

## **BIOBRANEM URYCHLENÉ DOZRÁVÁNÍ LIDSKÝCH DENDRITICKÝCH BUNĚK, DERIVOVANÝCH Z MONOCYTŮ**

**D. CHOLUJOVÁ, J. JAKUBIKOVÁ, J. SEDLÁK**

*Laboratoř imunologie nádorů, Ústav výzkumu rakoviny, Slovenská akadémia věd, Bratislava, Slovenská republika, e-mail: [exonsedl@savba.sk](mailto:exonsedl@savba.sk)*

*Pozn.*

*Obchodní název testovaného přípravku je BioBran, Bi-oBran nebo ImunoBran.*

**Přijato 17. září, 2008**

BioBran enzymaticky modifikovaný arabinoxylan z rýžových otrub, se testoval kvůli jeho možným účinkům na in-vitro dozrávání (maturaci) lidských dendritických buněk (DC). Nezralé DC (iDC) získané z plastických adheovaných periferních monocytů (Mo) ošetřených pomocí IL-4 a GM-CSF byli dále kultivované s cytokinovou maturační směsí 1 (CMM1; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6) nebo CMM2 (LPS a IFN- $\gamma$ ), aby se vyvolalo jejich dozrávání na zralé DC (matDC1 resp. matDC2). V přítomnosti nebo nepřítomnosti příslušné CMM byly aplikovány rozdílné koncentrace BioBranu (10, 100, 400 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ), aby bylo možné zhodnotit účinky BioBranu na maturační procesy DC.

BioBran indukoval dozrávání iDC, protože tyto buňky kultivované s IL-4/GM-CSF/BioBranem signifikantně zvyšovali regulovanými antigeny CD14 a CD1 na povrchu buněk expresi maturačního markeru CD83. Dále byl pozorován nárůst povrchové hustoty kostimulačních molekul CD80 a CD86 na iDC v přítomnosti BioBranu. BioBran navíc indukoval funkční dozrávání iDC, což bylo potvrzené sníženou endocytickou aktivitou iDC. BioBran také podporoval maturační potenciál cytokinových směsí, neboť v porovnání s DC maturovanými pouze samotnou příslušnou CMM i matDC1 a matDC2 vystavené BioBranu úplně ztratily CD14 a neregulované CD83, CD80 a CD86 antigeny. BioBran také zvyšoval expresi CD123 antigenu ve všech podmožinách DC. Velmi zajímavá je skutečnost, že matDC2 dozrávající v přítomnosti BioBranu (400 $\mu\text{g/ml}$ ) vykazovali vyšší hladiny CD123 a nejnižší hladiny CD11c antigenů na povrchu buněk, fenotyp reprezentovaný CD11cdimCD123bright populací plasmacytoidních DC. Tyto údaje dokazují, že BioBran silně podporuje dozrávání DC, a naznačují, že BioBran by tak mohl být užitečným činidlem pro vytvoření prostředí, které podporuje dozrávání DC.

*Klíčová slova: dendritické buňky, dozrávání, BioBran, buffy coat (koncentrát leukocytů po odstředění)*

Dendritické buňky jsou profesionálními buňkami představujícími antigeny (APC), které hrají hlavní roli při spuštění a regulaci imunitních reakcí, protože řídí jak vrozené (NK buňky, NKT buňky,  $\delta\gamma$  T buňky), tak i získané (T a B buňky) část imunity [1]. DC zahrnují podmožiny buněk s různými charakteristikami, které

pocházejí z progenitorových buněk kostní dřeně. U lidí mohou myeloidní a lymfoidní prekursorové buňky dát vzniknout myeloidním dendritickým buňkám CD11cbrightCD123dim (mDC) resp. plasmacytoidním dendritickým buňkám CD11cdimCD123bright (pDC) [2]. Antigenem nabitě DC periferní tkáň migrují aferentními

lymfatickými cévami do drenážních lymfatických uzlin, kde dodávají zpracované proteinové a lipidové antigeny T buňkám jak v podobě klasických molekul (hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy I a třídy II), tak i neklasických molekul představujících antigeny. Neaktivované iDC dodávají T buňkám antigeny, což v nepřítomnosti vhodné kostimulace vede k toleranci [3, 4]. Při styku s patogeny nebo jinými s „nebezpečím“ spojenými stimuly, jako jsou cytokiny, produkty poškozených tkání nebo vlastní lymfocyty, procházejí DC procesem aktivace a zrání, během kterého ztrácejí schopnost zachytávat Ag, ale získávají kapacitu pro aktivaci imunity. Tento proces maturace (dozrávání) zahrnuje změny v morfologii a motilitě, translokaci MHC na povrch buněk, zvýšenou expresi kostimulačních molekul (CD80/CD86 a CD40) a produkci cytokinů, které determinují třídu imunitní reakce tím, že selektivně polarizují vývoj efektorových T buněk [5].

Díky své schopnosti iniciovat, spojit a regulovat jak vrozenou, tak i získanou imunitu, představují DC potenciální nástroj pro imunoterapii rakoviny. Bylo zjištěno, že mDC a pDC také dokážou infiltrovat několik typů lidských nádorů, ale většina DC infiltrujících nádory byly nezralé DC [6]. Také se ukázalo, že některé sekundární faktory tumorů vedou k inhibici maturace DC včetně IL-10, VEGF, TGF- $\beta$  a PGE2 [7]. DC, které se setkaly s nádorovým antigenem v nepřítomnosti promaturačního prostředí, zůstávají v nezralém nebo nedozrálém stavu a může se vytvořit tolerogenní reakce [4]. Proto byla podpora maturace DC navržena jako terapie bojující proti toleranci řízené nádorem (tumor-driven tolerance) a pro stimulaci protinádorové imunity.

