



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

***In vitro* expanze a aktivace NK buněk pro účely
buněčné terapie**

Vypracovala: Monika Benešová
Vedoucí práce: Mgr. Monika Holubová, Ph.D.

České Budějovice 2014

Abstrakt

NK buňky jsou součástí nespecifické imunitní odpovědi a jsou jednou z hlavních složek protinádorové imunity. Ke své aktivaci nepotřebují antigenní stimul, ale rozeznávají poškozené (transformované) buňky podle snížené exprese MHC I molekul. Tito přirození zabíječi se stávají náplní mnoha klinických studií zabývajících se využitím protinádorové aktivity NK buněk jak u solidních nádorů, tak u hemato-onkologických onemocnění.

Cílem této práce bylo najít optimální podmínky pro *in vitro* expanzi a aktivaci NK buněk. NK buňky byly izolovány pomocí magnetické separace z frakce mononukleárních buněk a kultivovány ve dvou typech médií SCGM a X-VIVO 10 s přidáním interleukinu 2 popř. OKT3 protilátky. Dále byl sledován vliv přítomnosti podpůrných mononukleárních buněk na proliferaci NK buněk. Po 6-ti denní kultivaci byly buňky pasážovány a byl stanoven nárůst NK buněk a průtokovou cytometrií sledovány aktivační markery CD25 a CD336 (NKp44). Všechny experimenty probíhaly v podmínkách správné výrobní praxe.

Mírně větší výtěžek NK buněk byl pozorován u SCGM média bez výrazného rozdílu v ostatních aditivech. Mezi kulturami s/bez přidání podpůrných buněk byl pozorován značný rozdíl ve prospěch kultury s podpůrnými ozářenými mononukleárními buňkami. Nebyl zaznamenán rozdíl v kulturách s autologními nebo alogenními buňkami. Pomocí průtokové cytometrie jsme zjistili, že NK buňky, které mají vyšší proliferační potenciál, exprimují ve větší míře CD25, na rozdíl od buněk s nižší proliferací, které měly zvýšenou expresi znaku CD336.

Práce vedla k definici optimálních kultivačních podmínek pro NK buňky a stala se základem pro další vývoj léčivého přípravku z *in vitro* aktivovaných NK buněk.

Klíčová slova: NK buňky – kultivace - aktivita

Abstract

NK cells are part of the non-specific immune response and are one of the main components of antitumor immunity. They do not need antigen stimuli for their activation but recognize damaged (transformed) cells by characteristic decreased expression of MHC I molecules. These natural killers become subject of many clinical studies based on the use of anti-tumor activity of NK cells for both solid tumors and in hemato - oncological diseases.

The aim of this study was to find optimal conditions for *in vitro* expansion and activation of NK cells. NK cells were isolated from mononuclear cell fraction by magnetic separation and cultured in two types of media SCGM and X - VIVO 10 with the addition of interleukin-2 respectively OKT3 antibody. The influence of the mononuclear cells on proliferation of NK cells was tested. After a 6- day culture the cells were passaged and growth of NK cells was determined using hematological analyzer and flow cytometry. Expression of the activation markers CD25 and CD336 (NKp44) was observed. All experiments were conducted under conditions of good manufacturing practice.

Slightly higher gain of NK cells was observed in SCGM media without significant differences in the other additives. Much higher number of NK cells was observed in culture with supporting irradiated mononuclear cells. There were no differences in cultures with autologous or allogeneic cells. We found that NK cells with higher proliferative potential express increasingly CD25, unlike the cells with decreased proliferation which had increased expression of CD336 marker.

The work led to the definition of the optimal culture conditions for NK cells and became the basis for the further development of the medicinal product from *in vitro* activated NK cells.

Key words: NK cells – culture - activity

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat zejména vedoucí své bakalářské práce Mgr. Monice Holubové, PhD za odbornou pomoc při zpracování dané problematiky, její cenné rady, ochotu spolupráce a její trpělivost. Dále bych ráda poděkovala primáři Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň MUDr. Pavlu Jindrovi, PhD a vedoucímu laboratoře doc. MUDr. Danieli Lysákovi, PhD za možnost uskutečnění experimentálních pokusů. V neposlední řadě bych ráda věnovala poděkování svým rodičům za podporu v průběhu studia.

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
<i>1.1. Imunitní systém a nádor</i>	<i>11</i>
<i>1.2. Buňky imunitního systému</i>	<i>11</i>
1.2.1. Monocyty.....	13
1.2.2. Granulocyty	13
1.2.3. T-lymfocyty	14
1.2.4. B-lymfocyty.....	15
1.2.5. NK buňky	15
<i>1.3. Cytokiny.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4. NK buňky.....</i>	<i>16</i>
1.4.1. Historie	16
1.4.2. Vývoj NK	17
1.4.3. Zastoupení v orgánech.....	18
1.4.4. Subtypy NK buněk.....	20
1.4.5. Cytotoxická funkce NK buněk	21
1.4.6. Aloreaktivita NK buněk.....	22
1.4.7. Receptory NK buněk	22
1.4.8. In vitro aktivace NK buněk	25
<i>1.5. Hemato-onkologie.....</i>	<i>26</i>
1.5.1. Leukemie	26
1.5.2. Základní léčba hematologicko-onkologických onemocnění	27
1.5.3. Imunoterapie.....	27
1.5.4. Leukemie a NK buňky.....	28

2. CÍL PRÁCE	29
3. HYPOTÉZA	29
4. METODIKA	30
<i>4.1. Izolace NK buněk z periferní krve dárce pomocí magnetické separace</i>	<i>30</i>
<i>4.2. Kultivace</i>	<i>31</i>
<i>4.3. Pasáž NK buněk</i>	<i>32</i>
<i>4.4. Měření na průtokovém cytometru</i>	<i>32</i>
5. VÝSLEDKY	34
<i>5.1. Izolace NK buněk</i>	<i>34</i>
<i>5.2 Kultivace NK buněk</i>	<i>35</i>
5.2.1. Série 1 - Výběr vhodného kultivačního média a kombinace aktivačních látek	35
5.2.2. Série 2 - Vliv podpůrných ozářených buněk tzv. feeder cell na proliferaci a aktivitu NK	39
5.2.3. Testování aktivačních markerů CD25 a CD336 na NK buňkách průtokovou cytometrií.....	41
6. DISKUZE	43
7. ZÁVĚR	45
8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	46

Seznam použitých zkratek

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách)
ALL	acute lymphocytic leukemia (akutní lymfoblastická leukemie)
AML	acute myelogenous leukemia (akutní myeloidní leukemie)
APC	antigen-presenting cell (buňka předkládající antigen)
BCR	B-cell receptor (receptor B-lymfocytů pro antigen)
CCR	CC chemokine receptor (CC-chemokinový receptor)
CD	cluster designation
CD94/NKG2	membránový receptor C-tytu lecitinové rodiny
CLL	chronic lymphocytic leukemia (chronická lymfatická leukemie)
CML	chronic myelogenous leukemia (chronická myeloidní leukemie)
CSF	colony-stimulating factor (faktor stimulující růst kolonií)
CTL	cytotoxic thymus-derived lymphocyte
CXCR	CXC chemokine receptor (CXC-chemokinový receptor)
CX3CR	CX3C chemokine receptor (CX3C-chemokinový receptor)
FcR	receptory pro konstantní část (Fc) protilátky
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (granulocyty- makrofágy stimulující faktor)
GVHD	graft versus host disease (reakce štěpu protihostiteli)
GVL	graft versus leukemia (reakce štěpu proti leukémii)
HLA	human leukocyte antigen (hlavní lidský leukocytární antigen)
HSCt	haploidentical stem cell transplantation (transplantace haploidních kmenových buněk)
IFN	interferon
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin
KAR	killer activatory receptor (aktivační receptor NK buněk)
KIR	killer inhibitory receptor (inhibiční receptor NK buněk)
LAK	lymphokine-activated killer

MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
NCAM	neutral cell adhesion molekule (neutrální buněčná adhezivní molekula)
NK	natural killer (přirozený zabíječ)
NKR	natural killer receptors (receptor NK buněk)
PMN	polymorphonuclear neutrophil (polymorfonukleární neutrofil)
SCF	stem cell factor (faktor kmenových buněk)
Tc	cytotoxic T-cell (cytotoxický T-lymfocyt)
TCR	T-cell receptor (receptor T-lymfocytů pro antigen)
TGF	transforming growth factor (transformující růstový faktor)
Th	helper T-cell (pomocný T-lymfocyt)
TNF	tumor necrosis factor (tumor nekrotizující faktor)

ÚVOD

NK buňky jsou lymfocyty přirozeného (nespecifického) imunitního systému, které mají zásadní význam při obraně hostitele a imunitní regulaci. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost rozlišit zdravé buňky od buněk infikovaných virem či transformovaných v nádorové buňky. Na rozdíl od jiných buněk, mechanismus jejich účinku nastupuje zcela samostatně a jejich činnost není podmíněna potřebou dostávat signál od jiných imunitních buněk. Pro organismus hraje zásadní význam nikoli jejich počet, ale jejich aktivita, tzv. cytotoxicita. Využití NK buněk po transplantaci kostní dřeně může sloužit jako prostředek prevence relapsu onemocnění.

V současné době i přes dlouholetý výzkum počet onkologických onemocnění vzrůstá. Při mnohých patologických procesech výkonnost celého imunitního systému klesá současně s aktivitou NK a způsobí tak rizikový faktor pro vznik malignity a metastáz.

Cílem práce je nalézt optimální podmínky pro izolaci, kultivaci a aktivaci NK buněk v podmínkách splňujících kritéria správné výrobní praxe. Dílčími cíli je testování několika typů kultivačních médií a různých koncentrací aktivačních látek. Nejprve práce zahrnuje literární shrnutí imunitního systému, funkce NK buněk, jejich úlohu v imunitním systému a současně možné využití v imunoterapii, dále se věnuje praktickému osvojení metod izolace a následné kultivace buněk z plné krve. Dílčími cíli je také testování několika typů kultivačních médií a suplementů včetně aktivačních látek. Ze získaných výsledků je proveden rozbor a vyhodnocení získaných dat. Poslední část práce se zabývá diskuzí výsledků a stanovení optimálního postupu pro další aplikace.

Vývoj nových metod v imunoterapii představuje způsob zkvalitnění a prodloužení života pacientů ve všech oborech medicíny.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Imunitní systém a nádor

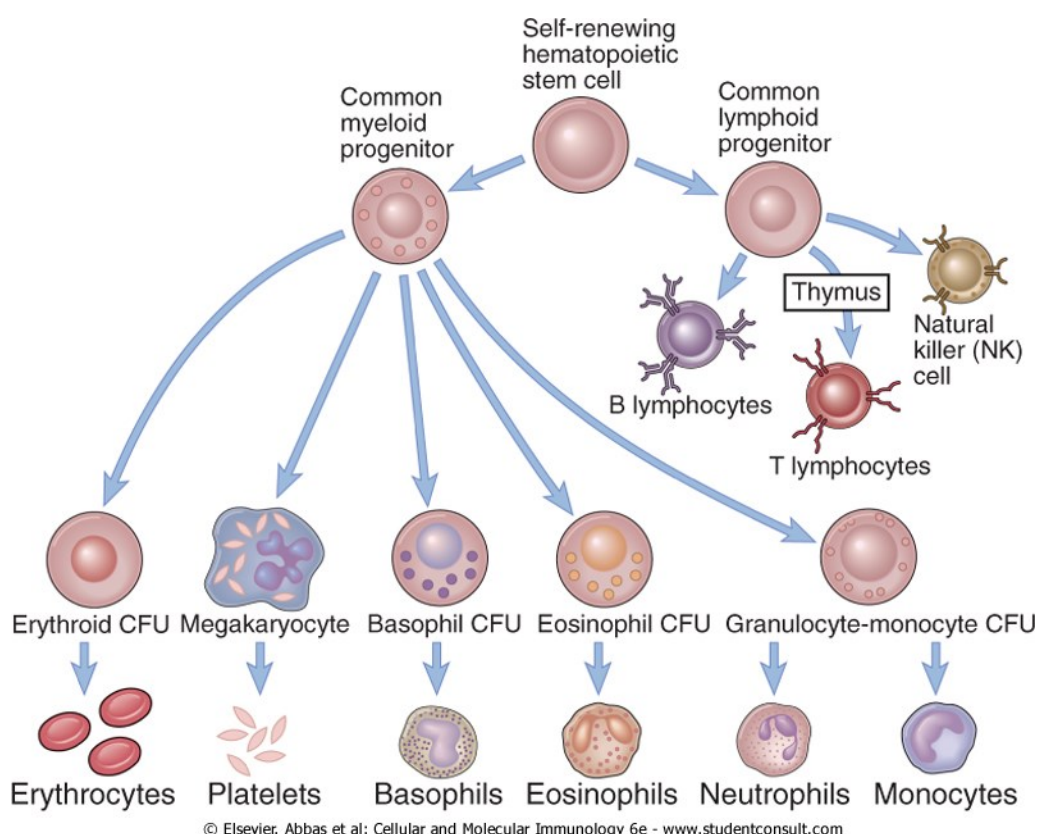
Každý živý organismus musí již od svého počátku odolávat cizorodým látkám z okolního prostředí. Schopnost jedince odolávat jednotlivým patogenům označujeme slovem pocházejícím z latinského *immunitas* - odolnost, tedy imunita.

Základním významem imunitního systému člověka a vyšších živočichů je nejen schopnost rozlišit látky (buňky) tělu vlastní od cizorodých, ale také udržení stálého vnitřního prostředí, zajištění tolerance vůči vlastním zdravým tkáním a schopnost odstranit buňky poškozené, napadené virem či maligně transformované. Během života se v každém organismu vyskytují desítky až stovky nádorově změněných buněk. Imunitní systém potlačí jejich růst a produkci a tím zabrání nádorovému bujení. V současné době existuje řada postupů využívající právě aktivaci buněk imunitního systému k potlačení nádorového bujení. Protinádorová imunita má velký význam v léčbě nádorového onemocnění. Nádorové buňky vznikají genetickou přeměnou zcela normálních zdravých buněk organismu a jsou vnímány jako antigenně podobné či vlastní, proto mnohdy unikají imunitnímu dozoru. V případě, že imunitní systém nádorovou tkáň odhalí jako škůdce, je schopen kontrolovat (zastavit) růst nádoru pouze v raných stádiích karcinogeneze. K imunitní reakci nemusí být důvodem ani zbytky rozpadlých nádorových buněk, které jsou odstraňovány jako jiné fyziologické fragmenty buněk. Imunitní odpověď proti nádoru nastává tehdy, produkuje-li molekuly, které rozpoznává organismus jako cizí. Často se stává, že nádor využije buňky imunitního systému ve svůj prospěch a buňky imunitního systému se tak stanou podpůrnými pro další růst nádorů. V boji proti nádorově změněným buňkám využívá organismus obě hlavní složky imunity.

