zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 104
proLékaře.cz | 5.12.2026

Využití katalytické podjednotky telomerázy jako nádorového antigenu u mnohočetného myelomu

Očadlíková D.[1], Kovářová L.[1], Hájek R.[1,2], Michálek J.[1,3]
[1]Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie při oddělení klinické hematologie,
[2]Interní hematoonkologická klinika, [3]I. dětská interní klinika, Fakultní nemocnice Brno

Souhrn
***Východiska*: Mnohočetný myelom je nevyléčitelné onemocnění. Jako standardní terapie je využívána vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací kmenových buněk či alogenní transplantací. Relaps onemocnění je však neodvratný, a proto jsou rozvíjeny i jiné směry léčby. Jedním z nich je buněčná imunoterapie, která využívá potenciálu cytotoxických T-lymfocytů. Jako nádorový antigen lze využít nádorově specifické proteiny. Jedním z nich je i katalytická podjednotka telomerázy hTERT a od ní odvozený nonapeptid vázající se na HLA-A2 systém molekul. *Typ studie a soubor:* Ve studii in vitro byla na souboru zdravých HLA-A2 pozitivních dárců testována možnost aktivace a identifikace myelom-specifických T-lymfocytů s využitím hTERT jako nádorového antigenu. *Metody a výsledky:* Z mononukleárních buněk periferní krve byly kultivovány T-lymfocyty a dendritické buňky. Dendritické buňky byly pulzovány nonapeptidem hTERT. Po opakované stimulaci T-lymfocytů takto pulzovanými dendritickými buňkami došlo k jejich aktivaci charakterizované produkcí interferonu gama. *Závěry*: Tato práce ukazuje možnost specifické aktivace a identifikace protinádorových T-lymfocytů, které lze využít při léčbě mnohočetného myelomu.**
Klíčová slova: mnohočetný myelom, imunoterapie, interferon gama, katalytická podjednotka telomerázy

Summary
Očadlíková D., Kovářová L., Hájek R., Michálek J.: Catalytic subunit of telomerase as a tumor antigen in multiple myeloma immunotherapy

***Backgrounds:* Multiple myeloma is an incurable hematological disease. High-dose chemotherapy including autologous stem cell transplantation is recently considered a standard therapy for myeloma. Unfortunately, a relapse of the disease is inevitable. Therefore, new approaches such as immunotherapy have been considered recently. A specific activation of cytotoxic T cells can be reached using dendritic cells loaded with tumor-specific antigen. Catalytic subunit of telomerase hTERT and an HLA-A2-specific nonapeptide derived from hTERT can be used. *Design and subjects:* Activation and identification of myeloma-specific T cells from healthy HLA-A2 blood donors has been tested in an in vitro study using hTERT-derived nonapeptide as a tumor-specific antigen. *Methods and results:* T cells and dendritic cells were obtained from peripheral blood. T cells were repeatedly stimulated with hTERT nonapeptide-loaded dendritic cells. Activated myeloma-specific T cells produced interferon gamma and were evaluated by flow cytometry. *Conclusion:* This study demonstrates feasibility of an in vitro identification of tumor-specific T cells that can be used in myeloma therapy.**
Key words: Multiple myeloma, immunotherapy, interferon gamma, catalytic subunit of telomerase

Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 3, p. 104–109.

1. Úvod

1.1 Význam buněčné imunoterapie v léčbě mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění charakterizované neoplastickou klonální proliferací plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřeni (1). Incidence MM činí přibližně 4 nemocní na 100 000 obyvatel s mediánem věku v době diagnózy nad 60 let (2, 3). Medián přežití ve skupině pacientů s cytogenetickými abnormalitami (asi 1/3 nově diagnostikovaných) nepřesahuje 2–3 roky. Naproti tomu medián přežití do relapsu ve skupině pacientů bez cytogenetických abnormalit je u 80–90 % z nich 4 roky, je-li do léčebného postupu zařazena autologní transplantace (4).

Autologní transplantace kmenových buněk po předchozí přípravě vysokodávkovaným melfalanem je v současné době považována za standardní terapii pro pacienty do 60–65 let. Další možnost představuje využití potenciálu alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk označovaných jako reakce štěpu proti myelomu (graft-versus-myeloma; GVM). Tento přístup však současně představuje vysoké riziko reakce štěpu proti hostiteli s vysokou morbiditou a mortalitou po transplantaci (4). V organismu však zůstává zbytkové nádorové onemocnění (minimal residual disease; MRD) a relaps je zpravidla neodvratný. MM je považován za onemocnění nevyléčitelné (1), a proto jsou hledány nové cesty, jak zlepšit jeho prognózu.

