

Hodnocení protinádorového efektu antigen-specifických T lymfocytů s využitím neradioaktivního testu cytotoxicity

Zahradová L.^{1,2}, Očadlíková D.¹, Kovářová L.^{1,3}, Hájek R.^{1,2}, Buliková A.³, Penka M.³, Michálek J.^{1,4}

¹Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie (LEHABI), FN Brno, Bohunice, ²Interní hematonekologická klinika, FN Brno - Bohunice, ³Oddělení klinické hematologie, FN Brno - Bohunice, ⁴I. dětská interní klinika, FN Brno, Dětská nemocnice

Souhrn

Východiska: K průkazu cytotoxického efektu T lymfocytů vůči cílovým, resp. nádorovým buňkám, je standardně používán *in vitro* test s radioaktivním chromem ⁵¹Cr. Tento test má však určité limity, zejména vysoké procento nespecifického pozadí, nízkou citlivost a použití radioaktivních materiálů. Vědomi si těchto limitací zavedli jsme neradioaktivní cytotoxický test s využitím fluorochromu 5-(6-) karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl esteru (CFSE) a propidium iodidu. **Obsah a cíle práce:** Cílem práce bylo ověřit cytotoxický efekt protinádorových T lymfocytů neradioaktivním testem. **Metody:** Ve studii byl použit model specifických T lymfocytů cytotoxických vůči nádorové linii buněk mnohočetného myelomu ARH 77. Specifické cytotoxické T lymfocyty byly získané imunomagnetickou separací na základě produkce interferonu gama a expandované na potřebné množství. T lymfocyty byly barveny CFSE a kultivovány s nádorovými buňkami ARH 77, pozdně apoptotické a nekrotické buňky byly odlišeny barvením propidium jodidem a hodnoceny pomocí průtokové cytometrie. **Výsledky:** Nejprve byla nalezena optimální barvicí koncentrace CFSE (1 μM). Cytotoxicita byla hodnocena při poměru efektorové:terčové buňky 2:1, 10:1 a 50:1 a to po 4, 24 a 48 hodinách kultivace. Specifická expandovaných T lymfocytů byla ověřena kultivací s alogenními mononukleárními buňkami a kultivací nespecifických T lymfocytů s buňkami nádorové linie ARH 77. **Závěr:** Takto zavedený test cytotoxicity je cenným nástrojem pro hodnocení efektorové složky imunitního systému a účinnosti protinádorových vakcín.

Klíčová slova: test cytotoxicity, CFSE, cytotoxické T lymfocyty

Summary

Zahradová L., Očadlíková D., Kovářová L., Hájek R., Buliková A., Penka M., Michálek J.: Evaluation of antigen-specific lymphocytes anti-tumour effect with use of non-radioactive cytotoxicity test

Objectives: Cytotoxicity test using radioactive chromium ⁵¹Cr has been standardly used to evaluate specific cytolytic activity of T lymphocytes. This test has some significant disadvantages because of the high non-specific background caused by spontaneous release of ⁵¹Cr from target cells, low sensitivity, and health risks associated with the use of a radioactive isotope. To avoid these limitations we have introduced a cytotoxicity test using 5-(6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and propidium iodide (PI). **Aim:** The aim of this study was to evaluate cytotoxic effect of antigen-specific T lymphocyte using a non-radioactive test with CFSE and PI staining. **Methods:** The model of cytotoxic T lymphocytes specific to multiple myeloma cell line ARH 77 was used. Activated myeloma-specific T cells that produce interferon-γ were isolated using immunomagnetic beads and further expanded *in vitro*. T lymphocyte labeled with CFSE were co-cultured with ARH77 target cells. To identify target cells in late apoptosis or necrosis, PI was used and measured by flow cytometry. **Results:** The optimal staining concentration of CFSE has been found (1 μM). Cytotoxicity has been evaluated with effector cells:target cells ratio 2:1, 10:1 and 50:1 after 4, 24 and 48 hours of *in vitro* cultivation. Tumor specificity has been verified by 2 sets of controls: third-party PBMC as negative control target cells and expanded CFSE-labeled interferon gamma negative fraction of T cells as negative control effector cells. **Conclusion:** The newly established cytotoxicity test is a valuable instrument to evaluate effector part of the immune system and efficacy of anticancer vaccines.

