

616.155.392:612.41

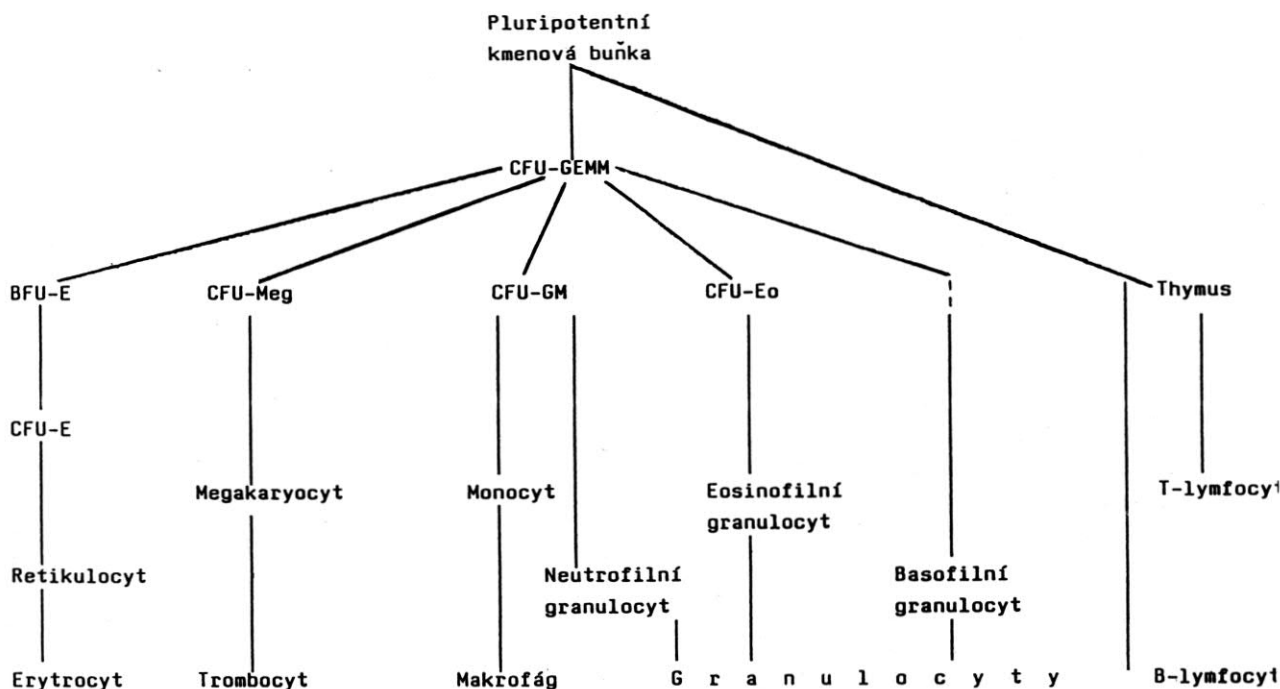
MOŽNOSTI VYUŽITÍ KULTIVACE HEMOPOETICKÝCH BUNĚK IN VITRO V KLINICKÉ HEMATOLOGICKÉ PRAXI

Kpt. MUDr. Stanislav FILIP, pplk. MUDr. Ladislav JEBAVÝ, CSc., plk. doc. MUDr. Milan BLÁHA, CSc.,
plk. doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.
Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

Buněčné elementy jak kostní dřeně, tak i periferní krve vznikají v procesu proliferace a diferenciaci pluripotentní hemopoetické kmenové buňky, která vytváří základ pro všechny krevní řady (4, 58, 65, 75). Proliferací a diferenciací pluripotentních hemopoetických kmenových buněk vznikají pluripotentní prekurzorové buňky pro

granulocyty, erytroblasty, megakaryocyty a makrofágy. Z těchto buněk, které v sobě nesou už vlastnosti pro další diferenciaci, vznikají unipotentní (progenitorové) buňky, které vytvářejí klon buněk pro jednu konkrétní krevní řadu (obr. 1).

První průkaz existence kmenových buněk krvetvorby



Obr. 1 Schéma diferenciace buněčného klonu odvozeného od pluripotentní hemopoetické kmenové buňky (Upraveno podle: Rich, I. N., 1988)

CFU-GEMM (colony-forming unit, granulocyte-erythrocytemegakaryocyte-macrophage) - pluripotentní prekurzorová buňka pro granulocyty, erytroblasty, megakaryocyty a makrofágy

BFU-E (burst-forming unit-erythroid) - raná erytroidní progenitorová buňka

CFU-E (colony-forming unit-erythroid) - pozdní erytroidní progenitorová buňka

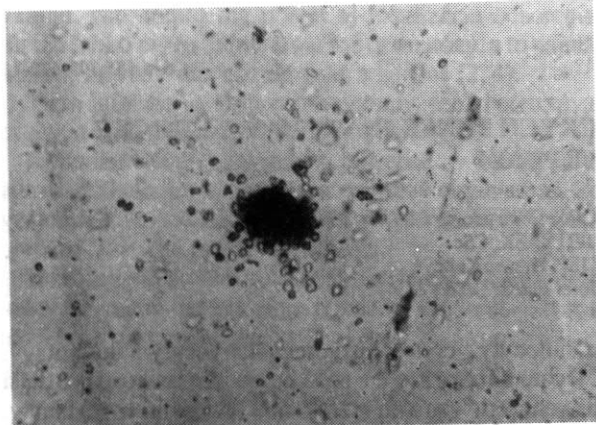
CFU-Meg (colony-forming unit-megakaryocyte) - progenitorová buňka pro megakaryocyty

CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte, macrophage) - progenitorová buňka pro neutrofilní granulocyty a makrofágy