1.2. Buňky imunitního systému

Největší počet buněk imunitního systému představují právě různé typy bílých krvinek. Jednotlivé typy leukocytů pod vlivem různých faktorů diferencují

z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni v procesu krvetvorby. Kmenové buňky nalézáme v kostní dřeni v malé míře po celý život. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie leukocytů: myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního prekursoru vznikají monocyty, dendritické buňky a tři typy granulocytů. Z prekursoru lymfoidního vznikají NK buňky, B-lymfocyty, T-lymfocyty (Hořejší – Bartůňková, 2009). Přehled jednotlivých linií diference leukocytů znázorněn na obr. 1.



Obrázek 1: Diference buněk imunitního systému (převzato z <http://cmapspublic.ihmc.us/>).

Buňky můžeme z hlediska morfologie dělit v závislosti na tvaru jádra a charakteru cytoplazmy na dvě základní skupiny: agranulocyty (monocyty, lymfocyty) a granulocyty.

1.2.1. Monocyty

Monocyty jsou základní složkou vrozeného imunitního systému, v němž jsou zodpovědné především za fagocytózu patogenů, včetně odstraňování mrtvých buněk. Podílejí se na rozmanitých funkcích v mnoha homeostatických procesech od hostitelské obrany tkáně až po patofyziologii několika chorob včetně rakoviny. Tyto mononukleární krevní buňky reagují na zprostředkování imunitní reakce a zajišťují hromadění zánětlivých cytokinů v místě zánětu (Hořejší – Bartůňková, 2009).

Monocyty se v průběhu svého zrání mohou diferencovat na makrofágy (tkáňové fagocytizující formy) a dendritické buňky (součást specifické imunitní odpovědi). Dendritické buňky neboli antigen prezentující buňky (APC) jsou schopny fagocytizující částici rozštěpit na proteinové fragmenty, vystavit je na svůj povrch a tím je prezentovat T-lymfocytům. Z toho vyplývá, že APC jsou základní součástí antigenně specifické části imunitního systému (Vácha *et al.*, 2008).

Díky jejich jedinečné schopnosti poskytovat antigeny T-buňkám se v posledních letech hojně využívají k přípravě terapeutických vakcín proti rakovině (Doseff – Parihar, 2012).

1.2.2. Granulocyty

Tyto buňky jsou charakteristické segmentovaným jádrem a velkým množstvím granul v cytoplazmě. Podle barvitelnosti granul různými barvivy se rozdělují na eozinofilní, barví se kyselými barvivy, bazofilní, barví se zásaditými barvivy a neutrofilní, špatně barvitelné. Nejpočetněji zastoupenou skupinou jsou neutrofilní granulocyty. Jejich jádro je proměnlivé (polymorfní) proto se také označují polymorfonukleární neutrofile (PMN). Vedle fagocytózy uplatňují svou protinádorovou aktivitu také expresí cytokinů, které mohou inhibovat proliferaci nádorových buněk (Mantovani, 2009).

Předchozí studie ukázaly, že PMN mohou mít také podpůrný vliv na nádorové buňky, např. pozitivním působením na angiogenezi (Kießling *et al.*, 1975; Pross – Jondal, 1975).

1.2.3. T-lymfocyty

Při růstu opouštějí kostní dřev a dozrávají v thymu a jsou součástí specifické imunitní odpovědi. Na základě CD markerů na povrchu rozlišujeme CD8+ cytotoxické T-lymfocyty – Tc, a pomocné CD4+ T-lymfocyty - Th. Některé T-lymfocyty mohou významně ovlivnit imunitní systém především díky své schopnosti vylučovat do krve cytokiny (Hořejší – Bartůňková, 2009).

Studie ukazují, že dříve pro protinádorovou imunologii významnější svou cytotoxicitou T-lymfocyty CD8+. V současné době však výzkumy poukazují na neméně významnou úlohu CD4+ T-lymfocytů (Perez-Diez *et al.*, 2007).

CD8+ T- lymfocyty představují buňky, jež jsou svým cytotoxickým účinkem (svými produkty) schopné zničit buňky, proti nimž jsou určeny. Tyto buňky po kontaktu s cílovými elementy (např. nádorovými buňkami či buňkami infikovanými virem) uvolňují serinové proteázy a perforiny, jež způsobují lýzu buněk. Rozpoznávají pouze antigeny předkládané APC na MHC molekulách I. třídy (Timmerman – Levy, 1999). Na svém povrchu obsahují TCR receptor. Aktivace je několikastupňový proces začínající rozpoznáním a vazbou Tc-lymfocytu na příslušné antigeny prezentované pomocí MHC I. třídy na povrchu APC, následuje vazba molekul mezi APC a Tc, jeho aktivace, proliferace a diferenciace. Vzniká tak klon efektorových buněk reagující s antigenním peptidem, který je krevním řečištěm roznesen do tkání (Vlková, 2008).

CD4+ lymfocyty jsou tzv. pomocné (helper) T-lymfocyty (Th), jež jsou součástí specifické buněčné i humorální imunity a mají schopnost zaktivovat ostatní složky imunitního systému (Vlková, 2008). Svou stimulační funkcí jsou schopny zvyšovat cytotoxickou reakci proti nádorovým buňkám, zejména aktivitou cytotoxických T-lymfocytů. Pomocné T-lymfocyty jsou schopny rozpoznat pouze antigeny předkládané APC na MHC molekulách II. třídy (Timmerman – Levy, 1999).

Podle cytokinů, které produkují, je můžeme rozdělit na Th₁, zodpovědné za regulaci imunitní reakce proti infekčním agens a aktivaci Tc lymfocytů a Th₂, jež rozvíjí imunitní reakce za pomoci B-lymfocytů, které rozeznaly, pohltily a následně rozštěpily

mikrobiální antigeny a usnadňují jejich diferenciaci na plazmatické buňky produkující řadu protilátek (Vlková, 2008). Protilátková odpověď založená na spolupráci B a Th (především Th₂) lymfocytů je účinná pro potlačení extracelulárních parazitů, zatímco zánětlivá odpověď založená na spolupráci Th₁ a makrofágů a na působení Tc se uplatňují v boji proti parazitům vnitrobuněčným.

1.2.4. B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou buňky imunitního systému zajišťující specifickou humorální odpověď. B-lymfocyty na svém povrchu obsahují důležitý receptor BCR, který tvoří komplex bílkovin, zahrnující především transmembránový imunoglobulin umožňující vazbu na volné imunoglobuliny v krvi či specifický antigen. Membránově vázaná protilátka je obvykle třídy Ig G nebo Ig M. Aktivace B-lymfocytu probíhá právě vazbou antigenu na membránový BCR receptor nebo pomocí Th₂ lymfocytu, jež rozpoznal antigen na antigen prezentující buňce. Tento způsob aktivace je považován za účinnější. B-lymfocyty se po aktivaci pomnoží, většina diferencuje na plazmatické buňky produkující značné množství protilátek. Zároveň druhá cesta aktivace vede ke vzniku paměťových buněk, urychlující při příštím setkání se stejným antigenem sekundární infekci (Ferenčík, 1989), což se využívá při očkování.

1.2.5. NK buňky

Vedle protinádorové imunity založené na buňkách specifické imunity, existují i mechanismy nespecifické imunity. Jde o důležitou komponentu přirozené imunity tzv. přirozené zabíječe (NK – natural killer), jež ke své aktivaci nepotřebují stimulaci antigenu. Této lymfocytární subpopulaci se věnujeme podrobně v kapitole 1.4.

1.3. Cytokiny

Cytokiny představují malé signální proteiny, které jsou produkovány především buňkami imunitního systému. Jsou schopné vyvolat aktivaci, dělení a diferenciaci některých typů buněk proti patogenům v organismu či jinou stimulaci imunitního systému. Zároveň jsou schopny i imunitní systém inhibovat. Rozlišujeme několik skupin cytokinů a to interleukiny (IL-1 až IL-32), chemokiny (př. IL-8), interferony (př.

IFN- α), transformující růstové faktory (TGF- α , TGF- β), faktory stimulující kolonie (CSF), faktory nekrotizující nádory (př. TNF α), jiné růstové faktory (př. SCF) (Hořejší – Bartůňková, 2009). Podle mechanismu působení jej dělíme na autokrinní (působící na buňku produkující), parakrinní (působící na buňky v těsné blízkosti produkujících buněk), endokrinní (působící na vzdálené tkáně po roznesení krevním řečištěm).

1.4. NK buňky

1.4.1. Historie

V roce 1970 Rolf Kiessling v rámci svého doktorského studia spolu s doktorským kolegou Hughem Prosem objevili, že NK buňky jako jedinečný druh lymfocytů jsou schopny přirozené cytotoxicity u myši (Kiessling *et al.*, 1975). Současně doktor Hugh Pross spolu s kolegou Mikaelem Jondalem pozorovali u člověka ten stejný jev (Pross – Jondal, 1975). Jejich práce byla provedena pod dohledem profesorů Evy Kleinové a Hanse Wigzella z Karolinského Institutu ve Stockholmu. Kiesslingův výzkum zahrnoval schopnosti T-lymfocytů lyzovat nádorové buňky, proti kterým byl již organismus očkován. Jondal a Pross studovali cytotoxicitu buněk v normální lidské krvi a účinek odstranění receptorů nesoucích buněk. Ve stejném roce rovněž Ronald Herberman publikoval obdobné výsledky u myši (Mantovani, 2009).

V roce 1980 Timonen a Saksela prokázali, že pomocí hustotní gradientové centrifugace a později využitím monoklonálních protilátek lze získat velké granulární lymfocyty, dnes známé jako NK buňky (Hořejší – Bartůňková, 2009). Bylo to poprvé, kdy NK buňky byly pozorovány také pod mikroskopem.

Jedná se o buňky, jež svou strukturou připomínají velké lymfocyty s četnými granuly, neobsahují však klasické receptory TCR a BCR. Jsou schopné rozlišit buňky infikované virem nebo změněné nádorem, neboť tyto buňky obsahují jen velmi malé množství MHC I antigenů na své membráně nebo jej dokonce postrádají a tím se tak skrývají před Tc lymfocyty. Po rozpoznání takové buňky, která má na svém povrchu málo těchto antigenů, popř. je zcela postrádá, ji NK buňka zahubí stejnou cytotoxickou reakcí, jako působí Tc-lymfocyty. K aktivaci NK buněk je zapotřebí řada faktorů.

Aktivované NK buňky produkují řadu cytokinů a chemokinů vedoucí k aktivaci buněk podílejících se na imunitní reakci. Produkce těchto látek jsou však také pozitivně i negativně regulovány poškozenými nebo nádorově transformovanými buňkami (Malmann *et al.*, 2012).

1.4.2. Vývoj NK

Diferencují se z pluripotentní kmenové buňky (lymfoidní linie) v kostní dřeni spolu s lymfocyty B a T. Zatímco vývoj B-lymfocytu probíhá u lidí v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech, vývoj T-lymfocytu probíhá v thymu. NK buňky jsou vývojově bližší T-lymfocytům a jsou považovány za jejich třetí subpopulaci vedle pomocných Th a cytotoxických Tc T-lymfocytů (Hořejší – Bartůňková, 2009). Jsou tedy také schopny dozrávat v thymu.

Vývoj NK buněk probíhá prostřednictvím pěti fází diferenciace. K terminální diferenciaci dochází prostřednictvím série náhodných událostí zprostředkovaných oběma indukčními a inhibičními vlivy jako jsou cytokiny a příbuzné signály pro buněčné a povrchové receptory. Vývoj NK postupuje řadou fází vyznačující se odlišnou expresí povrchových buněčných antigenů.

Hematopoetická kmenová buňka se diferencuje na myelodní a lymfoidní progenitor. Společný lymfoidní progenitor buněk u lidí je definován jako CD34(+)Lin(neg)CD10(+) (Galy *et al.*, 1995). Ze společného lymphoidního progenitoru začínají NK buňky svou diferenciační dráhu.

V sekundárních lymphoidních tkáních prostřednictvím analýzy exprese antigenu buněčného povrchu a ex vivo studií rozvoje lidských NK buněk můžeme identifikovat diferenciaci z lymphoidního progenitoru pro-NK, pre-NK, nezralé iNK, CD56^{bright} NK a CD56^{dim} NK (Di Santo, 2006). Přechod ze stádia pro-NK na pre-NK je fenotypově charakteristický vyšší povrchovou expresí CD117, známý také jako c-kit a svou funkční schopností reagovat na IL-15 (Freud *et al.*, 2006).

Klinické studie prokazují, že buňky pro-NK a pre-NK se mohou odklonit od buněčné linie NK a mohou se diferencovat na B, T- lymfocyty nebo dendritické buňky. Stádium nezralých iNK buněk se však zavazuje k linii NK buněk. Ty mají fenotyp CD34(-)CD117(+)CD94(-), na rozdíl od přechodných typů pro-NK a pre-NK, které jsou

CD34(+) (Freud *et al.*, 2006). Postup zrání z fáze pre-NK do iNK je také charakteristický zvyšující se expresí CD56 (Kim *et al.*, 2002). Molekula CD56 je obvykle považována za marker zralých NK buněk, závěrečná etapa zrání lidských NK buněk je však poznamenána poklesem CD56 a CD94 a současným zvýšením CD16 (FcR γ III) a receptorů KIR (Caligiuri, 2008; Freud - Caligiuri, 2006a).

