

616-001.28-036.11-089.843.018.46

KMENOVÉ BUŇKY KRVETVORBY VERSUS CYTOKINY

Doc. RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc., doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Úvod

Celotělové ozáření osob ionizujícím zářením v dávkách nižších než 10 Gy vede především k poškození kmenových buněk krvetvorby a rozvoji dřeňového syndromu nemoci z ozáření. Podíváme-li se do historie, první radiační nehoda, kde došlo k léčbě ozářených transplantací alogenní kostní dřeně, byla nehoda ve Vinče v Jugoslávii. Při této nehodě bylo během několika minut ozářeno 6 osob v dávkovém rozmezí 207–436 cGy. Profesor Mathé a spol. (13) podali ozářeným na vrcholu úbytku granulocytů v periferní krvi (27. až 36. den po ozáření) kostní dřeň v množství $10 \cdot 10^9$ buněk. K jejímu léčebnému efektu je těžké se vyjádřit, protože byla podána poměrně pozdě a dávky záření byly z dnešního pohledu nízké.

Druhou velkou radiační nehodou, kde bylo použito transplantace alogenní kostní dřeně, byla havárie černobylského jaderného reaktoru v roce 1986. Výběr ozářených k transplantaci byl proveden podle následujících kritérií (1):

- 1) obdržená dávka celotělového ozáření byla větší než 600 cGy,
- 2) nebylo diagnostikováno ireverzibilní toxické poškození jiných orgánů,
- 3) byl nalezen alespoň částečně HLA shodný dárce.

Pro 13 ozářených byl nalezen vhodný dárce kostní dřeně (5 - HLA identický, 8 - shoda nejméně v jednom haplotypu). Pouze **dva transplantovaní žili déle než 3 roky po nehodě**. Pět transplantovaných zemřelo brzy po transplantaci v důsledku rozsáhlých popálenin, tři zemřeli na intersticiální pneumonii, dva na GVHR (reakce štěpu proti hostiteli) a jeden na akutní selhání ledvin a akutní respirační onemocnění (ARDS). U obou dlouhodobě přežívajících štěp kostní dřeně působil jen dočasně, v poz-

dějším období byly přítomny pouze buňky příjemce. Tento fakt dokládá, že reziduální kmenové buňky krvetvorby nebyly zcela zničeny a v pozdějším období došlo k obnově endogenní hematopoézy. Přestože transplantace nebyla zcela nezbytná, zabránila dlouhému období neutropenie a infekce (2).

Není zcela jasné, proč byla léčba transplantací buněk kostní dřeně (BKD) u ozářených v Černobylu tak málo úspěšná. Pravděpodobně bylo podceněno radiační poškození dalších životně důležitých orgánů. Tuto domněnku podporuje fakt, že smrt byla ve většině případů spojena s akutním radiačním poškozením, pouze u dvou zemřelých byla prokázána GVHR. Dalším problémem je nalezení vhodného dárce - neshoda v hlavních HLA antigenech přináší velké riziko akutní a chronické GVHR. Dalším nepříznivým jevem byla skutečnost, že kostní dřeň byla transplantována relativně dlouho (6–16 dní) po ozáření. V případě časnější transplantace by bylo možno zkrátit období absolutní neutropenie a redukovat riziko infekce.

Během posledních deseti let od černobylské nehody došlo ještě k radiační nehodě v brazilské Goianě, běloruském Neshvizhu a izraelském Sorequ. Terapeutické přístupy v jednotlivých případech nastolily otázku nejlepší léčebné strategie. Profesor Gale a spol. (8) se domnívají, že pro úspěch v léčbě dřeňového syndromu nemoci z ozáření existují čtyři důležité body:

1. Stanovení dávky
2. Podpůrná péče
3. Hematopoetické růstové faktory
4. Transplantace kmenových buněk krvetvorby

Dávka záření

Přesné stanovení radiační expozice je důležité pro plán léčebné strategie.

