

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

HANA SVOBODOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Terapeutické využití dendritických buněk
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. Petr Sláma, PhD.

Vypracovala:
Hana Svobodová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Terapeutické využití dendritických buněk

vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne: 26. 4. 2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Hana Svobodová**
Studijní program: Agrobiologie
Obor: Molekulární biologie a biotechnologie
Název tématu: **Terapeutické využití dendritických buněk**
Rozsah práce: 30 stran

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma
2. Možnosti terapeutického využití dendritických buněk
3. Perspektivy využití dendritických buněk při léčbě závažných onemocnění

Seznam odborné literatury:

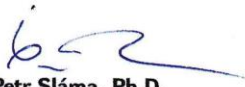
1. TOMAN, M. a kol. *Veterinární imunologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2009. 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
2. Databáze PubMed. Dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>
3. Databáze Web of Science. Dostupné na <http://portal.isiknowledge.com/>

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2017


Hana Svobodová
Autorka práce




Ing. Petr Sláma, Ph.D.
Vedoucí práce


doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček
Vedoucí ústavu


doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Ráda bych tímto poděkovala Ing. Petru Slámovi, PhD. za jeho odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při psaní mé bakalářské práce.

Abstrakt

Dendritické buňky (DC) patří mezi nejúčinnější antigen prezentující buňky. Jsou schopné rozeznat přítomnost antigenu a zajistit přenos dané informace do lymfatických uzlin, kde jsou důsledkem těchto mechanismů stimulovány T lymfocyty. Nezralé DC po setkání s antigenem začnou dozrávat, putovat k lymfatickým uzlinám a dalším sekundárním lymfatickým orgánům a měnit se z antigen vázajících buněk na účinné antigen prezentující buňky. Jsou také klíčové pro regulaci imunitní odpovědi, která ovlivňuje proces diferenciací T lymfocytů směrem k Th1 nebo Th2 odpovědi. Kultivace DC *in vitro* umožňuje manipulovat s těmito buňkami a objevovat tak nové terapie pro kontrolu lidských chorob. Jejich specifické vlastnosti mají velký potenciál využití nejen v protinádorové terapii, ale i v léčbě infekčních, autoimunitních a alergických onemocnění. Zejména indukce CD8⁺ T buněk prostřednictvím aktivace imunitního systému může přispět k inhibici růstu nádoru a zvýšení přežití pacientů. Povzbudivé výsledky byly zaznamenány také použitím nezralých DC v transplantologii.

Klíčová slova: dendritická buňka, protinádorová imunoterapie, HIV, tolDC

Abstract

Dendritic cells (DC) are the most effective antigen presenting cells. They are able to detect the presence of the antigen and ensure the transmission of information to the lymph nodes where T lymphocytes are stimulated by these mechanisms. DC mature after encountering the antigen, wander to the lymph nodes and other secondary lymphatic organs, and change from antigen-binding cells to active antigen presenting cells. They are also critical for regulating of immune response that affect the differentiation of T cells towards the Th1 or Th2 response. Cultivation of dendritic cells *in vitro* enables manipulation with these cells and discovering new therapies for controlling human diseases. Their specific properties have a great potential to be used not only for antitumor therapy but also in the treatment of infectious, autoimmune and allergic diseases. In particular, the induction of CD8⁺ T cells by activating the immune system can contribute to inhibition of tumor growth and increase patient survival. Encouraging results were also reported using immature dendritic cells in transplantology.

Keywords: dendritic cell, anticancer immunotherapy, HIV, tolDC

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Historie dendritických buněk	10
3	Biologie dendritických buněk	11
3.1	Obecná charakteristika a vznik DC.....	11
3.1.1	Vznik a diferenciacie DC	12
3.2	Funkce dendritických buněk	12
3.2.1	Aktivace a maturace DC	13
3.2.2	Rozpoznávání antigenu	14
3.3	Subpopulace dendritických buněk	14
3.3.1	Myeloidní DC.....	15
3.3.2	Plazmacytoidní DC	15
3.3.3	Folikulární dendritické buňky	17
4	Terapeutické využití dendritických buněk	18
4.1	Porucha tolerance a imunopatologické stavy	18
4.1.1	DC a únik nádorových buněk z imunitního dohledu.....	19
4.2	DC a protinádorová imunoterapie	19
4.2.1	Aktivní buněčná imunoterapie založená na protinádorových vakcínách	20
4.2.2	Protinádorové vakcíny v léčbě karcinomu prostaty	21
4.3	DC a infekční onemocnění.....	22
4.3.1	Infekce DC virem HIV	23
4.4	DC a autoimunitní onemocnění	23
4.4.1	pDC v patogenezi roztroušené sklerózy	24
4.5	DC a alergická onemocnění	25
4.5.1	IDEC v patogenezi atopické dermatitidy	25
4.6	DC v transplantologii	27
4.6.1	Tolerogenní DC podporující imunitní toleranci.....	27
5	Seznam zkratk	29
6	Závěr	30
7	Použitá literatura	31

1 ÚVOD

Fungování imunitního systému je zajištěno působením rychlých antigenně nespecifických a pomalu se rozvíjejících antigenně specifických mechanismů. Oba tyto mechanismy pak zahrnují humorální složky, které jsou představovány sekretovanými molekulami a sérovými proteiny, a buněčné, kterou tvoří různé druhy buněk. Spojení mezi specifickou a nespecifickou imunitou je zajištěno antigen prezentujícími buňkami (APC), z nichž nejúčinnější jsou dendritické buňky. V posledních letech jsou DC stále více studovány pro jejich roli adjuvantů ve vakcínách při prevenci proti mikrobiálním infekcím a odmítnutí aloštěpu, při léčbě rakoviny a autoimunitních onemocnění.

Cílem mé práce bylo tedy formou literární rešerše shrnout obecnou charakteristiku dendritických buněk a zejména nejnovější poznatky týkající se jejich využití v klinické praxi. Bakalářská práce je členěna do několika kapitol, z nichž první je věnována historii a významným objevům v oblasti dendritických buněk. Další kapitoly se zabývají biologií dendritických buněk – jejich obecnou charakteristikou, funkcemi a rozdělením do podskupin. Nejobsáhlejší kapitola práce popisuje roli DC v imunopatologických stavech a možnosti jejich využití jako terapeutického nástroje k léčbě některých závažných onemocnění. Převážná část této kapitoly je věnována zejména protinádorové imunoterapii, konkrétně léčbě karcinomu prostaty pomocí terapeutických vakcín na bázi dendritických buněk. Další podkapitoly shrnují využití DC v terapii infekčních, autoimunitních a alergických onemocnění. Poslední podkapitola se zabývá schopností DC navodit toleranci při transplantaci. Velký terapeutický potenciál DC dokazují také konkrétní případy studií uvedené v práci.

2 HISTORIE DENDRITICKÝCH BUNĚK

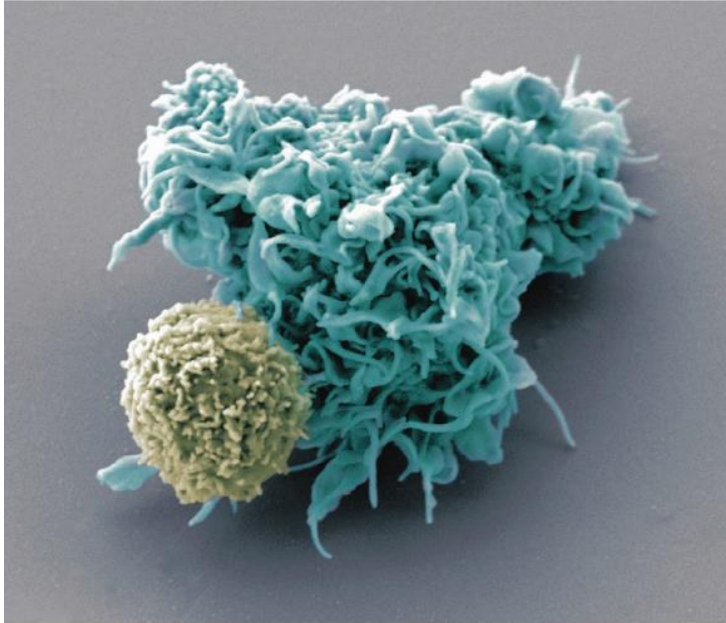
Prvním nalezeným druhem DC byly buňky v lidské epidermis objevené v roce 1868 Paulem Langerhansem. Domníval se, že tyto nepigmentované buňky slouží jako epidermální receptory. Ve svém článku “Über die Nerven der menschlichen Haut“ je popsal jako rozvětvené kožní buňky připomínající svým tvarem neuron (Langerhans, 1968). DC poprvé popsal Ralph Steinman v roce 1973. Ve slezině pozoroval subpopulaci buněk výrazného dendritického tvaru (Steinman, 1973). Brzy se zjistilo, že tyto buňky jsou odvozené od kostní dřeně a nacházejí se téměř ve všech lymfatických a většině nelymfatických tkáních. Nestle a Nickoloff byli první, kteří zjistili, že kůže obsahuje více typů DC včetně CD1a⁺ a CD14⁺ buněk. Obtížnost izolovat tyto buňky ve velkém množství ztížilo možnost studovat jejich biologické funkce (Nestle et al., 1993). Jacques Banchereau a Christophe Caux objevili způsob, jak rozlišit velké množství těchto buněk *in vitro* z hematopoetických progenitorových buněk (Caux et al., 1997). Geissmann et al. ve svých studiích stanovili generaci LC-like buněk z lidských monocytů v přítomnosti TGF- β (Geissmann et al., 1998). Potřebnou pro konečnou diferenciaci těchto buněk do Langerhansových buněk (LC) byla interakce sloučeniny s e-kadherinem vyjádřeným epidermálními keratinocyty (Van Den Bossche, 2013). Tyto specializované kultivační systémy, společně se studii na DC izolovaných z tkáňových vzorků, pomohly rozluštit složitost DC v lidské kůži (Mellman et al., 2011).