BioBran je doplněk stravy, který se získává reakcí hemicelulózy z rýžových otrub s vícenásobnými karbohydrátovými hydrolyzačními enzymy z hub Shiitake. Aktivní složka BioBranu je arabinoxylan. Předchozí výzkumy naznačily, že tento produkt podporuje buněčnou aktivitu přírodních zabijáků (NK = natural killers) in vitro a in vivo [8, 9]. Cílem tohoto výzkumu bylo prozkoumat možné modulatorní účinky BioBranu na diferenciaci a maturaci lidských DC in vitro.

## **Materiály a metody**

**Reagenty.** V tomto výzkumu byli použity nesledující monoklonální protilátky (mAbs): fluorescein isothiokyanát (FITC) konjugovaný s anti-human CD11c (IgG1) myší mAb, fykoerythrin (PE) konjugovaný s anti-human CD14 (IgG1) myší mAb, PE anti-human CD45 (IgG1) myší mAb, PE anti-human CD123 (IgG1) myší mAb, PE anti-human CD80 (IgG1) myší mAb, PE anti-human CD83 (IgG2b) myší mAb, PE anti-human CD86 (IgG2b) myší mAb, PE anti-human CD1a (IgG1) myší mAb a barvivo spojené s výměnou energie (ECD = energy-coupled dye) anti-human HLADR (IgG1) myší mAb. Všechny mAbs a izotypově sladěné kontroly byly zakoupené od společnosti Immunotech Beckman Coulter. Také jsme použili nesledující cytokiny a ligandy: rekombinační humánní kolonie granulocytů-makrofágů stimulační faktor (rhuGM-CSF; Santa Cruz Biotechnology), rekombinační humánní interleukin-4 (rhuIL-4; Santa Cruz), rekombinační humánní interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; Biomol), rekombinační humánní interleukin-6 (IL-6; Santa Cruz), faktor nádorové nekrózy (TNF $\alpha$  Santa Cruz), lipopolysacharid (LPS; Sigma-Aldrich), a interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; Bender MedSystem).

**BioBran** – denaturovaná hemicelulóza získaná z rýžových otrub, které se enzymaticky zpracují extraktem z hub Shiitake (*Lentinus edodes*). Hlavní chemická struktura a aktivní složka je arabinoxylan s xylózou ve svém hlavním řetězci a s polymerem arabinózy ve vedlejším řetězci. BioBran byl poskytnut společností Daiwa Pharmaceuticals Co. Ltd, Tokio v Japonsku. Roztok BioBranu se připravil rozpuštěním 1 dávky BioBran 1000 v destilované vodě na konečnou koncentraci 10 mg/ml.

**Izolace periferních krevních monocytů.** Monocyty byly izolovány z leukocytového koncentráту zdravých donorů (Národní transfúzní servis, Bratislava) pomocí centrifugace Pancol gradientem hustoty (1,077 g/ml, PAN-Biotech, Německo). Mononukleární buňky z rozhraní byly sesbírány, dvakrát promyty v PBS a jednou v AIM-V kompletním médiu (Gibco-BRL, Paisley, UK) a potom se nechaly 2 hodiny přilnout v plastových 6-přihrádkových miskách při 37 °C, 5%

CO2. Neadherované buňky byly jemně odstraněny trojitým promytím v PBS a jedním promytím v AIM-V médiu.

#### **Diferenciace a dozrávání dendritických buněk.**

Monocyty adherované na plast byly kultivované v 6-příhradkových miskách po dobu 6 dní v AIM-V kompletním médiu obohaceným o GM-CSF (1000 IU/ml) a IL-4 (1,000 IU/ml), aby se vytvořily iDC. Čerstvé médium s cytokiny bylo přidáno do buněčných kultur každý druhý den. Sedmý den bylo médium vyměněno a buňky byly kultivované v kompletním AIM-V médiu obsahujícím GM-CSF (1,000 IU/ml) a IL-4 (1,000 IU/ml) v přítomnosti nebo nepřítomnosti maturačních stimulů po dobu dalších 2 dní. Jako stimuly pro maturaci DC na matDC1, resp. matDC2 byla použita cytokinová maturační směs 1 (CMM1; TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) a IL-6 (10 ng/ml)), a cytokinová maturační směs 2 (CMM2; LPS (250 ng/ml) a IFN  $\gamma$  (1000 IU/ml)) s přidáním anebo bez přidání BioBranu (10, 100, 400 a 1000  $\mu$ g/ml) [10].

**Imunofenotypová analýza buněk.** Z monocytů získané DC byly sesbírány, promyty a znovu vloženy do PBS 0,2% BSA (Appllichem). Do 96-příhradkové mikromisky se dnem ve tvaru „V“ byla nepipetována stejná množství buněk (50  $\mu$ l/na příhrádku) a buňky byly inkubovány 2  $\mu$ l příslušného fluorochromokonjugovaného mAbs po dobu 30 minut při 37°C ve tmě. Na konci inkubace byly vzorky přeneseny do cytometrických zkumavek a byly přidány 2  $\mu$ l roztoku 7-amino-actinomycinu D (7-AAD; zásobní roztok 1 mg/ml v PBS) ve 300  $\mu$ l PBS na označení neživotoschopných buněk. Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 10 minut, chráněné před světlem a analyzované za použití Coulter Epics Altra průtokového cytometru.