Stanovení dávky vychází ze tří základních přístupů:

- 1) fyzikální dozimetrie
- 2) výpočtu
- 3) biologické dozimetrie

Přestože některé dozimetrické metody jsou velmi přesné, mají svoje podstatné limity. Jedním z nejpodstatnějších je nehomogenita expozice. Je také možno použít výpočet dávky pomocí počítačové simulace. Hlavním limitem této metody je, že dobře monitoruje radiační pole a méně osoby v tomto poli. Biologická dozimetrie je často nejdůležitějším indikátorem obdržené dávky záření. Avšak pomocí různých parametrů můžeme stanovit rozdílnou dávku. Je nutné odebrat vzorek krve brzy po ozáření, jednak pro možnou cytogenetickou analýzu a jednak pro použití k HLA typizaci.

Vedle celkové dávky je dobré znát dávkový příkon a uniformitu ozáření. Dávkový příkon je důležitý především z hlediska poškození jiných než hematologických tkání. Významným pomocníkem ke stanovení uniformity expozice je rozložení cytogenetických abnormalit mezi jednotlivé buňky. Uniformita je důležitá ke stanovení možnosti spontánní hematologické obnovy - např. v případě uniformního ozáření 15 Gy bude nutná transplantace kostní dřeně, zatímco v případě stínění jedné končetiny bude vhodnější podpůrná léčba.

Léčebná strategie

Léčba zahrnuje:

- 1) podpůrnou péči (prevence infekce, její léčba a transfuze)
- 2) hematologické růstové faktory
- 3) transplantace

Podpůrná léčba

Tato léčba je široce dostupná a má také významný poměr riziko/prospěch a je užívána u všech ozářených s rizikem poškození kostní dřeně. Není pochyb o vhodnosti izolace ozářeného s granulocytopenií v jednolůžkovém pokoji, případně více intenzivní izolaci v laminárním boxu. Riziko endogenních infekcí může být redukováno použitím antibiotik, která mění bakteriální flóru v gastrointestinálním traktu. Profesor Gale a spol. (8) doporučují fluorchinolony. Neexistují přesvědčivé údaje favorizující podání systémových antibiotik k prevenci infekce. Profesor McVittie v experimentech na letálně ozářených psech a opicích doporučuje aplikaci systémových antibiotik při poklesu počtu leukocytů v krvi pod $0,1 \times 10^9/l$ (11). Také z doporučení pro léčbu ozářených vypracovaném na závěr konference Vojenského radiobiologického institutu USA v Bethesda vyplynula vhodnost aplikace systémových antibiotik při poklesu počtu neutrofilních granulocytů pod $0,1 \times 10^9/l$ (3). Aktivaci latentních herpesvirových in-

fekcí může být předcházeno podáním acykloviru. Horečka nebo infekce musí být rychle léčeny. Je několik léčebných přístupů při podezření na bakteriální infekci zahrnujících aminoglykosidy nebo třetí generaci cefalosporinů a penicilin se širším spektrem působící i na *Pseudomonas aeruginosa*. Nebo se užívá jednosložková terapie cefalosporinovými antibiotiky třetí generace, která působí i na *Pseudomonas aeruginosa*, např. Cephaperazon (8). Podezření či dokumentované fungicidní onemocnění je léčeno konvenčně nebo amphotericinem opouzdřeným liposomy, který může mít při srovnatelné účinnosti menší toxicitu.

Riziko krvácení při hluboké trombocytopenii může být redukováno transfuzí trombocytů, které by měly být ozářeny (prevence přítomnosti lymfocytů). Při léčbě ozářených v Černobyli byly poprvé s úspěchem použity zmrazené alogenní trombocyty. Transfuze erytrocytů je doporučována podle nutnosti. Při léčbě ozářených z Černobyli se ukázalo, že spotřeba erytrocytů byla vyšší než předpokládaný odhad, z hlediska délky života erytrocytů. Zdá se, že ozáření vyvolává nepřímou destrukci erytrocytů.