3 BIOLOGIE DENDRITICKÝCH BUNĚK

Dendritické buňky (DC) představují nejúčinnější APC, které hrají klíčovou roli v imunitních reakcích. DC byly popsány jako buňky, které exprimují hlavní histokompatibilní komplex (MHC) I. i II. třídy antigenů, zajišťující komplementaritu povrchových molekul DC k povrchovým molekulám T lymfocytům. Tyto buňky jsou výjimečné zejména tím, že jako jediné APC kromě toho, že dokáží předložit zpracovaný antigen naivnímu T lymfocytu, jsou také klíčové pro regulaci imunitní odpovědi, která ovlivňuje proces diferenciaci T lymfocytů směrem k Th1 nebo Th2 odpovědi (Reid et al., 2000). A to nejdůležitější, že DC stimulují naivní CD4 a CD8 T lymfocyty účinněji, než jakékoliv doposud popsané antigen prezentující buňky (Lipscomb a Masten, 2002).

3.1 Obecná charakteristika a vznik DC

DC jsou pro svoji funkci přizpůsobeny již tvarem, na jehož základě získaly své pojmenování. Z povrchu DC vystupují dlouhé cytoplazmatické výběžky ($>10 \mu\text{m}$), připomínající dendrity neuronů, které jim umožňují interakci s okolními buňkami (Buc, 2001) a také významně zvětšují buněčný povrch (Krejsek a Kopecký, 2004). Od makrofágů se kromě morfologické stavby a schopností účinněji prezentovat antigen odlišují také poměrně menší fagocytární kapacitou a sníženým počtem lysozomů nacházejících se v cytoplazmě (Ferenčík et al., 2004). Kromě toho obsahují také málo ribozomů a jejich granulární endoplazmatické retikulum je méně vyvinuté. Naopak obsahují velký počet mitochondrií. Jádro je nepravidelné, s malými jádérky (Stites a Terr, 1994). Morfologie DC se však značně liší v závislosti na jejich lokalizaci v tkáni (Onji, 2004).



Obr. 1: Nezralá dendritická buňka (modře) interagující s CD4 T lymfocytom (žlutě) (Donahue a Schwartz, 2016).

3.1.1 Vznik a diferenciace DC

DC vznikají v kostní dřeni, kde jsou vytvářeny z $CD34^+$ hematopoetických progenitorových buněk. Progenitory a prekurzory DC se nacházejí v kostní dřeni, krvi, brzlíku a periferních tkáních (Onji, 2004).

3.1.1.1 Kultivace DC *in vitro*

Využití DC k terapii je umožněno díky laboratorním technikám, kterými lze získat prekurzory DC z periferní krve a poté je kultivovat *in vitro*. Jako nejčastější zdroj DC se používají progenitory $CD34^+$ hematopoetických buněk či periferní monocyty $CD14^+$. Diferenciace monocytů v DC může být dosaženo působením směsi cytokinů, (většinou GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-4 (případně IL-3), trijodtyroninu (Mooij et al., 1994), TNF- α , MCM, eventuálně CD40L (Pospíšilová et al., 2000).

3.2 Funkce dendritických buněk

DC se z hlediska funkce rozdělují na zralé a nezralé. Nezralé formy buněk se nachází v periferních tkáních, kde vytvářejí imunologickou bariéru a jsou vysoce

aktivní z hlediska fagocytózy. Při přímém setkání s patogeny je indukována sekrece cytokinů, jako interferon alfa (IFN- α), což umožňuje aktivovat eozinofily, makrofágy a přirozené zabíječe (NK). Po zachycení antigenu migrují nezralé DC do lymfatických orgánů, kde dozrávají a vystavují fragmenty vstřebaných patogenů (antigeny) na svém povrchu prostřednictvím molekul MHC I. a II. třídy, které jsou následně rozpoznávány specifickými lymfocyty (Banchereau et al., 2000). Přesun DC do sekundárních lymfatických orgánů ovlivňují chemokiny CCL19 a CCL21, pro které obsahují zralé DC receptor nazvaný CCR7 (Hořejší a Bartůňková, 2009).

3.2.1 Aktivace a maturace DC

Bylo zjištěno, že několik molekul, včetně CD40, TNF-R a IL-1R, aktivují přechod nezralých antigen vázajících DC na zralé antigen prezentující DC.

Proces maturace je spojen s několika koordinovanými procesy, jako je ztráta endocytických/fagocytických receptorů, zvýšení exprese kostimulačních molekul CD40, CD58, CD80 a CD86, změny v morfologii, v lysozomální kompartmentaci, snížení exprese CD68, zvýšení exprese lysozomů DC spojených s membránovými proteiny (DC-LAMP) a změna v kompartmentaci molekul MHC II. třídy (Banchereau et al., 2000).

Funkce DC je do značné míry ovlivněna mikroprostředím, ve kterém mohou tyto buňky stimulovat imunitní odpověď (Banchereau et al., 2000). Kromě schopnosti zachytit a zpracovat patogeny a jejich antigeny, vykonávají DC řadu dalších charakteristických funkcí:

1. Mnoho procesů v DC, zejména maturace a aktivace.
2. Morfologická a funkční univerzálnost v souladu s vývojem, zráním a výskytem v tkáni.
3. Obrana *in vivo*. Antigen prezentující funkce zahrnující rozpoznání a zpracování antigenu a přechod do lymfatických uzlin.
4. Iniciaci imunitní odpovědi. Stimulace klidových, naivních a paměťových B a T lymfocytů.
5. Vysoký potenciál ve stimulaci T lymfocytů. I malý počet DC a nízké hladiny antigenu dokáží vyvolat silnou odpověď T lymfocytů.
6. Aktivace NK buněk a NKT buněk.

7. Produkce interferonu I. typu plazmacytoidními DC.
8. Indikátory centrální a periferní tolerance (Onji, 2004).

3.2.2 Rozpoznávání antigenu

Základní funkcí hlavního histokompatibilního komplexu MHC (u člověka nazývaný jako HLA) je prezentovat antigen specifickému receptoru T lymfocytu (TCR). Tyto receptory jsou schopny rozpoznat antigeny, které jsou ve spojení s polymorfními molekulami MHC nebo nepolymorfními molekulami CD1, které jsou lokalizovány na membráně APC. Antigen je jednou částí vázaný na molekulu MHC a druhou, epitopem, pak na TCR (Toman, 2000).

Endogenní antigenní peptidy jsou v cytosolu vázány na TAP (transporter gene products) a dopraveny do endoplazmatického retikula, kde jsou spojeny s MHC I. třídy. MHC-peptidový komplex je následně dopraven k buněčnému povrchu, kde je případně rozpoznán cytotoxickými $CD8^+$ T lymfocyty (Pospíšilová et al., 2000).

Exogenní antigeny jsou do DC dostávány endocytózou, makropinocytózou nebo fagocytózou a v endosomálním kompartmentu jsou díky nízkému pH degradovány na peptidové fragmenty. Ty jsou spojovány v komplex s MHC II. třídy, a tak mohou být následně rozpoznány pomocnými $CD4^+$ T lymfocyty (Pospíšilová et al., 2000).