Key words: cytotoxicity test, CFSE, cytotoxic T lymphocytes

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 4, p. 244–248.

Úvod

Vzhledem k imunogenní povaze nádorových buněk hraje buněčná imunita klíčovou roli při ochraně organismu proti nádorovému onemocnění. Buňky imunitního systému jsou schopny rozpoznat nádorové buňky a v konečném důsledku je zničit. T lymfocyty jsou klíčovou součástí imunitního systému a jsou nezbytné pro buňkami zprostředkované imunitní reakce, které jsou zpravidla antigen-specifické. Antigen je po zpracování antigen prezentující buňkou (antigen presenting cell, APC) předložen T lymfocytům (1) a může vést k jeho

aktivaci, která vyústí v klonální expanzi antigen-specifických lymfocytů s cílem specifické lýzy terčové buňky nesoucí daný antigen (2). Cytotoxické T lymfocyty usmrcují terčové buňky nejčastěji dvěma způsoby. První způsob využívá uvolnění perforinů a granzymů z cytotoxických granulí. Perforiny vytvoří v membráně terčové buňky póry, granzymy v cytoplazmě štěpením aktivují enzymy kaspázy a spouštějí tak kaskádu reakcí vedoucích k apoptotické smrti terčové buňky. Druhý způsob spočívá ve spuštění apoptózy aktivací apoptotického receptoru Fas (CD 95) terčových buněk pomocí Fasligandu na T lymfocyttech. Další mechanismy vedoucí ke smrti terčových buněk mohou být zprostředkovány pro-

dukovanými cytokiny, např. tumory nekrotizující faktor alfa (3).

V současné době je stále více využíván protinádorový potenciál T lymfocytů. Je tudíž žádoucí ověřit cytolytickou aktivitu T lymfocytů *in vitro*, vzhledem k jejich klíčové roli při eliminaci nádorových buněk.

Nejčastěji používaným testem cytotoxicity *in vitro* je test s radioaktivním izotopem chromu ^{51}Cr , který byl popsán v roce 1968 (4). Terčové buňky jsou značeny radioaktivním ^{51}Cr a princip testu spočívá v detekci gama záření uvolněného ^{51}Cr z umírajících terčových buněk do supernatantu. S rozvojem průtokové cytometrie jsou hledány nové způsoby detekce apoptotických a nekrotických buněk, které by vykazovaly vyšší specificitu, byly snadno reprodukovatelné a zároveň jednoduché, spolehlivé a bezpečné. V testech založených na průtokové cytometrii byla pro označení jedné z populací buněk testována různá barviva jako jsou kalcein-AM (5), fluorescein isothiocyanát (6), 3, 3'-diiodoacetylkarboxycyanin [DiO 18 (3)] (7) nebo karboxyfluorescein diacetát (8), lýza terčových buněk byla hodnocena například pomocí barvení propidium jodidem (9).

Jedním z nových testů hodnocených průtokovým cytometrem je test s využitím 5-(6-) karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl esteru (CFSE). CFSE je nefluoreskující derivát fluoresceinu, který volně difunduje do cytoplazmy živých buněk. Zde je štěpen endogenními esterázami na fluoreskující sloučeninu, která se ireverzibilně váže na vnitrobuněčné bílkoviny a takto umožňuje dlouhodobé sledování dané buňky. Při buněčném dělení navíc CFSE přechází do dceřiných buněk, které pak obsahují poloviční množství tohoto barviva. CFSE barvení lze tudíž využít nejenom pro sledování dané populace buněk, ale také pro sledování dělicích se dceřiných buněk (10, 11). Další výhodou je také možnost současného hodnocení imunofenotypu buněk značením povrchových znaků monoklonálními protilátkami. Mohou být využity k bližší identifikaci buněčných populací či k monitoraci změn exprese povrchových molekul spojených např. s buněčnou aktivací (11–15).

Cílem barvení CFSE je odlišení jednotlivých populací. CFSE může být použito buď k označení efektorových, nebo terčových buněk ve smíšené kultuře *in vitro* (16–18).