Fenotypový rozdíl NK podskupin CD56^{bright} a CD56^{dim} v krvi je důležitý pro rozdílnou úlohu imunity. Cirkulující CD56^{bright} mohou vzhledem ke svému relativně vysokému vyjádření CD62L a CCR7 migrovat do sekundárních lymfoidních tkání. V sekundárních lymfoidních tkáních mohou interagovat s makrofágy a dendritickými buňkami a vést k sekreci cytokinů, které mohou aktivovat antigen prezentující buňky. NK CD56^{dim} pravděpodobně zřídka vstupují do sekundárních lymfoidních tkání a jejich význam slouží spíše k účelem zjištění abnormální MHC I. třídy sekundární virovou infekcí nebo maligní transformací (Caligiuri, 2008; Cooper *et al.*, 2001).

1.4.3. Zastoupení v orgánech

Periferní krev

NK buňky tvoří pouze 10% mononukleárních buněk v periferní krvi, a jak již bylo uvedeno většina (více jak 95%) z těchto cirkulujících NK buněk jsou CD56^{dim}, které vykazují podstatně vyšší cytolickou aktivitu proti cílovým nádorovým buňkám. CD56^{dim} vykazují vysokou expresi CD16 - nízko afinitního receptoru IIIA pro konstantní (Fc) oblast imunoglobulinu na povrchu opsonizovaných buněk. Tato interakce receptor-ligand je aktivačním signálem zprostředkovaným molekulou CD16, který vede k degranulaci NK a následné buněčné lýze závislé na protilátkách ADCC. NK buňky zprostředkované ADCC by měly ve skutečnosti být součástí protinádorové činnosti (Clynes *et al.*, 2000).

Podskupina NK CD56^{dim} CD16(+) KIR(+) může hrát také klíčovou roli při omezení růstu některých nádorů. Ukázalo se, že NK aloreaktivita podporuje reakci štěpu proti leukemii (GVL). To by mohlo být vysvětleno přítomností neshody mezi buňkami NK dárce a MHC třídy I příjemce postiženého AML (Ruggeri *et al.*, 2006).

Lymfatické tkáně

Většina lidských NK buněk se nachází v sekundárních lymphoidních orgánech. Představují zde asi 5% mononukleárních buněk v nezanícených lymfatických uzlinách a 0,4-1% v zanícených mandlích a uzlinách (Fehniger *et al.*, 2003).

Tyto NK buňky představují pozoruhodnou skupinu vrozených efektorových buněk, protože v lymfatických uzlinách nacházíme 40% všech lymfocytů, což je pozoruhodné neboť krev obsahuje pouze 2% z celkového počtu lymfocytů (Westernann – Pabst, 1992). Proto za fyziologických podmínek výskyt NK buněk v lymfatických uzlinách je až 10 krát vyšší než v periferní krvi (Ferlazzo *et al.*, 2004). Lidské NK buňky v sekundárních lymphoidních orgánech vykazují efektorové funkce, protože rychleji reagují s cytokiny (IFN- γ a TNF- α) a umožňují jejich sekreci k aktivaci dendritických buněk. Tuto produkci cytokinů využívá organismus k eliminaci patogenů, které porušily slizniční bariéry a aktivují tak adaptivní imunitní odpověď (Cooper *et al.*, 2001).

Nedávné studie poukazují na nalezení meziproductů NK buněk v lymfatických uzlinách, což poukazuje na místo možného rozvoje NK buněk a zrání přímo z CD34(+) hematopoetických prekurzorů v sekundárních lymphoidních orgánech (Freud *et al.*, 2005).

Epitel a sliznice

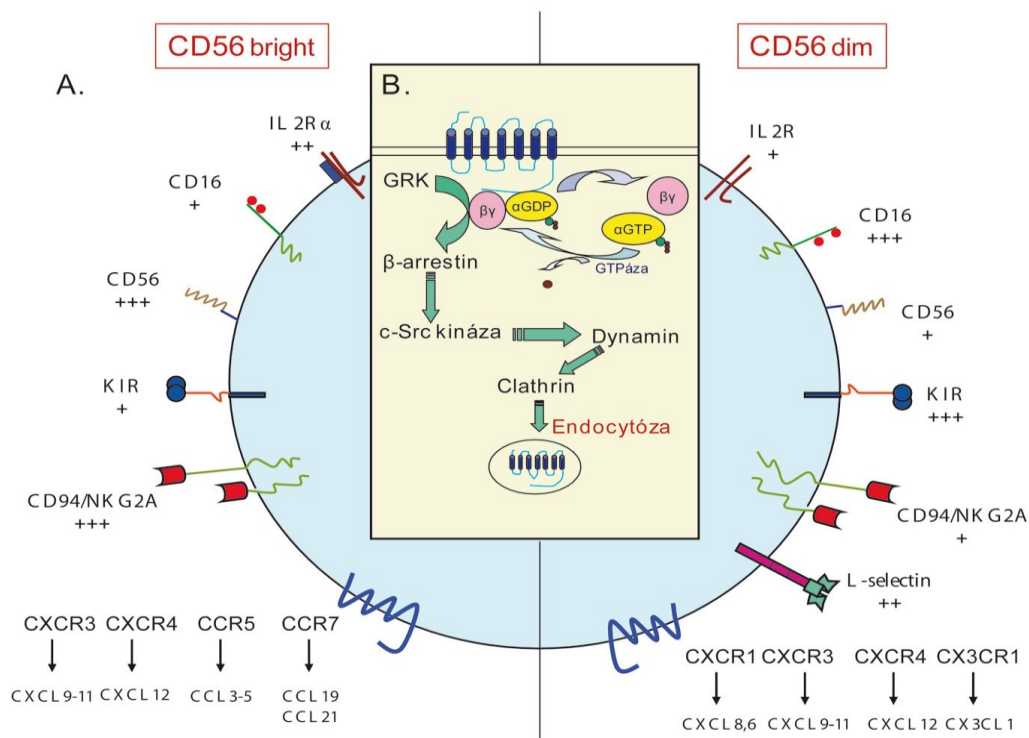
Epitel pokrývá vnější a vnitřní povrchy těla a je první linií obrany proti expozici toxinů a patogenů životního prostředí. Kromě toho působí také jako mechanická překážka. Epiteliální tkáň zajišťuje ochranu imunitního systému, vyznačuje se organizací a tkáňově specifickou složitostí. Epiteliální imunitní systém zajišťuje dynamickou rovnováhu mezi imunitním dohledem vůči patogenům a tolerancí na neškodné antigeny (např. potravinami či symbiotické bakterie). NK buňky obsažené v normální lidské dermis jsou především CD56(+)CD16(-) a postrádají expresi perforinu a NKG2D (Ebert *et al.*, 2006). Podporují zde prozánětlivou reakci prostřednictvím exprese cytokinů a mají svou roli i při hojení ran (Müller *et al.*, 2000). V slizniční tkáni tenkého střeva byly objeveny tzv. NK-22 buňky, které pomáhají chránit sliznici pomocí exprese IL-22 (Cella *et al.*, 2008.)

1.4.4. Subtypy NK buněk

Na povrchu NK buněk prokazujeme řadu charakteristických molekul, jež plní funkci receptoru pro cytokiny, adhezivní molekuly a chemokiny a jejichž pomocí je možné NK buňky identifikovat a určovat jejich subpopulace. NK buňky neobsahují receptor pro T-lymfocyty (T-cell receptor – TCR), jsou tedy CD3 negativní. Nejdůležitější membránovou molekulou je neutrální buněčná adhezivní molekula (NCAM) nesoucí označení CD56. Na většině NK buněk také nacházíme povrchovou molekulu FcR γ III receptor označovaný také jako CD16 (Biassoni *et al.*, 2001). Na základě hladiny těchto dvou molekul rozlišujeme dvě hlavní subpopulace NK buněk, CD56^{+dim}CD16⁺ a CD56^{+bright}CD16^{dim/-} (Cooper *et al.*, 2001). Dané dvě subpopulace NK buněk vykazují odlišnosti nejen ve funkci, ale také v odpovědi na stimulaci IL-2, v zastoupení jak adhezivních molekul, tak NKR a v cytotoxicitě (Frag - Caligiuri, 2006a).

NK buňky CD56^{+bright} na svém povrchu exprimují vysokoafinní receptor pro IL-2 tvořený z řetězců α , β , γ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) a expandují v *in vitro* a *in vivo* podmínkách i po velmi nízkých dávkách IL-2. Naopak CD56^{+dim} exprimují nízkoafinní receptory pro IL-2 tvořený řetězci α , β a jejich proliferační odpověď je nízká i na velmi vysoké dávky IL-2. Buňky CD56^{+dim} na rozdíl od buněk CD56^{+bright} mají vyšší schopnost usmrcovat terčové buňky. Tato vlastnost CD56^{+dim} buněk je dána vyšší denzitou membránových receptorů pro Fc fragment IgG a také přítomností velkého počtu cytoplazmatických granul obsahující granzymy a perforiny (Caligiuri, 2008). Subpopulace NK buněk mají také odlišné zastoupení v jednotlivých tělních kompartmentech, buňky CD56^{+bright} se nalézají v největším zastoupení v lymfatických uzlinách, buňky CD56^{+dim} jsou většinou populací v periferní krvi a ve slezině (Frag - Caligiuri, 2006a).

Jednotlivé subpopulace NK buněk se rovněž liší také produkcí cytokinů, CD56^{+bright} produkují mnohonásobně vyšší množství IFN- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-10, a IL-13 než CD56^{+dim} (Kopecký - Kopecký, 2010).



Obrázek 2: Membránové molekuly, aktivace a deaktivace receptoru NK buněk. A – hlavní rozdíly exprese povrchových receptorů u NK bright a NK dim. Míra exprese membránových molekul je vyznačena pomocí znaménka +. B – Po stimulaci receptoru dochází ke konformačním změnám receptoru (převzato z Kopecký – Kopecký, 2010).

1.4.5. Cytotoxická funkce NK buněk

NK buňky jsou schopny cílově identifikovat a usmrcovat buňky mechanismem, jež nepředpokládá přítomnost receptoru pro Ag na cytotoxické buňce. Mechanismus cytotoxicity NK buněk spočívá v aktivaci cytotoxických granul obsahující perforiny a granzymy. Perforin vytváří charakteristické póry v cytoplazmatické membráně napadené cílové buňky a tím vytváří vodný kanál, kterým se granzymy a další související molekuly dostávají do buňky a indukují apoptózu nebo osmotickou lýzu napadených buněk. Vytvořenými póry pronikají do cytoplasmy cílové buňky serinové proteázy - granzymy A a B, které aktivují kaspázy, což vede k apoptóze napadené buňky (Veugelers *et al.*, 2006). NK buňky mohou cílové buňky zabít bez předchozí senzibilizace. Tento účinek je však důkladně regulován pomocí inhibičních receptorů

(McKenna *et al.*, 2007). NK buňky cytotoxicky usmrcují ty cílové buňky, které na svém povrchu nemají buď zcela vyjádřeny molekuly MHC I. třídy nebo je mají v nízké míře (Raulet, 2004).

Velkou úlohu má buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách tzv. ADCC, neboli druh imunitní reakce, při němž dochází k likvidaci buněk, na jejichž povrchu je navázána protilátka. Fc fragment protilátky, která je navázána na antigen, lze rozpoznat podle nízké afinního receptoru FcγRIII (CD16) na povrchu NK buněk, který se váže na protilátku prostřednictvím spojených podjednotek obsahující imunoreceptor tyrosinu. Tento způsob je hlavní mechanismus zabíjení pro některé monoklonální protilátky. Rozdíly v úrovni exprese CD16 u podskupin NK buněk má funkční důsledky pro tuto buněčnou cytotoxicitu, z tohoto důvodu NK buňky CD56^{dim} vykazují vyšší hladiny ADCC než NK CD56^{bright} (Cooper *et al.*, 2001).

1.4.6. Aloreaktivita NK buněk

Aloreaktivita je obvykle spojována s T-lymfocyty. U transplantace orgánů je následkem rejekce darovaného orgánu, u transplantací kostní dřeně jde o reakci štěpu proti hostiteli (GVHD). Aloreaktivita NK buněk hostitele proti štěpu byla poprvé popsána v roce 1960 u myši. Štěpy rodičovské kostní dřeně byly zamítnuty podskupinou hostitelských F1 NK buněk, protože nebyla vybavena správnými inhibičními receptory, jež rozpoznávají dárcovské alely MHC I. třídy (Metcalf, 1963). Lidské NK buňky rozlišují mezi různými alelickými formami molekul MHC prostřednictvím inhibičních receptorů KIR (Ruggeri *et al.*, 2002). V případech, kde se dárce a příjemce geneticky shodují v MHC může obvykle méně intenzivní aloreaktivitu způsobovat rozeznávání fragmentů odlišných alelických forem vedlejších histokompatibilních antigenů.

1.4.7. Receptory NK buněk

NK buňky mají na svém povrchu dva základní typy receptorů. Aktivační receptory a inhibiční receptory (Hořejší – Bartůňková, 2009).

Aktivační receptory

Do skupiny aktivačních receptorů patří NKG2D, NKR (NKp30, NKp44 a NKp36), aktivační KIR a CD16 (Biassoni *et al.*, 2001). Signály zprostředkované těmito receptory aktivují NK buňku k použití jejích cytotoxických mechanismů. Aktivační receptor CD 16 vyvolává cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (viz výše).

Aktivační receptory na povrchu NK buněk mohou být rozděleny do dvou základních kategorií – rozpoznávací ligandy podobné MHC gp (MHC-like ligands) a non-MHC ligandy. V důsledku virové infekce, kdy dochází k uvolňování interferonů, reagují aktivační MHC-specifické receptory zejména na buňky s nižší expresí MHC gp. Aktivační receptory také rozpoznávají molekuly podobné MHC gp, nebo epitopy MHC gp, které se objevují na povrchu napadených buněk působením některých virů nebo nádoru (Raulet *et al.*, 2001).