Tyto dva způsoby však nejsou uplatnitelné u všech zpracovaných antigenů, zejména v DC. Nezralé DC zpracovávají exogenní solubilní proteiny, včetně antigenů nádorových, endogenní cestou. Tento proces se nazývá tzv. „**cross presentation**“ a jde o nepřímou prezentaci, která je pravděpodobně hlavní cestou indukce cytotoxických lymfocytů. Indukce $CD8^+$ T lymfocytů závisí na současné prezentaci antigenů vázaných na MHC I. i II. třídy a současné aktivaci $CD4^+$ T lymfocytů (Pospíšilová et al., 2000).

3.3 Subpopulace dendritických buněk

Byly indentifikovány dvě vývojové linie DC, kdy důkaz myeloidního původu DC vychází převážně z *in vitro* studií. Myeloidní a lymfoidní DC se liší fenotypem, lokalizací a funkcí. Z těchto linií vznikají celkem tři podtypy DC – Langerhansovy a intersticiální z myeloidní linie a lymfoidní DC z lymfoidní linie (Banchereau et al., 2000).

3.3.1 Myeloidní DC

Myeloidní dendritické buňky (mDC) jsou heterogenní subpopulací buněk, které je možné, dle přítomnosti CD-znaků, rozdělit do tří skupin – CD141⁺, CD11c⁺ a CD11b⁺. Tyto skupiny buněk se diferencují z monocytů (Buc, 2012).

DC, které osidlují většinu orgánů, jako jsou plíce, srdce, ledviny, játra, gastrointestinální trakt, se nazývají **intersticiální** (Buc, 2001). Ty nesou koagulační faktor XIIIa a exprimují molekuly CD14 a CD68. V případě, že jsou vmezeřeny mezi keratinocyty, se nazývají **Langerhansovy buňky** (Buc, 2012). Jedná se o nezralé DC nacházející se v epidermis, které exprimují molekuly CD1a, Lag a langerin (CD207) (Krejsek a Kopecký, 2004).

Jako migrační DC se označují ty buňky, které po pohlcení antigenu a své následné aktivaci putují do lymfatických uzlin, kam vstupují lymfatickými aferentními cévami (Buc, 2012). Cirkulující DC, které se nachází v krvi, tvoří asi 0,1 – 1 % leukocytů. V lymfě jsou tyto buňky označovány jako závojové (*veiled cells*) (Buc, 2001). Ve slezině, thymu a kostní dřeni se z důvodu absence aferentních cév vyskytují jen původní, rezidentní DC, které zde doputovaly z kostní dřeně, zatímco v lymfatických uzlinách zaujímají až 50 % veškerých DC (Buc, 2012).

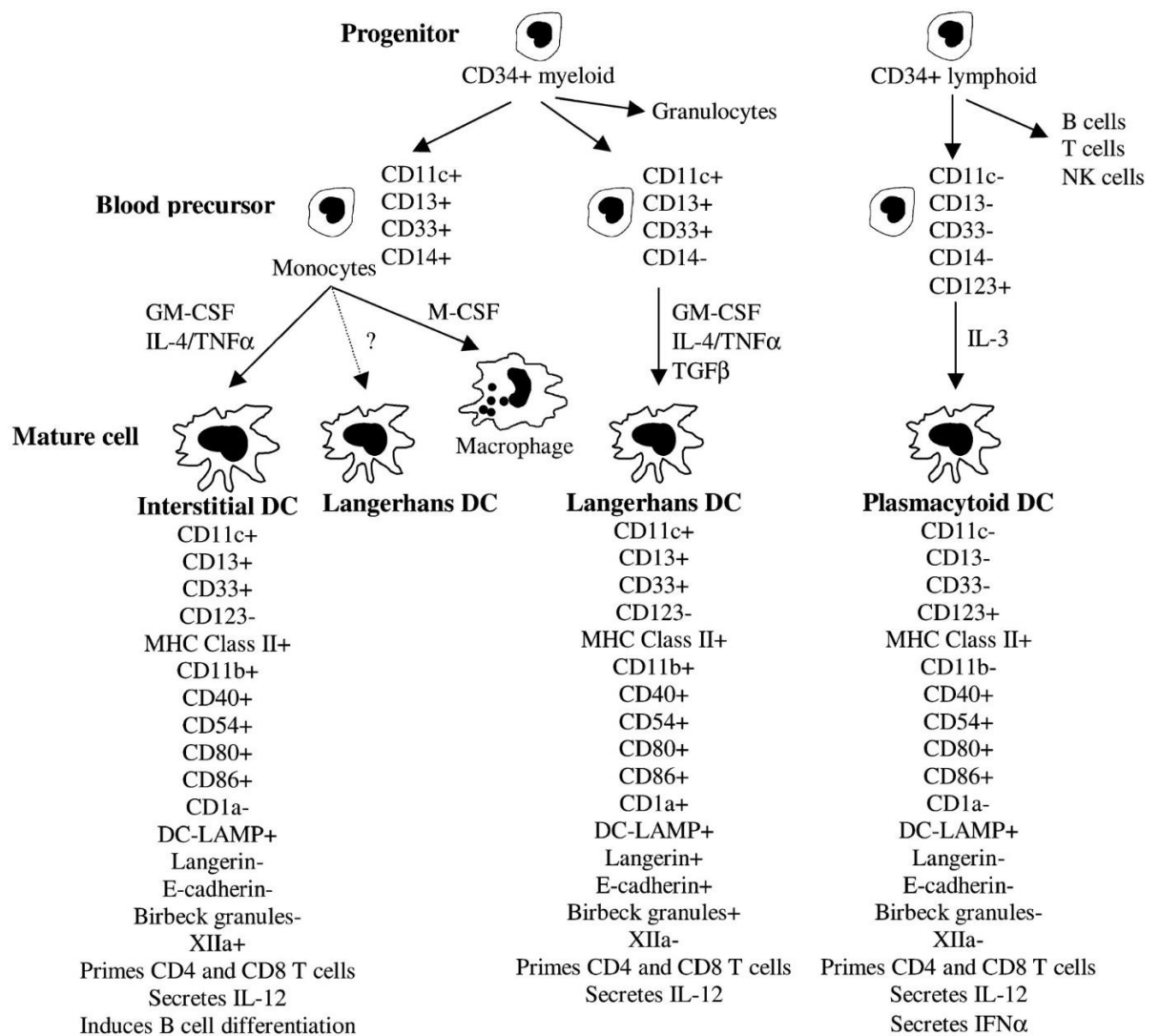
Hlavní růstové a diferenciační faktory pro mDC jsou IL-4 a GM-CSF. Exprimují převážně TLR. Základní biologickou funkcí mDC je ve zralém stavu stimulovat antigenně specifické T lymfocyty (Hořejší a Bartůňková, 2009) a polarizovat imunitní odpověď (Buc, 2012).

3.3.2 Plazmacytoidní DC

Plazmacytoidní (lymfoidní) dendritické buňky (pDC) se vyskytují především v lymfatických uzlinách a krčních mandlích, zatímco vzácné jsou ve dřeni brzlíku, kostní dřeni, slezině, sliznici lymfatických tkání a téměř chybí v periferních nelymfatických tkáních (Facchetti et al., 2016). V krvi zaujímají asi 0,5 % ze všech mononukleárních buněk (Buc, 2012). Tyto buňky dokážou exprimovat povrchové molekuly CD4 a CD123 a jsou CD11c⁻, CD13⁻, CD33⁻ (Krejsek a Kopecký, 2004).

Plazmacytoidní dendritické buňky se do lymfatických uzlin dostávají díky interakci svých adhezivních molekul s adhezivními molekulami buněk, které tvoří vény s vysokým endotelem (HEV) a usídlují se v oblastech odvozených od thymu (Buc, 2012).

Růstové faktory pDC představují CD40L a IL-3. Hlavní znak, jenž umožňuje identifikaci pDC v tkáních a krvi, je exprese receptoru pro IL-3. Tyto DC exprimují především receptory pro nukleové kyseliny TLR-7 a TLR-9. To vysvětluje produkci velkého množství IFN- α , protože TLR-7 a TLR-9 jsou s velikou účinností stimulovány virovou RNA, respektive DNA. Po stimulaci dochází u pDC také k maturaci a následně přeměně v APC pro specifické T lymfocyty. IFN- α produkovaný pDC je také důležitý pro aktivaci NK buněk a NKT buněk, které jsou rovněž velmi účinné při obraně organismu vůči virům (Hořejší a Bartůňková, 2009).



Obr. 3: Schéma vývoje podtypů lidských dendritických buněk z CD34⁺ hematopoetických progenitorových buněk (Lipscomb a Masten, 2002).

3.3.3 Folikulární dendritické buňky

Folikulární dendritické buňky (FDC) jsou morfologicky velmi podobné DC, jinak s nimi však nejsou příbuzné (Ferenčík et al., 2004). Odlišují se svým původem i funkcí (Buc, 2001). FDC se vyskytují v lymfatických folikulech ve skupinách B lymfocytů. Nemají schopnost prezentovat antigen, na svém povrchu neexprimují antigeny HLA II. třídy (Ferenčík et al., 2004).