Pozdně apoptotické a nekrotické buňky lze dále odlišit pomocí barviva propidium iodidu (PI) nebo 7-aminomycinu D (7-AAD). Pozdně apoptotické a nekrotické buňky mají poškozenou buněčnou membránu a takto poškozené buňky nejsou schopné vylučovat kladně nabitá barviva jako jsou PI a 7-AAD. Barviva, která projdou poškozenou membránou, se v buňce vážou na nukleové kyseliny a komplex barviva s nukleovou kyselinou pak lze detekovat průtokovým cytometrem (10, 19, 20).

Cílem naší práce bylo ověřit cytotoxický efekt nádorově-specifických T-lymfocytů cytotoxických vůči nádorové linii buněk mnohočetného myelomu ARH 77. Cytotoxický efekt byl hodnocen pomocí neradioaktivního

testu cytotoxicity s možností měření průtokovým cytometrem.

Materiál a metodika

Použité buňky a buněčná linie

Nádorová linie myelomových buněk (MB) ARH 77 získaná jako dar od Dr. N. Munshi (University of Arkansas, USA, 1995) byla kultivována v médiu RPMI 1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s 10% fetálním telecím sérem (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), penicilinem a streptomycinem (Sevac, ČR) při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂. Nádorový antigen byl připraven ozářením buněk ARH 77 dávkou 60 Gy.

Efaktorové T lymfocyty byly izolovány jako mononukleární buňky (MN) z nesrážlivé periferní krve zdravotních dárců z transfuzní stanice ve FN Brno po podepsání informovaného souhlasu metodou gradientové centrifugace (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a kultivovány v kompletním médiu (KM) obsahujícím X-VIVO 15 (50 mg/l gentamycin, 2 mM L-glutamin, 25 mg/ml hepes pufr (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s tepelně inaktivovaným 10% lidským AB sérem (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Příprava antigen-specifických cytotoxických T lymfocytů

Příprava antigen-specifických cytotoxických T lymfocytů probíhala podle dříve publikovaného postupu (21, 22). Ve stručnosti, MN periferní krve, obsahující lymfocyty a antigen prezentující buňky byly v Den 0 stimulovány ozářenými MB v poměru 20:1 (MN:MB) a Den 7 restimulovány ozářenými MB v poměru 2:1 (MN:MB). Den 8 kultivace byly T lymfocyty (TL) aktivované MB identifikovány na základě produkce aktivačního markeru interferonu gamma (IFN- γ) pomocí dostupného kitu (Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit, MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Německo). Magnetická separace se prováděla podle pokynů výrobce na koloně umístěné v magnetickém poli přístroje Vario MACS (MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Německo). IFN- γ pozitivní frakce byla získána dvojitou separací pro zvýšení čistoty. Specifické IFN- γ^+ TL byly dále expandovány v KM (5% CO₂, 37 °C) pomocí interleukinu 2 (IL-2, 500 IU/ml, Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko) a phytohemagglutininu (PHA, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA), který byl přidán 1. den expanze v množství 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KM. IL-2 byl přidáván 2–3krát týdně, 1krát týdně se prováděla výměna KM a byly přidávány alogenní MN jiného zdravotního dárce ozářené dávkou 30 Gy. Expanze probíhala po dobu 4–5 týdnů. Koncentrace buněk v KM byla 1x10⁶/ml.

CFSE značení T lymfocytů

Expandované TL byly resuspendovány ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS) v množství

1x10⁶/ml a následně barveny různými koncentracemi CFSE (0,1 μ M, 0,5 μ M a 1 μ M). Buňky byly inkubovány 7 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C, poté bylo přidáno FCS pro zastavení reakce a buňky byly 2krát promyty v PBS.

Příprava buněk k cytotoxickému testu

Expandované IFN- γ^+ TL značené CFSE byly kultivovány s nádorovými buňkami linie ARH 77 ve smíšené in vitro kultuře v KM (5% CO₂, 37 °C) s IL-2 v množství 10 IU/ml KM, a to v poměrech (TL:MB) 2:1, 10:1 a 50:1 po dobu 4 hodiny, 24, 48 a 72 hodin. Vitalita MB před přidáním do in vitro kultury byla nejméně 86 %. Jako negativní kontrola byly kultivovány IFN- γ^+ T lymfocyty s alogeními MN a IFN- γ negativní TL s nádorovými buňkami linie ARH 77.