Inhibiční receptory

Inhibiční receptory rozeznávají MHC gp I. Signály, které buňka prostřednictvím těchto receptorů dostane, inhibují cytotoxické mechanismy. Tyto receptory patří do dvou strukturních skupin imunoglobulinové a C-lektinové. NK buňky nemají univerzální inhibiční receptor, který by rozpoznal všechny alelické formy MHC gp I. Klony NK buněk na svém povrchu exprimují různé kombinace inhibičních receptorů rozeznávající některé z forem molekul MHC gp I. Na lidských NK buňkách byly nalezeny inhibiční receptory imunoglobulinové skupiny tzv. KIR (Hořejší – Bartůňková, 2009), které se váží rovnou na různé MHC gp I (tab 2.). C lektinový receptor CD94/NKG2 rozpoznává neklasickou MHC molekulu HLA-E (Braud *et al.*, 1998). Inhibiční receptory potlačují cytotoxickou aktivitu NK buněk a produkci zánětlivých cytokinů (IFN- γ , GM-CSF a TNF- α). V případě, že došlo k dostatečné vazbě příslušných ligandů na tyto receptory, je cílová buňka rozpoznána jako organismu vlastní a cytotoxická reakce neproběhne (Moretta *et al.*, 2001).

Tabulka 1. Přehled aktivačních a inhibičních receptorů NK buněk (převzato z Jewett *et al.*, 2013).

Receptors	Ligands
<u>Activating/inhibitory Receptors</u>	
FcγRIII (CD16)	Fc of antibodies
CD2	CD58 (LFA-3)
LFA-1	ICAM-1
2B4	CD48
CD69	Unknown
DNAM-1 (CD226)	CD112, CD155
NKp80	AICL
Tactile (CD96)	CD155, CD111
TIGIT	CD112, CD113, CD155
CRTAM	TSLC1
<u>C-type Lectin receptors –Activating/Inhibitory</u>	
CD94/NKG2A/B	HLA-E
NKG2D	MICA, MICB, ULBP-1, ULBP -2, ULBP -3, ULBP -4, ULBP -5, ULBP -6
CD94/NKG2C	HLA-E
CD94/NKG2E/H	HLA-E, Qa-1b
<u>Natural cytotoxicity receptors (NCR)</u>	
NKp46 (NCR1)	Viral Hemagglutinin
NKp44 (NCR2)	Viral Hemagglutinin
NKp30 (NCR3)	B7h6, HCMV-pp65
<u>Killer IG-like (KIR) – Activating/Inhibitory</u>	
KIR2DLs, KIR3DLs, KIR2DS	HLA-C, HLA-B, HLA-A, HLA-G
<u>Cytokines, growth factors and chemokines</u>	
<u>Toll-like receptors (TLR), NOD-like receptors (NLR) and RIG-I-like receptors (RLR)</u>	Bacterial DNA, LPS, peptidoglycan, teichoic acids, flagellin, pilin, viral dsRNA and fungi zymosan

Tabulka 2. Alely HLA I. třídy specifické pro hlavní inhibiční receptory imunoglobulinové skupiny tzv. KIR (převzato z Locatelli *et al.*, 2013).

KIR	Domain composition	KIR-ligand	Function
2DL1	D1 + D2	HLA-C ^{Lys80} (C2)	Inhibitory
2DL2/2DL3	D1 + D2	HLA-C ^{Asn80} (C1), HLA-B*46:01, HLA-B*73:01 Low affinity: HLA-C ^{Lys80} (C2)	Inhibitory
2DL4	D0 + D2	HLA-G	Inhibitory and activating*
2DL5	D0 + D2	Unknown	Inhibitory
3DL1	D0 + D1 + D2	HLA-B ^{Bw4} and some HLA-A ^{Bw4}	Inhibitory
3DL2	D0 + D1 + D2	HLA-A*03 and HLA-A*11	Inhibitory
2DS1	D1 + D2	HLA-C ^{Lys80} (C2)	Activating
2DS2	D1 + D2	Unknown	Activating
2DS3	D1 + D2	Unknown	Activating
2DS4	D1 + D2	HLA-A*11 and some HLA-C alleles	Activating
2DS5	D1 + D2	Unknown	Activating
3DS1	D0 + D1 + D2	HLA-B ^{Bw4} (?)	Activating

*KIR2DL4 may function as an inhibitory receptor in cytotoxicity while it triggers IFN- γ production.

1.4.8. *In vitro* aktivace NK buněk

Interleukin 2 představuje základní imunomodulační cytokin, stimulující proliferaci NK a T buněk *in vitro* i *in vivo* (Hájek *et al.*, 2000). Jedná se o charakteristický glykoprotein s velmi nízkou molekulovou hmotností., jehož hlavním zdrojem jsou Th lymfocyty, především Th1 (Casana *et al.*, 2002 ; Perrone *et al.*, 2004). Autokrinním a parakrinním působením stimuluje proliferaci antigen specifických T-lymfocytů, NK buněk a podporuje tak sekreci dalších cytokinů, proto se využívá pro aktivaci a další pomnožení tumor specifických LAK, CTL a NK buněk (Klener – Klener, 2009). Vedle IL-2 se často v *in vitro* expanzi používá také IL-15. I přesto, že se jedná o odlišné cytokiny, společně příznivě ovlivňují homeostázu, vývoj a funkci NK buněk (Becknell – Caligiuri, 2005). Pro zvýšení proliferace buněk se k NK buňkám přidávají také podpůrné buňky tzv. feeder cells, nejčastěji ozářením inhibované mononukleární buňky

stimulované protilátkou OKT3, které mohou mnohonásobně urychlit dělení buněk (Lim *et. al.*, 2013).

1.5. Hemato-onkologie

1.5.1. Leukemie

V současné medicíně představují zhoubná nádorová onemocnění významný celospolečenský problém. Z tohoto důsledku se tedy problematika onkologických onemocnění dostává do popředí zájmu nejen v klinických aplikacích, ale především v oblasti výzkumu. Hemato-onkologická onemocnění jsou definována jako nádorové choroby vznikající z krvetvorné kmenové buňky nebo z progenitorů jednotlivých vývojových řad hematopoézy postižené maligní transformací (Adam *et al.*, 2008). Tato onemocnění u napadených buněk vyvolávají nejen poruchy buněčného dělení, ale zpravidla také mutace vyvolávající poruchy v expresi genů podílejících se na řízení apoptózy (Testa - Riccioni, 2007). Charakteristická genetická změna spojená s expresí genů je často charakteristická pro konkrétní typ hematologické malignity, což tyto nádory do jisté míry odlišuje od jiných nádorů (Rohoň, 2009).

Leukemie je velmi široký pojem zahrnující celou řadu nemocí. Klinicky a patologicky se toto onemocnění dělí do dvou forem, akutní leukemie, rychle probíhající s intenzivními příznaky a krátkou prognózou, které bez léčby zpravidla vedou ke smrti během několika týdnů nebo měsíců, a chronická leukemie, nastupující pozvolna, prognóza bývá delší, neléčení vede ke smrti během měsíců až roků (Adam *et al.*, 2008). Onemocnění jsou klasifikována podle typu abnormálně změněné myeloidní nebo lymfoidní buňky nalezené v krvi nebo kostní dřeni. Na základě těchto klasifikací určujeme čtyři hlavní kategorie leukemií: akutní lymfoblastická leukemie (ALL), akutní myeloidní leukemii (AML), chronická lymfatická leukemie (CLL), chronická myeloidní leukemie (CML). Nejčastějším typem leukemie u dospělých osob je CLL a z myeloidních leukemií AML ve vyspělých zemích. AML má horší prognózu s vysokou mírou replasu onemocnění a důležitou roli hraje také věk pacienta (Costello *et al.*, 2004; Farag – Caligiuri, 2006b).

1.5.2. Základní léčba hematologicko-onkologických onemocnění

Základní léčba spočívá hlavně v chemoterapii, v některých případech následuje transplantace hematopoetických buněk. Do klinické praxe moderní chemoterapie je zavedeno mnoho vysoce účinných látek přirozeného původu např. antibiotika, hormony, do popředí se dostávají především nově připravované látky syntetického původu (Foran *et al.*, 2000). Kvalitní léčba umožněna důkladným poznáním mechanismu působení cytostatik na molekulární úrovni, ale také poznatků o mechanismu normálních a nádorových buněk s jejich využitím ve farmakologii (Henkes *et al.*, 2008). Transplantace kostní dřeně je pro řadu pacientů s agresivními formami leukémií jedinou možností pro překonání nemoci. Přes její nespornou efektivitu část nemocných po transplantaci relabuje. Standardní postupy řešení potransplantačních relapsů zahrnují chemoterapii či aplikaci dárcovských lymfocytů a nebývají bohužel ve větší části případů účinné.

1.5.3. Imunoterapie

Nádorová imunoterapie je léčebný postup využívající buď specifitu imunitního systému pro léčbu malignity směrováním léčiva do místa samotného nádoru, nebo indukci nádorové imunity (Hořejší – Bartůňková, 2009). Imunitní systém je tak schopen rozeznat a eliminovat nádorové buňky, i když jsou méně imunogenní než patogeny.

V současné době se provádí imunoterapie spočívající v imunizaci pacienta infuzí *in vitro* kultivovaných T nebo NK buněk pro prevenci a léčbu relapsu zejména po alogenní transplantaci (Arai – Klingemann, 2003) nebo prostřednictvím aplikace terapeutických protilátek (Morse *et. al.*, 2004). U některých nádorových onemocnění se využívají cytokiny, zejména IL-2, INF- α , nebo GM-CSF k zesílení buněčných mechanismů imunity (Hořejší – Bartůňková, 2009).

Imunoterapie s použitím NK buněk je užitečná zejména v situacích, kdy nelze využít infuzi T-lymfocytů, zejména tedy u haploidentických transplantací kmenových buněk (HSCt) od haploidentických dárců (Passweg *et. al.*, 2005).

1.5.4. Leukemie a NK buňky

NK buňky byly analyzovány především u akutní myeloidní nebo chronické myeloidní leukemie. Obecně vyplývá, že aktivita autologních NK buněk proti leukemickým buňkám je často snížena (Costello *et al.*, 2002). Leukemické buňky mohou uniknout obranným mechanismům imunitního systému, což vyplývá z relativně vysoké míry recidivy u leukemických relapsů po podání standardní nebo vysoce dávkované chemoterapie (Costello *et al.*, 2004;). Například u pacientů s AML bylo pozorována jasná souvislost s aktivitou NK buněk a přežitím bez relapsu (Farag – Caligiuri, 2006b). Na druhou stranu bylo zjištěno, že leukemické buňky mohou exprimovat HLA-G zprostředkující inhibiční signály pro NK buňky (Maki *et al.*, 2008).

Nejdůležitější zjištění upřesňující roli NK buněk v boji proti leukemickým buňkám je založená na výsledcích vyplývajících z transplantace hematopoietických kmenových buněk, který je založen na studiu alloreaktivních NK buněk a jejich aktivačních nebo inhibičních receptorů při transplantaci krvetvorných buněk (Ruggeri *et al.*, 2008).

V boji proti leukemickým buňkám je tedy nezbytná rostoucí znalost receptorů, včetně jejich ligandů namířených na cíle NK buněk, analýza fenotypu NK buněk či jejich činnost v průběhu leukemie nebo jejich samotná úloha po transplantaci.

2. CÍL PRÁCE

NK buňky hrají významnou úlohu v počáteční linii obrany organismu v boji proti nádorům. Cílem práce je tedy nalézt optimální podmínky jejich izolace z periferní krve zdravých dárců a jejich následné kultivace a aktivace v podmínkách splňující kritéria správné výrobní praxe. Dílčími cíli je testování dvou typů komerčních medií, aktivačních látek a současné srovnání využití podpory kultivace s využitím tzv. feeder cells (podpůrné buňky), v našem případě ozářené mononukleární alogenní či autologní buňky. Dále budou stanoveny aktivačních markery CD25 a CD336.

3. HYPOTÉZA

Každý typ buněk má své specifické kultivační podmínky, které mohou ovlivnit jejich růst a udržení se v kultuře. Komerční média jsou směsí různých látek, které jsou důležité pro kultivace. Různá média a různá aditiva ovlivňují chování buněk v *in vitro* podmínkách.

4. METODIKA

4.1. Izolace NK buněk z periferní krve dárce pomocí magnetické separace

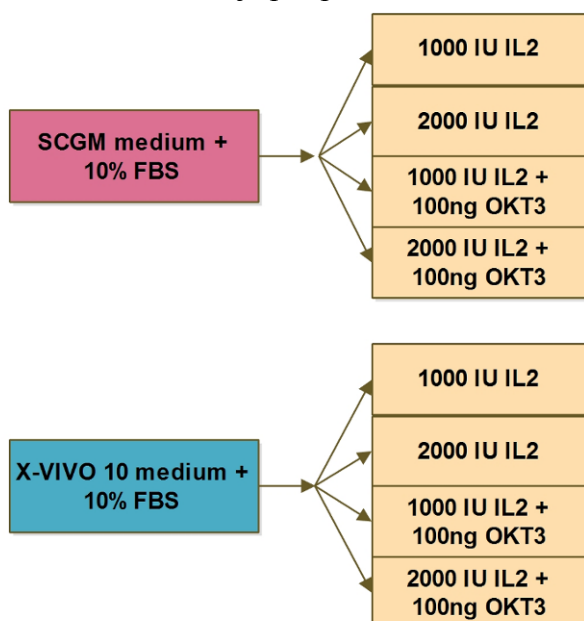
V laminárním boxu byla krev přelita ze dvou heparinizovaných zkumavek do předem označené 50 ml falkony a naředěna stejným množstvím fosfátového pufru PBS. Vzorek byl zhomogenizován opakovaným převrácením falkony. Do čtyř označených sterilních 15 ml falkon bylo napipetováno 7 ml roztoku LSM 1077 (separační roztok) a na tento roztok bylo sterilní pasterkou navrstveno stejné množství naředěné krve dárce tak, aby nepropadla na dno kolony. Falkony byly uzavřeny a centrifugovány 15 minut při 1000g, optimální stupeň rozběhu a brždění 6. Po centrifugaci byly falkony přeneseny zpět do laminárního boxu. Do nové 50 ml falkony byl stažen pasterkou ze čtyř zcentrifugovaných falkon buffy-coat a doplněn fosfátovým pufrem PBS na objem 30 ml. Následně probíhala centrifugace 10 min při 480g, stupeň rozběhu a brždění 9. Po centrifugaci byl obsah falkony opatrně slit a vzniklá peleta rozvolněna v 1 ml fosfátového pufru PBS. Vzorek byl opakovaným promícháním homogenizován a byla stanovena koncentrace buněk na hematologickém analyzátoru. Zbytek suspenze ve falkoně byl naředěn přidáním 5 ml pufru PBS/BSA/EDTA a centrifugován 10 min při 480g. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a peleta byla rozvolněna v 40 µl pufru PBS/BSA/EDTA. Dle výsledku WBC buněk z hematologického analyzátoru byla přidána k suspenzi 10-20 µl protilátky NK Cell Biotin-antibody a po důkladném promíchání bylo inkubováno 5 minut v chladícím bloku při 4° C. Po inkubaci s první protilátkou bylo přidáno k suspenzi 20 µl pufru PBS/BSA/EDTA a 20-40 µl protilátky NK Cell Microbead. Suspenze byla důkladným promícháním zhomogenizována a inkubována 10 minut v chladícím bloku při 4° C. Poté bylo k suspenzi bylo přidáno 500µl pufru PBS/BSA/EDTA a následně byla prováděna magnetická separace. Do laminárního boxu byl umístěn řádně odezinfikovaný magnetický držák MiniMacs. Do držáku byla přichycena separační kolona, pod níž byla vložena předem označená 15 ml falkona. Na separační kolonu byly napipetovány 3 ml pufru PBS/BSA/EDTA, jež prokapaly do připravené falkony pro zvlhčení umožňující lepší separaci buněk. Na

