické buňky a jejich význam v imunoterapii nádorů**

V současné době je v léčbě nádorů za nejúčinnější považována chemoterapie cytostatiky, ozařování nebo chirurgický zákrok. Někdy ale dojde k tomu, že léčba sice zlikviduje většinu nádorové tkáně, ale malé množství nádorových buněk v těle zůstane. Z těchto buněk se pak ve většině případů vyvine nová populace nádorových buněk. Proto je

velice důležité eliminovat z těla všechny nádorové buňky a v tomto ohledu má imunoterapie dendritickými buňkami dobré výsledky.<sup>12</sup>

Pod pojmem imunoterapie rozumíme léčebné postupy podporující nebo využívající obranné mechanismy imunity k působení proti nádoru. Imunoterapie je buď pasivní, když do organismu podáváme již hotové protilátky nebo aktivované leukocyty, nebo aktivní, podáváme-li různě upravené antigenní produkty nádoru, abychom vzbudili protinádorovou reakci imunitního systému. Imunoterapie dendritickými buňkami patří do té první kategorie. Principem imunoterapie nádorových onemocnění dendritickými buňkami je podávání in vitro připravených zralých dendritických buněk, které prezentují nádorové antigeny, což vede k indukci specifické protinádorové imunitní odpovědi u pacienta. Principem vakcíny je připravení dendritických buněk z monocytů pacienta. Monocyty získané z krve jsou izolovány pomocí gradientové centrifugace a separace na plast. Následně jsou kultivovány v termostatu za přítomnosti určitého množství cytokinů (GM-CSF, IL-4) přibližně 5 dní. V následujícím kroku se dendritickým buňkám předloží nádorové antigeny. Dnes jsou známy různé druhy nádorových antigenů a každá výzkumná laboratoř pracuje s jinou formou těchto antigenů. Řadíme sem různé peptidy, mRNA, nekrotické buňky nebo apoptotické buňky. V našem případě používáme buňky apoptotické. Ty jsou pohlceny a jejich části jsou vystaveny na buněčný povrch. Takto ovlivněné dendritické buňky jsou vráceny zpět do pacientova těla (injekčně), kde by měl spouštět specifickou protinádorovou odpověď. Po dobu mezi dokončením vakcíny v laboratoři a podáním pacientovi uchováváme vakcínu ve zmrazeném stavu při  $-80^{\circ}\text{C}$  ve speciálních zamrazovacích zkumavkách, které jsou umístěny ve zamrazovacím kontejneru. Tento kontejner zajišťuje postupné zamrazování vzorků konstantní rychlostí  $1^{\circ}\text{C}$  za minutu.

## 2.6 Prostředí vhodné pro přípravu vakcín z DC

Pacienti v onkologické léčbě jsou velice náchylní k virovým i bakteriálním infekcím, abychom zabránili tomu, aby společně s vakcínou byly pacientovi podány i choroboplodné zárodky musí celá procedura přípravy vakcíny s dendritickými buňkami probíhat ve sterilním



prostředí. Výsledný produkt totiž není možno před podáním pacientovi sterilizovat, protože by byly zahubeny i dendritické buňky.

Příprava protinádorových vakcín z dendritických buněk musí probíhat v tzv. superčistých prostorách, za podmínek které označuje zkratkou GMP. Je to zkratka z anglického názvu „Good Manufacturing Practice“ a do češtiny tento název překládáme jako správná výrobní praxe (SVP). Podmínky správné výrobní praxe jsou následující. Jednotlivé výrobní operace musí probíhat ve shodě s jednoznačně definovanými postupy a musí být zachovány zásady správné výrobní praxe, aby konečné produkty měly požadovanou jakost. Musí být zajištěn dostatek kvalifikovaných pracovníků k provádění všech úkolů, jež patří k odpovědnosti výrobce. Všichni pracovníci mají dbát zásad správné výrobní praxe a mají být podrobováni úvodnímu i pravidelně opakovanému školení a výcviku. Prostory a zařízení musí být umístěny, navrženy, konstruovány a udržovány tak, aby to odpovídalo činnostem, jež v nich mají probíhat. Jejich uspořádání a konstrukce musí minimalizovat riziko chyb a umožňovat účinné čištění a údržbu, tak aby se předcházelo křížové kontaminaci, usazování prachu nebo nečistot a aby se obecně zabránilo jakémukoliv nepříznivému působení na jakost produktu. Jako výchozí látky můžeme použít pouze materiál s certifikací GMP. Podrobné požadavky na pracovníky, prostory, postupy, procesy a přípravky ve všech základních oblastech SVP vymezuje první odstavec nového textu 1. dodatku "Výroba sterilních léčiv" evropských "Pokynů k SVP pro léčiva", který vstoupil v platnost v zemích Evropského společenství od 01. 01. 1997.<sup>13</sup>

Čisté prostory pro výrobu sterilních přípravků jsou rozděleny do 4 tříd – A, B, C a D. Každá výrobní činnost vyžaduje přiměřenou úroveň čistoty prostředí za provozu, aby bylo minimalizováno riziko mikrobiální nebo částicové kontaminace přípravku nebo zpracovávaných materiálů<sup>D</sup>. V čistých prostorách FN Motol je v laminárním boxu třída A, v okolí boxu třída B a prochází se přes místnost třídy C. Čistý prostor je možno definovat jako ohraničený prostor, ve kterém jsou garantované parametry stavu vzduchu jako:

- *prašnost vzduchu* (definovaná počtem prachových částic, bakterií, ...)
- *teplota vzduchu*
- *relativní vlhkost vzduchu*
- *tlak vzduchu*

### **Limity pro počet částic přítomných ve vzduchu**

Třída	Maximální přípustný počet částic/m <sup>3</sup> rovný nebo větší			
	Za klidu		Za provozu	
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
<b>A</b>	3500	0	3500	0
<b>B</b>	3500	0	350000	2000
<b>C</b>	350000	2000	3500000	20000
<b>D</b>	3500000	20000	nedefinován	nedefinován

Příčemž stav „za klidu“ je stav, ve kterém jsou zcela nainstalována provozuschopná výrobní zařízení, ale nejsou zde přítomni žádní pracovníci. Stav „za provozu“ je stav, kdy výrobní zařízení jsou v běžném provozu s předepsaným počtem pracovníků.

### **Limity pro mikrobiologické znečištění čistých prostor**

Třída	Doporučené limity pro mikrobiologickou kontaminaci			
	Vzorkování vzduchu CFU/m <sup>3</sup>	Petriho miska (průměr 90 mm) CFU/4hod	Kontaktní desky (průměr 55 mm) CFU/deska	Otisk rukavice 5 prstů CFU/rukavici
<b>A</b>	<1	<1	<1	<1
<b>B</b>	10	5	5	5
<b>C</b>	100	50	25	-
<b>D</b>	200	100	50	-

Doporučené limity pro mikrobiologickou kontrolu jsou ověřovány ve stavu čistého prostoru za provozu.