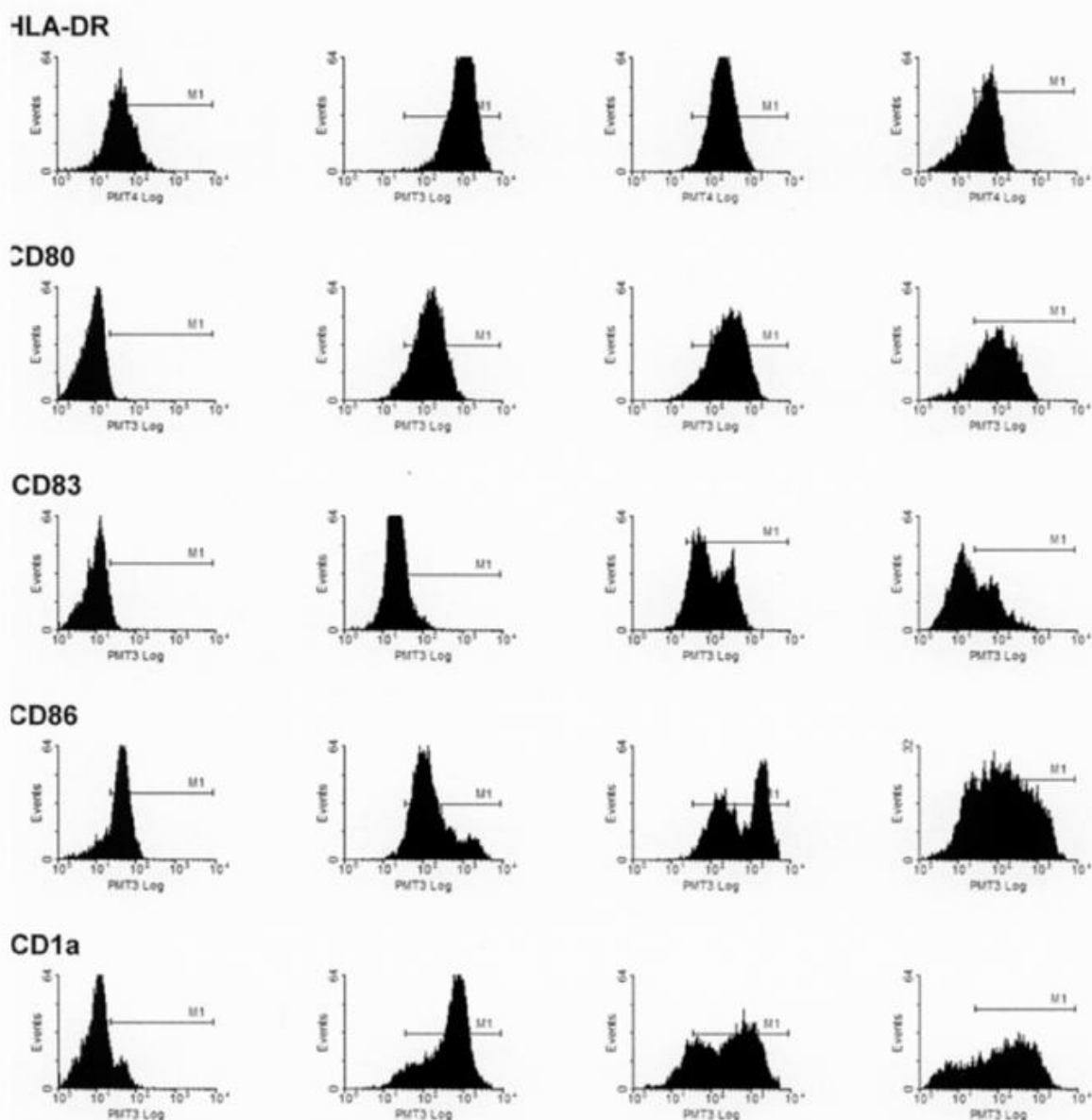
**Analýza endocytózy s FITC-dextranem.** Účinnost endocytózy byla hodnocena jako buněčné zachycování fluoresceinu isothiokyanátu (FITC) konjugovaného s dextranem monocyty, nezralými a zralými DC (matDC1, matDC2) kultivovanými v nepřítomnosti a přítomnosti BioBranu různých koncentrací (100, 400 a 1000  $\mu$ g/ml). Pro analýzu endocytózy bylo 2 x 10<sup>5</sup> buněk v každém vzorku inkubováno v AIM-V médiu s 1 mg/ml FITC-dextranu (Mr 40,000; Sigma) po dobu 60 minut buď při

37°C (pro absorpci) anebo 4°C (negativní kontrola). Po inkubaci byly buňky třikrát promyty ledově studenou PBS. Navíc byla použita trypanová modrá (0,2 %) na utlumení FITC fluorescence vázané na povrch. Akumulace FITC-dextranu v buňkách byla kvantifikována pomocí průtokové cytometrie. Neživotoschopné buňky a kontaminující lymfocyty byly vyloučeny podle jejich vlastností rozptylu a znečištění 7-AAD. Hodnoty byly počítány jako změna v procentu zelené fluorescenční pozitivitu mezi buněčnými vzorky při 37 °C resp. 4 °C.