FDC rozpoznávají antigen ve formě imunokomplexů a v této formě jej prezentují B lymfocytům. Tento proces vykonávají bez prostřednictví molekul HLA (Klener et al., 1999). Jsou nezbytné pro dozrávání lymfocytů B, zejména při sekundární imunitní odpovědi. Obklopují intaktní antigen nebo díky nefagocytovému Fc receptoru připoutávají imunitní komplexy na svůj povrch na dlouhou dobu (Ferenčík et al., 2004). Antigeny a jejich imunitní komplexy s protilátkami tvoří „korálky“ na povrchu FDC a jsou pak předávány B lymfocytům nacházejícím se v zárodečných centrech. FDC na svém povrchu dále exprimují molekulu CD23. Ta představuje ligand pro část CR2 koreceptorového komplexu CD19 B lymfocytů, takže FDC mohou ovlivňovat produkci protilátek. Jejich schopnost dlouhodobě držet antigenní částice může být i nevýhodná a může mít dopad na imunitní systém, např. při HIV infekci či v patogenezi prionóz (Ferenčík et al., 2004).

4 TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK

Jelikož jsou DC schopny indukovat dva protikladné stavy – indukci specifické imunitní odpovědi vůči nádorovým a infekčním antigenům a indukci tolerance, jsou v zájmu výzkumných týmů z celého světa. Funkční a fenotypová heterogenita mezi jednotlivými druhy DC je intenzivně zkoumána pro potenciální využití DC v imunoterapii některých chorob, primárně nádorových (Pospíšilová et al., 2000).

Dendritické buňky mohou být využity v klinické praxi v těchto oblastech:

1. Imunoterapie nádorů
2. Indukce antimikrobiální a antivirové imunity u imunosuprimovaných pacientů (např. HIV)
3. Indukce specifické tolerance vůči transplantovaným tkáním a orgánům
4. Specifická indukce tolerance vůči autoantigenům a při autoimunitních chorobách
5. Imunoterapie alergií (Pospíšilová et al., 2000)

4.1 Porucha tolerance a imunopatologické stavy

Porucha imunologické tolerance může vést k nežádoucím škodlivým reakcím, které způsobují autoimunitní choroby (AID) a alergie. Počet pacientů s autoimunitním onemocněním, těžkými alergiemi a transplantacemi stále roste. Celosvětově se odhaduje, že 1 z 10 jedinců (Cooper et al., 2009) trpí AID a u 1 z 9 je diagnostikovaná alergie.

V současné době vyžadují tito pacienti celoživotní podávání imunomodulačních léčiv, které ovšem vykazují řadu závažných vedlejších účinků. Znalost imunitních mechanismů tak vedla k vytvoření tolerogenních dendritických buněk (tolDC) s cílem dlouhodobě omezit nežádoucí imunitní reakce (Brinke et al., 2015).

Imunitní systém, mimo obrany proti infekčním agens, zodpovídá také za průběžné odstraňování odumřelých, zmutovaných či nádorově pozměněných vlastních buněk. Imunitní systém dokáže kontrolovat buněčný růst v prvních fázích karcinogeneze i ve stadiu tzv. preneoplázie. V pokročilém stadiu však mají imunitní mechanismy naopak dokonce podpůrný účinek na proliferaci nádorových buněk (Bartůňková, 2010).

Příčinou nádorového onemocnění je selhání správné interakce mezi imunitním systémem a nádorem. Selhání může nastat jak poruchou funkce imunitních mechanismů, tak i důsledkem únikových mechanismů samotné nádorové buňky (Bartůňková, 2002).

4.1.1 DC a únik nádorových buněk z imunitního dohledu

Nádory mohou imunitnímu dohledu uniknout postupem nazvaným „cancer immunoediting“. Tento proces je výsledkem tří fází, a to eliminace, rovnováhy (equilibrium) a úniku (escape) (Koebel et al., 2007).

Nádorové buňky ovlivňují přímo i nepřímo DC, což vede k aktivní účasti DC na úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu. Lze říci, že porušená protinádorová imunita je dána špatnou antigenní prezentací dendritických buněk. Některé nádory produkují faktory (oxid dusnatý, IL-10, TGF- β , VEGF), jejichž důsledkem je potlačena cytotoxická imunitní odpověď vůči nádoru a je indukována jeho tolerance. Tyto faktory tak inhibují životnost a funkce DC. Následkem toho je umožnění růstu nádoru a vznik metastáz (Pospíšilová et al., 2000).

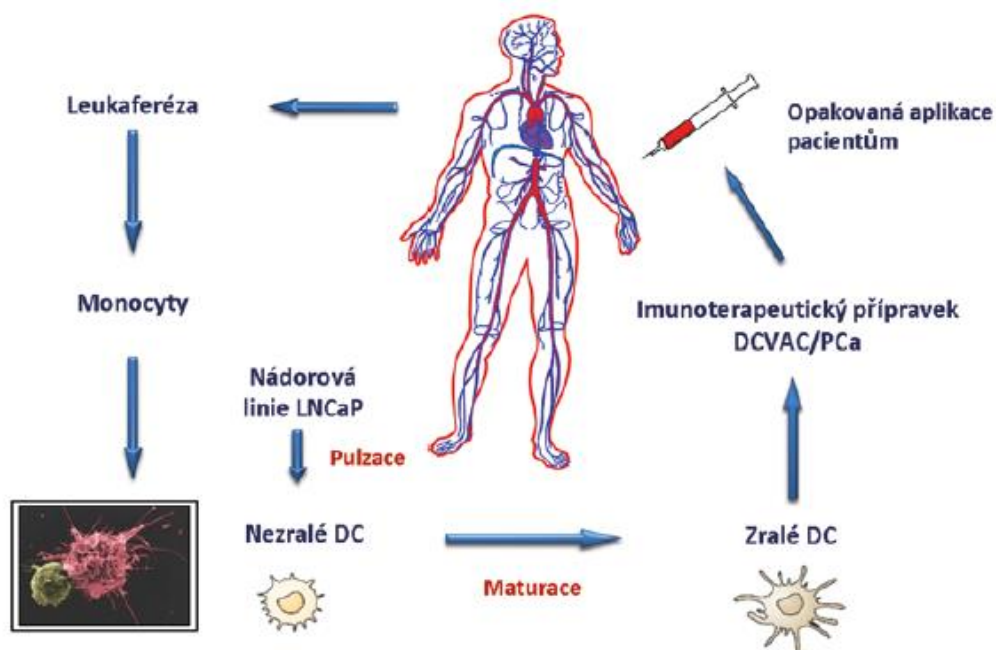
4.2 DC a protinádorová imunoterapie

Principem nádorové imunoterapie je různými způsoby vybudit složky imunitního systému tak, aby netolerovaly nádorové buňky, ale naopak proti nim vyvinuly imunitní odpověď a dokázaly překonat jejich únikové mechanismy (Bartůňková, 2010). Může být zprostředkována cestou aktivní nebo pasivní léčby. Pasivní léčba představuje podávání monoklonálních protilátek a cytokinů a adoptivních buněčných přenašečů, jako již „vzdělaných“ z prostředí *ex vivo*. Při aktivní imunoterapii jsou podávány upravené antigenní produkty nádoru (protinádorové vakcíny), kdy je cílem vyvolat reakci imunitního systému na nádor (Papaioannou et al., 2016).

Pro rozvoj specifické protinádorové imunity jsou rozhodující dendritické buňky, protože jsou jako jediné schopny prezentovat antigeny naivním T lymfocytům. DC pohlcují nádorové antigeny prostřednictvím makropinocytózy a fagocytózy (Krejsek a Kopecký, 2004).

4.2.1 Aktivní buněčná imunoterapie založená na protinádorových vakcínách

Monocyty získané z periferní krve leukaferézou jsou kultivovány *ex vivo* a přeměněny na dendritické buňky. Tyto DC jsou dále „pulsovány“ nádorovým antigenem (peptidy, mRNA, apoptotické buňky či lyzáty). DC jsou pohlcením těchto antigenů aktivovány a maturovány a ve formě protinádorové vakcíny vpraveny zpět do těla pacienta k vyvolání terapeutických T buněk *in vivo* (Podrazil et al., 2016).



Obr. 3: Obecné schéma protinádorového terapeutického protokolu založeného na dendritických buňkách (Podrazil et al., 2016).

Klinické studie ukázaly, že pro optimální indukci tumor specifických T lymfocytů by měly vakcíny DC vykazovat tři hlavní vlastnosti:

1. Schopnost migrovat do lymfatických uzlin, které poskytují optimální prostředí pro aktivaci T lymfocytů.
2. Dlouhověkost – DC musí zachovat svůj zralý fenotyp v lymfatických orgánech po dostatečně dlouhou dobu pro aktivaci a rozšíření tumor specifické odpovědi T lymfocytů, které jsou schopny odstranit nádor.
3. DC musí trvale prezentovat TAA (tumor-associated antigens) (Turnis a Rooney, 2010).

4.2.2 Protinádorové vakcíny v léčbě karcinomu prostaty

Karcinom prostaty je u mužů jedním z nejčastějších onkologických onemocnění. Při jeho včasném zachycení je léčitelný, v případě pozdního stanovení diagnózy jsou léčebné postupy limitované (Bartůňková, 2014).

Předpokládanou možností jeho léčby je právě protinádorová imunoterapie pomocí vakcín založených na DC. Jedná se například o níže popsané vakcíny Sipuleucel-T či DCVAC.

4.2.2.1 Sipuleucel-T

V roce 2010 byla americkou FDA schválena první vakcína založená na DC (Sipuleucel-T, Provenge®) určena pro léčbu pacientů s pokročilým asymptomatickým či mírně symptomatickým karcinomem prostaty resistantním na kastraci (Vacchelli et al., 2013). Jedná se o léčivý přípravek autologní buněčné imunoterapie sestávající ze tří intravenózních infuzí, které jsou podávány v intervalech dvou týdnů. Infuze je složena z autologních DC periferní krve, které jsou aktivovány pomocí fúzního proteinu PAP-GM-CSF a jejichž cílem je aktivace prostatické kyselé fosfatázy (PAP) a antigen specifických T lymfocytů CD4 a CD8. Takto aktivované lymfocyty jsou krví dopraveny k nádorovému ložisku, kde zahajují protinádorovou odpověď. Složení a počet buněk v jedné dávce je individuální u každého pacienta dle jeho leukaferézy. Sipuleucel-T obsahuje také další buňky imunitního systému, vyskytující se v periferní krvi, jako jsou T a B lymfocyty, NK buňky a další (Kantoff et al., 2010).

Do studia zkoumající účinnost přípravku bylo zapojeno celkem 512 pacientů, přičemž 341 z nich dostávalo Sipuleucel-T a 171 pouze placebo. Ve skupině pacientů, kterým bylo podáván Sipuleucel-T, došlo k poklesu úmrtí o 22 % a doba přežití se prodloužila o 4,1 měsíce (28,5 měsíců u skupiny Sipuleucel-T a 21,7 měsíců u skupiny placebo). Pravděpodobnost přežití po dobu 36 měsíců byla u skupiny Sipuleucel-T 31,7% a u skupiny placebo jen 23%. Doba potřebná k progresi onemocnění byla u obou skupin podobná. Vakcína byla většinou dobře snášena (Kantoff et al., 2010).

4.2.2.2 DCVAC

DCVAC je přípravkem aktivní buněčné imunoterapie na bázi DC, která je využívána k léčbě rakoviny prostaty (DCVAC/PCa) a ovarií (DCVAC/OvCa)

(Rožková, 2009). Imunoterapeutická vakcína DCVAC/PCa byla vyvinuta na Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol v Praze a momentálně je testována českou biotechnologickou společností Sotio. U jedinců s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty je přípravek navíc kombinován s chemoterapií.

Vakcína se připravuje z DC odvozených od monocytů pulzací a aktivací usmrcenými buňkami pocházejícími z nádorových linií. U karcinomu prostaty se jedná o buňky nádorové linie LNCaP. DC jsou aktivovány po pohlcení nádorových buněk maturačním činidlem poly:C (polyinosinová-polycytidylová kyselina), ligandem TLR-3 receptoru. V intervalech 3-6 týdnů po více než rok je pacientovi aplikována vakcína DCVAC/PCa s obsahem DC 10^7 (Podrazil et al., 2015).

Tato studie byla zahájena v roce 2014, přičemž výsledky jsou očekávány v roce 2018. V současné době již byly publikovány první výsledky, které poukazují na zvýšení mediánu přežití sledovaných pacientů o 8,2 měsíce déle než byl předpokládaný medián dle Halabiho monogramu a o 6 měsíců déle než bylo očekáváno dle MSKCC monogramu. Během léčby nebyly pozorovány žádné závažnější vedlejší účinky a došlo ke snížení regulačních T lymfocytů (Podrazil et al., 2015).

4.3 DC a infekční onemocnění

DC mají důležitou roli také během adaptivní imunitní odpovědi proti infekčním agens. Po vstupu infekčního agens migrují prekursorzy DC z krve do tkání napadených virem a produkují IFN typu 1 spolu dalšími buňkami vrozené imunity, jako jsou makrofágy a NK buňky. Tímto procesem jsou aktivovány prekursorzy DC nebo nezralé DC v napadené tkáni, které jsou schopné rozpoznat virus nebo jeho antigeny. Poté DC zachytí, zpracují a prezentují virový antigen T buňkám pro indukci adaptivní imunity. DC také stále kontrolují, zda v těle není přítomen stejný virus. Pokud by byl virus přítomen v některé tkáni, vyšlou DC lymfocytům signál k jeho zničení (Onji, 2004).

Přestože funkcí DC je rozpoznat a zachytit viry, byl podán experimentální důkaz, že DC mají u některých virem napadených hostitelů narušené fungování, fenotyp, nezralou aktivaci a defektní produkci cytokinů. Mezi viry ohrožující funkci DC patří virus hepatitidy B (HBV) a C (HCV), virus lidské imunodeficiencie (HIV), cytomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barrové (EBV) a několik dalších virů (Onji, 2004).

4.3.1 Infekce DC virem HIV

Infekce virem HIV je jednou z nejlépe charakterizovaných infekcí s dopadem na dendritické buňky. HIV je schopen přímo infikovat DC, a i když DC dokáží tento virus zachytit, výsledná interakce DC-HIV nevede k eradikaci viru nebo adekvátní HIV specifické obranné imunitě.

Přetrvávající infekce virem HIV vede k postupné destrukci T buněk, což je základní příčinou nemocnosti a úmrtnosti v získaném syndromu imunitní nedostatečnosti (AIDS). Infekce HIV vstupuje nejen do DC, ale i do monocytů (Austyn, 2000). Infikované monocyty jsou pak přeměněny na DC a následně dozrávají a migrují do lymfatických tkání, kde mohou snadno infikovat CD4 T lymfocyty (David et al., 2001).

4.3.1.1 Imunoterapeutické vakcíny proti viru HIV

Jednou ze strategií k vyléčení AIDS je vývoj imunoterapeutických vakcín na bázi DC, které jsou pulzovány virem a jejich cílem je zvýšit HIV-1 specifickou imunitní reakci.

V minulosti proto bylo aplikováno několik experimentálních vakcín. Ty však vykazovaly nízkou účinnost, přičemž celková míra úspěšnosti byla kolem 38 %. Jednotlivé protokoly se lišily volbou antigenu, kultivační metodou a dávkou, i když multivariační analýza neukázala vliv některého z nich na celkové hodnocení. Důležité však je, že vakcíny na bázi DC vyvolaly alespoň nějakou imunogenicitu. Ačkoliv vakcíny nefungovaly dle očekávání, jsou důkazem, že lze zvýšit imunitní odpověď vůči HIV-1 (Coelho, 2016).

4.4 DC a autoimunitní onemocnění

Imunitní tolerance vůči autoantigenům existuje na dvou úrovních, a to sice centrální a periferní. Hlavním mechanismem centrální tolerance je negativní selekce, za jejíž účastí stojí, mimo jiné, také dendritické buňky nacházející se v thymu a periferních tkáních (Gallegos a Bevan, 2004). Podstatou negativní selekce je odstranění autoreaktivních T lymfocytů v raném vývojovém stadiu procesem apoptózy. Ta spočívá v zneškodnění buněk s vysoce afinitní vazbou komplexu peptid/MHC. Škála prezentovaných autoantigenů v brzlíku pomocí DC však není kompletní. Příslušné T lymfocyty s TCR s nízkou afinitou pro vlastní peptid/MHC komplexy tak unikají,

dozrávají, přemísťují se na periferie (Inaba et al., 2002) a spadají pod mechanismy periferní tolerance, jejímž úkolem je zabránit vzniku autoimunitního onemocnění (Jonuleit et al, 2001).

DC mají velký význam při vzniku autoimunitních chorob, jelikož autoimunitní onemocnění vznikají na základě selhání autotolerance, kdy T lymfocyty útočí na buňky vlastních tkání (Hořejší a Bartůňková, 2009). Jedním z příkladů tohoto onemocnění je i roztroušená skleróza.

4.4.1 pDC v patogenezi roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza (MS) je chronické progresivní zánětlivé onemocnění postihující centrální nervový systém, způsobené T lymfocyty. Je považována za chorobu autoimunitní povahy, charakteristickou zánětem šedé i bílé kůry mozkové a současnou demyelinizací, poškozením axonů a úbytkem neuronů (Lassmann et al., 1998).

Některé cytokiny produkované dendritickými buňkami, jako IL-6, IFN typu 1 nebo TNF- α , mají podíl v patogenezi MS. U pacientů s MS se plazmacytoidní dendritické buňky nacházejí v mozkomíšním moku, na leptomeningách a v demyelinizačních lézích. Studovat význam pDC ve vývoji MS je však značně obtížné, vzhledem k jejich velmi nízké koncentraci v krvi (Von Glehn et al., 2012).

4.4.1.1 Imunomodulační léčba pDC pomocí glatirameracetátu

Plazmacytoidní dendritické buňky mohou být ovlivněny imunomodulační léčbou, kdy příkladem je léčba glatirameracetátem, jehož následkem je obnovení narušené maturace pDC a jejich regulační funkce. To může také zapříčinit pokles migrace aktivovaných pDC do centrálního nervového systému a změnu regulace funkce jiných buněk, jako je například podtyp Th1 lymfocytů, a tím ovlivnit vznik demyelinizačních lézí (Von Glehn et al., 2012).

4.4.1.2 Imunomodulační vliv vitamínu D

Vědci se domnívají, že vyšší riziko rozvoje MS mají jedinci s nižší hladinou vitamínu D a jedinci trpící MS vykazují jeho nedostatečnou hladinu. I když v patogenezi MS není účinek vitamínu D úplně objasněn, u pacientů s nízkou hladinou

vitaminu D3 byly později pomocí magnetické rezonance detekovány vysoce aktivní léze CNS. Vitamin D má důležité imunomodulační vlastnosti a dokáže ovlivňovat DC.

Bartosik-Psujek et al. zkoumali imunomodulační vliv vitaminu D na DC odvozené od monocytů, na změny v jejich diferenciaci, dozrávání a cytokin-chemokinovém profilu u pacientů trpících MS. Do studie bylo zapojeno celkem 26 pacientů s relaps remitující formou MS. Žádný pacient nepodstoupil v minulosti imunomodulační nebo imunosupresivní léčbu. Kontrolní skupina byla tvořena 13 zdravými jedinci. Z periferní heparinizované krve byly izolovány mononukleární buňky a poté byla provedena kultivace za přítomnosti IL-4 a GM-CSF a indukovaná buněčná diferenciace. 5. den byla vyvolána maturace přidavkem TNF a stejný den byl přidán i vitamin D3 (1,25-dihydroxyvitamin D3). Výsledky byl dokázán inhibiční vliv vitaminu D3 na diferenciaci a maturaci DC a také vliv na migraci DC k různým tkáním. Kromě toho byla zjištěna inhibovaná sekrece IL-23/12p40 a zvýšená sekrece CCL2. DC pacientů trpících MS byly méně fenotypově vyzrálé oproti kontrolním jedincům. Jedním z mechanismů pozitivního působení vitaminu D3 je tedy ovlivnění funkce DC u pacientů s MS (Bartosik-Psujek et al., 2010).

4.5 DC a alergická onemocnění

Pojmem alergie se rozumí hypersenzitivní reakce organismu vyvolaná imunitními mechanismy v přítomnosti určitého alergenu. Alergeny jsou látky bílkovinné povahy, které interagují s protilátkami IgE (IgG). Navázáním těchto protilátek na vysokoafinitní receptory Fc_εRI pro IgE, které jsou exprimovány na povrchu bazofilů a mastocytů, jsou alergeny degranulovány a jsou uvolněny protizánětlivé mediátory. Následkem toho dochází k rozvoji alergické reakce (Krejsek a Kopecký, 2004).

Termínem atopie je označována abnormální přecitlivělost časného typu na určitý druh alergenů. Mezi atopické onemocnění je řazeno atopické astma, atopická dermatitida, rýma, kopřivka či některé alergie na potraviny (Ferenčík et al., 2004).

4.5.1 IDEC v patogenezi atopické dermatitidy

Atopická dermatitida (AD) je charakterizována jako chronické či chronicky relabující kožní onemocnění se značnou hyperreaktivitou. Toto onemocnění je velmi často podmíněno geneticky (Akdis et al., 2006). Na narušenou obrannou funkci kůže má podíl také snížení až úplná absence antimikrobiálních peptidů nespecifické imunity

(beta-defenziny, katelicidiny), které je vyvoláno díky vlivu „proalergických“ cytokinů Th2, které se u atopiků nacházejí v postižených kožních ložiskách (Howell, 2007).

Rovnováha mezi populacemi Th1 a Th2 je u atopiků posunuta směrem k Th2. Atopický zánět je udržován a komplikován cytokiny sekretovanými těmito lymfocyty. Zvýšená přítomnost Th2 je charakteristická pro akutní fázi AD, zatímco chronické stadium je typické spíše Th1. Tato nerovnováha je následkem narušené funkce regulačních T lymfocytů a je zřejmě příčinou i kompletního atopického habitu (Akdis et al., 2006).

Bylo zjištěno, že v atopické kůži se mimo Langerhansových buněk vyskytuje i jiný druh DC, a to sice zánětlivé dendritické epidermální buňky (IDEC). Na povrchu IDEC dochází k expresi značného počtu receptorů pro protilátky IgE a jejich aktivací je zahájena signalizace sekrece cytokinů Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) a poté k propuknutí kožního zánětu influxem zánětlivých buněk. Průběh zánětlivého procesu je definován aktivací Langerhansových buněk, které u atopika exprimují vysoké množství FcεRI a ty po aktivaci antigenem (alergenem, bakteriemi) sekretují prozánětlivé cytokiny Th2, lymfokyny. Zároveň nastává influx prekurzorů IDEC a jiných T lymfocytů. Posléze aktivované IDEC produkují další cytokiny Th2 a tím udržují zánětlivé stavy kůže (Simon et al., 2004).

4.5.1.1 Role histaminu v AD

Histamin (HA) hraje důležitou roli při zánětu kůže. Jeho účinky jsou zprostředkovány čtyřmi receptory, H₁R – H₄R, spojenými s G proteinem. Tyto čtyři podskupiny jsou exprimovány jinými skupinami hematopoetických buněk a mají různé funkce. Důležitým v AD je H₄R, který je exprimován v leukocytech, zejména pomocí Mo-IDEC (monocyte-derived IDEC). Bylo zjištěno, že exprese a funkce H₄R je v kůži u pacientů s AD nedostačující (Leung, 2000). Hladina histaminu v kůži pacientů s AD je zvýšená ve srovnání s kůží zdravých jedinců (Stander and Steinhoff, 2002).

Dijkstra et al. provedli studii zkoumající expresi a funkci H₄R pomocí IDEC přítomných v kožních lézích pacientů s AD. Vzhledem k nízkému počtu v kůži byly IDEC vytvořeny z monocytů podle publikovaného protokolu (Novak et al, 2002). V této studii byla použita krev zdravých jedinců, protože tito jedinci mají vyšší hladinu histaminu v krvi, který může interferovat s generací Mo-IDEC.

Na základě studie bylo prokázáno, že HA a antagonisté H₄R (klobenpropit a 4-methylhistamin) dokáží svou vazbou a signalizací skrz histaminový receptor na M₀DEC snížit produkci Th2 chemokinu CCL2 a Th1 cytokinu IL-12. Snížení produkce CCL2 vedlo také ke snížení migrace monocytů. Právě možné příznivé účinky H₄R na zmírnění zánětu by mohly být nástrojem k léčbě AD (Dijkstra et al., 2008).

4.5.1.2 Sublinguální imunoterapie

Výzkumy dokazují, že DC mají také vliv na účinnost specifické alergické sublinguální imunoterapie. Tato imunoterapie spočívá v pravidelném vpravování dávky alergenu do organismu, který by si měl touto cestou na alergen postupně přivykat. Ačkoliv jsou po této terapii zaznamenány dobré výsledky poměrně často, není účinná u každého. Je velmi pravděpodobné, že právě DC jsou rozhodující pro určení toho, zda bude specifická terapie u daného alergika účinná či nikoliv (Zimmer et al., 2012).