Hematopoetické růstové faktory (HRF)

Rozhodnutí, zda použít HRF u ozářených je složitější vzhledem k tomu, že poměr rizika a prospěchu není tak dobře vyjádřen jako u podpůrné léčby. Převaha teoretických prací však dokumentuje, především na laboratorních zvířatech, že jejich použití je efektivní. Významné jsou dvě základní otázky:

- 1) Mají být použity HRF ihned po ozáření, nebo až po prodlevě? Gale a spol. doporučují první aplikaci co nejdříve po ozáření (8).
- 2) Který růstový faktor je nejlepší, a je-li jich více, jaké je nejvhodnější pořadí?

Nejsou to jednoduché otázky, protože některé faktory samotné i kombinace jsou toxické. Je nutné si uvědomit hlavní cíl, kterým je **urychlení obnovy granulocytů**, protože trombocyty mohou být nahrazeny trombocytární transfuzí. Další otázkou je, zda použít HRF stimulující obnovu primitivních KBK, nebo faktory stimulující více zadané prekurzory (schéma 1). V prvním pohledu se stimulace KBK zdá rozumná, neboť stimulace KBK povede v konečném efektu ke zvýšení počtu granulocytů a trombocytů v periferní krvi. Avšak bude-li interval mezi ozářením a periferní obnovou příliš dlouhý, mohou ozáření zemřít. Jestliže na druhé straně budeme stimulovat pouze zadané prekurzory, může se pokles KBK projevit až za týdny či měsíce po ozáření. Další otázkou je, zda v závislosti na dávce záření přežívá dostatečné množství kmenových buněk krvetvorby (KBK) pro obnovu funkce krvetvorby. Spornou otázkou není, zda jsou reziduálně poškozené KBK schopny stimulace, ale zdali produkce granulocytů a trombocytů bude obnovena rychle, aby ozáření mohli přežít.

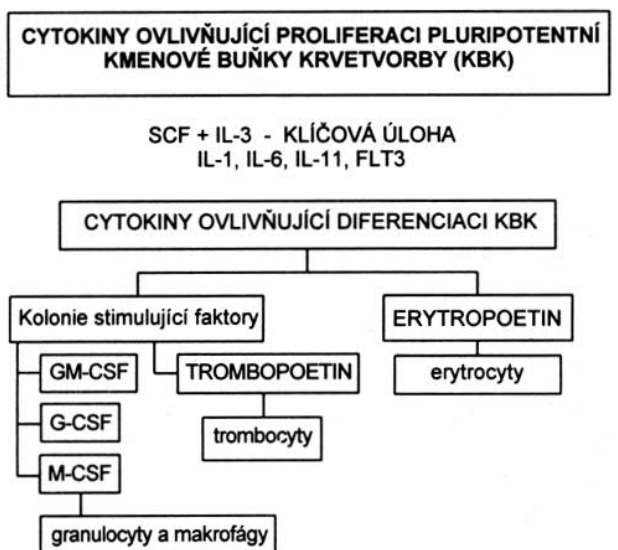


Schéma 1 Cytokiny ovlivňující proliferaci pluripotentní kmenové buňky krvetvorby (KBK)

Způsob léčby ozářených při radiačních nehodách vycházel především z výsledků dosažených na laboratorních zvířatech. V současné době jsou v klinickém užívání především dva faktory urychlující obnovu neutrofilních granulocytů v periferní krvi osob s aplazií kostní dřeně - granulocyty kolonie stimulující faktor (G-CSF) a granulocyty a makrofágy stimulující faktor (GM-CSF). Dalším faktorem, který prochází preklinickými zkouškami, je trombopoietin - stimulující tvorbu trombocytů a granulocytů, a interleukin 3 (IL-3). SCF (stem cell faktor) je také perspektivní látka, především z hlediska zajištění vhodného mikroprostředí pro obnovu KBK.