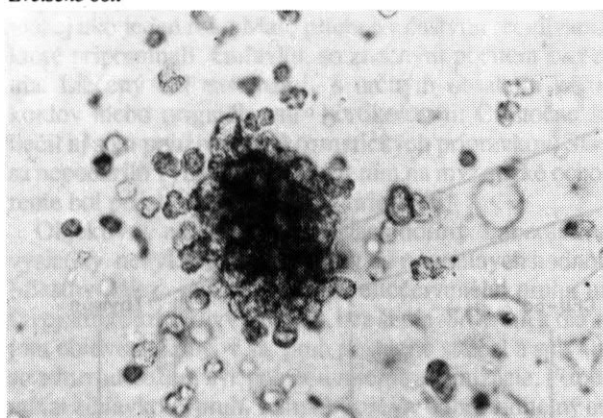
CFU-Eo (colony-forming unit-eosinophil) - progenitorová buňka pro eosinofilní granulocyty

podali v r. 1961 Till a McCulloch (74), když pozorovali kolonie vzniklé z pluripotentních hemopoetických buněk ve slezině ozářených myši. Zásadní význam pro studium fyziologických a patologických procesů krvetvorby u lidí mělo zavedení kultivace hemopoetických buněk *in vitro*.

Podstatou klonálního charakteru kultivace je imobilizace pluripotentních nebo unipotentních buněk v kultivačním médiu, do kterého je přidán specifický stimulační faktor (48). Pluripotentní a unipotentní buňky dávají základ vzniku buněčných klonů, které se dále diferencují ve zralé buňky, jež identifikujeme buď jako kolonie (tj. v případě, že shluk buněk je větší než 50 buněk), nebo jako "clusters" (tj. v případě, že shluk buněk je větší než 3 a menší než 50 buněk - viz obr. 2). Podle charakteru kolonie,



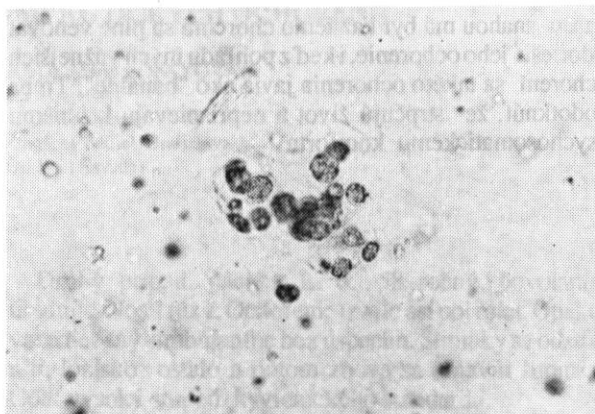
Obr. 2a
Kolonie buněk vytvořená z CFU-GM *in vitro* po 7 dnech kultivace
Zvětšeno 80x



Zvětšeno 450x

resp. "clusters" (velikost, zbarvení, zastoupení už diferencovaných buněk), můžeme určit původní pluripotentní prekurzorovou hemopoetickou buňku (CFU-GEMM), nebo unipotentní progenitorovou buňku (CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-Meg, CFU-Eo). Při proliferaci a následné diferenciaci hemopoetických buněk v organismu má důležitou roli hemopoetické indukční mikroprostředí (HIM) (59) a humorální působky označované jako růstové faktory (granulopoetin, erytropoetin, trombopoetin) a interleukiny (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7) (19, 29, 44, 51, 53, 54). Sledování působení růstových faktorů v organismu na buněčné a molekulární úrovni (15) má svůj význam pro pochopení nejenom podstaty proliferace, ale i diferenciaci hemopoetických buněk. Proces diferenciaci hemopoetických buněk a

působení růstových faktorů na jednotlivé řady hemopoetických buněk popisuje obr. 3 a tab. 1.



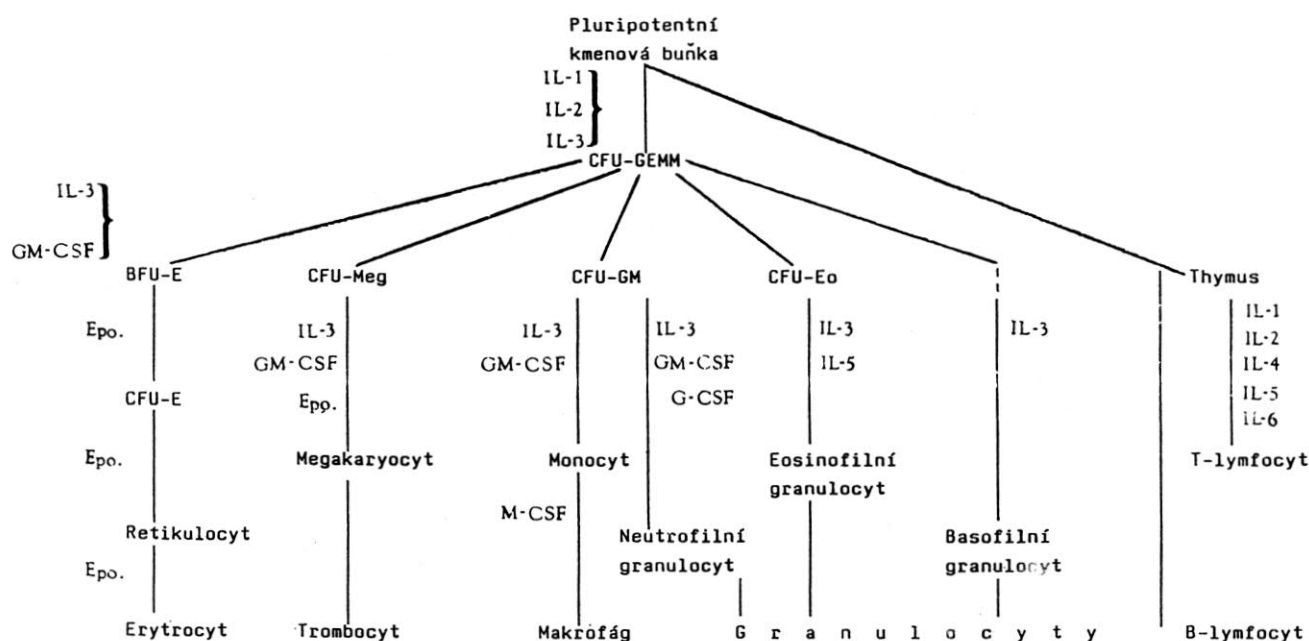
Obr. 2 b
Shluk buněk "clusters" vytvořený z CFU-GM *in vitro* po 7 dnech kultivace
(zvětšeno 450x)