Hodnocení viability buněk

K odlišení MB v pozdní apoptóze či nekroze byl použit 7-AAD a PI. Barvení 7-AAD bylo prováděno dle pokynů výrobce. Ve stručnosti: 0,5x10⁶ buněk bylo inkubováno s 20 μ l 0,005% 7-AAD 20 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byl přidán PBS s azidem sodným a vzorky byly ihned analyzovány. Pro barvení PI byl ke vzorkům o buněčnosti 0,5x10⁶ /ml přidán PI v koncentraci 1 mmg/ml a po 5–10minutové inkubaci při 4–8 °C byly vzorky v barvicím roztoku ihned analyzovány.

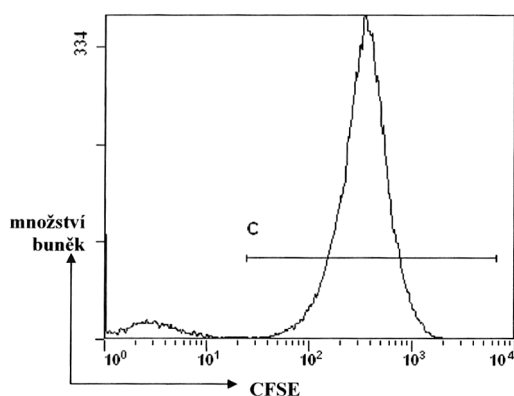
Analýza na průtokovém cytometru

Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Cytomics™MFC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA) softwarem Cytomics RXP. V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 30 tisíc buněk.

Výsledky

Optimalizace CFSE barvení

Optimalizace CFSE barvení probíhala pomocí 3 různých koncentrací 0,1 μ M, 0,5 μ M a 1 μ M tak, aby bylo umožněno spolehlivé rozlišení CFSE barvených efektorových buněk od autofluorescence MB. Rovněž bylo



Obr. 1. Odlišení CFSE pozitivní a CFSE negativní buněčné populace.

nutno přihlídnout k toxicitě CFSE, které by mohlo ve vyšší koncentraci ovlivnit vitalitu a funkci značených TL. Pro barvicí koncentrace CFSE 0,1 μ M a 0,5 μ M nebylo zcela jednoznačně možné rozlišit populaci barvených TL a nebarvených MB, které vykazovaly poměrně vysokou autofluorescenci (data nejsou znázorněna). Naproti tomu barvicí koncentrace CFSE 1 μ M nevedla k výraznějšímu poklesu vitality (vitalita min. 80 %), ale umožnila spolehlivé odlišení jednotlivých populací (obr. 1).

Značení CFSE o koncentraci 1 μ M dovolilo spolehlivé rozlišení T lymfocytů (CFSE pozitivní) – gate C od nádorových buněk (CFSE negativní).

Optimalizace cytotoxického testu

Pro optimalizaci cytotoxického testu bylo vyhodnoceno 5 experimentů s využitím MN periferní krve od pěti různých dárců. Pro in vitro kultury byly použity poměry TL:MB 2:1, 10:1, 50:1. Cytotoxicita byla hodnocena po 4, 24, 48 a 72 hodinách kultivace. Procento mrtvých nádorových buněk bylo hodnoceno dle následujícího výpočtu: 100krát (procento mrtvých MB ve směsné lymfocytární reakci – procento mrtvých MB kultivovaných bez TL)/(procento max. mrtvých MB – procento mrtvých MB kultivovaných bez TL). Procento maxima mrtvých MB bylo zjištěno po ozáření MB letální dávkou. Po 4 hodinách kultivace byla cytotoxicita pro poměr 2:1 21,8 % (11,4 %–38,9 %) (medián, min.–max.), pro poměr 10:1 34,3 % (18,1 %–65,5 %) a pro poměr 50:1 63,0 % (27,2 %–68,6 %). Při hodnocení po 24 hodinách kultivace byla cytotoxicita pro poměr 2:1 60,8 % (12,8 % až 73,1 %), pro poměr 10:1 69,8 % (38,0 %–78,2 %). Data z jednotlivých experimentů jsou shrnuta v tab.1. Ukázka rozlišení jednotlivých buněčných populací je znázorněna na obrázku 2.