Jednu z nich představuje protinádorová imunoterapie, která zaznamenala značný úspěch u melanomu a renálního karcinomu (5, 6). V posledním desetiletí byly rovněž podány experimentální důkazy o možnostech navození imunitní reaktivity i vůči méně imunogenním nádorům

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 105
proLékaře.cz | 5.12.2026

včetně MM (7, 8). Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny, zpravidla prostřednictvím dendritických buněk (DC). DC jsou pulzované specifickým nádorovým antigenem, který prezentují T-lymfocytům. Sehrávají tak klíčovou úlohu v indukci specifických protinádorových T-lymfocytů schopných cytotoxicky zabíjet nádorové buňky (9). U MM byly využity DC ve spojení s myelom-specifickým antigenem, tzv. Id-proteinem nebo lyzátem z nádorových buněk (10, 11). V současné době jsou testovány různé druhy potenciálních nádorových antigenů: apoptotická tělíska připravená ozářením nádorových buněk, nádorově specifické proteiny či peptidy, nádorová mRNA a DNA (12–14).

1.2 Peptidy jako nádorové antigeny

Většina popsaných tumor-asociovaných antigenů (TAA) je exprimována u jednoho či několika málo typů nádorů. Existují však tzv. univerzální TAA, které jsou exprimovány mnoha nádory. Jedním z nich je i katalytická podjednotka telomerázy (hTERT). Dosud byly popsány peptidy odvozené od hTERT a dalších peptidů pro nejběžnější alely HLA systému I. třídy (15–18). Je prokázáno, že antigenní peptidy včetně hTERT jsou schopny indukovat specifickou odpověď $CD8^+$ cytotoxických T-lymfocytů (CTL) (16, 17, 19). Některé TAA, jako např. hTERT, MUC-1 a další, jsou také exprimovány u MM a jsou schopny navodit efektivní CTL odpověď (19, 20).

1.3 hTERT jako nádorový antigen

hTERT je katalytická podjednotka enzymu telomerázy, jejímž úkolem je syntéza koncových úseků eukaryotických chromozomů-telomer (17, 21). V naprosté většině normálních diferencovaných lidských buněk je telomerázová aktivita potlačena, a v důsledku toho je jejich replikační kapacita omezena. Naproti tomu nádorové buňky vykazují telomerázovou aktivitu, což je činí v podstatě nesmrtelnými. Existuje velmi úzká korelace mezi aktivitou telomerázy a maligním potenciálem nádorových buněk (22).

Bylo prokázáno, že hTERT je schopna indukovat odpověď CTL u mnoha nádorových onemocnění jak in vitro (18, 23), tak in vivo (17, 24). Peptidy odvozené od hTERT nesou motivy pro nejběžnější alely HLA systému I. třídy (HLA-A2), což je jeden z důležitých předpokladů pro úspěšnou aktivaci T buněk a imunoterapeutické protokoly nové generace (15, 17, 19). U zdravých jedinců nebyla pozorována imunitní reakce proti hTERT. Přesto bylo prokázáno, že hTERT-specifické T buňky mohou být identifikovány ex vivo jak u zdravých jedinců, tak i u nemocných s nádory (25). Nedávno byly zahájeny klinické aplikace protinádorových vakcín využívajících hTERT jako nádorového antigenu (26).

V naší práci jsme využili nonapeptid hTERT I_{560} jako nádorový antigen a naložili do DC. Takto pulzovanými DC byly opakovaně stimulovány T-lymfocyty, které se aktivovaly a produkovaly měřitelné množství IFN-γ.

2. Materiál a metodika

2.1 Buněčné kultury

Mononukleární buňky (MN) byly izolovány z nesrážlivé periferní krve (PK) zdravých dárců z transfuzního oddělení ve FN Brno po podepsání informovaného souhlasu metodou gradientové centrifugace (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a kultivovány v médiu obsahujícím X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s 80U/ml DNAsy (Boehringer, Mannheim, Německo) a 1mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v 6jamkových miskách při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2 a 4,5 % O_2. Iniciální buněčnost byla $3{,}3x10^6$ buněk/ml tohoto média.