promytou kolonu bylo naneseno 500 μ l suspenze. Po protečení až suspenze byla kolona promyta 3 ml pufru PBS/BSA/EDTA. Ze stojánku byla falkona vyjmuta a místo ní umístěna nová sterilní falkona. Obsah falkony s buňkami, které již protekly, byl pasterkou znovu nakapán na kolonu a nechám kolonou projít ještě jednou ke zvýšení čistoty separace. Kolona byla opět promyta 3 ml pufru PBS/BSA/EDTA. Následovala centrifugace 10 minut při 480g, stupeň rozběhu i brzdění 9. Po centrifugaci byl obsah falkony slit do odpadové nádoby a peleta byla resuspendována v 1 ml příslušného kultivačního média. Byla změřena koncentrace takto získaných buněk na hematologickém analyzátoru. Čistota nasazované suspenze byla po izolaci zjištěna na průtokovém cytometru.

4.2. Kultivace

Vyseparované buňky byly rozpipetovány na 12-ti jamkovou kultivační destičku. Do jamek byly buňky nasazeny v koncentraci $2-3 \times 10^5$ (podle výtěžku) u první série pokusů a $1,8 \times 10^5$ u druhé série pokusů a doplněny příslušným médiem na objem 1 ml. Inkubace probíhala v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂.

V první série experimentu byly porovnávány dvě média - SCGM a X-VIVO 10 (dále jen X-VIVO) s přidáním 10%FBS do obou. Dále byly testovány dvě koncentrace proleukinu (IL-2) - 1000IU resp. 2000IU a vliv další možné aktivační látky protilátky OKT3 o koncentraci 100ng/ml. Proleukin byl přidáván každý druhý den společně s 50 μ l média pro udržení stálého objemu. Kombinace podmínek kultivace pro jednoho dárce NK buněk znázorňuje pro přehled obr. 3.



Obrázek 3: Kombinace kultivačních podmínek pro jednoho dárce NK ve dvou typech testovaných kultivačních médií s různou kombinací aktivačních látek

V druhé sérii experimentu byl porovnán vliv podpůrných buněk na růst a aktivaci NK buněk. Jako podpůrné buňky byly použity ozářené (25Gy) autologní anebo alogenní mononukleární buňky v koncentraci 1×10^6 na 1ml. NK buňky s přidáním anebo bez přidání těchto buněk byly kultivovány v podmínkách, které vyšly jako optimální v první sérii experimentů. Kombinace podmínek kultivace znázorňuje pro přehled tab 3.

Tabulka 3. Kombinace kultivačních podmínek pro jednoho dárce NK testující vliv podpůrných buněk s kombinací různých aktivačních látek .

IL-2 + OKT3	IL-2	Autologní MNC + IL-2 + OKT3	Autologní MNC + IL-2	Alogenní MNC + IL-2 + OKT3	Alogenní MNC + IL- 2
-------------------	------	--------------------------------------	----------------------------	-------------------------------------	----------------------------

4.3. Pasáž NK buněk

Do předem označených 15 ml falkon byl stažen pasterkou obsah jamek a jamky byly opláchnuty fosfátovým pufrem PBS. Oplach byl přidán do stejných falkon. Po oplachu PBS bylo do jamek přidáno 0,5ml roztoku pro uvolnění adherentních buněk (Tryple Select) a buňky byly inkubovány 5 minut v inkubátoru při 37° C. Uvolnění buněk z povrchu povrchu destičky bylo kontrolováno pod mikroskopem. Když bylo uvolněno více než 90 % buněk, bylo přidáno 1,5 ml příslušného média a uvolněné buňky byly přeneseny do příslušných falkon. Následovala centrifugace 10 min při 480 g. Po ukončení centrifugace byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna v 400 μ l PBS. Poté byla stanovena výsledná koncentrace na hematologickém analyzátoru a zastoupení NK buněk pomocí průtokového cytometru.

4.4. Měření na průtokovém cytometru

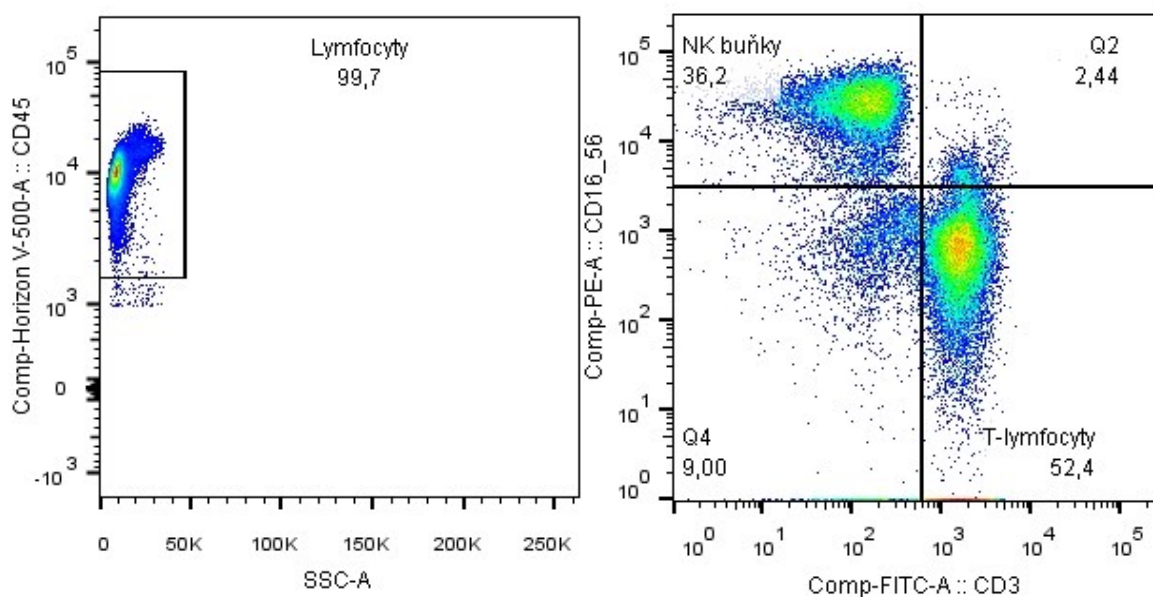
Na průtokovém cytometru byla provedena analýza zastoupení lymfocytárních subpopulací z krve dárce před a po izolaci. K 100 μ l krve resp. suspenze byly přidávány protilátky CD45 – Krome Orange, CD4 –PacificBLue, CD3 –FITC, CD16+56 –PE, , CD8 –PerCP, CD19 –PE-Cy7, CD25 – APC. Po 15min. inkubaci při pokojové teplotě ve tmě byly zkumavky s krví lyzovány a promyty pomocí přístroje FACS Lyse Wash

Assistent. Zkumavky s buněčnou suspenzí byly pouze promyty 4ml PBS a centrifugovány 5min při 1500RPM. Poté byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II. Po kultivaci (pasáži) byly provedena analýza zastoupení NK buněk a exprese aktivačních znaků. Příprava buněk byla stejná jako u izolované buněčné suspenze s použitím následující kombinace protilátek: CD16 –FITC, CD3 -PerCP, CD25 – PE-Cy7, CD336 - APC, CD56 - PacificBlue popř. PE a CD45 – Krome OrangeO. Vyhodnocení bylo provedeno v softwaru FlowJo.

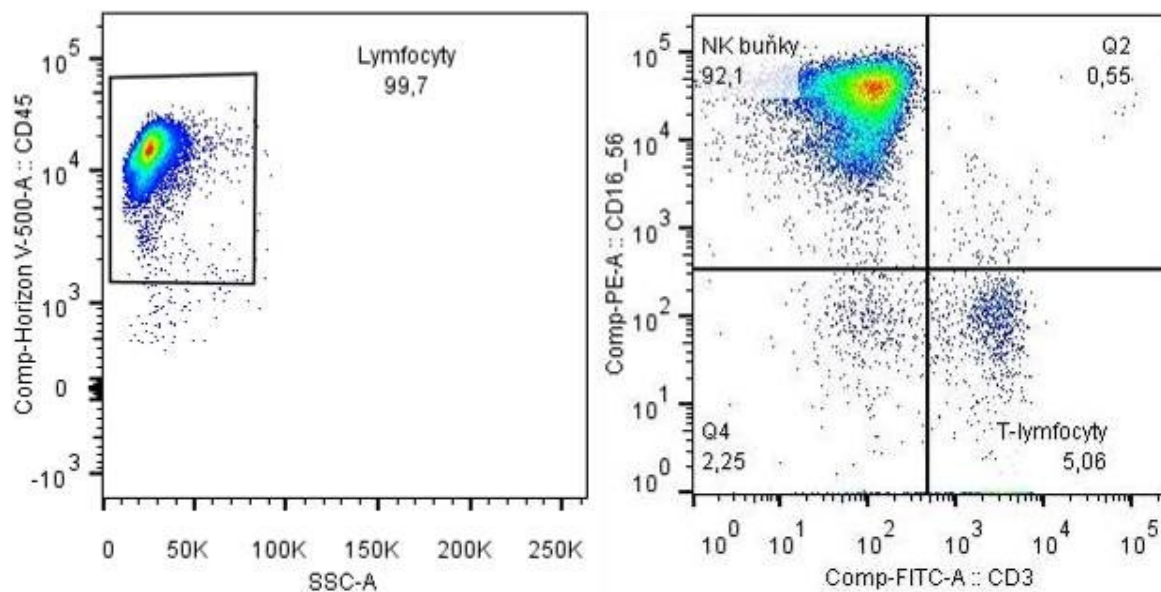
5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace NK buněk

NK buňky byly izolovány pomocí magnetických částic navazujících se na všechny non-NK buňky. Po provedení izolace dle pokynů výrobce, tj. koncentrace protilátek 10 μ l NK Cell Biotin-antibody a 20 μ l NK Cell Microbead, byla dosažena nízká čistota izolovaných NK buněk. V izolované frakci byly přítomny jak ostatní lymfocytární subpopulace, tak monocyty a granulocyty (obr. 4). Proto byla navýšena koncentrace použitých protilátek na dvojnásobek, čímž se podařilo zvýšit čistotu až na 90% (obr. 5). Proto byla jako optimální koncentrace přidávaných protilátek používaných v následujících izolacích stanovena koncentrace 20 μ l protilátky NK Cell Biotin-antibody a 40 μ l protilátky NK Cell Microbead.



Obrázek 4: Analýza leukocytů před izolací NK buněk stanovená průtokovou cytometrií s přidáním koncentrace protilátek dle pokynů výrobce tj. 10 μ l NK Cell Biotin-antibody a 20 μ l NK Cell Microbead.

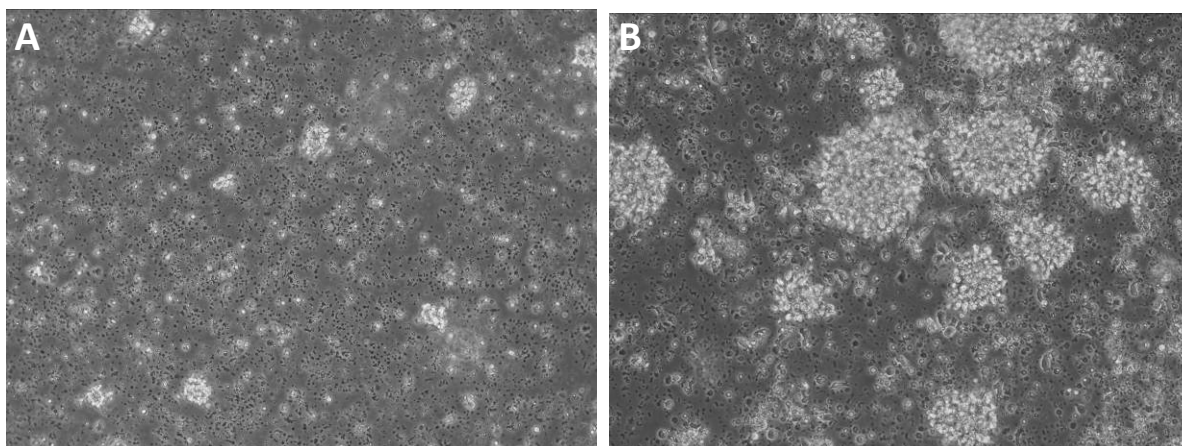


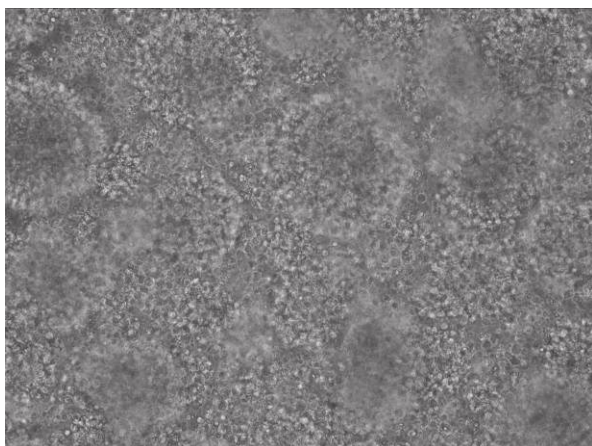
Obrázek 5: Analýza leukocytů po izolaci NK buněk stanovená průtokovou cytometrií s optimalizovaným množstvím protilátek po zvýšení koncentrace na dvojnásobek tj. optimalizovaným množstvím protilátky stanoveným na 20 μ l protilátky NK Cell Biotin-antibody a 40 μ l protilátky NK Cell Microbead.