Hodnocení procenta mrtvých terčových buněk po 4, 24 a 48 hodinách kultivace v poměru efektorové: terčové buňky 10:1, experiment 3. V kvadrantu E1 se nacházejí mrtvé terčové buňky (CFSE-negativní, PI-pozitivní). Cytotoxické T lymfocyty jsou CFSE pozitivní. Po 4 hodinách je množství mrtvých nádorových buněk ze všech nádorových buněk 44,7 %, po 24 hodinách 68,5 % a po 48 hodinách 80,5 %.

Ve vysokém poměru efektorových: terčových buněk se množství sledovaných terčových buněk blížilo přirozenému pozadí, proto je nebylo možné od přirozeného pozadí spolehlivě odlišit. Test byl buď nehodnotitelný, nebo vykazoval falešně negativní výsledky (data nejsou znázorněna). Obdobná situace nastala při hodnocení cytotoxicity po 48 hodinách a zejména po 72 hodinách kultivace.

Ověření imunofenotypu efektorových buněk

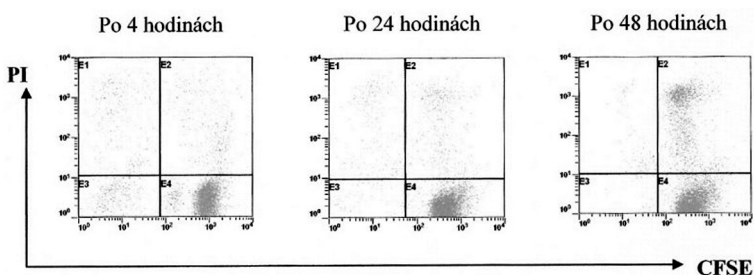
Ověření imunofenotypu expandovaných TL bylo provedeno před přidáním MB. Populace CD3⁺ představovala 99,6 % (medián, min. 95 %, max. 99,9 %) efektorových buněk. V experimentech převažovala populace CD3⁺CD4⁺ 65,9 % (medián, min. 13,4 % – max. 96,6 %)

Tab. 1. Cytotoxický efekt T lymfocytů vůči myelomovým buňkám.

Procento pozdně apoptických a nekrotických terčových (myelomových) buněk hodnocených po různé době kultivace s potenciálně antigen-specifickými cytotoxickými T lymfocyty. Byly testovány různé poměry efektorových:terčových buněk (E:T).

Poměr E:T Experiment č.	Po 4 hodinách			Po 24 hodinách			Po 48 hodinách		
	2:1	10:1	50:1	2:1	10:1	50:1	2:1	10:1	50:1
1	32,7	34,3	63,7	73,1	78,2	38,0	66,7	71,9	43,8
2	17,3	22,1	27,2	30,7	69,8	89,6	57,6	76,2	59,7
3	21,8	44,7	68,6	60,8	68,5	73,5	49,0	80,5	83,1
4	38,9	65,5	62,3	66,4	77,	87,4	73,3	65,1	66,8
5	11,4	18,1	ND	12,8	38,0	ND	20,2	37,9	ND
Medián	21,8	34,3	63,0	60,8	69,8	80,4	57,6	71,6	63,3
Minimum	11,4	18,1	27,2	12,8	38,0	38,0	20,2	37,9	43,8
Maximum	38,9	65,5	68,6	73,1	78,2	89,6	73,3	80,5	83,1

ND-neděláno

**Obr. 2. Cytotoxický efekt T lymfocytů vůči myelomovým buňkám – experiment 3.**

nad CD3⁺CD8⁺ buňkami 34,6 % (medián, min. 3,4 % – max. 95,4 %).