MacVittie a spol. (12) popsali, že G-CSF při aplikaci v dávce 10 µg/kg/den psům ozářeným absolutně letální dávkou 4 Gy 2 hodiny po ozáření a dále každý den v průběhu 21 dní po ozáření zajistil 100% přežití takto ozářených psů. Terapeutický efekt nebyl pozorován v případě, že G-CSF byl aplikován až od 7. dne po ozáření. Po ozáření vyšší dávkou - 4,5 Gy a léčbě GM-CSF od 1. dne po ozáření (100 µg/kg/den) přežilo 50 % psů. U všech skupin bylo použito podpůrné léčby (antibiotika, trombocyty, tekutiny, výživa). G-CSF a GM-CSF urychlují obnovu neutrofilních granulocytů a zvyšují jejich funkční kapacitu, mají však malý efekt na obnovu trombocytů. V kontrastu s tímto IL-3 má menší vliv na obnovu neutrofilů, ale urychluje také obnovu trombocytů (9).

Při léčbě ozářených při radiační nehodě byl GM-CSF poprvé použit v brazilské Goianě. Osm osob bylo protrahováno v průběhu 14 dní ozářeno gama zářením ¹³⁷Cs dávkou 2-8 Gy. GM-CSF v dávce 500 µg/m²/den byl aplikován i. v. od 21. dne po ozáření 1-11 dní. Čtyři pacienti zemřeli na gramnegativní sepsi. Jeden ozářený zemřel na začátku léčby. U ostatních došlo k vzestupu počtu granulocytů v periferní krvi, trombocyty a erytrocyty se neměnily. Během 18 měsíců po ozáření a léčbě byl počet

neutrofilů u třech přežívajících normalizován. U čtvrtého došlo ke granulocytopenii měsíc po léčbě GM-CSF. Butturini a Gale (4) na základě těchto výsledků se domnívají, že GM-CSF musí být podáván brzy po ozáření, aby došlo ke zkrácení období granulocytopenie a přežití ozářeného s minimálními vedlejšími účinky. Při další radiační nehodě v El Salvadoru byly tři osoby ozářeny dávkami 2,9 Gy, 3,7 Gy a 8 Gy. Byly léčeny GM-CSF 240 µg/m²/den i. v. až do vzestupu neutrofilů na 1,5x10⁹/l, tj. 9, 10 a 20 dní. Přesto ozářený dávkou 8 Gy zemřel 197. den po ozáření (15).

Farese a spol. (6) dokázali v experimentech na subletálně ozářených opicích, že společné podání IL-3 a GM-CSF vedlo k rychlejší obnově trombocytů a granulocytů než podání IL-3 a GM-CSF za sebou nebo podání pouze jednoho cytokinu. GM-CSF v kombinaci s IL-3 byl použit v léčbě ozářeného dávkou 10 Gy gama záření v Neshvizhu v Bělorusku. GM-CSF byl podáván i. v. 250 µg/m²/den 2. až 6. a 16. až 41. den po ozáření. IL-3 byl aplikován také i. v. 250 µg/m²/den 6.-41. den. Obnova neutrofilních granulocytů byla patrná 21. den po ozáření a retikulocytů o 10 dní později. 40. den po ozáření byl počet granulocytů v periferní krvi 5x10⁹/l. Ozářený zemřel 113. den po ozáření na pneumonii. Přestože ozářený zemřel, bylo pomocí léčby kombinace GM-CSF a IL-3 dosaženo rychlejší obnovy krvetvorby a z tohoto hlediska bylo použití HRF úspěšné.

Trombopoietin (25 µg/kg/den) aplikovaný opicím ozářeným celotělově dávkou 7 Gy od 1. do 18. dne prakticky zamezil vzniku trombocytopenie (<20 000/µl), která u neléčených trvala 12 dní, a zkrátil období neutropenie (<500/µl) z 15,5 na 12,3 dní. G-CSF (10 µg/kg/den) podávaný ve stejném časovém období také zkracoval období trombocytopenie (6,7 dní) a neutropenie (12,3 dny). Společné podání obou faktorů pak mělo nejlepší efekt - zamezilo se vzniku trombocytopenie a byla redukována doba neutropenie na 9 dní (7). Trombopoietin stimuloval v kostní dřeni nejen tvorbu CFU-Meg, ale také všech dalších kmenových buněk, CFU-GEMM, CFU-GM a BFU-E. Tento multilineový efekt může být vysvětlen tím, že megakaryocyty v kostní dřeni jsou schopny secernovat cytokiny (IL-3, IL-6, IL-1 a GM-CSF), které pak ovlivňují proliferaci a diferenciaci dalších linií.