4.6 DC v transplantologii

Transplantací se rozumí přenos jakékoliv buňky, tkáně či orgánu z donora na recipienta. Bylo prokázáno, že při takovém přenosu tkání a orgánů je největším problémem přítomnost histoinkompatibilních antigenů (Krejsek a Kopecký, 2004), které zodpovídají za přijetí či odmítnutí (reakci) cizího štěpu nebo transplantátu imunitním systémem recipienta, případně reakci štěpu proti hostiteli (GvHD – graft versus host disease) (Ferenčík et al., 2004; Kasiske et al., 2010). Protože dokonalá shoda typu tkáně není obvykle možná, je tak většina recipientů závislá na celoživotním podávání imunosupresivních léčiv, která se v první řadě zaměřují na T buňky jako prevenci rejekce transplantátu nebo GvHD (Kasiske et al., 2010).

4.6.1 Tolerogenní DC podporující imunitní toleranci

Protože aktivované DC mají schopnost podporovat destruktivní reakce T lymfocytů, zachování DC ve stavu odolném proti aktivaci je tedy absolutně nezbytným předpokladem pro terapii tolerogenními DC (tolDC). Je známo, že některá farmaka, jako je vitamin D₃, IL-10, TGF-β₁, dexamethason a kyselina acetylsalicylová, jsou schopna pozměnit reaktivitu DC pocházejících z kostní dřeně takovým způsobem, aby

mohly být zapojeny do procesu tolerance (Gregori et al., 2001; Hackstein et al., 2001; Roelen et al., 2003).

TolDC lze definovat jako zrání odolné buňky s nezralým nebo polozralým fenotypem, které na svém povrchu exprimují méně MHC II. třídy a kostimulačních molekul, jako jsou CD80, CD83 a CD86. Jsou typické stabilní zvýšenou expresí protizánětlivých membránových molekul a sníženou expresí prozánětlivých cytokinů, a to i v přítomnosti prozánětlivých signálů prostředí (Brinke et al., 2015).

Kromě generování tolDC *in vitro* pomocí biologických činidel mohou být DC upraveny také geneticky, a to vyřazením imunogenních či vložení tolerogenních vlastností. Stejně tak mohou být kultivovány *ex vivo* s populacemi tolDC pro následnou aplikaci do těla (McCurry et al., 2006).

4.6.1.1 Klinické studie využívající tolDC

Ezzelarab et al. zkoumali vliv tolDC získaných z donorových krevních monocytů rozmnožených ve vitaminu D3 a IL-10 na přežití alotransplantátu ledviny u modelových opic makak rhesus (*Macaca mulatta* Zimmermann, 1780). TolDC byly podávány intravenózně ($3,5-10 \times 10^6/\text{kg}$) spolu s B7-CD28 blokujícím kostimulačním činidlem CTLA4Ig týden před transplantací ledviny. CTLA4Ig byl podáván po dobu 8 týdnů a rapamycin byl podáván denně, počínaje druhým dnem před transplantací, a to po dobu 6 měsíců.

Medián přežití transplantátu byl 39,5 dní u kontrolních opic a 113,5 dní u opic léčených pomocí tolDC. Nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky spojené s infuzí tolDC a na základě hladin cirkulující donor specifické protilátky nebyl zjištěn žádný důkaz indukce senzibilizace hostitele. Imunologický monitoring také odhalil regulaci donor reaktivních paměťových CD95^+ T buněk a snížený poměr paměťových/regulačních T buněk u opic léčených tolDC oproti kontrolním. Ukončením histologie alotransplantátu byla u obou skupin prokázána mírná rejekce zprostředkovaná T buňkami a protilátkami (Ezzelarab et al., 2013).

Později byla provedena podobná studie, kde byly využity autologní tolDC pulzované s donorovým antigenem. Tentokrát byl však medián doby přežití transplantátu pouze 56 dní. Možným vysvětlením tohoto rozdílu mohou být různé dávky donorových antigenů využívající intaktních alogenních tolDC proti tolDC pulzovanými aloantigeny a také doba podávání buněčné infuze (Ezzelarab et al., 2017).

5 SEZNAM ZKRATEK

AD	Atopic Dermatitis
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Antigen Presenting Cells
CCL	chemokine C-C motif Ligand
CCR	chemokine C-C motif Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	Cluster of Differentiation 40 Ligand
CMV	Cytomegalovirus
DC	Dendritic cells
EB	Epstein-Barr virus
FDC	Follicular dendritic cells
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IDEC	Inflammatory Dendritic Epidermal Cells
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILR	Interleukin receptor
LC	Langerhans Cells
MCM	Minichromosome Maintenance Protein Complex
mDC	myeloid Dendritic cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mo-IDEC	Monocyte-derived Inflammatory Dendritic Epidermal Cells
MS	Multiple Sclerosis
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T cell
pDC	plasmacytoid Dendritic Cells
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor-Receptor

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout nedůležitější poznatky týkající se biologie dendritických buněk a jejich využití v terapii různých závažných onemocnění. Stěžejním objevem, který umožnil využití DC v terapii, byla jejich kultivace *in vitro* z monocytů.

Mimo jiné tak mohly být zahájeny studie zkoumající potenciál DC v protinádorové imunoterapii. Princip této terapie je založen na pulzování DC nádorovými antigeny a navození jejich maturace, kdy vpravení těchto DC zpět do organismu by pak mělo vyvolat imunitní reakci na příslušné nádorové buňky. Vzhledem k nadějným výsledkům v této oblasti by protinádorová imunoterapie s využitím DC mohla představovat cestu, jak poskytnou nové „velení“ imunitnímu systému, který ztratil obranný potenciál pod vlivem nádorových imunosupresivních reakcí. Mnoho laboratoří v dnešní době pracuje na přípravě nejvhodnější a nejúčinnější vakcíny DC. V centru zájmu je zjistit, v jaké formě jsou nádorové buňky nejvhodnější pro zpracování a prezentaci antigenu dendritickými buňkami, a jakým způsobem by měly být nádorové tkáně zpracovány.

Díky své schopnosti polarizovat imunitní odpověď jsou DC klíčové v patogenezi autoimunitních chorob, kdy byla prokázána typická polarizace směrem k Th1. DC mohou být ovlivněny imunomodulační léčbou, kdy příkladem je léčba glatirameracetátem či vitamínem D, jejímž následkem je obnovení narušené maturace DC a jejich regulační funkce při autoimunitních onemocněních.

Dendritické buňky ovlivňují také vznik alergie i reakci na její léčbu. Je velmi pravděpodobné, že právě DC jsou rozhodující pro určení toho, zda bude specifická terapie u daného alergika účinná či nikoliv.

Největší pozornost při udržování tolerance vůči transplantátu je zaměřena na léčbu dendritickými buňkami, které jsou přivedeny do stavu nezralosti. Terapie pomocí tolDC vedla k prodloužení přežití transplantátu, regulaci donor reaktivních paměťových CD95⁺ T buněk a snížený poměr paměťových/regulačních T buněk.

DC tedy představují jakéhosi prostředníka mezi mechanismy specifické a nespecifické imunity, bez kterého by nemohlo dojít k rozvoji účinné imunitní odpovědi. Standardizace výrobního protokolu a využití pomocných přístupů jsou rozhodující pro doladění budoucích léčebných strategií.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Akdis C.A.**, Akdis M., Bieber T., Bindslev-Jensen C., Boguniewicz M., Eigenmann P., ... a Luger (2006). Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy*, 61(8), 969-987.
- Austyn J. M.** (2000). Antigen-presenting cells: experimental and clinical studies of dendritic cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 162(supplement_3), S146-S150.
- Banchereau J.**, Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., ... a Palucka K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.
- Bartosik-Psujek H.**, Tabarkiewicz J., Pocinska K., Stelmasiak Z., a Rolinski J. (2010). Immunomodulatory effects of vitamin D on monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*.
- Bartůňková J.** (2002). *Imunodeficiency*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0244-4.
- Bartůňková J.**, a Paulík M. (2011). *Vyšetřovací metody v imunologii* (Vol. 2). Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3533-7.
- Bartůňková J.**, a Spíšek R. (2003). Dendritická buňka a její role v protinádorové terapii. *Vesmír*, 82(254), 254-255.
- Bartůňková J.**, Špíšek R., Podrazil M., a Kuklík R. (2014). Imunoterapie karcinomu prostaty. *Onkologie*, 8(1), 6-8.
- Bartůňková J.** (2010). Imunitní reakce na nádory a protinádorová vakcinace. *SANQUIS*, (82), 68-71.
- Bossche J.**, a Van Ginderachter J.A. (2013). E-cadherin: From epithelial glue to immunological regulator. *European journal of immunology*, 43(1), 34-37.
- Buc M.** (2001). *Imunológia*. Bratislava: Veda. ISBN 80-224-0667-8.
- Buc M.** (2012). *Základní a klinická imunologie*. Bratislava: Veda. ISBN 978-80-224-1235-3.
- Caux C.**, Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Durand I., Cella M., ... a Banchereau J. (1997). CD34 hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*, 90(4), 1458-1470.