Tabulka 1

Přehled růstových faktorů a jejich působení na buňky v lidském organismu

(Upraveno podle: Laver, J. - Moore, M. A. S., 1989)

Označení růstového faktoru	Buňky tvořící růstový faktor	Působení růstového faktoru
IL-1 (alfa a beta)	Makrofágy, epiteloidní buňky, endotelové buňky, fibroblasty	Indukce dalších interleukinů, indukce produkce CSF u některých buněk, cílové působení na lymfoidní a jiné nehemopoetické buňky
IL-2	Aktivované T-lymfocyty, makrofágy, fibroblasty	Diferenciace B a T lymfocytů, stimulace NK-buněk, indukce produkce dalších lymfokinů
IL-3 (Multi-CSF)	Aktivované T-lymfocyty, astrocyty	Stimulující faktor pro progenitorové buňky granulocytární, makrofágové, erytroidní a megakaryocytární řady
IL-4	T-lymfocyty	Stimulace proliferace T a B lymfocytů, potencování sekrece IgG
IL-5	Aktivované T-lymfocyty	Indukce proliferace a diferenciaci eosinofilních granulocytů, potencování sekrece IgM a IgA, při diferenciaci T-lymfocytů
IL-6	Fibroblasty, makrofágy a některé nádorové buněčné linie, T-lymfocyty	Indukce diferenciaci B-lymfocytů, zvyšování sekrece imunoglobulinů B-lymfocytů, uplatnění při diferenciaci T-lymfocytů
IL-7	Buňky kostní dřeně, které vytvářejí hemopoetické stroma	Podporování účinku růstových faktorů
GM-CSF	Monocyty, fibroblasty, endoteliální buňky	Faktor stimulující progenitory pro neutrofilní granulocyty a makrofágy, dále je třeba pro diferenciaci progenitorů erytroidní a megakaryocytární řady. Maturace granulocytů a makrofágů, stimulace leukemických progenitorů <i>in vitro</i>
G-CSF	Monocyty, fibroblasty, endoteliální buňky	Stimuluje tvorbu granulocytárních kolonií a maturaci granulocytů, stimuluje proliferaci leukemických progenitorů <i>in vitro</i>
M-CSF	Monocyty, fibroblasty, endoteliální buňky	Stimuluje tvorbu monocytárních kolonií a maturaci monocytů v makrofágy
Erytropoetin	Buňky ledvin a jater	Stimuluje proliferaci erytroidních progenitorů, je potřebný k diferenciaci a konečné maturaci buněk v erytrocyty. Indukce tvorby hemoglobinu



Obr. 3 Schéma působení růstových faktorů v procesu diferenciaci hemopoetických buněk ve zralé krevní buňky

(Upraveno podle: Mortensen, B. T. et al., 1989)

resp. "clusters" (velikost, zbarvení, zastoupení už diferencovaných buněk), můžeme určit původní pluripotentní prekurzorovou hemopoetickou buňku (CFU-GEMM), nebo unipotentní progenitorovu buňku (CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-Meg, CFU-Eo). Při proliferaci a následné diferenciaci hemopoetických buněk v organismu má důležitou roli hemopoetické indukční

zejících z BFU-E jsou kolonie dostatečně velké s velkým počtem erytroblastů, u CFU-E jsou kolonie podstatně menší. Z toho plyne, že s postupující zralostí erytroidních progenitorů se zmenšuje velikost kolonie a zkracuje se doba potřebná k jejímu vzniku (12).

Nezbytnou složkou pro růst erytroidních kolonií je erythropoetin (kyselý glykoprotein - hormon, který řídí proliferaci a terminální diferenciaci erytroidních buněk (12, 34). Dalším důležitým faktorem, který se uplatňuje zvláště na počátku erytropoézy, je IL-3/multi-CSF (15, 52).

Hladina erythropoetinu může být in vivo u myši zvýšená krvácením a potlačená hypertransfúzí, což může vést ke stavu, kdy množství CFU-E v kostní dřeni stoupá během 3 dnů po krvácení, zatímco při hypertransfúzi stejným způsobem klesá. Množství BFU-E se mění opačným směrem (59). In vitro kultivace progenitorových buněk byla využita při diagnostice a objasnění patogeneze, např. u polycytemia vera (40).

1. Pluripotentní prekurzorová buňka krvetvorby

Kolonie vytvořené z pluripotentní prekurzorové buňky, které obsahovaly buňky více krevních řad, byly popsány v klonálních kulturách buněk fetálních jater myši (36). Za krátkou dobu byly popsány lidské kolonie, a to z buněk jak kostní dřeni, tak i periferní krve (16). Při bližší analýze smíšených kolonií bylo zjištěno, že tyto kolonie jsou složeny z buněk jak erytroidní, granulocytární, megakaryocytární, tak i makrofágové řady (17), proto byla prekurzorová buňka, která vytvářela základ k tvorbě těchto kolonií, označena jako CFU-GEMM (mix-CFC) (37). Pro růst smíšených kolonií in vitro je nezbytná stimulace buněk lykoproteinem označovaným jako IL-3/multi-CSF (1, 35) a pro erytroidní složku v těchto koloniích je zapotřebí erythropoetinu (20, 48).