### **Teplota a relativní vlhkost**

Doporučené hodnoty jsou stanoveny projektem (specifikací). Zpravidla pro zimní provoz uváděná teplota 20±2 °C, pro letní provoz 22±2 °C. Relativní vlhkost má být zpravidla udržována na hodnotě 45±10 % r.v..

### **Tlakové rozdíly mezi místnostmi**

Vzduch je v místnosti pod tlakem, aby dovnitř nepronikla žádná nečistota. Doporučená hodnota podle EU je 10 až 15 Pa mezi místnostmi odlišných tříd čistoty. Tlakové

rozdíly mezi jednotlivými místnostmi jsou zpravidla definovány v projektu. I v tlumeném provozu musí být zajištěn přetlak čistých prostorů vůči okolnímu prostředí.

Dále se v čistých prostorech kontroluje počet výměn vzduchu, rychlost a rovnoměrnost proudění ve větraném prostoru, hlučnost a vibrace, výskyt elektrostatických nábojů, znečištění vzduchu plyny, radioaktivitou, biologickými látkami atd. V těchto prostorách pak pracují speciálně vyškolení laboranti, v protiprachových kombinézách a s náustky. Při každém vstupu a výstupu pracovníci i materiál prochází přes místnost s filtry. Uvnitř čistého prostoru jsou pak boxy s proudícím filtrovaným vzduchem pro samotnou práci s buňkami.<sup>14</sup>



### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1 Cíle práce

Účelem této práce byla optimalizace výrobního protokolu při výrobě vakcíny z dendritických buněk. Testovali jsme proto různé jednotlivé podmínky výrobního postupu a jejich vliv na kvalitu produktu. Jako hlavní faktory, které by mohli ovlivňovat kvalitu výsledného produktu, jsme určili vliv maturačních činidel, procesu zamrazování buněk, druhu použitého zamrazovacího média a druhu plastu použitého při maturaci.

Vliv maturačních činidel na maturaci dendritických buněk, jsme ověřovali porovnáváním fenotypu DC při použití různých poly I:C.

Po vyrobení jsou vakcíny zamrazovány na velmi nízkou teplotu, proto jsme zkoumali zda nedochází ke změnám u DC během zamrazování. Porovnávali jsme fenotyp buněk před zamražením a po rozmražení a také jejich životnost po rozmražení.

V laboratoři běžně používané zamrazovací médium, se v superčistých podmínkách používat nesmí. Proto jsme porovnávali rozdíly ve fenotypu a životnosti mezi DC zamraženými v běžně používaném zamrazovacím médiu a v novém testovaném médiu, které lze v superčistých podmínkách použít.

Jako poslední bod nás zajímal vliv plastiku, ze kterého jsou kultivační nádobky na výsledek maturace DC. Porovnávali jsme DC maturované na různých druzích plastu. K tomu jsme použili kultivační destičky z plastu typu treated, non-treated a ultralow attachment.

## 3.2 Protokol pro výrobu dendritických buněk pro protinádorové vakcíny

### Přístroje a pomůcky

- Centrifuga
- Laminární box
- Inkubátor
- Automatické pipety
- Pipetovací nástavec

### Spotřební materiál

- Serologické pipety 2, 5, 10, 25 ml (Nunc, Německo)
- Kultivační lahvičky, povrch 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Německo)
- Špičky CLP (Schoeller)
- 15 a 50 ml centrifugační zkumavky (Nunc, Německo)
- 1,8 ml zamrazovací zkumavky (Nunc, Německo)
- kultivační plastik - typ treated, non-treated, ultralow attachment

### Vstupní suroviny

- Buffy coat – 20 - 50 ml – celkem bylo zpracováno 7 dárců

### Reagencie

- Kultivační médium: CellGro DC (CellGenix, kat.číslo 2005)
- PBS (nemocniční lékárna)
- PBS + 2mM EDTA (nemocniční lékárna)
- Lidský rekombinantní GM-CSF (Gentaur, Německo, kat. číslo mGMP-rHuGM-CSF)
- Lidský rekombinantní IL-4 (Gentaur, Německo, kat. číslo mGMP-rHuIL-4)
- Poly (I:C)- Sigma, Poly (I:C)- Invivogen
- DMSO - Sigma

- FBS (fetální bovinní sérum), Human serum albumin 20% (BAXTER)
- Ficoll Paque Premium

## **Pracovní postup**

### **Izolace mononukleárních buněk**

#### ***Odběr materiálu ke zpracování***

- Buffy coat je transportován z transfuzního oddělení ÚHK T
- Zpracování materiálu do 24 hod, uchovávat při pokojové teplotě

#### ***Separace mononukleárních buněk***

- Hadičku vaku i nůžky očistíme alkoholem, hadičku nastříháme a obsah přelijeme do 50 ml centrifugační zkumavky
- Leukaferetický produkt naředíme pomocí PBS + 2mM EDTA minimálně dvakrát
- Do 50 ml zkumavek napipetujeme 15 ml Ficollu Paque a opatrně ho převrstvíme 35 ml naředěného leukaferetického produktu
- Centrifugujeme 1800 otáček/min, 30 minut při pokojové teplotě, při nejnižším stupni zrychlení i zpomalení = program č.2
- Odebereme prsteneček mononukleárních buněk na rozhraní Ficoll Paque a plazmy ⇒ nasajeme serologickou pipetou a přeneseme do nové 50 ml centrifugační zkumavky. Zkumavku poté doplníme do 50 ml pufrům PBS + 2mM EDTA.
- Centrifugujeme 1200 otáček/min, 10 minut při pokojové teplotě = program č.1
- Supernatant odlijeme do nádoby na tekutý odpad. Peletku na dně resuspendujeme serologickou pipetou v 10 ml PBS. Poté doplníme do 30 ml pufrům PBS.
- Dvakrát zopakujeme předchozí krok = promytí mononukleárních buněk s centrifugací 1000 otáček/min resp. 800 otáček/min, při prvním resp. druhém promytí – nastavíme na program č.5
- Po posledním promytí odsajeme supernatant a resuspendujeme peletu buněk v CellGro médiu



- Provádíme mikroskopické stanovení počtu = pomocí počítací buněk do 10 ml roztoku pro počítání přidáme 10 $\mu$ l buněčné suspenze vložíme do přístroje a odečteme výsledek. Stanovení životnosti buněk = 10 $\mu$ l buněčné suspenze + 10 $\mu$ l trypanové modři, směs umístíme do Bürkerovy komůrky a prohlédneme pod mikroskopem.