Po 2hodinové kultivaci byla suspenze rozdělena na adherentní a neadherentní frakci. Byl odebrán supernatant s neadherentní frakcí bohatou na T-lymfocyty a tyto buňky byly kultivovány v kompletním médiu (KM) obsahujícím X-VIVO 15, 50 mg/l gentamycin, 2 mM L-glutamin, 25 mM hepes pufr (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), 10% lidské AB-sérum (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a 10 IU/ml interleukinu 2 (IL-2) (Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko) po dobu 7 dnů při 37 °C v atmosféře 5% CO_2.

Adherentní frakce bohatá na prekurzory DC byla dále kultivována v médiu pro DC: X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) se 100 ng/ml interleukinu 4 (IL-4) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 800 U/ml granulocyty a makrofágy stimulujícím faktorem (GM-CSF) (Schering Plough, New Yersey, USA) a 40 ng/ml tumor-nekrotizujícím faktorem alfa (TNF-α) (Bender Medsystems Diagnostics, Vídeň, Rakousko) po dobu 6 dnů při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2 a 4,5 % O_2. Médium pro DC včetně IL-4, GM-CSF a TNF-α bylo měněno každé 2 dny (27, 28).

2.2 Příprava antigenu

Jako antigen byl využit nonapeptid I_{540} odvozený od hTERT s aminokyselinovou sekvencí ILAKFLHWL (Clinalfa, Läufelfingen, Švýcarsko) a specificitou vůči HLA-A2 třídě. Pracovní roztok byl připraven rozpuštěním 274,4 μg nonapeptidu hTERT v 1 ml sterilní vody pro tkáňové kultury. hTERT byla k DC přidávána ve formě takto připraveného pracovního roztoku. Jako negativní kontrola byl využit nonapeptid ^{476}ILKEPVHGV^{484} odvozený od HIV-1 reverzní transkriptázy (HIV-1) (Clinalfa, Läufelfingen, Švýcarsko) vázající se rovněž na alelu HLA-A2 (29). Pracovní roztok byl připraven rozpuštěním 249,0 μg nonapeptidu HIV-1 v 1 ml sterilní vody pro tkáňové kultury a v této formě byl přidáván k DC.

2.3 Pulzování DC nádorovým antigenem

7. den kultivace byly DC pulzovány antigenem. Byl přidáván antigen hTERT či referenční peptid HIV-1 ve formě pracovního roztoku (viz 2.2) (30) v množství 20 μg peptidu/200 000 DC (29). DC byly inkubovány s antigenem 24 hodin (29, 30).

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 106
proLékaře.cz | 5.11.2026

2.4 Stimulace a restimulace T-lymfocytů

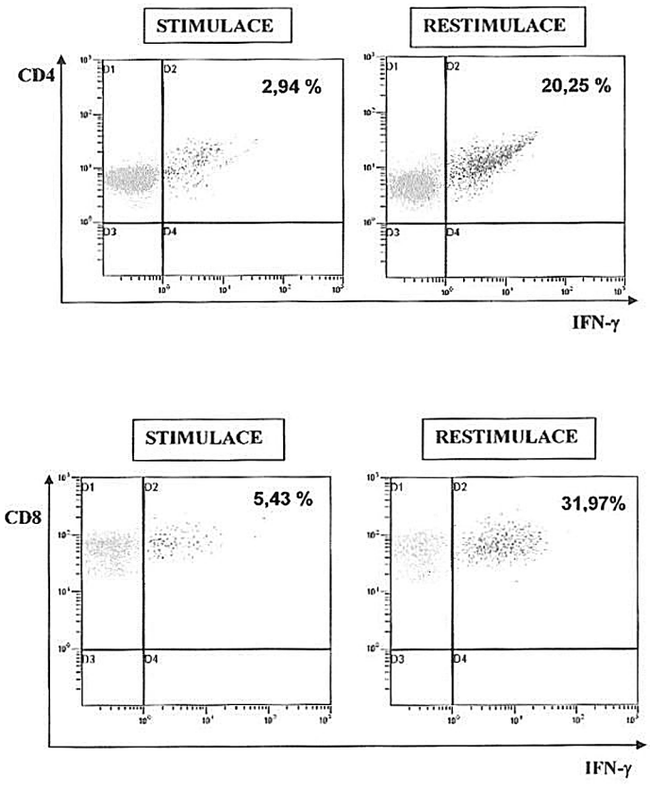
8. den kultivace byly pulzované či samotné DC smíchány s T-lymfocyty v poměru 1:20. Část DC byla zamražena a uchovávána při -80 °C pro pozdější restimulaci. DC byly 2 hod před restimulací kultivovány v KM. Restimulace byla prováděna pulzovanými či samotnými DC v restimulačním poměru 1:2 (28).