5.2 Kultivace NK buněk

5.2.1. Série 1 - Výběr vhodného kultivačního média a kombinace aktivačních látek

Kultivace 6 zdravých dárců probíhala po dobu 6-ti dní v různých experimentálních podmínkách. Postupný nárůst buněk je znázorněn na obr. 6.





Obrázek 6: NK buňky kultivované v SCGM médiu s 1000IU. (A) Buňky po 2 denní kultivaci, (B) Buňky po 4 denní kultivaci, (C) Buňky po 6-ti denní kultivaci

První série pokusů spočívala ve srovnání dvou použitých odlišných typů kultivačních médií SCGM a X-VIVO 10, dvou koncentrací IL-2 a testování vlivu OKT3 protilátky. Po uplynutí 6-ti dní byl stanoven procentuální nárůst buněk.

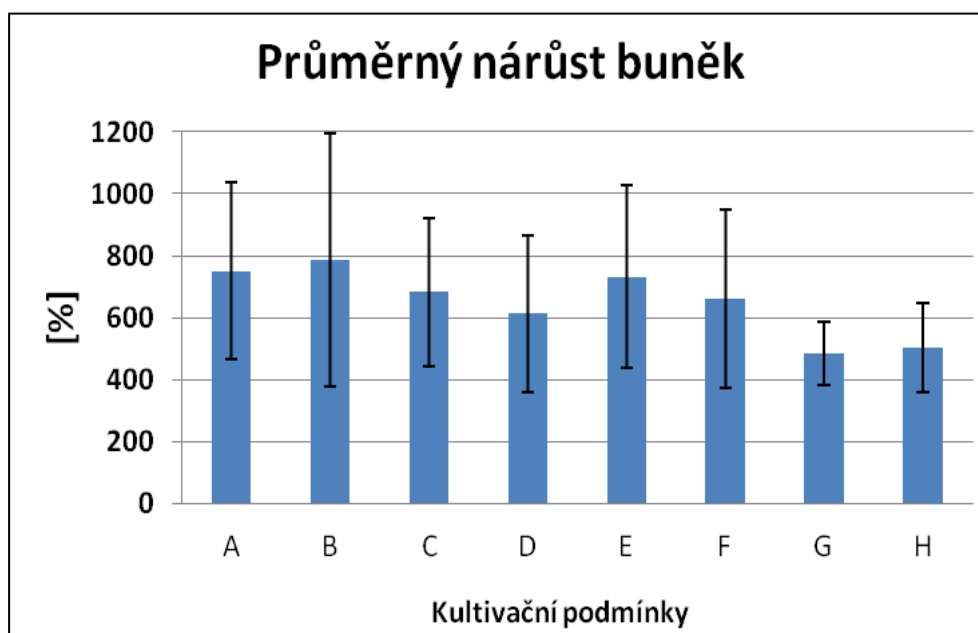
Z našich výsledků vyplývá, že z použitých médií byl průměrný nárůst NK buněk vyšší u média SCGM a to o 40% u koncentrace 1000 IU a o 100% u koncentrace 2000IU v porovnání s X-VIVO 10 médiem. Přítomnost protilátky OKT3 nevykazovala zvýšený proliferační potenciál buněk. U obou medií a obou koncentrací IL-2 byl nárůst buněk nižší v rozmezí 20-80%. I v případě kombinace IL-2 s OKT3 buňky narostly více v SCGM médiu. U koncentrace 1000 IU bylo detekováno o 110% více buněk než v X-VIVO 10 mediu a u koncentrace 2000 IU IL-2 o 80%. Statistické hodnocení dosažených výsledků nebylo vzhledem k vysoké variabilitě vzorků možno provést. Výsledky jsou souhrnně znázorněny v obr. 7. a tab. 4. Pro úplnost znázorňujeme výsledky jednotlivých dárců v obr. 8.

Pro zjednodušení následujících experimentů jsme jako standardní kultivační podmínky zvolili SCGM medium a 1000 IU IL-2.

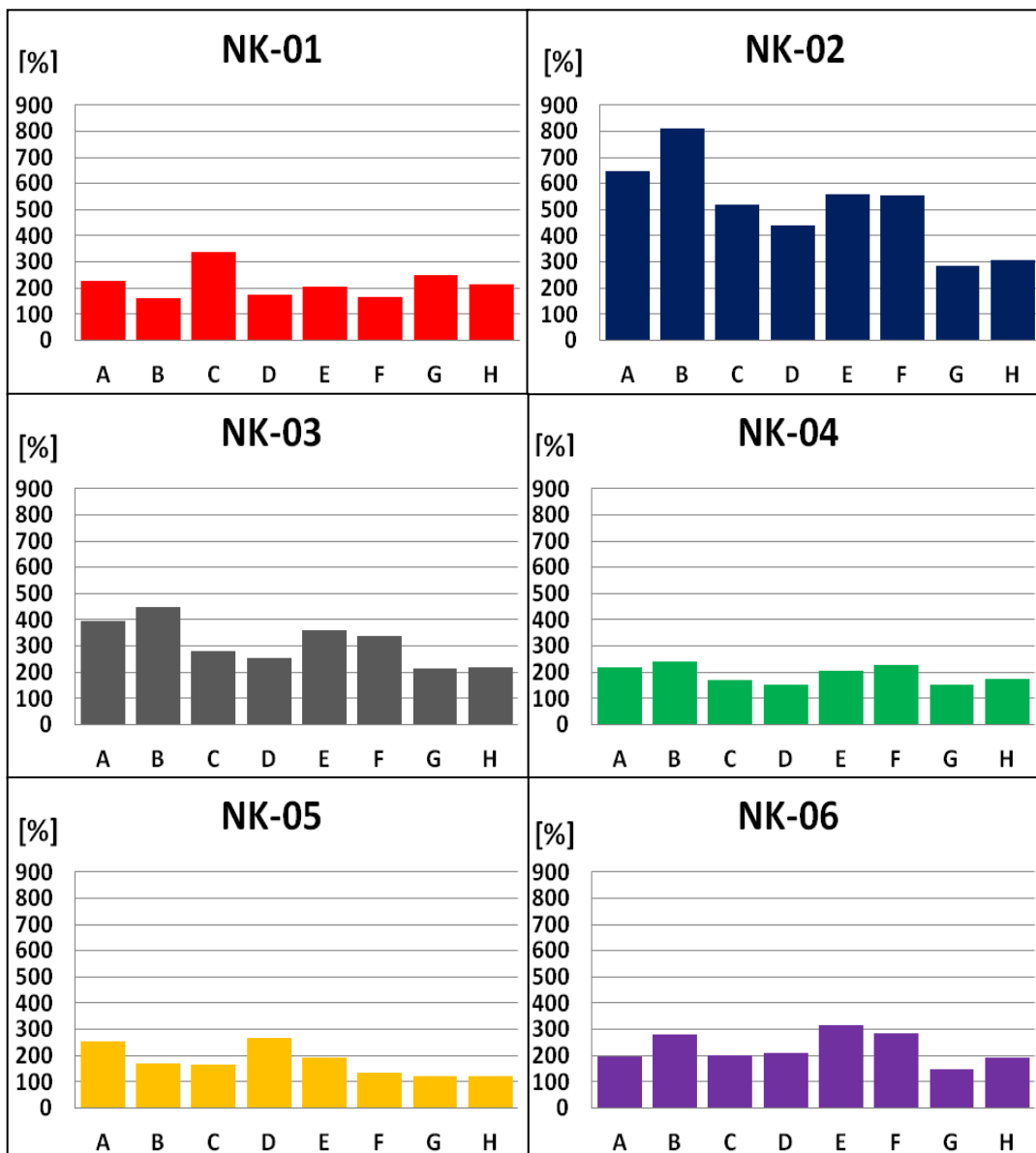
Tabulka 4. Zisk NK buněk v závislosti na původní hodnotě (%)

Označení dárce	A	B	C	D	E	F	G	H
NK-01	225	161	338	173	204	165	248	212
NK-02	646	811	517	440	557	554	283	305
NK-03	396	446	282	254	360	340	214	219
NK-04	216	240	168	154	207	227	151	172
NK-05	255	170	165	266	193	133	121	122
NK-06	198	281	200	208	315	285	149	192

Kultivační podmínky: **A** - SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **B** - SCGM +10%FBS + 2000IU IL2 **C** - X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **D** - X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2; **E** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **F** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 2000IU IL2; **G** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **H** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 2000IU IL



Obrázek 7: Průměrný procentuální zisk NK buněk za různých kultivačních podmínek po dobu šesti dní testovaných ve dvou typech kultivačních médií SCGM a X-VIVO s různou kombinací aktivačních látek. Z grafů vyplývá, že médium SCGM obsahovalo vyšší procentuální nárůst NK buněk pohybující se mezi 600-800 %, zatímco kultivace v médiu X-VIVO značí procentuální nárůst v rozmezí zhruba 400-650%. Přítomnost protilátky OKT3 v kultivačních médiích naopak z grafů značí nepatrně nižší procentuální zisk NK v kulturách. Optimální koncentrací IL- 2 stanovena 1000IU/ml.
(Kultivační podmínky: **A** - SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **B** - SCGM +10%FBS + 2000IU IL2 **C** - X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **D** - X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2; **E** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **F** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 2000IU IL2; **G** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **H** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2)



Obrázek 8: Procentuální zisk NK buněk za různých kultivačních podmínek po dobu šesti dní u jednotlivých dárců. U čtyř ze šesti dárců byl prokázán vyšší růst u SCGM média. Dárce NK-01 vykazoval nejvyšší procentuální zisk u média X-VIVO v kombinaci s 1000IU IL-2, dárce NK-05 ve stejném médiu v kombinaci s 2000IU IL-2.

(Kultivační podmínky: **A** - SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **B** - SCGM +10%FBS + 2000IU IL2 **C** - X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **D** - X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2; **E** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; **F** - OKT3 + SCGM +10%FBS + 2000IU IL2; **G** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; **H** - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2)

5.2.2. Série 2 - Vliv podpůrných ozářených buněk tzv. feeder cell na proliferaci a aktivitu NK

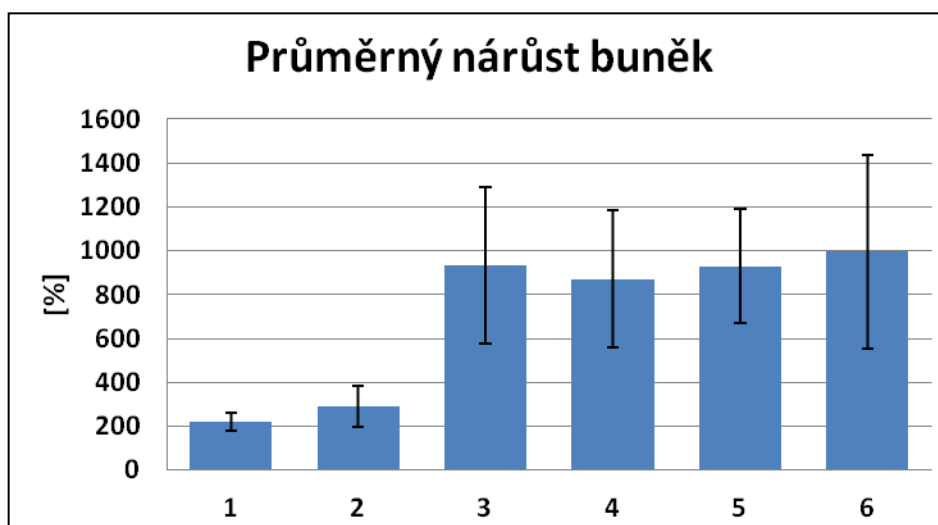
Izolované NK buňky byly nasazené na destičku s SCGM+10%FBS a IL-2 1000IU/ml. Jako podpůrné buňky byly použity ozářené autologní a alogenní mononukleární buňky (25Gy). Po uplynutí 6-ti denní kultivace byl stanoven nárůst buněk.

Mezi kulturami s přidanými a bez přidaných podpůrných buněk byl velmi výrazný rozdíl ve prospěch kultury obsahující ozářené podpůrné mononukleární buňky u jednotlivých dárců a to až o 500-600%. Mezi kulturami obsahující autologní buňky byl zisk NK buněk nižší než v kultuře s alogenními podpůrnými buňkami asi o 30% v přítomnosti OKT3 a o 110% bez OKT3 protilátky. U autologních podpůrných buněk zvyšovala protilátka OKT3 nárůst buněk o zhruba 50%. U alogenních podpůrných buněk byl pozorován opačný efekt. Přítomnost OKT3 protilátky snížil průměrný nárůst buněk o 40%. Výsledky jsou znázorněny souhrnně v obr. 9. a tab. 5. Pro úplnost jsou výsledky u jednotlivých dárců v obr. 10.