2. Unipotentní (progenitorové) buňky krvetvorby

2.1 Erytroidní progenitorové buňky

Z pluripotentní prekurzorové buňky mohou vzniknout postupnou diferenciací erytroidní progenitorové buňky označované jako BFU-E (raná erytroidní progenitorová buňka) (3, 25, 33) nebo dále CFU-E (pozdní erytroidní progenitorová buňka) (60, 72). Výsledkem jejich růstu jsou kolonie různé morfologie. Zatímco u kolonií vychá-

2.2 Progenitorové buňky pro neutrofilní granulocyty a makrofágy

Progenitorové buňky této řady byly prvními hemopoetickými buňkami úspěšně kultivovanými v klonálním systému in vitro (63, 64). Vzniklé kolonie z této progenitorové buňky obsahují jen granulocyty, nebo jen makrofágy, ale část vzniklých kolonií může být i smíšených. Pro vznik kolonií granulocytů a makrofágů in vitro je zapotřebí stimulace specifickým glykoproteinem označovaným jako GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (1, 6, 9, 50). Tento růstový faktor mimo jiné stimuluje také iniciální proliferaci progenitorových buněk pro erytroidní řadu, řadu eosinofilních granulocytů, megakaryocytů a pluripotentních prekurzorů, aniž mění průběh jejich buněčné diferenciaci. Pro vznik kolonií

zralých buněk je zapotřebí náležitých specifických stimulatorů (50). Další analýzou růstových faktorů, které se uplatňují při tvorbě granulocytárních a makrofágových kolonií, byly popsány stimulující faktory pouze pro tvorbu makrofágových kolonií označených jako M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (9, 19) a růstový faktor pro tvorbu kolonií neutrofilních granulocytů G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (19, 28). V současné době byly syntetizovány a popsány také rekombinantní růstové faktory pro neutrofilní granulocyty a makrofágy (7, 39, 61).

2.3 Progenitorové buňky pro megakaryocyty, eosinofilní a basofilní granulocyty

Ke kultivaci progenitorových buněk těchto řad se používají stejné podmínky a stimulatory růstu jako pro kultury pluripotentních prekurzorových buněk (37, 43, 48). První kolonie vzniklé in vitro z CFU-Meg obsahovaly asi 20 megakaryocytů (49). Při kultivaci je potřebné přidat sérum obsahující zvýšenou koncentraci trombopoetinu, který potencuje tvorbu těchto kolonií i v podmínkách in vitro. Zvýšenou hladinu potřebných stimulačních faktorů je možno dosáhnout např. přidáním PHA-LCM (phytohemagglutinin - stimulated leukocyte - conditioned medium), tj. média z kultury lidských leukocytů stimulovaných rostlinným lektinem z *Phaseolus vulgaris* (47). Megakaryocyty vzniklé v kultuře z CFU-Meg jsou schopny plné maturace, jsou normálně hyperploidní a uvolňují trombocyty (49).

Při tvorbě a další diferenciaci progenitorových buněk jak pro eosinofilní, tak i pro basofilní granulocyty je zapotřebí růstového faktoru GM-CSF. Pro další diferenciaci v eosinofilní granulocyty je zapotřebí IL-3 a IL-5 a pro basofilní granulocyty IL-3 (9).

3. Využití klonálních metod kultivace hemopoetických pluripotentních a unipotentních buněk in vitro při poruchách krvetvorby

Kromě zásadního přínosu pro poznávání fyziologie a patofyziologie krvetvorby umožňují klonální metody detekce hemopoetických buněk pochopit patogenezi a zpřesnit klasifikaci některých krevních chorob. Kultivace progenitorových buněk in vitro přispívá k diagnostice, prognostice nebo k monitorování průběhu onemocnění a léčby. K těmto sledováním se používá kultivace jak pluripotentních prekurzorových buněk (CFU-GEMM), tak i unipotentních - progenitorových buněk (CFU-E, BFU-E, CFU-GM a CFU-Meg).

3.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

Společnou charakteristikou hemopoetických buněk nemocných s AML je neschopnost vytvářet kolonie normální velikosti při kultivacích těchto buněk in vitro jak z kostní dřeně, tak i z periferní krve. Vyplyvá to jednak z klonálního charakteru onemocnění a jednak z různě pozmeněné aktivity růstových faktorů (10, 45). V klonálních kulturách kostní dřeně neléčených pacientů s

AML a u pacientů v relapsu tohoto onemocnění mohou být pozorovány následující obrazy:

- nepřežívají žádné buňky
 - perzistují jednotlivé buňky a nedochází k tvorbě shluků
 - objeví se malé shluky buněk (3 - 19 buněk) - "microclusters"
 - tvoří se velké shluky buněk (20 - 39 buněk) - "macroclusters"
 - vedle shluků se může tvořit i malé množství kolonií.
- V kultuře je abnormálně vysoký počet shluků v poměru k počtu kolonií (55).

Je známo, že existuje určitá korelace mezi typem růstu progenitorů in vitro a pozdějším navozením remise u pacientů s AML (14, 59, 76). Když je u pacientů s AML navozena úplná remise, zcela se obnoví normální růst kolonií CFU-GM ze dřeně. Ukázalo se, že kultivace progenitorových buněk CFU-GM má význam i v předvídání relapsu onemocnění (38, 56). Klonální kultivace má svoje opodstatnění také v období před zahájením indukční léčby a v průběhu této léčby, při monitorování reparace kostní dřeně (77). Samozřejmě je nutno mít na mysli, že všechny údaje získané klonálními technikami jsou založeny na růstu buněk in vitro, což nemusí beze zbytku odrážet poruchy krvetvorby in vivo (41, 46).