2.5 Značení pomocí interferonu gama

Antigenem aktivované T-lymfocyty produkující interferon gama (IFN-γ) byly zhodnoceny pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagens, Miltenyi Biotec, Bergisch GlaDCach, Německo) podle pokynů výrobce (28, 31). Stejným způsobem byly zpracovány i T-lymfocyty stimulované samotnými DC či pomocí HIV-1.

2.6 Průtoková cytometrie

T-lymfocyty ($1x10^6$) po restimulaci pulzovanými DC byly inkubovány 15 minut s monoklonálními protilátkami anti-CD4 značenými fluoroisothiokyanátem (FITC), anti-CD8 FITC, anti-CD3 phycoerythrin-cyaninem (PE-Cy) (Immunotech, Marseille, Francie) a s anti-IFN-γ phycoerythrinem (PE) (Miltenyi Biotec, Bergisch GlaDCach, Německo). T-lymfocyty byly analyzovány na průtokovém cytometru CytomicsTM FC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). Jako negativní kontrola byly využity nestimulované T-lymfocyty a T-lymfocyty stimulované samotnými DC.



Obr. 1. Identifikace myelom-specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru (příklad jednoho z experimentů).
Vysvětlivky: měření aktivovaných T-lymfocytů pomocí produkce IFN-γ u CD4+ a CD8+ T lymfocytů 48 hodin po stimulaci a 24 hodin po restimulaci. Tučně jsou znázorněny procentuální hodnoty aktivovaných T-lymfocytů. Data byla měřena na průtokovém cytometru pro experiment č. 1.

2.7 Statistické hodnocení

Ke statistickému zpracování výsledků byly využity mediány a mediány diference po odečtení pozadí v negativní kontrole s jejich minimy a maximy. Ke zjištění statistické významnosti aktivace T-lymfocytů byl využit Mediánový test a Mann-Whitneyův U-test (tab. 1–3).

Tab. 1 . Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů po stimulaci.

T-lymfocyty (TL)	$CD4^+$TL (%) **Medián diference (minimum -maximum)**	p	$CD8^+$TL (%) **Medián diference (minimum -maximum)**	p
IFN-γ^+ $CD3^+$ stimulace hTERT (n = 9)	1,60 (0,50-3,18)		2,36 (0,35-5,85)	
IFN-γ^+ $CD3^+$ stimulace HIV (n = 4)	0,71 (-0,30-1,11)	**0,076** (MT)	0,80 (-0,10-0,90)	**0,031** (MT)
IFN-γ^+ $CD3^+$ stimulace DB samotné (n = 7)	1,33 (-0,38-2,16)		0,83 (0,70-3,80)	

Vysvětlivky: procentuální zastoupení (mediány diferencí) stimulovaných a nestimulovaných IFN-γ^+ $CD3^+$ $CD4^+$ a IFN-γ^+ $CD3^+$ $CD8^+$ hTERT- a HIV-1-specifických T-lymfocytů a T-lymfocytů aktivovaných samotnými DB s jejich minimy a maximy v závorkách. Měřeno na průtokovém cytometru 48 hod po stimulaci, T-lymfocyty byly stimulovány DB naloženými hTERT, HIV-1 a samotnými DB. Data byla vyhodnocena pomocí Mediánového testu (MT), kde n je počet experimentů a p statistická významnost.

Tab. 2. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů po restimulaci.

T-lymfocyty (TL)	$CD4^+$TL (%) **Medián diference (minimum -maximum)**	p	$CD8^+$TL (%) **Medián diference (minimum -maximum)**	p
IFN-γ^+ $CD3^+$ restimulace hTERT (n = 9)	9,88 (1,2-15,55)		10,35 (1,36-27,17)	
IFN-γ^+ $CD3^+$ restimulace HIV (n = 4)	1,30 (0,30-4,36)	**0,005** (MT)	2,00 (0,04-3,43)	**0,005** (MT)
IFN-γ^+ $CD3^+$ restimulace DB samotné (n = 7)	0,76 (-0,30-0,81)		0,96 (-0,20-1,40)	