**Průtoková cytometrická analýza.** Vzorky byly analyzované pomocí čtyřbarevného průtokového cytometru Epics Altra (Beckman Coulter) vybaveného argonovým laserovým (15 mV) zdrojem pracujícím na 488 nm. Emise fluorochromů byla zaznamenána přes speciální fluorescenční filtry pro určitá pásma propustnosti: FITC, 525 nm (FL1); PE, 575 nm (FL2); ECD, 610 nm (FL3); 7-AAD; 675 nm (FL4). Údaje byly analyzované pomocí softwaru WinMDI verze 2.7 (J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornie). Pro imunofenotypizaci byl výběr populace buněk („gatování“) proveden na kolmém rozptylu („side scatter“ = SSC; osa Y) oproti stupnici oranžové fluorescence barviva ECD (HLA-DR pozitivita; osa X), a to za účelem provedení separace reziduálních lymfocytů. Neživotoschopné (7-AAD-pozitivní) buňky byly z analýzy vyloučeny. Průměrně bylo v jednom vzorku sesbíráno 20 000 buněk.

#### **Výsledky**

**Fenotypická charakterizace Mo a z Mo získaných DC v různých stádiích maturace in vitro.** Fenotypická analýza byla provedena za účelem potvrzení diferenciace a maturačního stavu DC. Lidské periferní CD14<sup>+</sup> Mo byly izolovány plastickou adhezí z leukocytových koncentrátů zdravých donorů a kultivovány v přítomnosti GM-CSF a IL-4 po dobu 6 dní pro navození jejich diferenciace na iDC. Dodatečné dvoudenní ošetření iDC dvěma rozdílnými maturačními cytokinovými koktejly (CMM1, CMM2 bylo použito za účelem získání 2 odlišných populací zralých DC, nazvaných matDC1 a matDC2. Jak je vidět na obrázku 1, Mo prominentně vykazovaly CD14 a HLA-DR. Stejně tak vykazovali

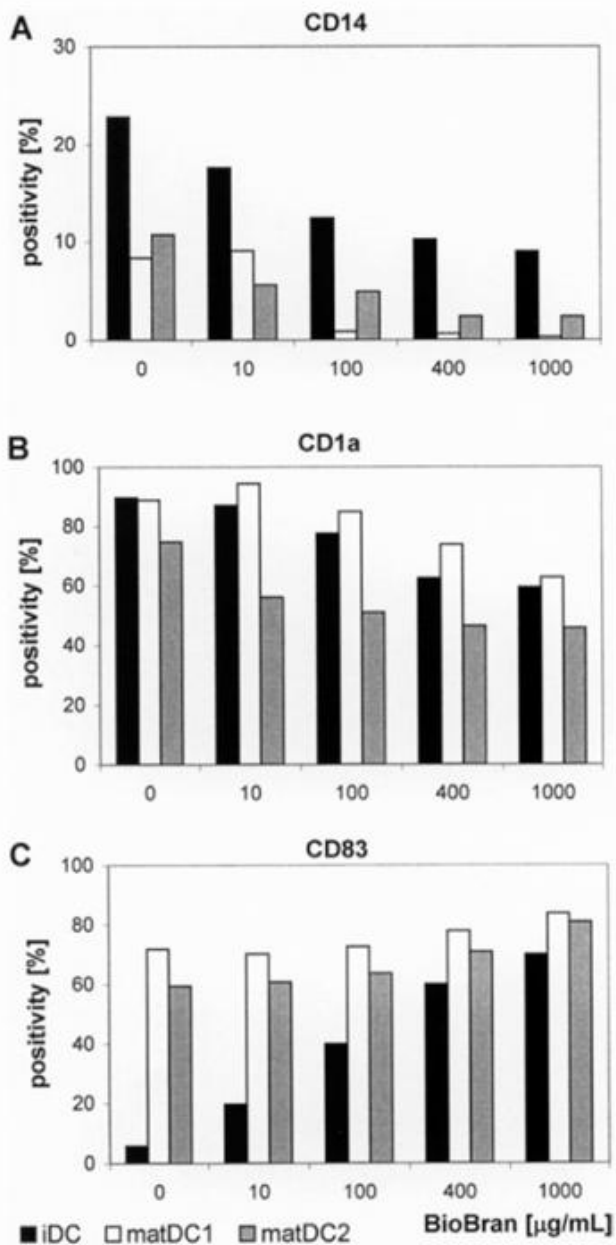


**Obrázek 1: Fenotyp Mo a DC v různých stádiích maturace in vitro.** Lidské periferní Mo se analyzovaly pomocí průtokové cytometrie a byli kultivované s GM-CSF a IL-4 (1000 UI/ml) po dobu 6 dní, aby se získaly iDC. iDC byly kultivovány v přítomnosti GM-SF a IL-4 po dobu dalších 2 dní, buď s CMM1 nebo CMM2 pro navození jejich maturace na matDC1 a matDC2, v tomto pořadí. Na konci se posbíraly podmnožiny iDC, matDC1 a matDC2, zabarvily se fluorochromem-konjugovaným mAbs proti indikovaným antigenům na buněčném povrchu a analyzovaly se pomocí průtokové cytometrie. Tento prezentovaný fenotyp Mo a DC je typický pro více jak pět buněčných kultivací.