Při řadě radiačních nehod nejsou v důsledku ozáření zničeny všechny kmenové buňky krvetvorby, protože nedošlo k rovnoměrnému ozáření organismu a část kostní dřeně nebyla ozářena tak vysokou dávkou záření, aby byly zničeny všechny kmenové buňky krvetvorby v kostní dřeni. Výsledky radiobiologických experimentů i klinické zkušenosti z několika radiačních nehod ukazují, že terapie pomocí růstových faktorů stimuluje kmenové buňky krvetvorby a zkracuje období aplazie. Včasná podání HRF po nehodě je nutné, vzhledem ke zkrácení období neutropenie, kdy jsou ozáření velmi citliví k infekčním onemocněním (15). Získané poznatky

vedou k předpokladu, že HRF jsou přínosem pro léčbu dřeňového syndromu nemoci z ozáření a nepředstavují pro ozářeného prakticky žádné riziko. Jejich podávání by však mělo být omezeno na ozářené, u nichž se na základě diagnostiky předpokládá vývoj středního nebo těžkého poškození kostní dřeně.

Transplantace kmenových buněk krvetvorby

Existují dva základní důvody, proč je třeba uvažovat o transplantaci kmenových buněk krvetvorby:

- Předpoklad, že všechny KBK budou ozářením zničeny a obnova endogenní krvetvorby nebude možná. Je však velmi nepravděpodobné, že po takto vysokých dávkách by nebyly ireverzibilně poškozeny další orgány, např. plíce a gastrointestinální trakt.
- Pravděpodobnější je situace, kdy malá část KBK přežije ozáření, ale obnova granulocytů v periferní krvi nebude dostatečně rychlá, aby ozářený mohl přežít.

V obou případech je nutné provést transplantaci brzy po ozáření. Jak vyplývá z pokusů na zvířatech transplantace je úspěšná pouze v případě, je-li provedena brzy po ozáření. Obvykle je velmi obtížné nalézt odpovídajícího dárce v krátkém časovém intervalu po ozáření.

Tabulka 1

Transplantace KBK

autologní	- tkáňová banka (zmrazeno)
alogenní	- KBK z periferní krve po mobilizaci
	- KBK z kostní dřeně
	- KBK z pupečnickové krve

Z imunologického hlediska je **autologní** transplantace KBK samozřejmě nejvhodnější způsob transplantace. Musela by však být vytvořena banka KBK od osob s velkým rizikem ozáření. Druhou možností, která však není dostatečně prozkoumána, je možnost vyplavení KBK z kostní dřeně do periférie v případě nerovnoměrného ozáření. Těchto buněk však je málo. Jejich možné použití závisí na možnosti expanze ex vivo pod vlivem vhodné kombinace cytokinů.

Alogenní transplantace kostní dřeně představuje pro ozářeného velké riziko. Největší zkušenosti s použitím tohoto způsobu léčby jsou z léčby ozářených v Černobylu. Z důvodů nalezení vhodného dárce byla transplantace provedena pozdě, 6.-16. den po ozáření. Nebyl nalezen HLA identický dárce pro všechny transplantované. Rozsáhlé radiační i termické popáleniny situaci velmi komplikovaly a někteří ozáření zemřeli brzy po transplantaci, kdy se efekt transplantované kostní dřeně ještě nemohl projevit. Jako další významné riziko se ukazuje

GvHR a toxicita látek, které je nutno podávat pro připojení transplantátu.