Vysvětlivky: procentuální zastoupení (mediány diferencí) restimulovaných a nestimulovaných IFN-γ^+ $CD3^+$ $CD4^+$ a IFN-γ^+ $CD3^+$ $CD8^+$ hTERT- a HIV-1-specifických T-lymfocytů a T-lymfocytů aktivovaných samotnými DB s jejich minimy a maximy v závorkách. Měřeno na průtokovém cytometru 24 hodin po restimulaci, T-lymfocyty byly stimulovány DB naloženými hTERT, HIV-1 a samotnými DB. Data byla vyhodnocena pomocí Mediánového testu (MT), kde n je počet experimentů a p statistická významnost.

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 107
proLékaře.cz | 5.11.2026

Tab. 3. Porovnání aktivace hTERT specifických T-lymfocytů s kontrolami.

T-lymfocyty	p_1 [hTERT vs. HIV-1]	p_2 [hTERT vs. DB]	p_3 [DB vs. HIV-1]
CD4 (stimulované)	**0,021**	0,711	0,089
CD8 (stimulované)	**0,031**	0,186	0,131
CD4 (restimulované)	**0,005**	**0,007**	0,131
CD8 (restimulované)	**0,009**	**0,005**	**0,038**

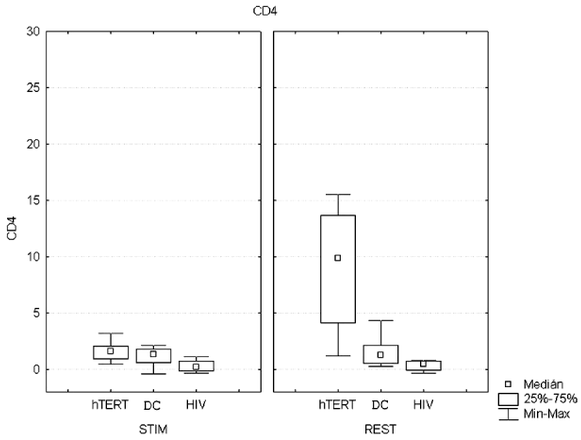
Vysvětlivky: pro každou porovnávanou dvojici je uvedena statistická významnost (p_1 - p_3) získaná porovnáním procentuálního zastoupení mediánů diferencí (re)stimulovaných IFN-γ$^+$ CD3$^+$ CD4$^+$ a IFN-γ$^+$ CD3$^+$ CD8$^+$ T-lymfocytů příslušné dvojice: DB naloženými hTERT = hTERT, DB naloženými HIV-1 = HIV-1 a DB samotnými. Data byla vyhodnocena pomocí Mann-Whitneyova testu.

3. Výsledky

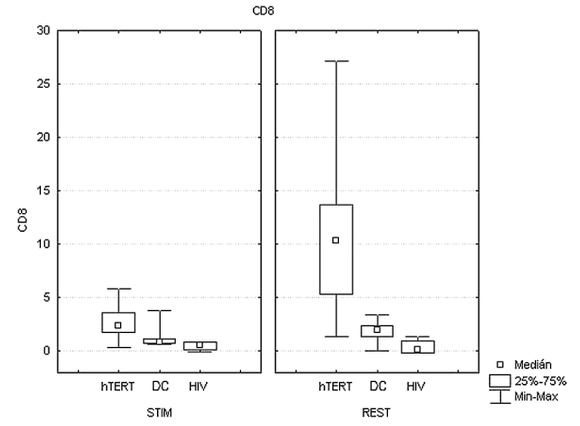
Na základě dříve publikovaných optimalizačních experimentů (28) byla provedena stimulace a restimulace T-lymfocytů DC pulzovanými nonapeptidem hTERT. 48 hodin po stimulaci a 24 hodin po restimulaci byla provedena identifikace protinádorových myelom-specifických T-lymfocytů (28) na průtokovém cytometru (obr. 1).