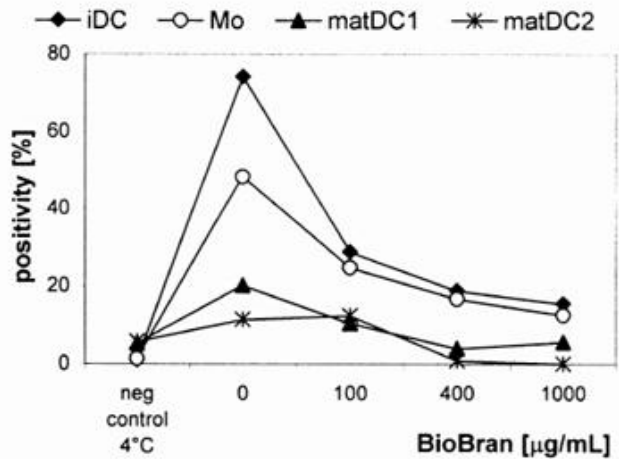
nízkou pozitivitu CD86, ale téměř úplně jim chyběla exprese CD1a, CD83 a CD80. Naopak ve srovnání s Mo, iDC regulovaly CD14 směrem dolů, ale silně vykazovaly molekulu CD1a představující antigen. Byly pozitivní na expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 a vykazovali marginální expresi CD83. Zralé DC (obě: matDC1 a matDC2) extenzivně zvyšovaly expresi maturačního markeru CD83 a kostimulačních molekul CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2).

**BioBran upravuje expresi markerů diferenciace a maturace na DC.** Pro zkoumání účinku BioBranu na dozrávání DC byly iDC vystavené různým koncentracím (10, 100, 400 a 1000  $\mu$ /ml) BioBranu v přítomnosti nebo nepřítomnosti příslušné maturační směsi (Obr. 2). Povrchová exprese antigenů CD14, CD1 a CD83 na iDC, matDC1 a matDC2 byla vyšetřována průtokovou cytometrií na HLA-DR<sup>+</sup> gatované buňky. BioBran regulovaly expresi monocytových markerů CD14 (Obr. 2A) a molekulu CD1a představující antigen (Obr. 2B) na





Obrázek 2. Účinek BioBranu na expresi antigenů diferenciace/maturace v DC podmnožinách. Povrchová exprese CD14, CD1a a DC maturačního markeru CD83 byla zkoumána průtokovou cytometrií na HLA-DR pozitivní gatované iDC, matDC1 a matDC2. Je ukázáno procento buněčné pozitivity a toto procento reprezentuje tři nezávislé experimenty.



Obrázek 3. Endocytová aktivita populací Mo a DC. Buňky byly inkubované s FITC-označeným dextranem (1mg/ml) po dobu 60 minut při 37 °C a 4 °C (negativní kontrola). Trypánová modrá byla použita na potlačení na povrch vázané zelené fluorescence. Endocytóza byla zhodnocená průtokovou cytometrií jako procento dextran-pozitivních buněk. Prezentované výsledky reprezentují tři podobné experimenty provedené na buňkách rozličných donorů.

povrchu iDC směrem dolů, ale vysoce zvýšil expresi CD83 (Obr. 2C), markeru zralých DC. Podobně jako u iDC byla se zvyšujícími se koncentracemi použitého BioBranu pozorována regulace CD14 a CD1a směrem dolů a regulace CD83 směrem nahoru i u zralých populací DC (matDC1 a matDC2).

**BioBran snižuje endocytovou aktivitu iDC.** BioBran byl testovaný na jeho schopnost ovlivňovat endocytovou aktivitu Mo a z Mo pocházejících DC. Endocytóza byla zhodnocena na základě zachycování FITC konjugovaného s dextranem při 37 °C, s negativní kontrolou inkubovanou 4 °C. Neošetřené iDC a Mo vykazovali vysokou úroveň endocytové aktivity (73% resp. 48% FITC-dextran-pozitivních buněk), zatímco matDC1 i matDC2 vykazovali jasnou redukci zachycování dextran-FITC (14,9% resp. 5,6%; Obr. 3). Při porovnání s kontrolními iDC byl zjištěn významný pokles endocytové aktivity iDC kultivovaných v přítomnosti BioBranu a tento účinek BioBranu závisel na dávce (27,7% u BioBranu 100 µg/ml, 17,7% u BioBranu 400 µg/ml a 14,4% dextran-pozitivních buněk u BioBranu 1000 µg/ml; Obr. 3). Podobné výsledky byly pozorovány u monocytů, kdy 100 µg/ml BioBran snížilo procento FITC-dextran-pozitivních buněk na 12,7%.