### **Výroba nezralých DC**

#### **Den 0**

- Izolované a promyté a spočítané mononukleární buňky naředíme v CellGro médiu na koncentraci buněk 5x10<sup>6</sup>/ml
- *Separace monocytů adherenci na plast*  $\Rightarrow$  přeneseme 15 ml buněčné suspenze do kultivačních lahvíček s povrchem 75 cm<sup>2</sup>. Lahvičky umístíme do inkubátoru a inkubujeme 1,5 – 2 hod při 37°C v prostředí s 5% CO<sub>2</sub>.
- *Příprava CellGro média s cytokiny*  $\Rightarrow$  alikvoty cytokinů GM-CSF a IL-4 necháme rozmrazit při pokojové teplotě. V 50 ml centrifugačních zkumavkách si připravíme potřebné množství média s cytokiny tak, aby koncentrace byla pro GM-CSF 500 U/ml, IL-4 20 ng/ml
- Po inkubaci odstraníme neadherovanou frakci oplachováním dna lahvičky pufrům PBS pokojové teploty. Provedeme tři oplachování 10 ml PBS. Po třetím oplachu kompletně odsajeme PBS.
- K adherovaným buňkám na dně lahvičky přidáme kultivační médium s cytokiny. Na jednu lahvičku 20 ml CellGro média s cytokiny.

#### **Den 6 (140-148 hodin po započatí kultivace)**

- *Sběr nezralých DC*: odsajeme buněčnou suspenzi z kultivační lahvičky a obsah přeneseme do 50 ml centrifugační zkumavky. Dno lahvičky ještě opláchneme 10 ml pufru PBS pokojové teploty. Zkumavku doplníme Do 50 ml pufrům PBS.
- Centrifugujeme 1200 otáček/min, 10 minut při pokojové teplotě = program č.1
- Supernatant odsajeme a peletu buněk resuspendujeme v CellGro médiu
- Mikroskopicky hodnotíme vzorek buněčné suspenze

## *Maturace DC*

### **Maturace dendritických buněk**

- Pomalu rozmrazíme alikvot maturačního činidla (poly (I:C)) při pokojové teplotě.
- Přeneseme suspenzi pulzovaných dendritických buněk do 6 jamkových kultivačních destiček. K buněčné suspenzi přidáme poly (I:C) na výslednou koncentraci 50 µg/ml.
- Inkubace 24 hodin v inkubátoru při 37°C v prostředí s 5% CO<sub>2</sub>
- Po inkubaci dendritické buňky třikrát promyjeme v PBS ⇒ centrifugace 1200 otáček/min, 10 minut při pokojové teplotě. Po druhé centrifugaci odstraníme supernatant a resuspendujeme v PBS. Po třetí centrifugaci resuspendovat DC v CellGro médiu
- Provedeme mikroskopické zhodnocení vzorku buněčné suspenze.
- Analýza vzorku buněčné suspenze na průtokovém cytometru.

### **Zamražení výsledného produktu (den 7)**

- *Příprav zamrazovacího média:* v 50 ml centrifugační zkumavce smícháme Human serum albumin 20% a DMSO v poměru 9:1. Zchladíme na 4°C .
- Buněčnou suspenzi centrifugujeme při 1200 otáčkách/min, 10 minut při 4°C = program č. 4
- Peletu buněk resuspendujeme v zamrazovacím médiu, tak aby 1 zamrazovací zkumavka obsahovala 1,8 ml zamrazovací směsi.
- *Zamražení suspenze:* v procesu zamrazování je používán zamrazovací kontejner 5100 Cryo 1°C Freezing Container, „Mr.Frosty“, do kterého jsou umístěny zamrazovací zkumavky s produktem. Kontejner umístíme do mrazáku Hereus (-80°C).

### **Rozmrazování výsledného produktu**

- Zamrazovací zkumavky vyjmeme z mrazáku a co nejrychleji rozmrazíme pouze za pomoci rukou

- Rozmražený obsah zamrazovacích zkumavek přepipetujeme do 15 ml centrifugační zkumavky a pomalu přidáme 10 ml CellGro média.
- Vzniklou směs centrifugujeme 1200 otáček/10 minut při pokojové teplotě, slijeme supernatant a resuspendujeme peletu buněk v 1 ml PBS.
- Provedeme mikroskopické zhodnocení vzorku buněčné suspenze.
- Opět centrifugujeme 1200 otáček / 5 minut při pokojové teplotě, odstraníme supernatant a resuspendujeme ve 100  $\mu$ l 2% roztoku PBS se sérem.
- .Provedeme analýzu vzorku buněčné suspenze na průtokovém cytometru

### **Příprava vzorků pro analýzu povrchových znaků pomocí průtokového cytometru**

- zkumavky si označíme číslem a požadovanou kombinací protilátek
- do každé zkumavky napipetujeme 100 $\mu$ l buněčné suspenze dendritických buněk.
- Přidáme od každé požadované protilátky 5  $\mu$ l, krátce protřepeme
- Inkubujeme 20 minut v lednici, opět protřepeme a přidáme 2ml roztoku PBS
- Vzorek umístíme do centrifugy a centrifugujeme 1200 otáček / 5 minut při pokojové teplotě, supernatant odlijeme a peletu buněk resuspendujeme v malém objemu PBS.
- Přidáme 200  $\mu$ l PBS, protřepeme a měříme na průtokovém cytometru.

## **3.2 Princip průtokové cytometrie**

Průtoková cytometrie je dnes standardní metodou pro analýzu buněk v suspenzi. Buňky v suspenzi se označí pomocí monoklonálních protilátek, které mají na sobě navázanou fluorescenční molekulu tzv. fluorochrom. Protilátky s fluorochromem se vážou specificky na příslušný antigenní znak na povrchu vyšetřovaných buněk. Po označení se suspenze vloží do průtokového cytometru. Průtokový cytometr je komplikované zařízení skládající se z vlastního průtokového cytometru a výkonného počítače. V průtokovém cytometru je analyzovaná buněčná suspenze rozptýlena v laminárně proudící kapalině. Unášené buňky jsou vypuzovány přetlakem skrze trysku, která vytvoří tenký proud suspenze, v němž letí buňky jedna za druhou. Pro správnou analýzu je důležité aby se buňky ocitly vedle sebe. Proud

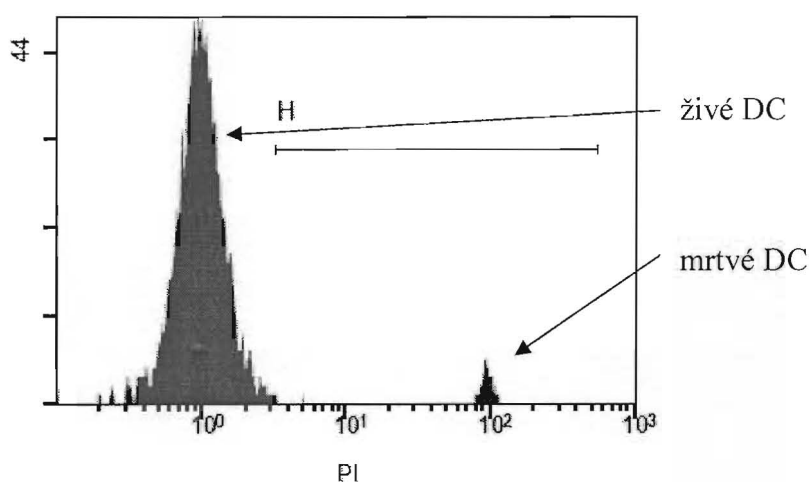


vycházející z trysky protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že laserové světlo se od ní buď odrazí nebo rozptýlí. V případě použití fluorochromů se pak detekuje ještě excitované (fluorescenční) záření.