Během posledního desetiletí od černobylské havárie bylo dosaženo významných pokroků při transplantaci kmenových buněk krvetvorby. Jedná se především o nalezení alternativních zdrojů kmenových buněk krvetvorby. Nejvýznamnějším zdrojem jsou KBK izolované z periferní krve. Lze je použít jak při autologní, tak při alogenní transplantaci. Výhodou tohoto způsobu je, že k odběru není třeba anestezie. Druhou významnou výhodou je, že obnova krvetvorby i imunitních funkcí je podstatně rychlejší než u nestimulované kostní dřeně. Je to důsledek mobilizace pomocí HRF, která převede KBK z kostní dřeně do cirkulace. V případě, že použijeme k transplantaci kostní dřeň po mobilizaci cytokiny, je rychlost obnovy krvetvorby i imunitních funkcí srovnatelná s transplantací PKB. Je velmi těžké určit jasný rozdíl mezi PKB a BKD, protože kostní dřeň vždy obsahuje směs krevních a dřeňových elementů a je pravděpodobné, že cytokiny ovlivňují populaci buněk odpovědných za rychlou obnovu krvetvorby jak v periferní krvi, tak v kostní dřeně. Obvykle je k mobilizaci užíván G-CSF a KBK jsou odebírány leukoferézou. Buňky jsou zamrazeny a když je to nutné, podány příjemcům. Mobilizací pomocí G-CSF bylo získáno významné množství CD34⁺ buněk a buněk tvořících CFU-GM. Retrospektivní analýza ukázala, že v případě použití PKB byla obnova rychlejší než při použití kostní dřeně (2). Evropská skupina pro transplantaci kostní dřeně a krve publikovala výsledky s alogenní transplantací PKB u 59 nemocných s hematologickými malignitami. Akutní GvHR II.-IV. stupně se rozvinula u 66 % nemocných a chronická GvHR u 36 % (14). Z výsledků je zřejmé, že GvHR představuje velký problém. K redukci T-lymfocytů ve štěpu může být použito metody pozitivní selekce CD34⁺ buněk, představující hlavní pool primitivních hematopoetických buněk. Další novou metodou je možnost izolace AC-133⁺ buněk. Tento antigen je glykosylovaný protein s molekulovou hmotností 120 kD. Je selektivně exprimován na CD34⁺ nezadaných buňkách a buňkách zadaných směrem na tvorbu granulocytů a makrofágů. Buňky nesoucí tento antigen jsou zodpovědné za dlouhodobou obnovu krvetvorby (17). Použití metody pozitivní selekce CD34⁺/AC133⁺ může redukovat výskyt a závažnost GvHR a umožnit rychlejší obnovu krvetvorby.

Nutnost během krátké doby najít vhodného (HLA identického) alogenního dárce je hlavní problém, který jak v Černobylu, tak i v současnosti komplikuje využití transplantace jak BKD, tak PKB.

Možným alternativním zdrojem alogenních KBK je krev z pupečnickové šňůry, která je bohatá na KBK a má relativně malý objem (50-70 ml). Lymfocyty z tohoto zdroje jsou imunologicky nedospělé, což přepokládá nízký výskyt GvHR. Bylo popsáno (10) použití tohoto zdroje KBK u 25 dětí a 64 % přežití do 100. dne po transplantaci. Provedená

sérologická typizace prokázala shodu s dárce ve třech antigenech u 90 % transplantovaných a v šesti antigenech pouze u 25-30 % transplantovaných. Přesto se GvHR III. a IV. stupně vyskytla pouze u 9 % transplantovaných. Hlavním problémem omezujícím použití pupečnickové krve u dospělých je její relativně malé množství a tím i malé množství získaných progenitorových buněk. Jsou proto hledány metody zvyšující množství prekurzorů.

Hlavní výhody expanze buněk ex vivo jsou:

- využití zdrojů s nedostatečným obsahem buněk
 - pupečnicková krev
 - KBK vyplavených do periférie u nerovnoměrně ozářených osob
- odstranění nádorových buněk (neexpandují)
- malý objem pro kryokonzervaci
- genové manipulace