3.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

U pacientů s ALL je charakter růstu kolonií a shluků (clusters) granulocytů a makrofágů zachován. Monitorováním granulopoetické aktivity (42) a kultivací progenitorů CFU-GM jak z kostní dřeně, tak i z periferní krve (11, 31) u ALL ukázaly, že právě klonální kultivace může přispět jak k diagnostice remise, tak i relapsu onemocnění. Nejvýznamnější se však jeví monitorování reparace kostní dřeně pomocí CFU-GM, BFU-E a CFU-E po cytostatické léčbě. Své místo zde má kultivace pluripotentních prekurzorových buněk (CFU-GEMM) (31) a progenitorových buněk erytroidní řady z periferní krve (11). V případě, že je počet kolonií z kostní dřeně snížen, je příčinou tohoto jevu pravděpodobně infiltrace kostní dřeně blastickou populací buněk. Naproti tomu může být v periferní krvi počet buněk tvořících kolonie z CFU-GM značně zvýšen (31).

3.3 Chronická myeloidní leukémie (CML)

U pacientů s CML v chronické fázi bylo zjištěno zmnožení pluripotentních prekurzorů (27), časných erytroidních progenitorů (BFU-E) i pozdních progenitorů (CFU-E) v kostní dřeni i v periferní krvi (70, 77). Nejnapadnější změnou u CML je zvýšení počtu CFU-GM v periferní krvi oproti kostní dřeni (23). V remisi se počty hemopoetických buněk normalizují. Důležitým nálezem však je, že již několik měsíců před hematologickými projevy blastického zvratu lze zjistit změnu typu růstu progenitorových buněk. Výsledky kultivace jsou obdobné jako u pacientů s AML (71). Určitým přínosem pro zkvalitnění diagnostické kultivace progenitorových buněk in vitro je také postup, jehož podstatou je rozizolování buněk a sledování tvorby kolonií v jednotlivých generacích (77).

3.4 Myelodysplastický syndrom (MDS)

Kultivace progenitorových buněk in vitro pro granulocyty a makrofágy v kostní dřeni a periferní krvi nemocných s MDS je považováno za důležité pomocné vyšetření pro další klasifikaci a určení prognózy nemoci (73). I podle našich zkušeností je zřejmé, že kultivace CFU-GM in vitro je důležitá při monitorování a včasné diagnostice možné blastické transformace MDS v akutní leukémii.

MDS představuje nehomogenní skupinu onemocnění (5), kterou můžeme rozdělit následovně:

- refrakterní anémie
- refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
- refrakterní anémie s nadbytkem blastů
- chronická myelomonocytární leukémie
- refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci

Podle současných patogenetických představ (68) dochází u MDS k poškození hemopoetické kmenové buňky a vzniku geneticky nestabilních progenitorových buněk. Při kultivačním vyšetření CFU-GM z kostní dřeni pacientů s MDS vznikají změny, které jsou podobné jako u pacientů s AML. Vyšetření hemopoetických pluripotentních prekurzorových a progenitorových buněk (21, 69) přináší cenné a prognosticky závažné informace o funkčním stavu krvetvorby pacientů s MDS, kdy je možno do určité míry předpokládat zvrát onemocnění v akutní leukémii (22, 24). K patogenезi MDS přispěly také studie kultivace progenitorů CFU-GM, které srovnávaly CML a MDS (26).

3.5 Polycytemia vera

V kostní dřeni i periferní krvi pacientů s pravou polycytémií byly nalezeny zvýšené počty kolonií vycházejících z CFU-GEMM (2, 18). Bylo zjištěno, že erytroidní progenitory patologického buněčného klonu jsou na erytropoetinu závislé, ale mají k němu značně zvýšenou citlivost (8, 13, 78). Zjištění erytroidních progenitorových buněk s vysokou citlivostí k erytropoetinu může sloužit k odlišení jednak pravé polycytémie od ostatních myeloproliferativních poruch krvetvorby a může v podstatné míře přispět k další prognóze onemocnění (40, 67).

3.6 Idiopatická myelofibróza

U myelofibrózy je počet progenitorových buněk v kostní dřeni snížen (30, 62, 67). V periferní krvi se však vyskytují CFU-GM v množství asi 50krát vyšším. Podobně to platí i pro BFU-E (59).

3.7 Aplastická anémie

Toto onemocnění představuje snížený a omezený přísun buněk z hemopoeticky aktivních tkání. Ukázalo se, že představuje defekt v proliferaci nebo diferenciaci pluripotentních hemopoetických kmenových buněk determinovaných progenitorových buněk CFU-GM a BFU-E (12, 32).

4. Kultivace progenitorových buněk krvetvorby in vitro v naší praxi

Po zavedení metody klonální kultivace progenitorových buněk (CFU-GM, BFU-E a CFU-E) z kostní dřeni a periferní krve in vitro u hematologických nemocných jsme získali první zkušenosti u 45 vyšetřovaných osob (I. a II. interní klinika FN a dětská klinika FN v Hradci Králové). Nejtypičtější kultivační nálezy z kostní dřeni a periferní krve jsme shrnuli do tabulky 2. Schéma kultivace progenitorových buněk in vitro jsme rozšířili a doplnili u některých hematologických onemocnění takto:

4.1 Akutní myeloidní leukémie

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z kostní dřeni a periferní krve u nově diagnostikovaných pacientů před zahájením cytostatické léčby;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM z kostní dřeni 15. až 20. den po ukončení cytostatické kúry - sledování reparace kostní dřeni, její kvantitativní i kvalitativní stránky;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM z kostní dřeni a periferní krve jako jeden z důležitých ukazatelů pro posouzení dosažené remise;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM z periferní krve (eventuálně podle potřeby z kostní dřeni) při včasné diagnostice relapsu onemocnění.