Procento aktivovaných T-lymfocytů na základě produkce IFN-γ bylo hodnoceno pro CD4$^+$ a CD8$^+$ T-lymfocyty po stimulaci a restimulaci. V tabulce 1, resp. v tabulce 2 jsou uvedeny mediány diference CD4$^+$ a CD8$^+$ T-lymfocytů, získaných rozdílem procentuálních hodnot IFN-γ$^+$ stimulovaných, resp. restimulovaných a nestimulovaných T-lymfocytů, s jejich minimy a maximy. Mediány diference s minimy a maximy pro CD4$^+$ a CD8$^+$ (re)stimulované T-lymfocyty jsou znázorněny graficky (graf 1 a graf 2). T-lymfocyty byly stimulovány DC pulzovanými hTERT nonapeptidem, HIV-1 nonapeptidem a samotnými DC. Tyto 3 soubory různě (re)stimulovaných T-lymfocytů byly vzájemně statisticky porovnány Mediánovým testem. Statistická významnost aktivace CD4$^+$ T-lymfocytů po stimulaci je p = 0,076 resp. 0,070 a CD8$^+$ T-lymfocytů 0,031 resp. 0,055 s využitím Mediánového testu (tab. 1). Pro restimulované CD4$^+$ T-lymfocyty je p = 0,005 resp. 0,002 a pro CD8$^+$ T-lymfocyty 0,005 resp. 0,002 (tab. 2). Nejvyšší produkce IFN-γ byla zaznamenána u T-lymfocytů aktivovaných DC pulzovanými hTERT nonapeptidem po restimulaci, pro CD4$^+$ resp. CD8$^+$ T-lymfocyty je 9,88 % (1,2-15,55 %) resp. 10,35 % (1,36–27,17 %), medián diference (minimum-maximum).

Pro důkaz specifické aktivace T-lymfocytů (re)stimulovaných DC pulzovanými hTERT nonapeptidem bylo provedeno statistické srovnání s negativní kontrolou, tedy s T-lymfocyty (re)stimulovanými DC pulzovanými HIV-1 nonapeptidem a samotnými DC. Srovnány byly i kontroly vzájemně. Výsledky byly zpracovány pomocí Mann-Whitneyova U testu (tab. 3).



Graf 1. Produkce IFN-γ CD4$^+$T-lymfocyty po aktivaci nádorovým antigenem hTERT vůči negativní kontrole.
Vysvětlivky: procentuální zastoupení stimulovaných (STIM) a restimulovaných (REST) CD4$^+$IFN-γ$^+$T-lymfocytů s jejich mediány, 25. a 75. percentily, minimy a maximy (Min; Max). V prvním případě byly ke stimulaci využity DC pulzované hTERT jako nádorovým antigenem, ve druhém případě samotné DC a nakonec DC naložené HIV-1 jako nestimulujícím peptidem.



Graf 2. Produkce IFN-γ CD8$^+$T-lymfocyty po aktivaci nádorovým antigenem hTERT vůči negativní kontrole.
Vysvětlivky: procentuální zastoupení stimulovaných (STIM) a restimulovaných (REST) CD8$^+$IFN-γ$^+$T-lymfocytů s jejich mediány, 25. a 75. percentily, minimy a maximy (Min; Max). V prvním případě byly ke stimulaci využity DC pulzované hTERT jako nádorovým antigenem, ve druhém případě samotné DC a nakonec DC naložené HIV-1 jako nestimulujícím peptidem.

Srovnání T-lymfocytů aktivovaných DC pulzovanými hTERT s T-lymfocyty aktivovanými DC pulzovanými HIV-1 nestimulujícím nonapeptidem ukázalo, že specifická aktivace pomocí hTERT je významně vyšší pro CD4$^+$ i CD8$^+$ T-lymfocyty jak po stimulaci, tak po restimulaci (p = 0,021, 0,031, 0,005 a 0,009 v pořadí CD4$^+$ a CD8$^+$ stimulované, CD4$^+$ a CD8$^+$ restimulované T-lymfocyty). Při srovnání T-lymfocytů aktivovaných hTERT a samotnými DC je specifická aktivace významně vyšší pouze po restimulaci a nevýznamná po stimulaci (p = 0,711, 0,186, 0,007 a 0,005 v pořadí uvedeném výše). Vedlejším zjištěním bylo, že aktivace samotnými DC vede k vyšší odpovědi restimulovaných CD8$^+$ T-lymfocytů než po aktivaci HIV-1.

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 108
proLékaře.cz | 5.11.2026

4. Diskuse

Antigen hTERT je specifický pro HLA-A2 alelu a tedy aktivaci $CD8^+$ T-lymfocytů (17). Výsledky ukázaly, že při stimulaci T-lymfocytů DC pulzovanými hTERT dochází k jejich významné aktivaci oproti nestimulovaným T-lymfocytům nebo T-lymfocytům stimulovaným samotnými DC či DC pulzovanými HLA-A2 specifickým nestimulujícím referenčním peptidem HIV-1.