Není jasné, jaký je rozdíl v proliferačním potenciálu CD34 izolovaných buněk z periferní krve a pupečnickové krve. Bylo dokázáno, že po expanzi ex vivo dochází ke zkrácení telometrické DNA. Pokles telometrické DNA je spojován se stárnutím buněk. Novorozenecké buňky izolované z pupečnickové krve CD34⁺/CD38^{low} považované za primitivní kmenové buňky schopné dlouhodobé obnovy krvetvorby mají delší telomeru než buňky izolované z dospělé kostní dřeně (16). Zdá se tedy, že novorozenecké buňky mají lepší potenciál k dlouhodobé proliferaci než buňky dospělé. Schopnost dlouhodobé obnovy hematopoézy z pluripotentních kmenových buněk krvetvorby byla u myši dokázána především v transplantacích experimentech využívajících letálně ozářené myši, kterým byly transplantovány syngenní buňky kostní dřeně. Cashman a spol. (5) popsali schopnost lidských kmenových buněk krvetvorby z kostní dřeně (separovaných na gradientu 1,077g/ml Ficoll/Hypaque) a podobně separovaných progenitorů z pupečnickové krve osídlit a obnovit krvetvorbu (myelopoézu a B-lymfopoézu) u subletálně ozářených imunodeficitních neobézních diabetických myšič (NOD/SCID). Experimenty ukázaly, že časná obnova mnoha typů lidských hematopoetických buněk byla shodná u příjemců 10^7 buněk izolovaných z pupečnickové krve jako u 2×10^7 buněk z kostní dřeně, přestože výchozí počet CD34⁺ buněk byl u pupečnickové krve 10krát nižší (5).

Otázkou je, jaká subpopulace buněk by měla být využita k expanzi ex vivo. V řadě studií se objevuje populace CD34⁺ buněk. Některé skupiny používají buňky CD34⁺, které neexprimují hlavní histokompatibilní komplex II, tj. CD34⁺HLA-DR⁻ nebo CD34⁺/CD38^{low}. Nejnověji byly popsány jako primitivní progenitorové buňky buňky CD34⁺/AC133, jejichž diferenciaci získáme především CFU-GM a méně BFU-E. Buňky mohou být separovány pomocí imunoafinitních či imunomagnetických kolon. Nejjednodušším způsobem expanze ex vivo je kultivace těchto buněk 8-12 dní v Iskově modifikaci Dul-

beccova média s určitým obsahem fetálního telecího séra a cytokiny. Právě výběr vhodné kombinace cytokinů je důležitý pro to, zda dojde k expanzi primitivních buněk, či k proliferaci buněk již zadaných určitým směrem. Jako absolutní požadavek se ukazuje SCF. Dále je pak často užíván IL-3, IL-6, IL-1, G-CSF a GM-CSF. V našich experimentech jsme k expanzi AC133 buněk použili kombinace SCF, IL-3 a IL-11. Sedmý den kultivace jsme získali 20násobné množství buněk. Absolutní počet CD34 buněk v kultuře mírně stoupal, výrazný byl nárůst absolutního počtu CD33⁺ buněk, tedy prekurzorů pro granulocytární řadu. Použití expandovaných buněk v léčbě ozářených je budoucnost dalšího desetiletí.

Závěr

Jedním z hlavních důvodů morbiditu a mortality v důsledku ozáření osob vysokými dávkami ionizujícího záření je aplazie kostní dřeně. Na základě známých radiačních nehod jsou hodnoceny výhody využití hematopoetických růstových faktorů a transplantace kmenových buněk krvetvorby (KBK). Ukazuje se, že k nejlepšímu výběru vhodné léčebné strategie je třeba dokonalá znalost radiační expozice.

Doporučená léčebná strategie v závislosti na dávce záření je:

- < 2 Gy Pozorování
- 2-8 Gy Podpurná péče
Hematopoetické růstové faktory
- > 8 Gy Podpurná péče
Transplantace kostní dřeně + CSF

G-CSF a GM-CSF stimulují proliferaci a diferenciaci přežívajících kmenových buněk na granulocyty, případně monocyty a makrofágy. Jejich použití je doporučováno po ozáření středními dávkami záření (2-8 Gy), kdy je předpoklad, že zůstal zachován určitý pool progenitorových buněk schopný v definované době obnovit krvetvorbu. V klinickém zkoušení je další faktor - trombopoietin, který stimuluje jak tvorbu trombocytů, tak tvorbu granulocytů.