U každé analyzované buňky detektory zaznamenávají nejméně 2 parametry vyjadřující fluorescence na různých vlnových délkách a 2 optické parametry. První proměřuje velikost buňky, kterou zaznamenává jako parametr FSc (Forward scatter). FSc vyjadřuje rozptýl světla do velmi malého dopředného úhlu. Druhý parametr označujeme jako SSc (Side scatter), ten zaznamenává světlo odražené. Parametr SSc hodnotí kompaktnost buněčného povrchu, přítomnost cytoplazmatických granulí uvnitř buňky a optické vlastnosti cytoplasmy a jádra.<sup>2,6</sup>

### 3.3 Analýza dat v průtokové cytometrii

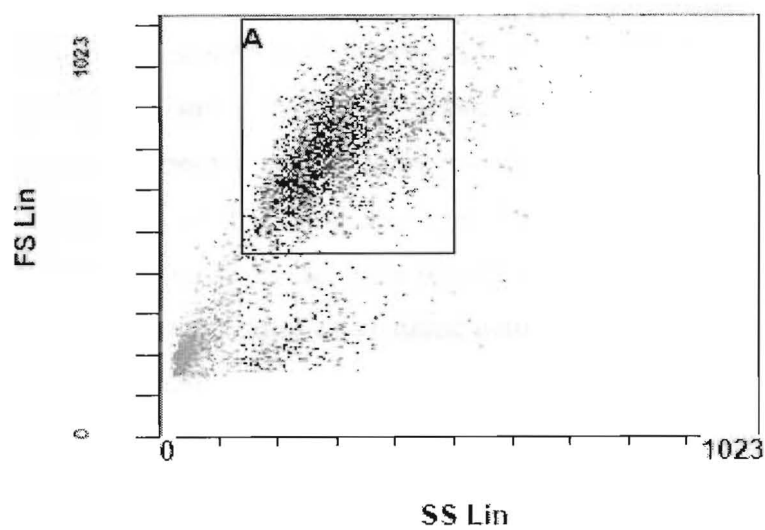
Všechny tyto parametry se zaznamenávají do počítače ve formě matice, což je důležité pro další analýzu dat. Pomocí analytického softwaru se data pak převedou do srozumitelné grafické podoby. Nejjednodušším zobrazením je histogram. Ukazuje nám kolik procent buněk je pozitivních na určitý parametr, případně jaké intenzity fluorescence určitá subpopulace buněk dosahuje. Pro všechny buňky pak můžeme zjistit základní statistická data, jako je četnost, průměrnou intenzitu fluorescence, její medián, modus, standardní odchylku, geometrický průměr atd.



**Obr. 3** Histogram – dendritické buňky označené propidium jodidem



Dalším nejběžnějším zobrazením je bodový graf (dot plot). Tento typ zobrazení se používá pro zjištění vzájemného vztahu dvou parametrů. Každá buňka v grafu je zastoupena tečkou, v případě stejného umístění více teček se tečky vzájemně překryjí a na grafu se neprojeví.<sup>2,6</sup>



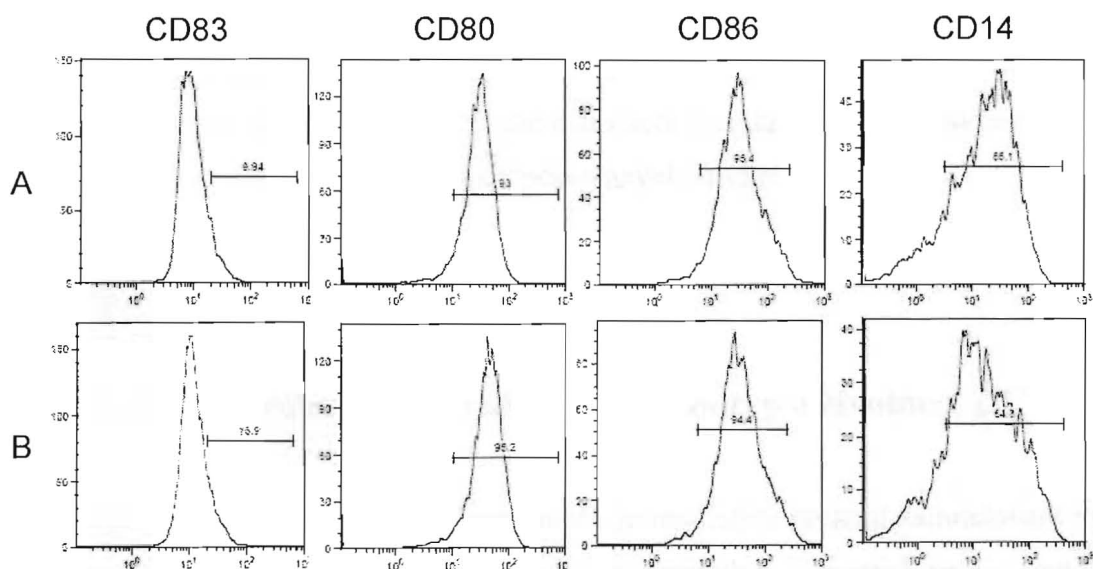
**Obr. 4** „Dot plot“ – gate A je vymezením charakteristických hodnot FSc a SSc pro DC

## 4. VÝSLEDKY

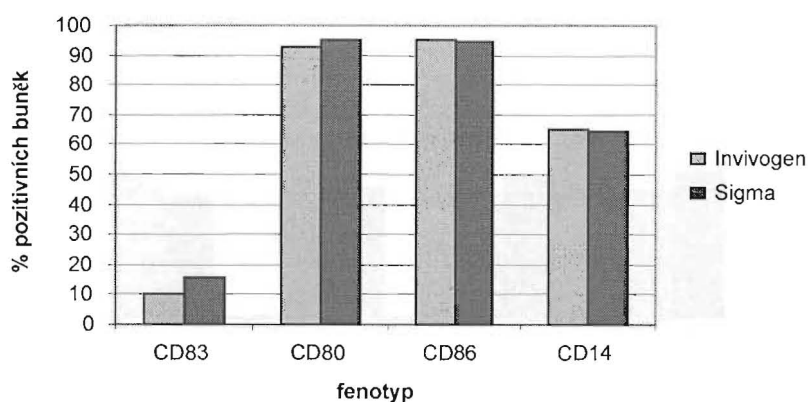
### 4.1 Porovnání vlivu různých poly I:C na fenotyp DC

Zkoumali jsme, zda při použití různých druhů maturačních činidel budou DC maturovány stejnou měrou. K maturaci DC jsme použili stejné maturační činidlo od různých výrobců. Pokusy jsme prováděli na plastu typu treated a non-treated. Plasty pro tkáňové kultury jsou vyrobeny z velmi čistého polystyrenu, povrch treated je navíc speciálně ošetřený vrstvou Nunclon, aby byl dostatečně hydrofilní pro růst buněk.

Jako maturační činidlo jsme použili poly I:C od firmy Invivogen a poly I:C od firmy Sigma. Poly I:C je synteticky vytvořené maturační činidlo, které aktivuje Toll-like receptor 3 a jeho signální dráhy.



**Obr.5** Porovnání fenotypu DC při použití poly I:C Invivogen (A) a poly I:C Sigma (B) na plastiku typu non-treated.



**Graf 1** Porovnání výsledků průtokové cytometrie při stimulaci různými poly I:C na plastru typu non-treated

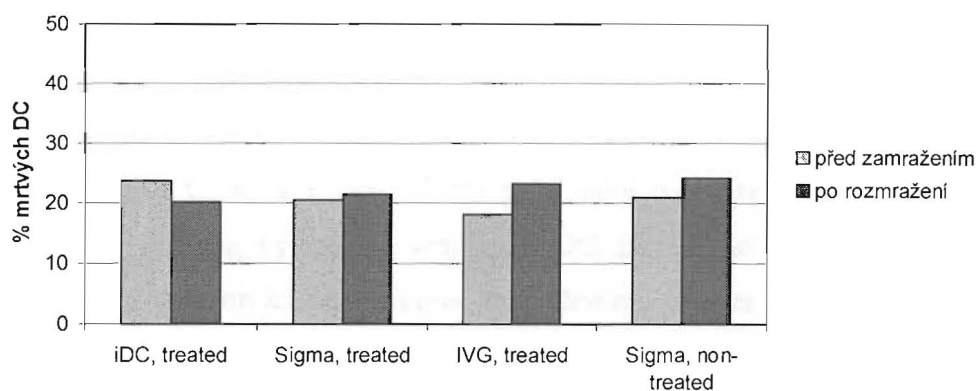
## Diskuze

Podrobná analýza fenotypu dendritických buněk po maturaci, při které jsme použili různá poly I:C, odhalila pouze malé rozdíly mezi jednotlivými populacemi DC (graf 3). Nezaznamenali jsme ani větší rozdíl mezi výsledným počtem stimulovaných buněk. Tyto výsledky zcela jasně ukazují na to, že obě maturační činidla mají velice podobnou účinnost na průběh maturace u dendritických buněk pěstovaných in vitro.

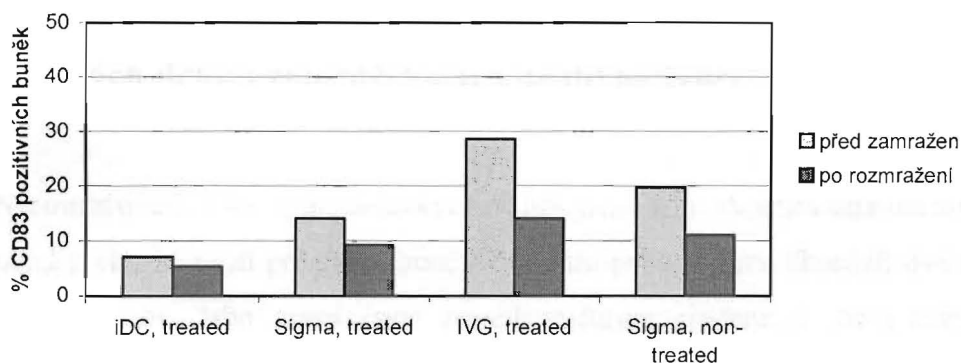
## 4.2 Vliv zamrazování a rozmrazování na fenotyp a životnost DC

Při výrobě vakcín dendritických buněk je důležitým krokem zamrazování výsledného produktu. Maturované dendritické buňky se resuspendují v zamrazovacím roztoku a jsou umístěny do speciální zamrazovací zkumavky. Zkumavky jsou pak umístěny do speciálního zamrazovacího boxu, který zajišťuje pomalé a rovnoměrné zamražení. Zkumavky jsou zamrazovány na výslednou teplotu - 80°C.

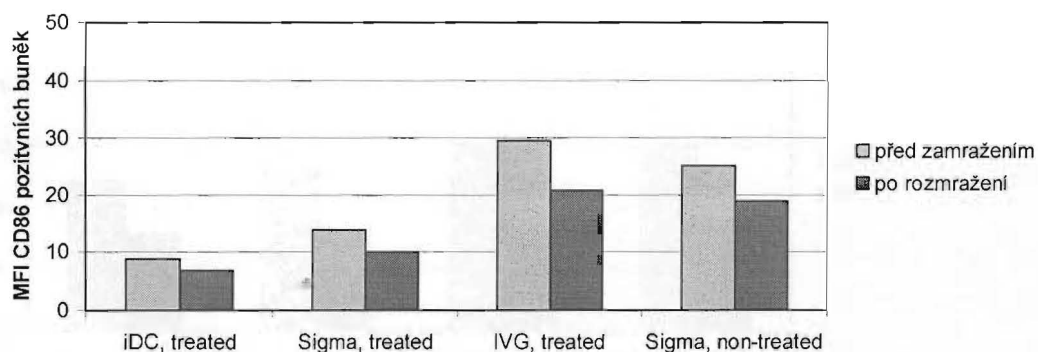
Cílem této části optimalizace výrobního protokolu, bylo zjistit zda nedochází ke změnám ve fenotypu u zamražených buněk.