Nejsilnější odpověď T-lymfocytů aktivovaných DC pulzovanými hTERT byla zaznamenána u $CD8^+$ T-lymfocytů po restimulaci: 10,35 % (1,36–27,17 %), medián diference (minimum-maximum), což je dáno specificitou peptidu pro HLA-A2 alelu (tab. 2, graf 2). Rovněž došlo k aktivaci $CD4^+$ T-lymfocytů: 9,88 % (1,2–15,55 %) po restimulaci, což ukazuje na možnost zkřížené prezentace antigenu DC $CD4^+$ T-lymfocytům (tab. 1, graf 1). Při srovnání aktivace nonapeptidem hTERT s aktivací nestimulujícím nonapeptidem HIV-1 byly nalezeny statisticky významné rozdíly při stimulaci i restimulaci $CD4^+$ i $CD8^+$ T-lymfocytů, což dokazuje navození specifické odpovědi nonapeptidem hTERT. Srovnání s aktivací samotnými DC ukázalo statistickou významnost pouze po restimulaci, což lze přičítat fyziologické schopnosti DC. Při srovnání stimulace HIV-1 nonapeptidem a samotnými DC nebyly prokázány statisticky významné rozdíly s výjimkou $CD8^+$ T-lymfocytů po restimulaci (tab. 3) potvrzující schopnost DC navodit aktivaci T-lymfocytů po opakované stimulaci.

Naměřené výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi (31, 32), které rovněž ukázaly možnost identifikace protinádorových T-lymfocytů při využití proteinů jako tumor asociovaných antigenů. Jako TAA byly využity heat shock protein gp96 a MUC-1. DC získané ze zdravých HLA-A2 pozitivních dárců byly pulzovány proteinem. Pulzovanými DC byly stimulovány autologní T-lymfocyty, které produkují IFN-γ. Buněčná produkce IFN-γ byla stanovena metodou ELISPOT (32). Nonapeptid odvozený z MUC-1 proteinu byl rovněž využit jako TAA u MM. Byl testován in vitro na HLA-A2 pozitivních pacientech s MM. DC pulzované tímto nádorovým antigenem dokáží úspěšně aktivovat myelom-MUC-1-specifické CTL a mohou být využity v protinádorové imunoterapii MM (31). Úspěšná adoptivní T-buněčná imunoterapie byla demonstrována u některých nádorových onemocnění, zejména u melanomu. V tomto sdělení ukazujeme, že i u MM, který je považován za málo imunogenní, lze identifikovat populaci potenciálně myelom-specifických T-lymfocytů.

Literatura

1. **Adam Z., Hájek R, Ščudla V, a kol.** Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova Univerzita Brno 1999; 1–260.
2. **Adam Z, Vorlíček J, Králová E, a kol.** Terapie mnohočetného myelomu (Therapy of multiple myeloma). Masaryk University Brno, 1993: 1–220.
3. **Kyle RA.** Multiple myeloma: review of 869 cases. Mayo Clin Proc 1975; 50: 29–40.
4. **Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, et al.** Treatment of multiple myeloma. Blood 2004; 1: 20–32.
5. **Thumer B, Haendle I, Roder C, et al.** Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. J Exp Med 1999; 190: 1669–78.
6. Advances in immune-based therapies of renal cell carcinoma. Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4: 1081–96.
7. **Barlogie B, Jagannath S, Epstein J, et al.** Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. Semin Hematol 1997; 34: 67–72.
8. **Yi Q, Österborg A.** Idiotype-specific T cells in multiple myeloma:targets for an immunotherapeutic intervention? Med Oncol 1996; 13: 1–7.
9. **Büchler T, Hajek R.** Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma. Med Oncol 2002; 19: 213–308.
10. **Yi Q, Desikan R, Barlogie B, Munshi N.** Optimizing dendritic cells-based immunotherapy in multiple myeloma. Br J Hematol 2002;117:297–305.
11. **Wen YJ, Min R, Tricot G, Barlogie B, Yi Q.** Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma-promissing effector cells for immunotherapy. Blood 2002; 99: 3280–5.
12. **Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, et al.** Ex vivo induction of myeloma-specific cytotoxic T-lymphocytes. Blood 2003; 4: 1435–42.
13. **Reichardt V, Milazzo C, Müller M, Grünebach F, Brossart P.** Induction of myeloma specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2002; abstract 3182.
14. **Treon SP, Raje N, Anderson KC.** Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. Semin Oncol 2000; 27: 598–613.
15. **Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S.** Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T-lymphocytes. Blood 2001; 97: 2903–7.
16. **Brossart P, et al.** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. Blood 2000; 96: 3102–3108.
17. **Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Demoyen PL, Zanetti M.** Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. PNAS 2000; 97: 4796–801.
18. **Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, et al.** Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. Cancer Res 2001; 61: 8366–70.
19. **Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM.** The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 1999; 10: 673–90.
20. **Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, et al.** Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a myeloma patient. The Journal of Immunology 1994; 153: 2102–9.
21. **Fajkus J.** Jak začínají a končí chromozomy, rub a líc buněčné nesmrtelnosti. Živa 2002; 6: 245–8.
22. **Shay JW, Bacchetti S.** A survey of telomerase activity in humen cancer. Eur J Cancer 1997; 33: 787–91.
23. **Vonderheide RH.** Telomerase as a universal tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. Oncogene 2002; 21: 674–9.
24. **Pang JX.** Human telomerase reverse transcriptase as a target for tumor immunotherapy. Ai Zheng 2003; 22: 893–5.
25. **Matthews P, Jones CJ.** Clinical implications of telomerase detection. Histopathology 2001; 38: 485–9.
26. **Schultze JL, Maecker B, Von Bergvelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH.** Tumor immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. Vox Saguinis 2001; 80: 81-9.