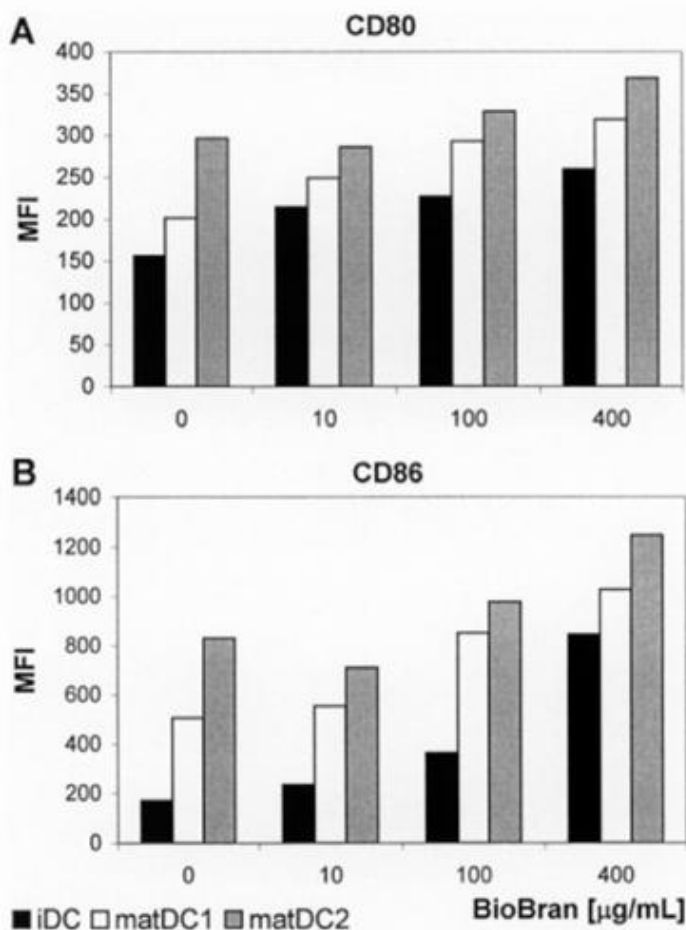
**BioBran zvyšuje povrchovou expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86.** Aby bylo možné zhodnotit účinek BioBranu na expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86, byly iDC pocházející z Mo ošetřeny po dobu 2 dní BioBranem (10, 100, 400 µg/ml) nebo byly maturované s CMM1 nebo CMM2 v přítomnosti BioBranu. Expresie CD80 a CD86 na buněčném povrchu iDC, matDC1 a matDC2 byly zkoumány průtokovou cytometrickou analýzou na HLA-DR pozitivně gatovaných buňkách (Obr. 4). Kontrolní matDC2 maturované v přítomnosti LPS a IFN- $\gamma$  vykazovaly v porovnání s kontrolními matDC1 maturovanými v přítomnosti IL-1 $\beta$ , IL-6, a TNF $\alpha$  MFI~201) nebo nezralými DC (MFI~156) nejvyšší hladiny CD80 (MFI~296). Podobně vykazovaly matDC2, v porovnání s matDC1 (MFI~506) a iDC (MFI~170), nejvyšší hladiny CD86 (MFI~829). BioBran zvyšoval průměr fluorescenční intenzity kostimulačních molekul CD80 a CD86 v závislosti na způsobu dávkování u všech

podmnožin DC. V přítomnosti BioBranu v koncentraci 400 µg/ml se MFI z CD80 zvýšilo na 368 u mDC, na 319 u matDC1 a na 260 u iDC. BioBran (400 µg/ml) dokonce značně zvyšoval CD86 antigen (MFI~1248 u matDC2, 1027 u matDC1 a 845 u iDC).

**BioBran reguluje  $\alpha$  řetězce CD123 receptorů interleukinu 3 směrem nahoru.** V přítomnosti BioBranu byla pozorována regulace CD123 směrem nahoru u  $\alpha$  subjednotky lidského receptoru interleukinu 3, jasně vyjádřená na plasmatoïdních DC a regulace adhézních molekul DC na buněčném povrchu mat DC2 buněk směrem dolů (Obr. 5). BioBran 400 µg/ml indukoval 2-násobné snížení CD11c pozitivitu na matDC1 v porovnání s kontrolními buňkami (z 78,9% na 38,7%). V protikladu k tomu BioBran zvyšoval CD123 pozitivitu na iDC, mDC a matDC1 a to v závislosti na dávce. Největší účinek BioBranu bylo vidět u iDC, kde BioBran 400 µg/ml indukoval 5-násobné zvýšení pozitivitu CD123 v porovnání s kontrolními buňkami (z 8,1% na 39,9%). V přítomnosti BioBranu vykazovaly podmnožiny iDC, matDC1 a matDC2 vyšší hladinu CD123 a nižší hladinu CD11c antigenů na buněčném povrchu, fenotyp představoval CD11cdim CD123 plasmatoïdní populaci DC.