Coelho A.V., de Moura R.R., Kamada A.J., da Silva R.C., Guimarães R.L., Brandão L.A., ... a Crovella, S. (2016). Dendritic cell-based immunotherapies to fight HIV: how far from a success story? A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1985.

Cooper G.S., Bynum M.L., a Somers E.C. (2009). Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity*, 33(3), 197-207.

David S.A., Smith M.S., Lopez G.J., Adany I., Mukherjee S., Buch S., ... a Narayan O. (2001). Selective transmission of R5-tropic HIV type 1 from dendritic cells to resting CD4+ T cells. *AIDS research and human retroviruses*, 17(1), 59-68.

Dijkstra D., Stark H., Chazot P.L., Shenton F.C., Leurs R., Werfel T., a Gutzmer R. (2008). Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H₄ receptor. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1696-1703.

Donahue D.A., a Schwartz O. (2016). Actin'on HIV: How Dendritic Cells Spread Infection. *Cell host & microbe*, 19(3), 267-269.

Ezzelarab M.B., Raich-Regue D., Lu L., Zahorchak, A.F., Perez-Gutierrez A., Humar A., ... a Morelli A.E. (2017). Renal Allograft Survival in Nonhuman Primates Infused With Donor Antigen-Pulsed Autologous Regulatory Dendritic Cells. *American Journal of Transplantation*, 17(2), 1-14.

Ezzelarab M.B., Zahorchak A.F., Lu L., Morelli A.E., Chalasani G., Demetris A.J., ... a Shapiro R. (2013). Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *American Journal of Transplantation*, 13(8), 1989-2005.

Facchetti F., Cigognetti M., Fisogni S., Rossi G., Lonardi S., a Vermi W. (2016). Neoplasms derived from plasmacytoid dendritic cells. *Modern Pathology*, 29, 98-111.

Ferenčík M., Matřha V., a Rovenský J. (2004). *Ilustrovaný imunologický slovník*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-243-9.

Fučíková T. (2002). *Imunologie: Vnitřní lékařství*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-138-6.

Gallegos A.M., a Bevan M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*, 200(8), 1039-1049.

- Geissmann F.**, Prost C., Monnet J.P., Dy M., Brousse N., a Hermine O. (1998). Transforming growth factor β 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, 187(6), 961-966.
- Gregori S.**, Casorati M., Amuchastegui S., Smiroldo S., Davalli A.M., a Adorini L. (2001). Regulatory T cells induced by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1945-1953.
- Gutstein N. L.**, a Wofsy D. (1986). Administration of F (ab') 2 fragments of monoclonal antibody to L3T4 inhibits humoral immunity in mice without depleting L3T4+ cells. *The Journal of Immunology*, 137(11), 3414-3419.
- Hackstein H.**, Morelli A.E., Larregina A.T., Ganster R.W., Papworth G.D., Logar A.J., ... a Thomson A.W. (2001). Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7053-7062.
- Hořejší V.**, a Bartůňková J. (2009). *Základy imunologie* (Vol. 4). Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Howell M.D.** (2007). The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 7(5), 413-417.
- Inaba K.**, Turley S., Iyoda T., Yamaide, F., Shimoyama S., e Sousa C.R., ... a Steinman R.M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *Journal of Experimental Medicine*, 191(6), 927-936.
- Jonuleit H.**, Kühn U., Müller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., ... a Enk A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology*, 27(12), 3135-3142.
- Kantoff P.W.**, Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., ... a Xu Y. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(5), 411-422.
- Kasiske B.L.**, Zeier M.G., Chapman J. R., Craig J.C., Ekberg H., Garvey C.A., ... a Kreis H.A. (2010). KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney international*, 77(4), 299-311.

- Klener P.** (1999). *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-007-X.
- Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., Zerafa N., Rodig S.J., Old L.J., ... a Schreiber R.D.** (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903-907.
- Krejsek J., a Kopecký O.** (2004). *Klinická imunologie*. Hradec Králové: NUCLEUS HK. ISBN 80-86225-50-X.
- Langerhans P.** (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv*, 44(2), 325-337.
- Lassmann H., Raine C.S., Antel J., a Prineas J.W.** (1998). Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *Journal of neuroimmunology*, 86(2), 213-217.
- Lechler R., Chai J.G., Marelli-Berg F., a Lombard G.** (2001). Appropriate targets for monoclonal antibodies in the induction of transplantation tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356(1409), 659-663.
- Leung D.Y.** (2000). Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5), 860-876.
- Lipscomb M.F., a Masten B.J.** (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological reviews*, 82(1), 97-130.
- McCurry K.R., Colvin B.L., Zahorchak A.F., a Thomson A.W.** (2006). Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation. *Transplant international*, 19(7), 525-538.
- Mellman I., Coukos G., a Dranoff G.** (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480-489.
- Mooij P., Simons P.J., de Haan-Meulman M., De Wit H.J., a Drexhage H.A.** (1994). Effect of thyroid hormones and other iodinated compounds on the transition of monocytes into veiled/dendritic cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumour-necrosis factor- α and interleukin-6. *Journal of endocrinology*, 140(3), 503-512.
- Nestle F.O., Zheng X.G., Thompson C.B., Turka L.A., a Nickoloff B.J.** (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *The Journal of Immunology*, 151(11), 6535-6545.

- Novak N.**, Kraft S., Haberstock J., Geiger E., Allam P., a Bieber T. (2002). A reducing microenvironment leads to the generation of FcεRI high inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). *Journal of investigative dermatology*, 119(4), 842-849.
- Onji M.** (2004) *Dendritic Cells in Clinics*. Tokyo: Springer. ISBN 978-4-431-67013-1.
- Papaioannou N.E.**, Beniata O.V., Vitsos P., Tsitsilonis O., a Samara P. (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of Translational Medicine*, 4(14), 1-15.
- Podrazil M.**, Horvath R., Becht E., et al. (2015). Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 6(20), 18192-18205.
- Pospíšilová D.**, Zavacká A., Hrušák O., Šedivá A., Spíšek R., a Bartůňková J. (2000). Dendritické buňky a jejich využití v terapii nádorových chorob. *Časopis Lékařů Českých*, 1(139), 519-523.
- Quach H.**, Ritchie D., Stewart A.K., Neeson P., Harrison S., Smyth M.J., a Prince H.M. (2010). Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*, 24(1), 22-32.
- Reid S.D.**, Penna G., a Adorini L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current opinion in immunology*, 12(1), 114-121.
- Roelen D.L.**, Schuurhuis D.H., van den Boogaardt D.E., Koekkoek K., van Miert P.P., van Schip J.J., ... a Ossendorp F. (2003). Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation*, 76(11), 1608-1615.
- Rožková D.**, Tišerová H., Fučíková J., Lašovička J., Podrazil M., Ulčová H., ... a Šedivá A. (2009). FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clinical immunology*, 131(1), 1-10.
- Simon D.**, Vassina E., Yousefi S., Kozlowski E., Braathen L.R., a Simon H.U. (2004). Reduced dermal infiltration of cytokine-expressing inflammatory cells in atopic dermatitis after short-term topical tacrolimus treatment. *Journal of allergy and clinical immunology*, 114(4), 887-895.
- Ständer S.**, a Steinhoff M. (2002). Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Experimental dermatology*, 11(1), 12-24.
- Steinman R.M.**, a Cohn Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142-1162.

- Stites D.P.**, a Terr A.I. (1994). *Základní a klinická imunologie* (Vol. 7). Praha: Victoria Publishing. ISBN 80-85605-37-6.
- Ten Brinke A.**, Hilkens C.M., Cools N., Geissler E.K., Hutchinson J.A., Lombardi G., ... a Martinez-Caceres E.M. (2015). Clinical use of tolerogenic dendritic cells-harmonization approach in European collaborative effort. *Mediators of inflammation*, 1-8.
- Toman M.** (2000). *Veterinární imunologie*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9727-3.
- Turnis M.E.**, a Rooney C.M. (2010). Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer. *Immunotherapy*, 2(6), 847-862.
- Vacchelli E.**, Vitale I., Tartour E., Eggermont A., Sautès-Fridman C., Galon J., ... a Galluzzi L. (2013). Trial watch: anticancer radioimmunotherapy. *Oncoimmunology*, 2(9), 1-13.
- Von Glehn F.**, Santos L.M., a Balashov K.E. (2012). Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple sclerosis. *Immunotherapy*, 4(10), 1053-1061.
- Zimmer A.**, Bouley J., Le Mignon M., Pliquet E., Horiot S., Turfkruyer M., ... a Moussu H. (2012). A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 1020-1030.