4.2 Akutní lymfoblastická leukémie

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z kostní dřeni a periferní krve u nově diagnostikovaných pacientů před zahájením cytostatické léčby;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM z kostní dřeni 15. až 20. den po ukončení cytostatické kúry - sledování reparace kostní dřeni;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z kostní dřeni a periferní krve při určování dosažené remise.

4.3 Chronická myeloidní leukémie

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z kostní dřeni a periferní krve u nově diagnostikovaných pacientů;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM při včasné diagnostice akcelerace, resp. blastického zvrátu; toto vyšetření provádět z periferní krve, v případě pozitivního kultivačního nálezu doplnit o kultivaci z kostní dřeni;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM z periferní krve a kostní dřeni při sledování reparace kostní dřeni.

4.4 Myelodysplastický syndrom

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z kostní dřeni a periferní krve u nově diagnostikovaných, ale i u pacientů přicházejících pro novou progresi onemocnění;
- vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a

CFU-E u pacientů, kde se předpokládá zvrát onemocnění v akutní leukémii (potom dále podle 4.1).

4.5 Polycytemia vera

- Vyšetření progenitorových buněk BFU-E a CFU-E z periferní krve za přítomnosti a nepřítomnosti erythropoetinu;
- vyšetření progenitorových buněk BFU-E a CFU-E při určování dosažené remise onemocnění.

4.6 Idiopatická myelofibróza

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z periferní krve a kostní dřeně u nově diagnostikovaných pacientů - následovně sledovat další vývoj a prognózu onemocnění.

4.7 Aplastická anémie

- Vyšetření progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-E z periferní krve a kostní dřeně u nově diagnostikovaných pacientů - sledování nastupující reparace kostní dřeně.

4.8 Kultivace progenitorových buněk k určování viability kostní dřeně při autologních transplantacích

4.9 Kultivace progenitorových buněk při monitorování léčby pomocí růstových faktorů (IL-3, GM-CSF, G-CSF a erythropoetinu) a vhodnosti jejich použití pro normalizaci krvetvorby

Souhrn

Od prvního průkazu existence kmenových buněk krvetvorby ve slezině ozářených myši v r. 1961 došlo k podstatnému rozvoji kultivačních metodik in vitro. Tyto metody přispěly k rozšíření znalostí o fyziologii i patofyziologii krvetvorby. Jejich využívání dostalo své opodstatnění také v klinické praxi. Kultivace progenitorových buněk krvetvorby z kostní dřeně a periferní krve se v klinické hematologii využívá k stanovení přesné diagnózy, prognózy, sledování léčby a včasné diagnostice relapsu nebo blastického zvrátu onemocnění.

Autoři diskutují o možnostech využití kultivačních metodik u leukémií, polycytemia vera, myelodysplastického syndromu, myelofibrózy a dřeňového útlu, kde již získali první vlastní zkušenosti. Na základě těchto výsledků vypracovali optimální vyšetřovací schéma pro oddělení intenzivní hematologické péče.

Literatura

1. ANDREEFF, M. - WELTE, K.: Hematopoietic colony-stimulating factors. *Seminare in oncology*, 16, 1989, s. 211-229.
2. ASH, R. C. et al.: In vitro studies of human pluripotential hematopoietic progenitors in polycythaemia vera. Direct evidence of stem cell involvement. *J. Clin. Invest.*, 69, 1982, s. 112-118.

Tabulka 2

Nejtypičtější kultivační nálezy z kostní dřeně a periferní krve in vitro u některých vybraných hematologických onemocnění

In vitro Onemocnění	CFU - GM				BFU - E a CFU - E			
	Kostní dřeň		Periferní krev		Kostní dřeň		Periferní krev	
	Kolonie	"Clusters"	Kolonie	"Clusters"	Kolonie	CFU-E	Kolonie	CFU-E
Akutní myeloidní leukémie	↓ ↓	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↑	↓	↓	↓ ↑	↓ ↑
Akutní lymfatická leukémie	↓	↓	↑	↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
Chronická myeloidní leukémie	↓	↓	↑ ↑	↑ ↑	↑	↑	↑	↑
Myelodysplastický syndrom	↓ ↓	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↑	↓	↓	↓	↓
Polycytemia vera Bez Erytrop./S Erythropoetinem	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑
Idiopatická myelofibróza	↓	↓	↑ ↑	↑ ↓	↓	↓	↑ ↑	↑ ↑
Aplastická anémie	↓	↓	↓ ↑	↓ ↑	↓	↓	↓ ↑	↓ ↑