#### Diskuse

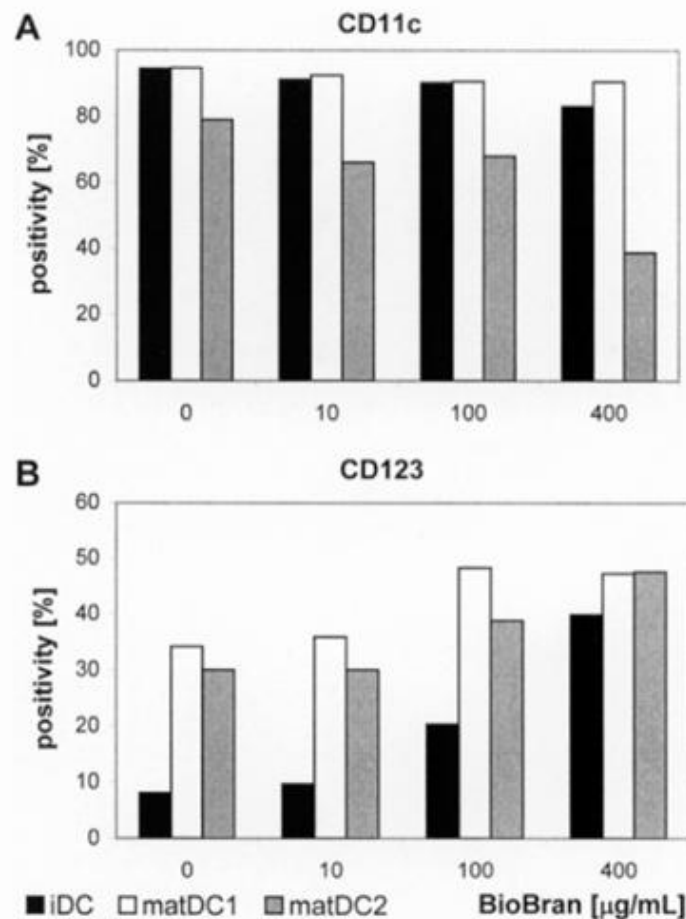
BioBran je výživový doplněk získaný z hemicelulózy rýžových otrub enzymaticky ošetřené vícenásobnými hydrolyzačními enzymy získanými z *Lentinus edodes* mycelia (houby Shiitake). V předchozích studiích BioBran vykazoval imunomodulační účinky na buňky jak vrozeného (NK buňky, makrofágy) tak i získaného (T a B lymfocyty) imunitního systému [11]. BioBran se ukázal jako silný posilovač aktivity NK buněk [8, 9, 12] provázené zvýšenou sekrecí TNF $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . BioBran také zvyšoval fagocytózu makrofágů indukci tvorby TNF- $\alpha$ , IL-6 a oxidu dusíku [13, 14]. DC jsou neúčinnějšími buňkami představujícími antigeny a hrají hlavní roli ve vytváření a regulaci protinádorové imunity. Po zachycení antigenů nádoru procházejí iDC fenotypovými a funkčními změnami a diferencují se na matDC. Mezi DC a NK buňkami existuje úzké pronikání na začátku imunitní reakce proti virům a nádorovým buňkám [15].



Obrázek 4. Účinek BioBranu na povrchovou expresi kostimulačních molekul. Buněčná povrchová exprese CD80 a CD86 markerů byla měřena průtokovou cytometrií na populacích iDC, matDC1 a matDC2 kultivovaných v přítomnosti příslušné cytokinové kombinací bez přidání (kontrolní buňky) nebo s přidáním BioBranu v indikovaných koncentracích. Výsledky jsou vyjádřeny jako fluorescenční intenzity (MFI) a reprezentují tři nezávislé experimenty.

Na základě výše uvedených účinků BioBranu na aktivitu NK jsme chtěli vymezit jeho možnou roli při maturaci DC in vitro.

Aplikovali jsme dvě maturační procedury, které se používají na přípravu DC z periferních krevních monocytů. Průtoková cytometrická analýza exprese antigenů buněčného povrchu stejně jako testy zachycování kapek dextranu potvrdili účinnou produkci jak nezralých, tak i zralých DC. BioBran dokázal na



Obrázek 5. Účinek BioBranu na povrchovou expresi CD11c a CD123. Fenotyp buněčného povrchu nezralé DC (iDC) a zralé DC (matDC1, matDC2) byl zkoumán průtokovou cytometrií na gatovaných HLA-DR pozitivních buňkách. Uvedené výsledky jsou typické pro tři samostatné experimenty.

koncentraci závislé snížení CD14 a augmentaci CD83 markerů diferenciaci u matDC1 resp. iDC buněk. Navíc snížení zachycování dextranu a regulace exprese kostimulačních molekul směrem nahoru podporovaly přesun směrem ke zralějšímu fenotypu DC navozený BioBranem.

Cytokinová vzorek uvolněný z nádorových buněk a nádorové stromy složené z fibroblastů, endoteliálních buněk a infiltrovaných imunitních buněk kooperativně

ovlivňuje aktivaci DC. Nádorová infiltrace CTL nebo T, NK a NKT buňkami souvisí s příznivou prognózou u různých neoplázií, jako je melanom, karcinomy tlustého střeva a vaječníků [16–18]. Na druhé straně neefektivní aktivace DC u karcinomu pankreatu [19], indukce T-buněčné anergie zprostředkované APC buňkami [20] anebo změněný vzorec infiltrace DC spolu se sekvencí kolorektálního adenokarcinomu [21] jsou příklady toho, jak se nádory vyhýbají detekci imunitní systémem.

Léčba BioBranem navodila na koncentraci závislou augmentaci exprese antigenů CD123 jak u nezralých, tak i u zralých DC, zatímco snížení exprese CD11c bylo pozorováno jen u buněk matDC2. Tedy fenotyp CMM2-maturovaných DC připomíná typickou maturaci plasmacytoidních DC. Nedávno byla popsána produkce mDC z CD34+ buněk, které představují markery jak myeloidních, tak i plasmacytoidních DC [22]. Podobně byla pozorovaná koexprese antigenů CD123 a CD11c na DC pocházejících z monocytů, stejně jako snížené zachycování FITC-značeného dextranu způsobené maturací. [23]. Toto je v souladu s našimi výsledky získanými kombinací BioBranu s CMM1. Na druhé straně byla popsána z krve derivovaná podmnožina CD123+mDC s vysokou absorpcí FITC-značeného dextranu, která korelovala s nezralým fenotypem a se signifikantní nádor-inhibující aktivitou [24].