**Graf 2** Porovnání počtu mrtvých buněk před zamražením a po rozmražení na různých typech plastru



**Graf 3** Porovnání počtu CD83 pozitivních dendritických buněk před zamražením a po rozmražení, při použití různých typů plastru a maturačních činidel



**Graf 4** Porovnání MFI (mean fluorescence intensity) CD86 pozitivních dendritických buněk před zamražením a po rozmražení, při použití různých typů plastru a maturačních činidel



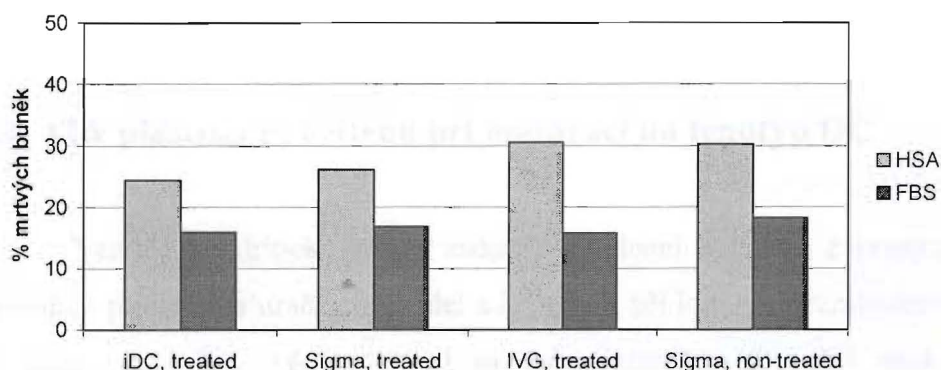
## Diskuse

Při porovnání výsledků jednotlivých vzorků je vidět, že u části dendritických buněk se mírně snížila exprese CD83 a CD86. V této práci nebylo testováno, zda tato fenotypová změna má nějaký vliv na výslednou schopnost DC stimulovat naivní lymfocyty. Počet dendritických buněk ve vzorcích zůstává před zamražením i po rozmražení téměř stejný.

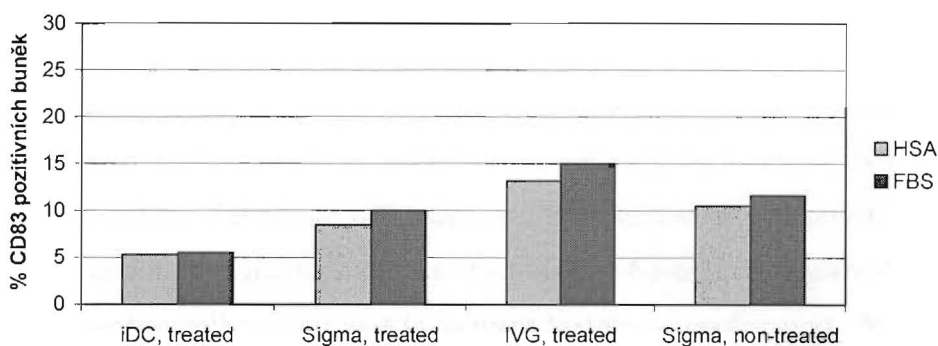
Zamrazování buněk i když je velice šetrné a pomalé, může tedy mít vliv na fenotyp zamrazovaných buněk. Dá se ovšem počítat s tím, že ne všechny buňky ve vzorku vydrží takovou radikální změnu prostředí. Výsledný produkt stále obsahuje dostatečný počet dendritických buněk.

### 4.3 Vliv různých druhů zamrazovacích médií na fenotyp a životnost DC

Při zamrazování vzorků dendritických buněk jsme také zkoušeli zda má zamrazovací médium nějaký vliv na lepší přežívání buněk. V tomto pokusu jsme zkoušeli dva různé typy zamrazovacích médií. Jako první jsme použili médium složené z 20% human serum albuminu (HSA) a 10% DMSO v poměru 9:1, které testujeme. Jako druhé jsme použili médium obsahující 20% fetální bovinní sérum (FBS), 10% DMSO a RPMI v poměru 2:1:7, které se běžně v laboratoři používá, ale nevyhovuje výrobním podmínkám v superčistých prostorách.



**Graf 5** Procento mrtvých DC po rozmražení při použití různých druhů zamrazovacích médií.



**Graf 6** Porovnání počtu CD83 pozitivních DC při použití různých druhů zamrazovacích médií

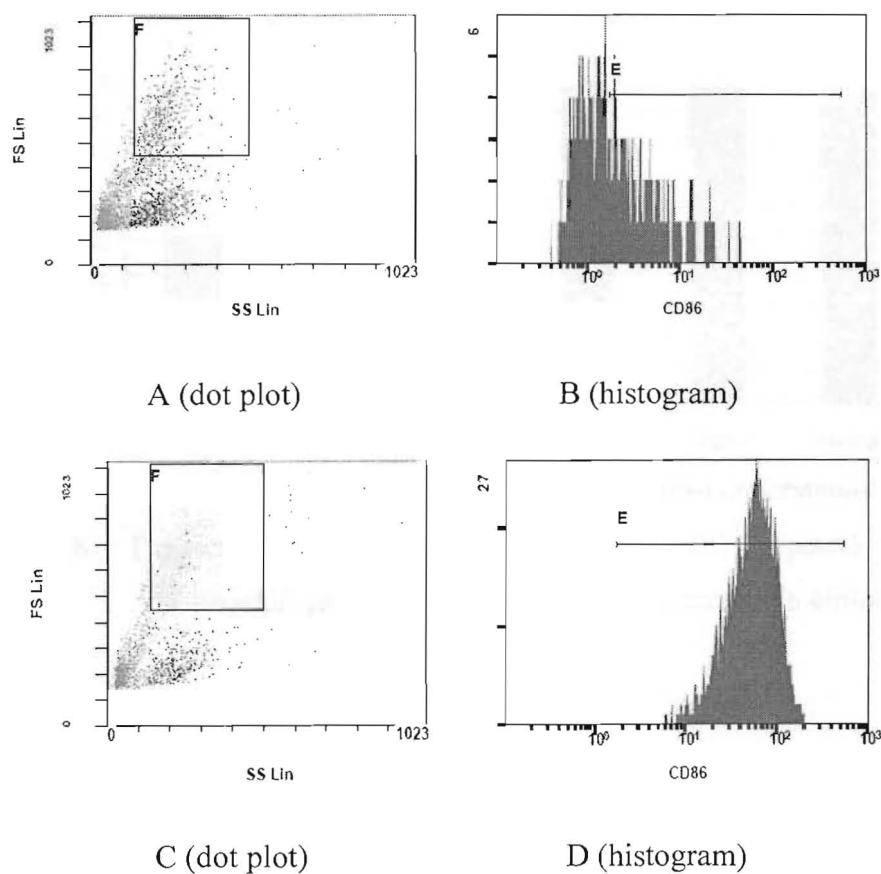
## Diskuze

Vzorky jsme po vyndání z mrazáku rychle rozmrazili a měřili na průtokovém cytometru. Měření ukázalo, že v médiu s FBS bylo více DC s lepší schopností prezentace antigenu. Životnost buněk byla také lepší při použití zamrazovacího média s FBS. Po porovnání výsledků jsme dospěli k závěru, že buňky resuspendované a zamražené v médiu s obsahem fetálního bovinního séra lépe přežívají zamražení vzorku. Rozdíly mezi výsledky obou druhů zamrazovacích médií jsou sice malé ale znatelné, teoreticky by proto bylo optimálnější zamrazovat buňky v médiu obsahujícím FBS. Bohužel toto sérum není možné používat v superčistých laboratořích, kde se vakcína vyrábí. Za těchto podmínek se zamrazovací médium s obsahem human serum albuminu, jeví jako adekvátní náhrada za médium s FBS.