Ověření specificity expandovaných T lymfocytů

Myelom-specifický cytotoxický potenciál byl porovnáván s efektem myelom-nespecifických TL vůči MB a s efektem myelom-specifických TL vůči nespecifickému antigenu. Myelom-specifické TL byly kultivovány s alogenními monocytů zdravého dárce v poměrech 2:1 a 10:1. TL nevykazovaly významný cytotoxický efekt. Dále byly kultivovány IFN- γ ⁻ frakce TL s MB. IFN- γ ⁻ TL představují myelom-nespecifické TL, tedy takové, které neodpověděly na nádorový antigen aktivací spojenou s produkcí INF- γ a proliferací. Data z jednotlivých experimentů jsou shrnuta v tabulce 2.

Tab. 2. Specificita cytotoxického efektu T lymfocytů.

Ověření specificity cytotoxického efektu T lymfocytů. IFN- γ ⁺, aktivované T lymfocyty, byly kultivované buď s buňkami myelomové linie (ARH 77), nebo s alogenními mononukleárními buňkami zdravého dárce (MNC) jako kontrola. Jako další kontrola byla kultivovaná IFN- γ ⁻ frakce s buňkami myelomové linie (ARH 77).

	Po 4 hodinách		Po 24 hodinách	
	2:1	10:1	2:1	10:1
IFN- γ ⁺ s ARH 77	11,4	18,1	12,8	38,0
IFN- γ ⁺ s MNC	0,1	1,9	2,5	6,9
IFN- γ ⁻ s ARH 77	1,4	0,8	0,3	0,8

Diskuse

Buněčná imunita hraje klíčovou roli při ochraně organismu proti nádorovému onemocnění. Její nezbytnou sou-

částí jsou cytotoxické T lymfocyty, které jsou schopny specificky usmrtit nádorové buňky. Jsou proto považovány za jedny z perspektivních adeptů imunoterapeutických intervencí. *In vitro* získané cytotoxické T lymfocyty, které jsou specifické vůči nádorovým buňkám lze použít ke specifické imunoterapii (2). Důležitou součástí imunoterapeutických protokolů je ověření specifické cytolytické aktivity T lymfocytů vůči nádorovým buňkám.

Standardně používaným cytotoxickým testem je test s radioaktivním izotopem chromu Cr⁵¹. Hlavní nevýhodou tohoto testu je především vysoké procento nespecifického pozadí způsobené spontánním uvolňováním ⁵¹Cr ze značených buněk, negativní vliv ⁵¹Cr na populaci efektorových buněk, problémy se značením některých buněčných typů, nízká senzitivita a rizika spojená s použitím radioaktivního materiálu (8, 23, 24).

V této práci prezentujeme zavedení cytometrického testu pro hodnocení cytotoxicity na bázi barevného označení efektorových buněk pomocí CFSE a barvení apoptických a nekrotických buněk 7-AAD či PI. Test navíc umožňuje rozlišení jednotlivých subpopulací TL a přitom se jedná o metodu rychlou, jednoduchou, spolehlivou a neradioaktivní (16). Metoda je jednoduše hodnotitelná průtokovým cytometrem s jedním laserem. Představuje tak výhodnější alternativu ve srovnání s klasickým testem s radioaktivním Cr⁵¹ z několika důvodů. Jsou to: 1. užití neradioaktivních materiálů, které eliminuje nejen zdravotní rizika pro personál, ale též potíže spojené s požadavky na použití a likvidaci radioaktivního materiálu, 2. CFSE je univerzální marker schopný označit jakoukoliv populaci sledovaných buněk, 3. CFSE značení umožňuje současné použití monoklonálních protilátek proti povrchovým buněčným znakům a dovoluje tak bližší identifikaci jednotlivých subpopulací (15), 4. CFSE značení je stabilní a použitelné i pro testy trvající několik dní (15, 16), 5. CFSE je v běžných barvicích koncentracích netoxické, nemodifikuje lytické vlastnosti efektorových buněk (16–18).

V našich experimentech byla použita koncentrace CFSE, která je v literatuře popisována jako bezpečná,

tedy koncentrace, která neovlivňuje vitalitu a funkci značených buněk (11, 17).