Až dodnes zůstává nejasný mechanismus, v kterém buď samotný BioBran anebo v kombinaci s maturačními směsmi ovlivňuje expresi kostimulačních a diferenciacních markerů. Kromě imunomodulačních účinků BioBran zvyšuje kvasinkami navozenou apoptózu MCF-7 buněk [25] a apoptózu senzitivovaných lidských T-buněk leukémie navozenou smrtícími receptory CD95 [26].

Předpokládáme, že BioBran jako účinný modifikátor biologické odpovědi může stimulovat maturaci DC také *in vivo*. DC jsou centrální regulátory imunitního propojení vrozených a získaných imunitních reakcí, jejich přítomnost v mikroprostředí nádorů koreluje s přežitím [27], i když jejich počet a funkčnost jsou u pacientů s rakovinou ovlivněny [28, 29].

Možný prospěšný účinek BioBranu je v budoucím scénáři, ve kterém odstranění inhibičních signálů v mikroprostředí nádoru v kombinaci s dalšími terapeutickými strategiemi může být úspěšné při překonávání imunologické nedostatečnosti.

Autoři děkují za odbornou technickou pomoc paní Margitě Sulikové a paní Janě Chovancové. Tato práce byla podpořena komerčním grantem od Daiwa Pharmaceutical Co. Ltd. Také děkujeme všem dárcům krve za darování krevních vzorků pro tuto studii.

## Reference

- [1] RESCHNER A, HUBERT P, DELVENNE P et al. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 2008; 152: 219–226.
- [2] BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767–811.
- [3] STEINMAN RM, HAWIGER D, LIU K et al. Dendritic cell function *in vivo* during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 15–25.
- [4] LUTZ MB, SCHULER G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445–449.
- [5] UENO H, KLECHEVSKY E, MORITA R et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; 219: 118–142.
- [6] PERROT I, BLANCHARD D, FREYMOND N et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 2007; 178: 2763–2769.
- [7] RABINOVICH GA, GABRILOVICH D, SOTOMAYOREM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267–296.
- [8] GHONEUM M, JEWETT A. Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoside from rice bran, and its synergy with



- interleukin-2 in vitro. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 314–324.
- [9] GHONEUM M, ABEDI S. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1581–1588.
- [10] HOCHREIN H, O'KEEFFE M, LUFT T et al. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192: 823–833.
- [11] GHONEUM M. Anti-HIV activity in vitro of MGN-3, an activated arabinoxylane from rice bran. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 25–29.
- [12] KIM HY, KIM JH, YANG SB et al. A polysaccharide extracted from rice bran fermented with *Lentinus edodes* enhances natural killer cell activity and exhibits anticancer effects. *J Med Food* 2007; 10: 25–31.
- [13] GHONEUM M, MATSUURA M. Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran). *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17: 283–292.
- [14] GHONEUM M, MATSUURA M, GOLLAPUDI S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN3/Biobran) enhances intracellular killing of microbes by human phagocytic cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21: 87–95.
- [15] MORETTA L, FERLAZZO G, BOTTINO C et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006; 214: 219–228.
- [16] GALON J, COSTES A, SANCHEZ-CABO F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960–1964.
- [17] HAANEN JB, BAARS A, GOMEZ R et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 451–458.
- [18] ZHANG L, CONEJO-GARCIA JR, KATSAROS D et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203–213.
- [19] BELLONE G, CARBONE A, SMIRNE C et al. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol* 2006; 177: 3448–3460.
- [20] CUENCA A, CHENG F, WANG H et al. Extralymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res* 2003; 63: 9007–9015.
- [21] YUAN A, STEIGEN SE, GOLL R et al. Dendritic cell infiltration pattern along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *APMIS* 2008; 116: 445–456.
- [22] WARD KA, STEWART LA, SCHWARER AP. CD34+-derived CD11c++BDCA-1++CD123++DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2006; 8: 130–140.
- [23] HO CS, MUNSTER D, PYKE CM et al. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 2002; 99: 2897–2904.
- [24] SHI J, IKEDA K, MAEDA Y et al. Identification of CD123(+) myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumoristatic potential. *Cancer Lett* 2008; 270:19–29.
- [25] GHONEUM M, GOLLAPUDI S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 2005; 25: 859–870.
- [26] GHONEUM M, GOLLAPUDI S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2003; 201: 41–49.
- [27] NAGORSEN D, VOIGT S, BERG E et al. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 2007; 5: 62–69.
- [28] MARTIN-AYUSO M, ALMEIDA J, PEREZ-ANDRES M et al. Peripheral blood dendritic cell subsets from patients with monoclonal gammopathies show an abnormal distribution and are functionally impaired. *Oncologist* 2008; 13: 82–92.
- [29] KOVAROVA L, BUCHLER T, POUR L et al. Dendritic cell counts and their subsets during treatment of multiple myeloma. *Neoplasma* 2007; 54: 297–303.