Při ozáření dávkami 8-12 Gy je většina kmenových buněk krvetvorby zabita (přestože existuje určitá radiorezistentní část kmenových buněk) a i přes možnost přežití části KBK v důsledku nerovnoměrnosti ozáření je rychlá obnova vlastní krvetvorby z endogenních zdrojů nepravděpodobná. Proto je doporučována transplantace KBK:

- **autologní** (brzy po ozáření dochází k vyplavení KBK z kostní dřeně do periférie, separace CD34 nebo AC133 buněk a jejich expanze ex vivo a následná reinjekce)
- **alogenní** - tkáňová banka
 1. HLA identický dárce (kostní dřeň, periferní kmenové buňky - odebrané po mobilizaci G-CSF)
 2. pupečnicková krev - separace CD34 nebo AC133 buněk a jejich expanze ex vivo.

Literatura

1. BARANOV, A. - GALE, R.P. - GUSKOVA, A.: Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. *N. Engl. J. Med.*, 1987, vol. 321, p. 205-212.
2. BISHOP, M.R.: Potential use of hematopoietic stem cells after radiation injury. *Stem Cells*, 1997, vol. 15, Suppl. 2, p. 305-310.
3. BROWNE, D., et al.: Treatment of radiation injuries. Plenum Press, New York and London, 1990, p. 219-229.
4. BUTTURINI, A. - GALE, R.: Role of haematopoietic growth factors in radiation victims. RhGM-CSF following the Goiana accident. In Browne, D., et al. (eds.), Treatment of radiation injuries. New York, Plenum Press, 1990, p. 127-132.
5. CASHMAN, J., et al.: Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Brit. J. Haematol.*, 1997, vol. 97, p. 1026-1036.
6. FARESE, A.M., et al.: Combination protocols of cytokine therapy with interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a primate model of radiation-induced marrow aplasia. *Blood*, 1993, vol. 82, p. 3012-3018.
7. FARESE, A.M., et al.: Combined administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances multilineage hematopoietic reconstitution in nonhuman primates after radiation-induced marrow aplasia. *J. Clin. Invest.* 97, 1996, vol. 9, p. 2145-2151.
8. GALE, R.P. - BUTTURINI, A. - BARANOV, A.: Radiation accidents: primum non nocere. *Bone Marrow Transplantation*, 1993, vol. 11, p. 421-424.
9. GANSER, A., et al.: Effects of recombinant human interleukin 3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1990, vol. 76, p. 455-462.
10. KURTZBERG, J. - LAUGHLIN, M. - GRAHAM, M.L.: Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 335, p. 157-166.
11. MacVITTIE, T.J. - MONROY, R.L.: Rescue of lethally irradiated animals. In Browne, D., et al. (eds.), Treatment of radiation injuries. New York, Plenum Press, 1990, p. 11-17.
12. MacVITTIE, T.J. - MONROY, R.L. - PATCHEN, M.L.: Therapeutic use of recombinant human G-CSF in a canine model of sublethal and lethal whole-body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990, vol. 57, p. 723-736.
13. MATHE, G. - JAMMET, H. - PENDIC, B.: Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés à haute dose accidentellement. *Rev. Française Etudes Clin. Biol.*, 1959, vol. 4, p. 226-235.
14. SCHMITZ, N. - BACIGAPULA, A. - LABOPIN, M.: Transplantation of allogeneic blood progenitor cells: the EBMT experience. *Bone Marrow Transplant*, 1996, vol. 17, Suppl. 2, p. S40a.
15. THIERRY, D., et al.: Haematopoietic growth factors in the treatment of therapeutic and accidental irradiation-induced bone marrow aplasia. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995, vol. 67, p. 103-117.
16. VAZIRI, H., et al.: Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, p. 9857-9860.
17. YIN, A., et al.: AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997, vol. 90, 12, p. 5002-5012.

Klíčová slova: Dřeňový syndrom nemoci z ozáření; Léčba; Kmenové buňky krvetvorby.

Do redakce došlo 27. 5. 1998