Tabulka 5. Zisk NK buněk v závislosti na původní hodnotě (%)

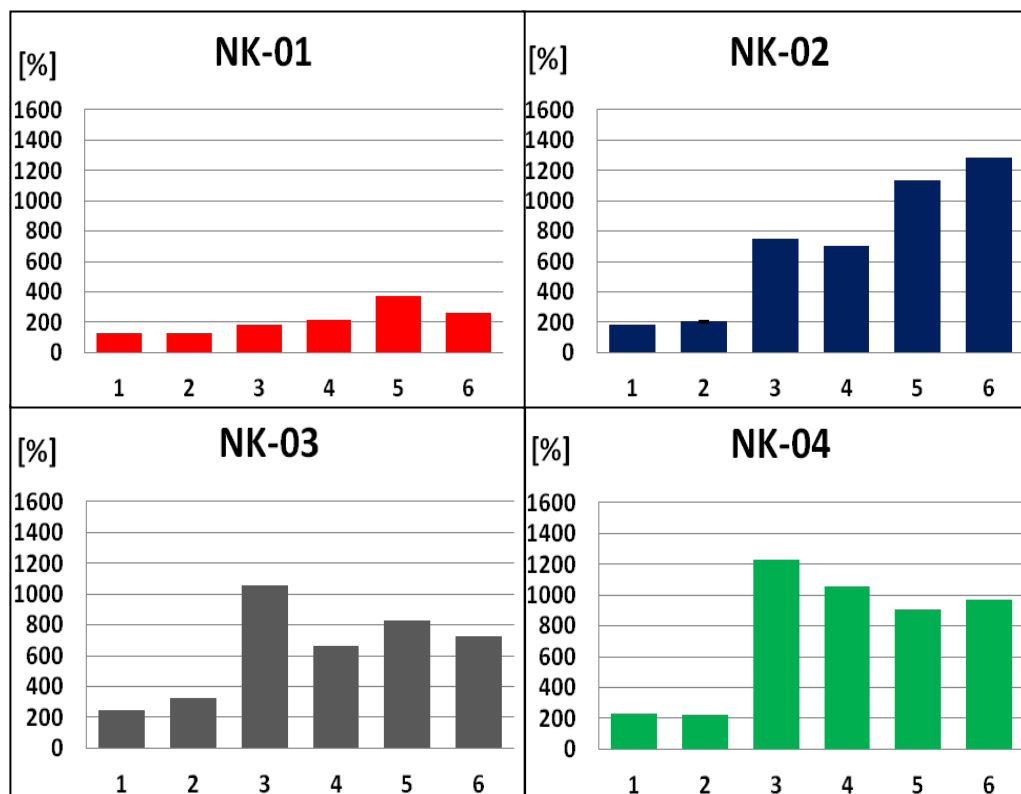
Označení	1	2	3	4	5	6
NK-01	126	128	185	215	376	259
NK-02	185	204	752	702	1133	1283
NK-03	249	322	1056	663	830	728
NK-04	227	222	1227	1054	907	972
NK-05	219	353	815	968	772	567
NK-06	219	353	815	968	1006	1430

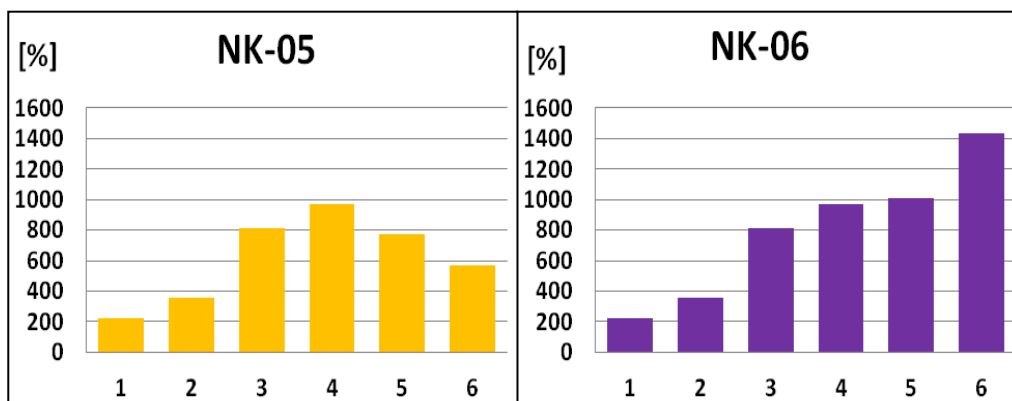
(Kultivační podmínky: 1 1000IU IL2 + OKT3; 2 1000IU IL2; 3 1000IU IL2 + OKT3+autologní MNC; 4 1000IU IL2+autologní MNC; 5 1000IU IL2 + OKT3 + alogenní MNC; 6 1000IU IL2+ alogenní MNC)



Obrázek 9: Zisk NK buněk v závislosti na původní hodnotě (%) s využitím podpůrných ozářených buněk tzv. feeder cell u všech testovaných dárců. Z uvedeného grafu lze vidět, že podpůrné buňky mají pozitivní vliv na proliferaci buněk. Kultury s těmito buňkami vykazovaly až o 600% vyšší procentuální zisk u jednotlivých dárců.

(Kultivační podmínky: 1 1000IU IL2 + OKT3; 2 1000IU IL2; 3 1000IU IL2 + OKT3+autologní MNC; 4 1000IU IL2+autologní MNC; 5 1000IU IL2 + OKT3 + alogenní MNC; 6 1000IU IL2+ alogenní MNC)



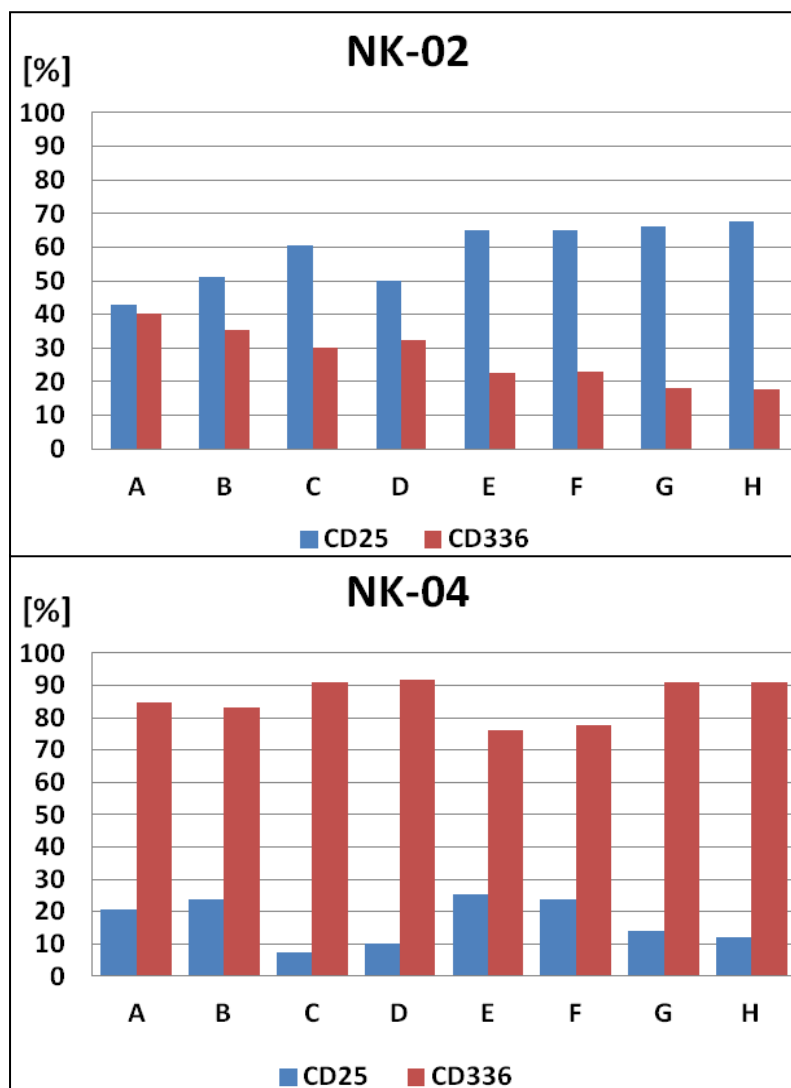


Obrázek 10: Procentuální zisk NK buněk u šesti testovaných dárců označených NK-01 až NK-06 s využitím podpurných ozářených buněk tzv. feeder cell u všech testovaných dárců. Z následujících grafů vyplývá zjištění, že kultury bez přidaných podpurných buněk vykazují rozdílné hodnoty u jednotlivých dárců ve prospěch kultury s tzv. feeder cell až o 600%. Dárce NK-01, NK-02 a NK-06 vykazuje hodnoty vyšší u autologních ozářených buněk než u alogenních, dárce NK-03, NK-04 a NK-05 naopak.

(Kultivační podmínky: **1** 1000IU IL2 + OKT3; **2** 1000IU IL2; **3** 1000IU IL2 + OKT3+autologní MNC; **4** 1000IU IL2+autologní MNC; **5** 1000IU IL2 + OKT3 + alogenní MNC; **6** 1000IU IL2+ alogenní MNC)

5.2.3. Testování aktivačních markerů CD25 a CD336 na NK buňkách průtokovou cytometrií

Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena exprese dvou aktivačních znaků CD25 a CD336. Bylo zjištěno, že dynamika těchto znaků je protichůdná. V případě vyšší exprese CD25 byla detekována nižší exprese CD336 a naopak. V kulturách s OKT3 protilátka byla detekována vyšší exprese CD25 znaku a to u všech kombinací. V případě kultury bez podpurných buněk byla exprese vyšší o 5-15%. U kultur s přidanými podpurnými buňkami až o 15-30%. Výrazná variabilita byla nalezena mezi jednotlivými dárci. U dárců, kde byl růst buněk značně pomalý oproti ostatním, dominovala exprese CD336. Naopak u dárců s vyšším proliferačním potenciálem byla zvýšena exprese CD25. Expresi obou znaků u dvou odlišných dárců znázorňuje obr. 11.



Obrázek 11: Aktivační markery na dvou odlišně proliferujících NK buňkách. Znaky analyzovány průtokovou cytometrií po 6-ti denní kultivaci. NK-02 rychle proliferující buňky; NK-04 pomalu proliferující buňky

Kultivační podmínky: (A - SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; B - SCGM +10%FBS + 2000IU IL2 C - X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2, D - X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2; E - OKT3 + SCGM +10%FBS + 1000IU IL2; F - OKT3 + SCGM +10%FBS + 2000IU IL2; G - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 1000IU IL2; H - OKT3 + X VIVO+10%FBS + 2000IU IL2)

6. DISKUZE

NK buňky představují jednu ze základních složek nespecifické buněčné imunity. Jejich hlavní význam spočívá především v identifikaci transformovaných či virem napadených cílových buněk v organismu a také v imunitní regulaci. Využití NK buněk v imunoterapii představuje významný přínos do moderní medicíny.

V současné medicíně mnohé studie využívají časově a ekonomicky velmi náročné postupy buněčné terapie. Naším cílem bylo najít optimální podmínky *in vitro* expanze a aktivace NK buněk pro účely protinádorové imunoterapie v podmínkách nemocničního zařízení.

V preklinických experimentech a v klinických hodnoceních bývají nejčastěji používané dva typy kultivačních médií SCGM a X-VIVO 10 medium, která jsme pro naše účely také zvolili (Carlens, 2000).

Z našich výsledků vyplývá, že médium SCGM vykazuje mírně vyšší procentuální zisk NK buněk v kultuře izolované od zdravého dárce než X-VIVO 10 medium a proto je pro kultivace vhodnější. Klíčovou složkou nezbytnou pro aktivaci NK buněk je IL-2, který bývá v kombinaci s protilátkou OKT3 (Cho - Campana, 2003). Naše dosažené výsledky však vliv OKT3 protilátky na proliferaci NK buněk neprokázaly. Naopak její přítomnost značí nepatrně menší procentuální zisk NK buněk. Pozitivní vliv OKT3 protilátky je často dáván do souvislosti s další složkou používanou hojně pro kultivaci savčích buněk - tzv. feeder cells (podpůrné buňky). Jednou z možností podpory proliferace v případě NK buněk jsou ozářením inhibované autologní či alogenní mononukleární leukocyty (Lim *et al.*, 2013). Kultury s přidanými podpůrnými buňkami vykazují velmi výrazný rozdíl ve prospěch kultury obsahující ozářené podpůrné mononukleární buňky u jednotlivých dárců. Zisk NK buněk byl vyšší než v kultuře s alogenními podpůrnými buňkami asi o 30% v přítomnosti OKT3 a o 110% bez OKT3 protilátky v porovnání s kulturami obsahující autologní buňky. Protilátka OKT3 zvýšila nárůst v kultuře s přidanými autologními podpůrnými buňkami asi o 50%. Opačný důsledek pozorován u alogenních podpůrných buněk kde přítomnost protilátky OKT3 vyvolala snížení průměrného nárůstu buněk zhruba o 40%.

Vzhledem k tomu, že se jedná o preklická data k připravovanému klinickému hodnocení, je nutné určit parametry kvality, tudíž prokázat aktivaci NK buněk. V naší studii jsme použili standardní lymfocytární marker aktivace CD25 a NK specifický marker CD336. Z našich experimentů vyplynulo, že nárůst proliferace souvisí s expresí CD25. Obdobné výsledky již publikovány v předchozích studiích (Clausen *et al.*, 2003). U buněk vykazující větší proliferační potenciál byly exprese CD25 vyšší v porovnání s buňkami s menší mírou proliferace, kde naopak převažovala exprese CD336. CD25 tedy můžeme využít jako marker proliferace.

7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo definovat optimální kultivační podmínky pro izolaci a aktivaci NK buněk v rámci kritérií správné výrobní praxe. Kultivačním médiem pro budoucí klinická hodnocení bylo zvoleno médium SCGM s přidanými podpůrnými mononukleárními buňkami a IL-2 o koncentraci 1000IU/ml. Použití autologních či alogenních podpůrných buněk je otázkou další studie. Práce prokázala zajímavou dynamiku exprese aktivačních markerů CD25 a CD336, která je předmětem dalšího výzkumu.

Tato práce byla finančně podpořena výzkumným grantem ČNRDD a MZ ČR - RVO (Fakultní nemocnice Plzeň - FNPl, 00669806).