3. AXELRAD, A. A. et al.: Properties of cells that produce erythroid colonies in vitro. In: Proc. of the 2nd intern. workshop on hemopoiesis in culture. W. A. Robinson (ed), Washington, US government printing office, 1974, s. 226-234.
4. BASERGA, A. - ZAVAGLI, G.: Ferrata's stem cells: an historical review on hemocytoblasts and hemohistoblasts. *Blood Cells*, 7, 1981, s. 537-542.
5. BENNETT, J. M. et al.: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Brit. J. Haematol.*, 51, 1982, s. 189-199.
6. BURGESS, A. W. - METCALF, D.: The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, 56, 1980, s. 947-958.
7. CARACCILO, D. et al.: Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of GM-CSF for optimal stimulation of human macrophage colony formation in vitro. *J. Exp. Med.*, 166, 1987, s. 1851-1860.
8. CASADEVALL, N. et al.: Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. *Blood*, 59, 1982, s. 447-451.
9. CLARK, S. - KAMEN, R.: The human hematopoietic colony stimulating factors. *Science*, 236, 1987, s. 1229-1237.
10. DEMETRI, G. D. - GRIFFIN, J. D.: Hemopoietins and leukemia. *Hematology-oncology clinics of North Am.*, 3, 1989, s. 535-553.
11. DUTTERA, M. J. et al.: Serial in vitro bone marrow culture in acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 42, 1973, s. 687-699.
12. EAVES, A. C. - EAVES, C. J.: Erythropoiesis in culture. *Clin. Haematol.*, 13, 1984, s. 371-391.
13. EAVES, C. J. - EAVES, A. C.: Erythropoietin (Ep) dose response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human marrow and in patients with polycythemia vera. *Br. J. Haematol.*, 52, 1978, s. 1196-1210.
14. ERIDANI, S. et al.: Haematopoietic patterns of acute leukemia in remission: CFU-E and CFU-GM colony formation. *Acta Haematol. (Basel)*, 70, 1983, s. 11-18.
15. FARRAR, W. L. et al.: Molecular events associated with the action of haemopoietic growth factors. *J. Cell. Sci. Suppl.*, 10, 1988, s. 243-255.
16. FAUSNER, A. A. - MESSNER, H. A.: Granulocytic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood*, 52, 1978, s. 1243-1248.
17. FAUSNER, A. A. - MESSNER, H. A.: Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblast. *Blood*, 53, 1979, s. 1023-1027.
18. FAUSNER, A. A. - MESSNER, H. A.: Pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) in polycythemia vera: analysis of erythropoietin requirement and proliferative activity. *Blood*, 58, 1981, s. 1224-1227.
19. GABRILOVE, J. L.: Introduction and overview of hematopoietic growth factors. *Semin. Hematol.*, 26, 1989, s. 1-4.
20. GANSER, A. et al.: In vivo effects of recombinant human erythropoietin on circulating human hemopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 17, 1989, s. 433-435.
21. GEISSLER, K. et al.: Deficiency of pluripotent hemopoietic progenitor cells in myelodysplastic syndromes. *Blut*, 57, 1988, s. 45-49.
22. GEARY, C. G.: Pre-leukemic myelodysplasia. *Hematol. Reviews*, 2, 1988, s. 131-161.
23. GOLDMAN, J. M. et al.: Circulating granulocytic and erythroid progenitor cells in chronic granulocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 46, 1980, s. 7-13.
24. GREENBERG, P. L.: The smoldering myeloid leukemic states: clinical and biologic features. *Blood*, 61, 1983, s. 1035-1044.
25. GREGORY, C. J. - EAVES, A. C.: Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony response. *Blood*, 49, 1977, s. 855-864.
26. GRONDA, M. et al.: In vitro change in CFU-GM in chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Its implication in the dysfunction of the hematologic barrier. *Sangre (Barc.)*, 33, 1988, s. 277-281.
27. HARA, H. et al.: Pluripotent hemopoietic precursors in vitro (CFU-mix) in aplastic anemia. *Exp. Hematol.*, 8, 1980, s. 1165-1171.
28. HARA, H. et al.: Pluripotent, erythrocytic and granulocytic hemopoietic precursors in chronic granulocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 9, 1981, s. 871-877.
29. HARA, H. - NAMIKI, M.: Mechanism of synergy between granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in colony formation. *Exp. Hematol.*, 17, 1989, s. 816-821.
30. HIBBIN, J. A. et al.: Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.*, 57, 1984, s. 495-503.
31. CHERVINSKY, D. S. et al.: The significance of the ratio of blood to marrow hematopoietic progenitors (CFU-GM and CFU-GEMM) in relation to disease of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 13, 1989, s. 483-489.
32. CHUDOMEL, V. et al.: Progenitor white cells and serum inhibitors in patients with bone marrow aplasia. *Folia Haematol. (Leipzig)*, 106, 1979, s. 358-364.
33. ISCOVE, N. N. - SIEBERG, F.: Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hematol.*, 3, 1975, s. 32-43.
34. ISCOVE, N. N.: The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet.*, 10, 1977, s. 323-334.
35. ISCOVE, N. N. et al.: Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension culture in response to IL-1 and IL-3. *J. Immunol.*, 143, 1989, s. 2332-2337.
36. JOHNSON, G. R. - METCALF, D.: Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1977, s. 3879-3882.
37. JOHNSON, G. R.: Haemopoietic multipotential stem cells in culture. *Clin. Haematol.*, 13, 1984, s. 309-327.
38. JEHN, U. - WACHOLZ, K.: CFU-GM colony formation of peripheral blood and bone marrow in adult acute leukemia at presentation, during remission and at relapse. *Int. J. Cell. Cloning*, 3, 1985, s. 199-213.
39. LAVER, J. - MOORE, M. A. S.: Clinical use recombinant human hemopoietic growth factors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 1989, s. 1370-1382.
40. LEMOINE, F. et al.: A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. *Blood*, 68, 1986, s. 996-1002.
41. MARIE, J. P.: Culture of clonogenic stem cells in human acute myeloid leukemia. *Presse Med.*, 16, 1987, s. 2059-2067.
42. MANGALIK, A. et al.: Granulopoietic studies in acute lymphoblastic leukemia. *Blut*, 34, 1977, s. 77-88.
43. MAZUR, E. M. et al.: Modest stimulatory effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 15, 1987, s. 1128-1133.
44. MAZUR, E. M. - COHEN, J. L.: Basic concepts of hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. *Clin. Pharm. Ther.*, 46, 1989, s. 250-256.
45. MC CULLOCH, E. A. et al.: Normal and leukemic hemopoiesis compared. *Cancer*, 42, 1978, s. 842-853.
46. MC CULLOCH, E. A. et al.: Stem cell renewal and differentiation in acute myeloblastic leukemia. *J. Cell Sci. Suppl.*, 10, 1988, s. 67-81.
47. MESSNER, H. A. et al.: The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow. *J. Cell Physiol.*, 1, 1982, s. 45-51.
48. MESSNER, H. A.: Human stem cells in culture. *Clin. Haematol.*, 13, 1984, s. 393-404.
49. METCALF, D. et al.: Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 72, 1975, s. 1744-1748.
50. METCALF, D. et al.: Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells. *Blood*, 55, 1980, s. 138-147.
51. METCALF, D.: The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell*, 43, 1985, s. 5-6.
52. METCALF, D.: Multi-CSF-dependent colony formation by cells of a murine hemopoietic cell line. Specificity and action of multi-CSF. *Blood*, 65, 1985, s. 357-362.
53. METCALF, D.: The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 67, 1986, s. 257-267.
54. MIGLIACCIO, G. et al.: In vitro differentiation of human granulocyte-macrophage and erythroid progenitors: Comparative analysis of the influence of recombinant human erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-3 in serum-supplemented and serum deprived cultures. *Blood*, 72, 1988, s. 248-256.
55. MOORE, M. A. S. et al.: Agar culture studies in 127 cases of untreated acute leukemia: The prognostic value of reclassification