### 4.4 Vliv plastiku použitého při maturaci na fenotyp DC

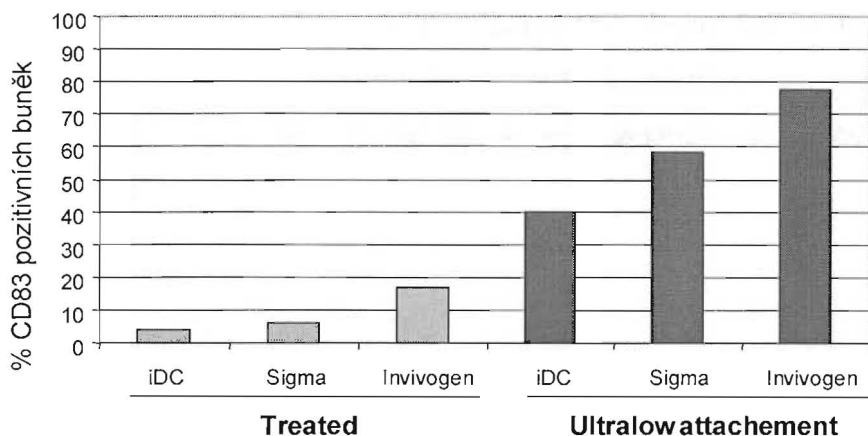
Nezralé dendritické buňky získáme pětidenní kultivací z monocytů periferní krve, následuje přidání maturačních činidel a inkubace, při které se nezralé dendritické buňky mění na zralé. Zralé DC pak exprimují na svém povrchu maturační markery a kostimulační molekuly, hlavně CD83 a CD86. Při těchto pokusech jsme zkoušeli, zda má povrch kultivační nádoby nějaký vliv na maturaci DC. Výsledky na plastech typu treated a non-treated nebyly

příliš uspokojivé, při kultivaci docházelo k přílišné adhezci buněk na plast a to následně komplikovalo jejich sběr a ovlivňovalo jejich fenotyp (nízká exprese molekuly CD83 u maturovaných DC). Byl proto testován další typ kultivačních destiček s povrchem ultralow attachment. Tento povrch je potažen speciální hydrogelovou vrstvou která je hydrofilní a neutrálně nabitá. Zabraňuje přílišnému přilnutí kultivovaných buněk a usnadňuje tím jejich odstraňování z povrchu po maturaci. Použili jsme 6 jamkovou kultivační destičku s povrchem treated (nepřilnavý) a ultralow attachment (extrémně nepřilnavý). Po proběhlé maturaci byla vyhodnocen fenotyp maturovaných buněk.

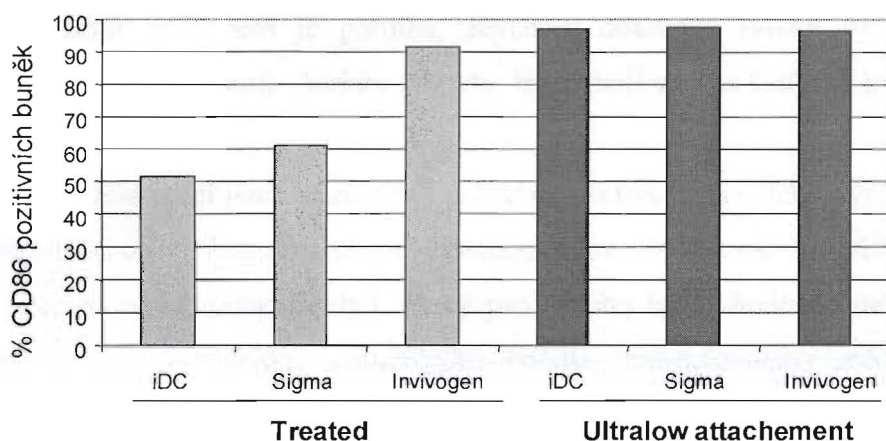


**Obr. 6** Porovnání fenotypu buněk maturovaných na plastu typu treated (A, B) s buňkami maturovanými na plastu typu ultralow attachment (C, D)





**Graf 7** Porovnání množství CD83 pozitivních DC u plastů typu treated a ultralow attachmentment při použití různých druhů maturačních činidel.



**Graf 8** Porovnání množství CD86 pozitivních DC u plastů typu treated a ultralow attachmentment při použití různých druhů maturačních činidel.

## Diskuze

Při porovnání fenotypu zjištěného průtokovou cytometrií u dendritických buněk maturovaných na plastu typu treated a ultralow attachmentment jsme zjistili výrazné rozdíly. Mezi fenotypy jednotlivých populací DC můžeme vidět rozdíly v histogramech, kdy DC pěstované na plastu typu ultralow attachmentment jsou výrazně lépe maturovány a jsou tudíž schopny lépe prezentovat antigeny než DC maturované na plastu typu treated. Na plast typu ultralow attachmentment jsme také pozorovali zvýšení maturačních markerů i u kontrolních nestimulovaných buněk (iDC), což by se teoreticky stát nemělo. Je tedy možné, že tento typ

plastu má přímý vliv na průběh maturace DC. Tento fakt bude ještě předmětem dalšího zkoumání. Z výsledků je zřejmé, že typ použitého plastiku má vliv při maturaci dendritických buněk a při výrobě DC vakcín by se lépe uplatnily kultivační nádoby typu ultralow attachment.

## 5. ZÁVĚR

Dendritické buňky mají velký potenciál pro léčbu některých nádorových onemocnění. K tomu abychom mohli z dendritických buněk vyrábět vakcínu určenou pro pacienty standardním způsobem je potřeba, abychom dokonale zvládli výrobní proces. Je proto důležité, abychom znali všechny aspekty, které mají vliv na kvalitu i kvantitu zpracovávaných buněk.

V této práci jsme se zaměřili pouze na některé části celého výrobního procesu a snažili jsme se ho celkově optimalizovat. Postupně jsem obměňovali pomůcky současně používané za jiné, u kterých jsme doufali, že by pro výrobu byly vhodnější než ty stávající. Zaměřili jsme se na vliv plastu, maturačního činidla, zamrazovacího média a zamrazování na dendritické buňky získané od dárců.

Při prvním pokusu jsme zkoušeli různé druhy maturačních činidel. Používali jsme maturační činidlo typu poly I:C (derivát kyseliny ribocytidilové), což je syntetický analog dvouvláknové RNA replikované u mnoha virů. Tato látka indukuje v hostitelském organismu produkci cytokinů, včetně interleukinů a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF- $\alpha$ ). Porovnávali jsme mezi sebou dvě poly I:C, přičemž každé bylo od jiného výrobce. V tomto pokusu jsme nezaznamenali výraznější rozdíly mezi oběma maturačními činidly.

Při dalším pokusu jsme zkoušeli rozdíly mezi zamrazovacími médii. Médium které se používá nyní totiž nevyhovuje podmínkám superčisté laboratoře, ve které se vakcína připravuje. Porovnávali jsme fenotyp a životnost buněk v jednotlivých médiích po rozmražení. Výsledky nám ukázaly, že současně používané médium má lepší vliv na fenotyp i životnost DC. Nově zkoušené médium sice nedosahuje takových výsledků, ale jeví se jako adekvátní náhrada za současně používané médium.



Zkoumali jsme také jak moc velký vliv má zamrazování buněk na jejich fenotyp a životnost. Zamrazování připravených buněk je totiž podstatnou součástí metody přípravy vakcíny s DC. Zamrazování ač velice pomalé a rovnoměrné má vliv na životnost i fenotyp DC. Po rozmražení vzorku jsme sledovali sníženou životnost buněk i expresi kostimulačních molekul CD86 i CD83.

Při posledním pokusu jsme zkoušeli úplně nový typ kultivačního plastiku typu ultralow attachment oproti současně používanému typu treated. Na buňkách kultivovaných na plastu typu ultralow attachment jsme zaznamenali výrazně vyšší expresi kostimulačních molekul CD83 i CD86. Výhodou u tohoto typu plastu byl i snadnější sběr maturovaných dendritických buněk po kultivaci. Proto je tento typ kultivačního plastiku pro výrobu vakcíny DC určitě vhodnější než typ současně používaný.

V této práci jsem se pokusila charakterizovat dendritické buňky a proces jejich výroby. Přestože v současnosti je jejich příprava ne zcela standardizovaná a jejich účinnost v léčbě nádorových onemocnění pouze ve stádiu výzkumu, je velice pravděpodobné, že v této oblasti můžeme očekávat rychlý vývoj. Optimalizace procesu kultivace dendritických buněk je velmi důležitou součástí jejich výzkumu, protože na nich závisí jejich praktické využití. Proto by bylo vhodné z průzkumem výrobního procesu pokračovat.

Předmětem této práce nebylo provedení testů, které charakterizují DC po funkční stránce. Fenotyp dendritických buněk, zejména exprese maturačního markeru CD83, často koreluje s jejich funkční kapacitou. Nicméně je zásadní dále stanovit, zda námi vyrobené DC produkují zánětlivé a polarizační cytokiny, například IL-12 p70, důležitý pro polarizaci Th1 buněk. Dále je nutné ověřit, zda indukují proliferaci lymfocytů a vyloučit, zda v přílišné míře neindukují vznik T regulačních lymfocytů.

Pokud tyto testy dopadnou úspěšně, lze přistoupit k testování účinnosti samotné vakcíny na bázi dendritických buněk nesoucích nádorové antigeny, v našem případě antigeny získané z nádorových buněk karcinomu ovaria. Nejprve bude in vitro testována schopnost takto připravených DC indukovat nádorově-specifické lymfocyty. Poté bude zahájena samotná klinická studie, kde bude po aplikaci vakcíny, vyrobených podle pravidel správné výrobní praxe dle evropských norem, hodnocena její bezpečnost a účinnost.

## 6. LITERATURA

1. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. Základy imunologie. Praha : TRITON, 2001. 260 s. ISBN 80-7254-215-X
2. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, et al. Vyšetřovací metody v imunologii. Praha : Grada Publishing, a.s., 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1
3. HOŘEJŠÍ, Václav. Molekulární a buněčné mechanismy fungování imunitního systému [online]. [2005] [cit. 2008-04-14]. Dostupný z WWW: <http://www.otvorenave-da.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/007.pdf>
4. ŠEDIVÁ, Darina, STRÍŽ, Ilja. Dendritické buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. Alergie [online]. 2002 [cit. 2008-04-14]. Dostupný z WWW: <http://www.tigis.cz/alergie/alergie202/sediva.htm>
5. BANCHEREAU, Jacques, STEINMAN, Ralph. Dendritic cells and the control of immunity. Nature [online]. 1998, vol. 392 [cit. 2008-04-14]
6. KREJSEK, Jan, KOPECKÝ, Otakar. Klinická imunologie. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004. 941 s. ISBN 80-86225-50-X
7. SPÍŠEK, Radek, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. Dendritická buňka v imunitě : Její role při regulaci imunitní reakce. Vesmír [online]. Duben 2003, č. 82 [cit. 2008-04-14]. ISSN 1214-4029
8. BANCHEREAU, Jacques , et al. Immunobiology of Dendritic Cells. Annual Review of Immunology [online]. 2000, vol. 18 [cit. 2008-04-14].
9. FERENČÍK, Miroslav. Receptory podobné Toll (TLRs), prirodzená imunita . Alergie [online]. 2003 [cit. 2008-04-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.tigis.cz/alergie/aler103/08ferencik.htm>>
10. HOŘEJŠÍ, Václav. Receptory TLR - klíčové molekuly imunitního systému : Imunologové stále ještě objevují molekulární obdoby neznámých velkých zvířat. Vesmír [online]. 2004, č. 83 [cit. 2008-04-14]. ISSN 1214-4029
11. KOČÁREK, Eduard. Molekulární biologie v medicíně. Brno : NCO NZO, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4
12. SPÍŠEK, Radek, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. Dendritická buňka v protinádorové terapii : Výhry i prohry imunitních reakcí. Vesmír [online]. květen 2003, č. 82 [cit. 2008-04-14]. ISSN 1214-4029
13. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. c2007 [cit. 2008-04-14]. Dostupný z WWW: <[http://www.sukl.cz/\\_download/cs08pokynform/vyr/vyr32.rtf](http://www.sukl.cz/_download/cs08pokynform/vyr/vyr32.rtf)>
14. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. c2007 [cit. 2008-04-14]. Dostupný z WWW: <[http://www.sukl.cz/\\_download/cs08pokynform/vyr/vyr7.rtf](http://www.sukl.cz/_download/cs08pokynform/vyr/vyr7.rtf)>

## POUŽITÉ OBRÁZKY

- A. [http://www.medicineatyaale.org/v2i4\\_july\\_august2006/science.html](http://www.medicineatyaale.org/v2i4_july_august2006/science.html)
- B. [www.vesmir.cz/clanekPDF.php3?CID=1635&YID=1760](http://www.vesmir.cz/clanekPDF.php3?CID=1635&YID=1760)