8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

- 1.) ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. *Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí*. Grada, Praha, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4.
- 2.) ARAI, S., KLINGEMANN, H.G. *Role of immunotherapy in stem cell transplantation*. International Journal of Hematology, 2003, č.77, s. 22-28.
- 3.) BAUD, V.M., ALLAN, D.S., O'CALLAGHAN, C.A., SODERSTROM, K., D'ANDREA, A., OGG, G.S., LAZETIC, S., YOUNG, N.T., BELL, J.I., PHILIPS, J.H., LANIER, L.L., MCMICHAEL, A.J. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 1998, č. 391, s. 795-799.
- 4.) BECKNELL, B., CALIGIURI, M.A. *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells*. Advances in Immunology, 2005, č. 86, s. 209-239.
- 5.) BIASSONI, R., CANTONI, C., PENDE, D., SIVORI, S., PAROLINI, S., VITALE, M., BOTTINO, C., MORETTA, A. *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. Immunol Rev, 2001, č. 181, s. 203-214.
- 6.) BISHOP, G.A., HAXHINASHO, S.A., STUNZ, L.L., HOSTAGER, B.S. *Antigen-specific B-lymphocyte activation*. Critical Reviews, 2003, č. 23, s. 149-197.
- 7.) CALIGIURI, M.A. *Human natural killer cells*. *Blood*, 2008;112 :461-469.
- 8.) CARLENS, S., GILLJAM, M., REMBERGER, M., ASCHAN, J., CHRISTENSSON, B., DILBER, M.S. *Ex vivo T lymphocyte expansion for retroviral transduction: influence of serum-free media on variations in cell expansion rates and lymphocyte subset distribution*. Exp Hematol, 2000, č. 28, s. 1137-1146.
- 9.) CASANA, P.H., HERNANDEZ, H., ARANA, M.J. *Interleukin 2-inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo*. Biochemical

and Biophysical Research Communications, 2002, č. 299, s. 818-824.

10.)CELLA, M., FUCHS, A., VERMI, W., FACCHETTI, F., OTERO, K., LENNERZ, J.K., DOHERTY, J.M., MILLS, J.C., COLONNA, M. *A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity*. Nature, č. 457, s. 722-725.

11.)CLAUSEN, J.L., VERGEINER, B., ENK, M., PETZER, A.L., GASTL, G., GUNSILIUS, E. *Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells*. Immunobiology, 2003, č.207, s. 85-93.

12.)CLYNES, R.A., TOWERS, T.L., PRESTA, L.G., RAVETCH, J.V. *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nat Med, 2000, č. 6, s. 443-446.

13.)COOPER, M.A., FEHNIGER, T.A., CALIGIURI, M.A. *The biology of human natural killer-cell subsets*. TRENDS in Immunology, 2001, č.22, s. 633-640.

14.)COSTELLO, R.T., FAURIAT, C., SIVORI, S., MARCENARO, E., OLIVE, D. *NK cells: innate immunity against hematological malignancies?* Trends Immunol, 2004, č. 25, s. 328-333.

15.)COSTELLO, R.T., SIVORI, S., MARCENARO, E., LAFAGE-POCHITALOFF, M., MOZZICONACCI, M.J., REVIRON, D., GASTAUT, J.A., PENDE, D., OLIVE, D., MORETTA, A. *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002, č. 99, s. 3661-3667.

16.)DI SANTO, J.P. *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance*. Annu Rev Immunol, 2006, č. 24, s. 257-286.

- 17.)DOSEFF, A., PARIHAR, A. *Monocyte subsets and their role in tumor progression*. InTech, 2012. ISBN: 978-953-51-0439-1.
- 18.)EBERT, L.M., MEUTER, S., MOSER, B. *Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance*. J Immunol, 2006, č. 176, s. 4331-4336.
- 19.)FARAG, S.S., CALIGIURI, M.A. *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006a, č. 20, s. 123-137.
- 20.)FARAG, S.S., CALIGIURI, M.A. *Immunologic approaches to acute leukemia in the elderly*. Semin Hematol, 2006b, č. 43, s. 118-125.
- 21.)FEHNIGER, T.A., COOPER, M.A., NUOVO, G.J., CELLA, M., FACCHETTI, F., COLONNA, M., CALIGIURI, M.A. *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T ceel-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003, č. 101, s. 3052-3057.
- 22.)FERENČÍK, M. *Imunochémia*. ALFA, Bratislava, 1989.
- 23.)FERLAZZO, G., THOMAS, D., LIN, S.L., GOODMAN, K., MORANDI, B., MULLER, W.A., MORETTA, A., MUNZ, C. *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004, č. 172, s. 1455-1462.
- 24.)FORAN, J.M., CUNNINGHAM, D., COIFFIER, B., SOLAL-CELIGNY, P., REYES, F., GHIELMINI, M., JOHNSON, P.W., GISSELBRECHT, C., BRADBURN, M., MATTHEWS, J., LISTER, T.A. *Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20 antibody): analysis of factors associated with response*. Ann Oncol, 2000;11 Suppl 1:117-121.
- 25.)FREUD, A.G., BECKNELL, B., ROYCHOWDHURY, S., MAO, H.C., FERKETICH, A.K., NUOVO, G.J., HUGHES, T.L., MARBURGER, T.B., SUNG, J.,

BAIOCCHI, R.A., GUIMOND, M., CALIGIURI, M.A. *A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells.* Immunity, 2005, č. 22, s. 295-304.

26.)FREUD, A.G., CALIGIURI, M.A. *Human natural killer cell development.* Immunol Rev, 2006, č. 214, s. 56-72.

27.)GAFFEN, S.L., LIU, K.D. *Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications.* Cytokine, 2004, č. 28, s. 109-123

28.)GALY, A., TRAVIS, M., CEN, D., CHEN, B. *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.* Immunity, 1995, č. 3, s. 459-473.

29.)GRIMM, E.A., BRUNER, J.M., CARINHAS, J., KOPPEN, J.A., LOUDON, W.G., OWEN-SCHLAUB, L., STECK, P.A., MOSER, R.P. *Characterization of interleukin-2-initiated versus OKT3-initiated human tumor-infiltrating lymphocytes from glioblastoma multiforme: Growth characteristics, cytolytic activity, and cell phenotype.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 1991, č. 32, s. 391-399.

30.)HÁJEK, R., ŽÁČKOVÁ, D., PENKA, M., KRAHULCOVÁ, E., KOŘÍSTEK, Z., VINKLÁRKOVÁ, J., ADLER, J., JANOVSÁ, E., INDRÁK, K., FABER, E., DOUBEK, M., KLABUSAY, M., OLTOVÁ, A., KUGLÍK, P., DVOŘÁKOVÁ, D., BOURKOVÁ, M.L., DUŠEK, L., MAREŠCHOVÁ, I., MAYER, J., VORLÍČEK, J. *Autologní transplantace s podáním interleukinem 2 aktivovaného štěpu periferních kmenových buněk nemocným s chronickou myeloidní leukemií.* KLINICKÁ ONKOLOGIE, 2000, č. 13, s. 159-166.

31.)HENKES, M., VAN DER KUIP, H., AULITZKY, W.E. *Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trade mark).* Ther Clin Risk Manag, 2008; 4:163-187.

- 32.)HERBERMANN, R.B., NUNN, M.E., HOLDEN, H.T., LAVRIN, D.H. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells.* Int. J. Cancer, 1975, č. 16, s. 230-239.
- 33.)HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie.* 4.vyd., Triton, Praha, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- 34.)CHO, D., CAMPANA D. *Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy.* Korean J Lab Med, 2009, č. 29, s. 89-96.
- 35.)JEWETT, A.1, MAN, Y.G., TSENG, H.C. *Dual functions of natural killer cells in selection and differentiation of stem cells; role in regulation of inflammation and regeneration of tissues.* J Cancer, 2013;4(1):12-24. doi: 10.7150/jca.5519.
- 36.)KIESSLING, R., KLEIN, E., PROSS, H., WIGZELL, H. „Natural“ killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cel. Eur. J. Immunol, 1975, č. 5, s. 117–121.
- 37.)KIESSLING, R., KLEIN, E., WIGZELL, H. Natural killer cells in the mouse. Eur. J. Immunol, 1975, č. 5, s. 112-117.
- 38.)KIM, S., IIZUKA, K., KANG, H.S., DOKUN, A., FRENCH, A.R., GRECO, S., YOKOYAMA, W.M. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. Nat Immunol, 2002, č. 3, s. 523-528.
- 39.)KLENER, P., KLENER, P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* Grada Publishing, Praha, 2009. ISBN 978-80-247-2808-7.
- 40.)KOPECKÝ, J., KOPECKÝ O. *NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory.* Klin Onkol, 2010, č. 23, s. 5-9.
- 41.)LIM, O., LEE, Y., CHUNG, H., HER, J.H., KANG, S.M., JUNG, M.Y., MIN, B., SHIN, H., KIM, T.M., HEO, D.S., HWANG, Y.K., SHIN, E.C. *GMP-compliant, large-*

scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo. PLoS One, 2013;8(1):e53611. doi: 10.1371/journal.pone.0053611. Epub 2013 Jan 11.

42.)LOCATELLI, F., PENDE, D., MINGARI, M.C., BERTAINA, A., FALCO, M., MORETTA, A., MORETTA, L. *Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells.* Front Immunol, 2013;4:(15). doi: 10.3389/fimmu.2013.00015.

43.)MAKI, G., HAYES, G.M., NAJI, A., TYLER, T., CAROSELLA, E.D., ROUAS-FREISS, N., GREGORY, S.A. NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia*, 2008, č.5, s. 998-1006.

44.)MALMANN, M.R., SCHMIDT, S.V., SCHULTZE, J.L. *Macrophages in human cancer: Current and future aspects.* Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2012.

45.)MANTOVANI, A. *The yin-yang of tumor-associated neutrophils.* Cancer Cell, 2009, č. 16, s. 173-174.

46.)MCKENNA, D.H., SUMSTAD, D., BOSTROM, N., KADIDLO, D.M., FAUTSCH, S., MCNEARNEY, S., DEWAARD, R., MCGLAVE, P.B. , WEISDORF, D.J., WAGNER, J.E., MCCULLOUGH, J., MILLER, J.S. *Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience.* TRANSFUSION, 2007, č. 47, s. 520-528.

47.)METCALF, D. *The Fate of Parental Preleukemic Cells in Leukemia-susceptible and Leukemia-resistant F₁ Hybrid Mice.* Cancer Res, 1963, č. 23, s. 1774-1781.

48.)METKAR, S.S., WANG, B., AGUILAR-SANTELISES, M., RAJA, S.M., UHLIN-

HANSEN, L., PODACK, E., TRAPANI, J.A., FROELICH, C.J. *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation.* Immunity, 2002, č. 16, s. 417-428.

49.) MORETTA, A., BOTTINO, C., VITALE, M., PENDE, D., CANTONI, C., MINGARI, M.C., BIASSONI, M., MORETTA, L. *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.* Annual Review of Immunology, 2001, č. 19, s. 197-223.

50.) MORSE, M.A., LYERLY, H.K., CLAY, T.M., ABDEL-WAHAB, O., CHUI, S.Y., GARST, J., GOLLOB, J., GROSSI, P.M., KALADY, M., MOSCA, P.J., ONAITIS, M., SAMPSON, J.H., SEIGLER, H.F., TOLOZA, E.M., TYLER, D., VIEWEG, J., YANG, Y. *How does the immune system attack cancer?* Current Problems in Surgery, 2004, č. 41, s. 115-132.

51.) MÜLLER, K.M., BICKEL, M., WIESMANN, U.N., SPÖRRI, B. *Natural killer cells activate human dermal fibroblasts.* Cytokine. 2000, č. 12, s. 1755-1762.

52.) PASSWEG, J.R., STERN, M., KOEHL, U., UHAREK, L., TICHELLI, A. *Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplantation, 2005, č. 35, s. 637-643.

53.) PEREZ-DIEZ, A., JONCKER, N.T., CHOI, K., CHAN, W.F., ANDERSON, C.C., LANTZ, O., MATZINGER, P. *CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells.* Blood, 2007, č. 109, s. 5346-5354.

54.) PERRONE, G., VINCENZI, B., SANTINI, D., VERZI, A., TONINI, G., VETRANI, A., RABITTI, C. *Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer.* Cancer Letters, 2004, č. 208, s. 227-234.

55.)PROSS, H.F., JONDAL, M. "Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes". Clin. Exp. Immunol, 1975, č. 21, s. 226–235.

56.)RAULET, D.H. *Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response*. Nature Immunology, 2004, č. 5, s. 996-1002.

57.)RAULET, D.H., VANCE, R.E., MCMAHON, C.W. *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. Annual Review of Immunology, 2001, č. 19, s. 291-330.

58.)ROHOŇ, P. *Molekulární biologie v hematookologii - od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2009. ISBN 978-80-244-2224-4.

59.)RUGGERI, L., AVERSA, F., MARTELLI, M.F., VELARDI, A. *Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self*. Immunol Rev, 2006, č. 214, s. 202-218.

60.)RUGGERI, L., CAPANNI, M., URBANI, E., PERRUCCIO, K., SHLOMCHIK, W.D., TOSTI, A., POSATI, S., ROGAIA, D., FRASSONI, F., AVERSA, F., MARTELLI, M.F., VELARDI, A. *Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants*. Science magazine, 2002, č. 295, s. 2097-2100.

61.)RUGGERI, L., MANCUSI, A., BURCHIELLI, E., CAPANNI, M., CAROTTI, A., ALOISI, T., AVERSA, F., MARTELLI, M.F., VELARDI, A. *NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood Cells Mol Dis, 2008, č. 40, s. 84-90.

62.)RUGGERI, L., MANCUSI, A., CAPANNI, M., MARTELLI, M.F., VELARDI, A. *Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer*. Current Opinion in Immunology, 2005, č. 17, s. 211-217.

- 63.)TESTA, U., RICCIONI, R. *Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. Haematologica*, 2007, č. 92, s 81-94.
- 64.)TIMMERMANN, M.J, LEVY, R. *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. Annual Reviews*, 1999, č. 50, s. 507-529.
- 65.)TIMONEN, T., SAKSELA, E. *Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. J Immunol Methods*, 1980, č.36, s. 285-291.
- 66.)VÁCHA, M., FELLNEROVÁ, I., BIČÍK, V., PETRÁSEK, R., ŠIMEK, V. *Srovnávací fyziologie živočichů. Masarykova univerzita, Brno*, 2008. ISBN 978-80-210-3379-5.
- 69.)VEUGELERS, K., MOTYKA, B., GOPING, S., SHOSTAK, I., SAWCHUK, T., BLEACKLEY, CH. *Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. Molekular Biology of the Cell*, 2006, č. 17, s. 623-633.
- 70.)VLKOVÁ M. *Flowcytometrická analýza T a B lymfocytárních subpopulací u pacientů s humorálními imunodeficiencemi. Dizertační práce. Masarykova univerzita, Brno*, 2008.
- 71.)WESTERMANN, J., PABST R. *Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. Clin Investig*, 1992, č. 70, s. 539-544.