- of leukemia according to in vitro growth characteristics. *Blood*, 44, 1974, s. 1-18.
56. MOORE, M. A. S.: Prediction of relapse and remission in AML way bone marrow culture criteria. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells*, 17, 1976, s. 109-124.
 57. MORTENSEN, B. T. et al.: Bone marrow culture and haemopoietic growth factors: Recent developments and current status. *Eur. J. Haematol.*, 42, 1989, s. 77-83.
 58. NEČAS, E.: Funkční organizace kmenových buněk krvetvorné tkáně. *Čs. Fysiol.*, 5, 1988, s. 401-423.
 59. NEUWIRT, J. - NEČAS, E.: Kmenové buňky a krevní choroby. Praha, Avicenum 1981.
 60. NIJKOF, W. - WIERENGA, P. K.: Isolation and characterisation of the CFU-E. *Exp. Hematol.*, 10, 1982, s. 307-323.
 61. OTTMAN, O. G. et al.: Proliferative effects of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) on highly enriched hematopoietic progenitor cells, in Neth, R., Gallo, R., Greaves, et al. (eds): *Modern trends in human leukemia VII*, Berlin, Springer-Verlag, 1987, s. 244-247.
 62. PARTANEN, S. et al.: Circulating haematopoietic progenitors in myelofibrosis. *Scand. J. Haematol.*, 29, 1982, s. 325-330.
 63. PIKE, B. L. - ROBINSON, W. A.: Human bone marrow colony growth in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 76, 1970, s. 77-84.
 64. PLUZNIK, D. H. - SACHS, L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue cultures. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 66, 1965, s. 319-324.
 65. PRCHAL, J. T. et al.: A common progenitor for myeloid and lymphoid cells. *Nature*, 274, 1978, s. 590-591.
 66. RICH, I. N.: The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: Sensing and responding to normal and pathophysiological signals. *Anticancer Res.*, 8, 1988, s. 1015-1040.
 67. ROBAK, T.: Antigenic characteristics of erythropoietin dependent and independent erythroid progenitors (BFU-E and CFU-E) in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis defined by monoclonal antibodies. *Arch. Imm. et Therap. Exp.*, 36, 1988, s. 733-745.
 68. RASKIND, W. H. et al.: Evidence for a multistep pathogenesis of a MDS. *Blood*, 63, 1984, s. 1318-1320.
 69. RUUTU, T. et al.: Erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. *Scand. J. Haematol.*, 32, 1984, s. 395-402.
 70. SHIK, L. Y. et al.: In vitro culture studies of blood and marrow cells in chronic myeloid leukemia at different phases of the disease. *Blut*, 57, 1988, s. 125-130.
 71. SPITZER, G. et al.: Significance of PHA-induced clonogenic cells in chronic myeloid leukemia and early acute myeloid leukemia. *Blood Cells*, 2, 1976, s. 149-159.
 72. STEPHENSON, J. R. et al.: Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1971, s. 1542-1546.
 73. TENNANT, G. B.: Undetectable peripheral blood CFU-GM as a prognostic indicator in myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.*, 12, 1988, s. 961-962.
 74. TILL, J. E. - MC CULLOCH, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 14, 1961, s. 213-222.
 75. TILL, J. E. - MC CULLOCH, E. A.: Haematopoietic stem cell differentiation. *Biochem. Biophys. Acta*, 605, 1980, s. 431-459.
 76. TILLY, H. et al.: Daily evaluation of circulating granulocyte-monocyte progenitors during bone marrow recovery from induction therapy in acute leukemia. *Leukemia Res.*, 10, 1986, s. 353-356.
 77. WANDL, V. et al.: Rapid decline of clonogenic hemopoietic progenitors in semisolid cultures of bone marrow sample derived from patients with chronic myeloid leukemia. *Int. J. Cell. Cloning*, 7, 1989, s. 314-321.
 78. ZANJANI, E. D. et al.: Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro. Dependence on erythropoietin. *J. Clin. Invest.*, 59, 1977, s. 841-848.

Klíčová slova: CFU-GM; BFU-E; CFU-E; Akutní leukémie; Chronická leukémie; Myelodysplastický syndrom; Polycythemia vera; Idiopatická myelofibróza; Aplastická anémie.