Navíc test s CFSE a s PI a 7AAD je senzitivnější než test s Cr⁵¹ zejména v nízkých poměrech efektorových a terčových buněk (17, 18). Oproti tomu ve vysokém poměru efektorových:terčových buněk (50:1) se ukazují možné limitace testu, neboť nízká koncentrace terčových buněk nemusí vždy umožnit spolehlivé rozlišení od přirozeného pozadí, a tudíž může vést k falešně negativnímu výsledku, zejména tam, kde terčové buňky vykazují vysokou autofluorescenci a může také docházet k interferenci s efektorovými buňkami barvenými CFSE. Proto je při použití tohoto testu nutné nejprve optimalizovat experimentální podmínky pro detekci lýzy terčových buněk.

Tato nová metoda současně dovoluje přesnou imunofenotypizaci terčových i efektorových buněk pomocí monoklonálních protilátek proti povrchovým antigenům (15), což je výhodné zejména v případě heterogenních buněčných populací (13).

Takto zavedený neradioaktivní test cytotoxicity je v současné době cenným nástrojem pro hodnocení efektorové složky imunitního systému a účinnosti protinádorových vakcín.

Poděkování

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

Literatura

1. **Hart DN.** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245–87.
2. **Michálek J, Büchler T, Hájek R.** T lymphocyte therapy of cancer. *Physiol. Res* 2004; 53: 463–469.
3. **Krejsek J, Kopecký O.** Klinická imunologie. Nucleus HK, 2004.
4. **Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B.** Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968; 14: 181–96.
5. **Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M.** An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 177: 101–11.
6. **Karawajew L, Jung G, Wolf H, Micheel B, Ganzel K.** A flow cytometric long-term cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1994; 177: 119–30.
7. **Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL.** Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1993; 166: 45–54.
8. **McGinnes K, Chapman G, Marks R, Penny R.** A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1986; 86: 7–15.
9. **Papa S, Vitale M, Mariani AR, Roda P, Facchini A, Manzoli FA.** Natural killer function in flow cytometry. I. Evaluation of NK

lytic activity on K562 cell line. *J Immunol Methods* 1988; 107: 73–8.

10. **Shapiro HM.** Practical flow cytometry, 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2003.
11. **Lyons AB.** Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dilution. *J Immunol Methods* 2000; 243: 147–52.
12. **Schmid I, Ferbas J, Uittenbogaart CH, Giorgi JV.** Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. *Cytometry* 1999; 35: 64–74.
13. **Mannering SL, Morris JS, Jensen KP, et al.** A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells. *J Immunol Methods* 2003; 283: 173–83.
14. **Godfrey WR, Krampf MR, Taylor PA, Blazar BR.** Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood* 2004; 103: 1158–65.
15. **Jedema I, van der Werff N, Barge RMY, Willemze R, Falkenburg JHF.** A new CFSE based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 2004; 103: 2677–82.
16. **Marín L, Minguela A, Torio A et al.** Flow cytometric quantification of apoptosis and proliferation in mixed lymphocyte culture. *Cytometry A* 2003; 51: 107–118.
17. **Sheehy ME, McDermott AB, Furlan SN, Klenerman P, Nixon D.** A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *J Immunol Methods* 2001; 249: 219–20.
18. **Lecoeur H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon ML.** A novel flow cytometric assay for quantification and multiparametric characterisation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001; 253: 177–87.
19. **Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV.** A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 170: 145–57.
20. **King MA.** Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243: 155–66.
21. **Očadlíková D, Kovářová L, Penka M, et al.** Identifikace nádorově-specifických T lymfocytů na základě produkce interferonu gama u mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 2005; 18: 55–58.
22. **Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, et al.** Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2003; 102: 1435–1442.
23. **Volgmann T, Klein-Struckmeier A, Mohr H.** A fluorescence-based assay for quantitation of lymphokine-activated killer cell activity. *J Immunol Methods* 1989; 119: 45–51.
24. **Flieger D, Gruber R, Schlimok G, Reiter C, Pantel K, Riethmüller G.** A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 1995; 180: 1–13.

MUDr. Lenka Zahradová

Oddělení klinické hematologie

Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie

FN Brno, PMDV

Jihlavská 20

625 00 Brno

e-mail: lzahradova@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 13. 1. 2006

Přijato: 20. 9. 2006