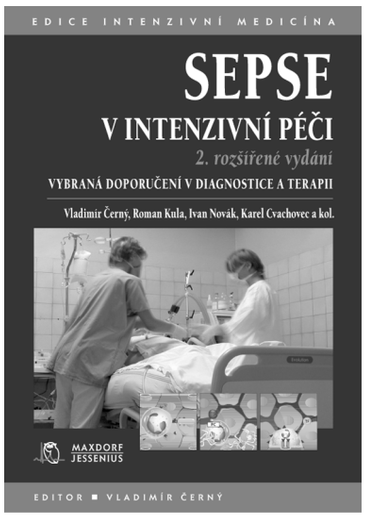
zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 109
proLékaře.cz | 5.12.2026

27. **Büchler T, Hájek R, Bourková L, a kol.** Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. Vaccine 2003; 21: 877–82.
28. **Očadlíková D, Kovářová L, Vidláková P, a kol.** Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty 26.–28.května 2004; 53: 113–16.
29. **Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W.** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. Blood 2000; 96: 3102–8.
30. **Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM.** The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 1999; 10: 673–9.
31. **Beckove H, Witzens M, Choi C, et al.** MUC-1-reactive cytotoxic memory T cells in bone marrow of myeloma patients. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2003; Blood, abstract 5227.
32. **Yi Q, Qian J, Xie J, et al.** Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma using dendritic cells pulsed with tumor-derived heat shock protein gp96. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2004; Blood, abstract 2451.

Mgr. D. Očadlíková
Oddělení klinické hematologie – Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapieFN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno–Bohunice

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZČR NR 7475-3.

Došlo do redakce: 1. 7. 2005
Přijato: 17. 7. 2005



SEPSE V INTENZIVNÍ PÉČI (2. vyd.)

Vladimír Černý, Roman Kula, Ivan Novák, Karel Cvachovec a kolektiv

Sepse se stala jedním z nevážnějších témat v oblasti intenzivní medicíny. V roce 2002 vydalo nakladatelství Maxdorf publikaci, která obsahovala doporučené postupy léčby těžké sepse. Text vycházel z výzkumů mezinárodní skupiny expertů International Sepsis Forum. Nyní byl rozšířen o nová, aktualizovaná doporučení léčby septického šoku (Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock; 2004) a s ohledem na závažnost problematiky byl do knihy zařazen i doporučený postup diagnostiky jedné z nejtěžších forem invazivního meningokokového onemocnění – meningokokové sepse. Cílem a přáním autorů je usnadnit svým kolegům z nejširší odborné veřejnosti rozhodování v denní klinické praxi. Pokud bude tento účel alespoň z části splněn, nebylo jejich úsilí vynaložené na vznik této publikace zbytečné.

Vydal Maxdorf v roce 2005, formát A5, váz., ISBN 80-7345-054-2, 212 str., 395 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz