

CIRKADIÁNNÍ RYTMY LEUKOCYTŮ A CHRONOMODULAČNÍ ÚČINEK RŮSTOVÉHO FAKTORU G-CSF (GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR)

CIRCADIAN RHYTHMS OF WHITE BLOOD CELLS AND CHRONOMODULATORY EFFECT OF GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)

R. VYZULA, J. MALASKA

ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE, FN BRNO

Souhrn: Hematopoetický systém se všemi komponentami je charakteristický multifrekvenční časovou strukturou s prominentními rytmy v buněčné proliferaci, buněčné funkci a hodnotami v periferní krvi v různých chronobiologických frekvencích. Cirkulující elementy v periferní krvi prokazují vysoce reprodukovatelné cirkadiánní rytmy. Časové závislosti a rozsah těchto rytmů byly stanoveny u zdravé lidské populace. Předvídat v čase se dá nejen počet buněk, ale i jejich funkce. Cirkadiánní rytmus buněčné proliferace v kostní dřeni může vést k načasování léčby fázově specifickými a nespecifickými látkami za účelem maximalizovat požadovaný účinek a přitom minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky na kostní dřeň. Prokázán byl chronomodulační účinek G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) u myši, který pokud bude potvrzen, může vést ke zlepšení cytotoxického účinku cytostatik stejně jako ke zlepšení stimulace periferních kmenových buněk nutných pro vysokodávkovanou chemoterapii s následnou transplantací těchto buněk. Chronoterapie růstovými faktory by mohla ve svém důsledku vést ke zlepšení situace v onkologii pokud se týká přežívání a kvality života nemocných.

Klíčová slova: chronobiologie - leukocyty - kostní dřeň - leukocytární růstový faktor - chronoterapie

Summary: The hematopoietic system in all its components is characterized by a multifrequency time structure with prominent rhythms in cell proliferation, cell function and appearance in the peripheral blood in different chronobiological frequencies. The circulating elements in the peripheral blood show highly reproducible circadian rhythms. The timing and the extent of these rhythms were established in a clinically healthy human population. Not only the number but also the reactivity of circulating blood cells varies predictably as a function of time. The circadian rhythm of cell proliferation in the bone marrow may allow timed treatment with cell cycle specific and nonspecific agents in an attempt to maximize the desired and to minimize the undesired treatment effects upon the marrow. A chronomodulatory effect of G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) has also been shown in mice which, if confirmed, might reduce the cytotoxic effect of cytostatic drugs as well as improve the stimulation of peripheral stem cells for high dose chemotherapy regimens followed by transplantation of these cells. Chronotherapy by growth factors might lead to improvement of the situation in oncology - survival and quality of life.

Key words: chronobiology - white blood cells - bone marrow - white blood cells growth factor - chronotherapy

Chronobiologie

Pravděpodobně od samého začátku inteligentního života si lidstvo uvědomuje, že existence každého jednotlivce je ovlivňovaná pravidelně se opakujícími rytmy, pod jejichž vlivem se naše civilizace po stamiliony let vyvíjela. Trvalo však ještě velmi dlouho než se tyto rytmy začaly vědecky studovat a nejen simplicítně a mysteriózně zneužívat pro tzv. okultní vědy. Snad nejvíce si uvědomujeme cirkadiánní (rytmus slunečního dne), cirkatrigintální (rytmus lunárního měsíce) a cirkanuální rytmy (roční rytmus), i když zajímavé jsou i méně známé rytmy ultradiánní (kratší než 20 hod.), infradiánní (delší jak 28 hod.) a cirkaseptální (týdenní). Zvláště poslední je zajímavý tím, že dosud neznáme ani nastínění mechanismu jeho vzniku, přesto se týdenní rytmy v našem životě vyskytují - např. rytmus teploty, srdeční akce, acidobazické rovnováhy a leukocytů (8). Zjišťování a vědecké zkoumání takových rytmů se stalo doménou posledního století a zvláště v posledních desetiletích můžeme vidět výrazný rozkvět studia chronobiologie, čímž se dostává tento vědní obor do širšího povědomí lékařů k jejich klinickému využití. Pokroky, kterých bylo dosaženo v chrono-onkologii (např. poznáním rytmu enzymu dihydroypyrimidin reduktázy) vedou k dalšímu zlepšení kvality života onkologických pacientů při podstupování chemoterapeutické léč-

by. Postupně se ukazují zajímavé rytmy i v hematopoetickém systému, jejichž využití se může odrazit v léčbě hematologických malignit. Správné načasování léčby, volba intervalů mezi léčbami, transplantace kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk, vysokodávkovaná terapie, stimulační terapie a časově závislé podávání růstových faktorů, které by vedly nejen ke zlepšení terapeutického indexu, ale i ekonomizaci léčby, jsou jistě zajímavými oblastmi chronobiologie, jejíž uznání a respektování může přinést užitek pacientovi.

Cílem tohoto krátkého přehledu je zaměřit se na dosavadní znalosti o chronobiologických rytmech části hematopoetického systému, pochopení jejich chování a nastínění dalšího směru využití chronobiologie ke stanovení optimálního účinku leukocytárního růstového faktoru a tím zlepšení terapeutických možností u indikovaných maligních onemocnění.

Cirkadiánní rytmus leukocytů a některých subpopulací v periferní lidské krvi

Rytmickým změnám leukocytů v periferní krvi se sice nevěnovalo mnoho vědců, ale přesto s podivem zjišťujeme, že již v minulém století se objevují první informace o kolísání hladin leukocytů (26). Přesné výsledky této i několika dalších historických zmínek se nepodařilo zjistit, ale i tak zmínka o těch

Tabulka 1

Přehled vývoje znalostí o cirkadiánním chování leukocytů a některých jejich subpopulací v periferní lidské krvi

autor	soubor	akrofáze	nadir	poznámky
Nasse (26) 1850	NA	NA	NA	uvádí kolísání leukocytů, blíže nezjištěno
Türk (38) 1912	NA	NA	časné ranní hodiny	leukocytóza digestivní a po cvičení
Sabin (29) 1925	NA	odpoledne		popisuje hodinové variace leukocytů, blíže nezjištěno
Shaw (31) 1927	NA	1. odpoledne 2. okolo 24.00		blíže nezjištěno
Smith (36) 1929	2	15.00 – 16.00	časné ranní hodiny	každý dobrovolník podstoupil 5 sérií měření
Zirm (44) 1933	34	1. 14.00 2. okolo 24.00	7.00 hod.	
Garrey (14) 1935	NA	1. odpoledne 2. okolo 24.00	časné ranní hodiny	blíže údaje nezjištěny
Haus (17) 1983	150	24.00 20.00 24.00-04.00 06.00 24.00	08.00 08.00 08.00 12.00 18.00	leukocyty neutrofilly lymfocyty B-buňky T-buňky

Poznámka: NA - není k dispozici, akrofáze - maximální vzestup, nadir - maximální pokles.

to snahách je informativní, a proto ji uvádíme v tabulce. Türk v roce 1912 informuje o zjištění rytmických změn v hladinách leukocytů. Popisuje nejnižší hodnoty (nadir) v časných ranních hodinách a zjištěné změny interpretuje jako digestivní leukocytózu nebo leukocytózu po cvičení (38). Podrobnější informace získáváme až v r. 1925 kdy práce prof. Sabina a spol. popisuje odpolední vrchol (akrofázi) v počtu leukocytů, na kterém se převážně podílejí polymorfonukleární neutrofilly (29). Stejně výsledky publikuje Shaw v roce 1927, uvádějící akrofázi v odpoledních a nočních hodinách, převážně způsobenou neutrofilními buňkami (31). V roce 1929 Smith a spol. sledují nejen charakter cirkadiánního rytmu leukocytů, ale i ovlivnění tohoto rytmu určitými fyziologickými pochody (menstruace, digestivní procesy) a různými fyziologickými stavy (mírné cvičení, únava) (36). Z jejich práce vyplývá potvrzení základních informací popsaných dříve (29,31). Zirm a spol. v roce 1933 opět potvrzují Shawovu práci, i když nacházejí méně vyjádřený noční vzestup (44). Tyto výsledky jsou dále potvrzeny o dva roky později Garreyem a spol. (14). Chronobiologickými zákonitostmi hematologických a imunologických parametrů se důkladně zabývala minnesotská skupina chronobiologů pod vedením prof. Halberga. Z jeho laboratoře pochází celá řada vynikajících prací, které shrnul na počátku 80. let Haus a spol. (17). Autoři sledovali u 150 zdravých dobrovolníků cirkadiánní změny leukocytů a zjistili poměrně plynulou sinusovou křivku jejich cirkadiánního výskytu i jednotlivých subpopulací s nadirem leukocytů v 8.00 ráno a akrofází ve 24.00 hod. Cirkadiánní parametry jejich výsledků jsou uvedeny v tab. č. 1.

Na tomto místě je vhodné se zmínit o průkopnických studiích provedených Dérerem v Bratislavě, v předválečných, ale hlavně v 50. letech. Dérer pozoroval z chronobiologického hlediska několik parametrů, mezi kterými byly i hodnoty periferních leukocytů. U chronické lymfadenózy a myelózy zjistil v průběhu podávání cytostatické léčby 6denní rytmus v poklesu leukocytů (7,8,11). Stejně výsledky popisuje po radiační, hormonální a pyrogenní zátěži jak u pacientů s myelózou, tak u zdravých dobrovolníků po pyrogenní zátěži (9). Periodické změny v tvorbě a zániku krvinek vysvětluje existencí rytmů v organismu, které jsou funkcí centrálního nervového systému, neurohumorálním mechanismem zvláště hypothalamo-hypofyzární osy. V dalším Dérer popisuje při-

pad periodické idiopatické neutropenie u dítěte, kde nachází 4-, 12- a 24denní periody a slabé periody 6denní. Poukazuje na možnost genetického ovlivnění těchto rytmů (10).

Cirkadiánní rytmy proliferační aktivity v kostní dřeni

S rozvojem zájmu o chronobiologii nejrůznějších parametrů se od 60. let začínají objevovat práce, které se nezabývají jen popisem cirkadiánních rytmů leukocytů (neutrofilů) v periférii, ale začínají si všimnout cirkadiánních změn proliferační aktivity kostní dřene samotné. Problematika, která je zvláště důležitá v dnešní době při podávání cytotoxické chemoterapie, která *de facto* není toxická leukocytům maturovaným a distribuovaným v periférii, ale toxická proliferujícím buňkám v kostní dřeni. Mauer v roce 1965 zveřejnil první práci na toto téma, studující diurnální změny proliferace kostní dřene pomocí inkorporace H^3 -thymidinu (22). Zjistil nadir mitotického indexu proliferujících buněk v 06.00 hod. a DNA syntézy myeloidních buněk ve 24.00 hod. a akrofázi mitotického indexu v 18.00 hod. Další práce pocházejí z laboratoře chronobiologů Smaaland a spol. V letech 1986 až 1988 provedli odběry kostní dřene u 16-ti zdravých dobrovolníků mužského pohlaví. Pomocí flowcytometrie sledovali cirkadiánní změny v aktivitě DNA syntézy ve všech buňkách kostní dřene. Stejně tak sledovali změny v počtu kultivovaných CFU - GM (Colony Forming Unit - Granulocyte-Macrophage). Výsledky ukazovaly shodu v rytmu celkové syntézy DNA a v počtu kultivovaných kolonií CFU - GM. Maximální hodnoty DNA syntézy se zjistily v době od 08.00 hod. do 16.00 hod. s průměrem kolem 13.00 hod. a minimální od 24.00 hod. do 04.00 hod. s průměrem kolem 01.00 hod. (32-34).

Výše uvedené výsledky jsou zajímavé natolik, že by se daly okamžitě využít v klinické praxi pro stanovení optimální doby podání cytostatické léčby, která bude mít minimální myelosupresivní účinky, anebo optimální stimulační účinky růstových faktorů. Tyto výsledky však nevycházejí z komparativních studií a tím neumožňují posouzení míry vlivu stresu, ročního období, pohlaví a jiných variabilních parametrů, na kterých chronobiologická pravidla závisí. Smaaland a spol. (35) proto provedli novou práci, která v jedné klinické studii sledovala 16 mužských dobrovolníků, u kterých byly odebrány ve stejnou dobu vzorky kostní dřene a periferní krve ve 4 hodinových intervalech pokrývajících 24 hod. období. Výsledky jsou shrnuty v tab. č. 3 a ukazují shodné nebo téměř shodné hodnoty s jednotlivými výše uvedenými studiemi.

Tabulka 2

Cirkadiánní variace v proliferační aktivitě lidské kostní dřene

autor	soubor	akrofáze	nadir	poznámky
Mauer (22) 1965	11 mužů	1. 18.00	1. 06.00 2. 24.00	1. mitotický index 2. DNA syntéza
Smaaland (33) 1991	16 mužů	13.00 hod.	01.00 hod.	CFU-GM/DNA syntéza všech buněk kostní dřene

Poznámka: akrofáze - maximální vzestup, nadir - maximální pokles, CFU-GM = Colony Forming Unit - Granulocyte-Macrophage

Tabulka 3

Cirkadiánní variace periferních hematologických parametrů a hematopoetických parametrů v kostní dřeni.

Smaaland 1995, 16 mužů		
parametr	vzorek	akrofáze (medián)
leukocyty	periferní krev	15.36 hod.
neutrofilly	periferní krev	22.36 hod.
lymfocyty	periferní krev	03.24 hod.
CFU-GM	kostní dřeň	13.04 hod.
S-fáze/DNA syntéza	kostní dřeň	13.12 hod.

poznámka: CFU-GM = Colony Forming Unit - Granulocyte-Macrophage

Růstové faktory

Objevením a zavedením růstových faktorů typu G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) a GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) do klinické praxe se výrazně zlepšilo řešení myelosupresivního účinku cytostatické léčby a tak snížilo riziko infekčních komplikací. Jejich použití vedlo k tomu, že je nyní reálnější dodržování standardních cytostatických dávek v daných termínech u většiny pacientů a je možné používat vysokodávkované cytostatické režimy. Jedná se o glykoproteiny, které zasahují do proliferace a diferenciace hematopoetických progenitorových buněk (27). Tyto typy růstových faktorů zasahují do zrání neutrofilů a makrofágů. Mimo tyto základní funkce se jeví, že stimulující faktory (CSF) hrají důležitou roli také v modulaci funkce zralých krevních elementů, ovlivňující i distribuci zralých a progenitorových buněk v těle (6). Uvádí se zvýšení fagocytární schopnosti, chemotaxe, imobilizace a další. CSF pravděpodobně účinkují prostřednictvím specifických receptorů, jejichž struktury jeví určitou vzájemnou příbuznost (18,40). Pro klinickou praxi se připravují rekombinantní technologií. G-CSF je dostupný jako r-HuG-CSF pod názvem filgrastim (Neupogen, Amgen Roche, Švýcarsko) a glykozylovaný lenograstim (Granocyte, Rhone-Poulenc Rorer, Francie). GM-CSF se vyrábí formou neglykozylovaného r-HuGM-CSF jako preparát molgramostim (Leucomax, Novartis, Švýcarsko) a formou glykozylovaného preparátu sargramostimu (Interberin, Wyeth-Lederle, v registračním řízení).

Klinické použití těchto myeloidních růstových faktorů v hemato-onkologické praxi je široké. Podávání je důležitou indikací u pacientů s neutropenií vyvolanou specifickou onkologickou léčbou (3,18,41). Seymour et al. dokázali, že podávání lenograstimu následně po chemoterapii nádorů nevede k úplnému vyhnutí se leukopenie, ale úspěšně vede ke zkrácení doby potřebné k normalizaci hladiny neutrofilů a stanovili optimální dávku 5 ug/kg/den (30). Další oblastí, ve které se s výhodou používají G-CSF a GM-CSF je použití po stimulačních režimech ke sběru progenitorových buněk (4,5,21,40) a podání vysokodávkované cytostatické chemoterapie. Celá řada studií ukázala, že po vysokodávkované chemoterapii podávání růstového faktoru signifikantně zkracuje návrat hladiny neutrofilů k normě, redukuje mikrobiologicky zdokumentované infekce během neutropenie, zkracuje trvání hospitalizace a užívání antibiotik (2,15,28,30,37). Základní dávkovací schéma bylo sice stanoveno, ale existují interindividuální rozdíly a stávající ekonomická situace ve zdravotnictví nás nutí přemýšlet nad dalšími možnými metodami, které by vedly k racionálnějšímu podávání růstových faktorů. Jednou z takových zkoušených metod se ukazuje chronobiologie - chronoterapie. Základní myšlenkou je, zda vhodným načasováním podání růstového faktoru nezískáme úsporu podaného množství a přitom adekvátní nebo i vyšší účinnost, jak při sběru progenitorových buněk, tak k překlenutí kritické neutropenie po vysokodávkované chemoterapii.

Preklinické studie s G-CSF

V naší práci, provedené v laboratořích prof. Hrubeskeho v Albany, U.S.A., jsme se pokusili zjistit zda cirkadiánní - časově závislé podání růstového faktoru může ovlivnit počty leukocytů a hlavně neutrofilů v periferní krvi (39). Použili jsme samičky myši C3HeB/FeJ průměrného věku 12-14 týdnů, které dostaly subkutánně buď r-metHuG-CSF (Neupogen, Amgen) nebo placebo (sterilní fyziologický roztok). G-CSF bylo podáno v dávce 5 µg/kg váhy po 5 dnů v jednom ze 6-ti denních časů, rozdělených ve 4 hodinových intervalech. Leukocyty byly měřeny z žilní krve v den před léčbou a dále denně po dobu 5-ti dní se začátkem poslední aplikace G-CSF a posledním odběrem den 11. Současně byly provedeny krevní nátěry ke zjištění počtu neutrofilů. Ze závěrů vyplývá (viz tab. č. 4.):

Tabulka 4

Chronomodulační účinky G-CSF na periferní leukocyty a neutrofilní buňky v preklinické studii.

Autor	soubor	HALO* dávka	vzestup	pokles
Vyzula (39) 1992	89 myši, C3HeB/FeJ	2,6,10,14,18,22 5 µg/kg/váhy	leu - 18 HALO neu-14,18,HALO	leu - 6,10 HALO neu - 10 HALO

Poznámka: *HALO - Hours After Light Onset, HALO 2,6,10 - období spánku, HALO 14,18,22 - období aktivity, leu - leukocyty, neu - neutrofilní buňky.

- koncentrace leukocytů a neutrofilů po aplikaci G-CSF jevíly variace v závislosti na denní době aplikace G-CSF
- nejvyšší hodnoty leukocytů byly dosaženy pokud byl G-CSF aplikován uprostřed denní aktivity (18 HALO) a nejvyšší hodnoty neutrofilů byly zaznamenány pokud byl G-CSF aplikován na začátku nebo uprostřed denní aktivity těchto nokturálních zvířat (14, 18 HALO)
- pokles leukocytů a neutrofilů byl zaznamenán, pokud byl G-CSF aplikován v době obvyklého probuzení těchto zvířat (10 HALO) a pokles leukocytů ještě navíc zasahoval do doby pozdního spánku (6 HALO).

Práce jednoznačně ukazuje, že podání G-CSF laboratorním myším, při zohlednění působení stresu při odběru materiálu, vede k odlišné odpovědi v počtech periferních leukocytů a neutrofilů v závislosti na denní době aplikace a způsobuje jak vzestup těchto buněk, tak paradoxně překvapující přechodný pokles.

Diskuse

Existují jednoznačné důkazy, že redukce cytostatické léčby nebo odklady v léčebném schématu snižují pravděpodobnost kontroly nebo vyléčení maligního onemocnění (12,19,20). Stejně tak se ukazuje, že léčebné výsledky některých maligních onemocnění se zlepšují, pokud se zvyšují dávky cytostatických léků (23,25). Je to dáno faktem, že účinnost některých cytostatických léků je závislá na tzv. dose intensity, tj. dávka/kg/týden, která může mít vyšší procento úspěšnosti. Proto se stává krajně důležitým minimalizovat toxické účinky na zdravé senzitivní tkáň, zvláště kostní dřeň.

Leukopenie a neutropenie jsou hlavní příčinou nedodržování předepsaných termínů nebo dávek chemoterapie a dále i morbidity a mortality onkologických pacientů. Febrilní neutropenie je častou komplikací cytostatické léčby vyžadující poměrně intenzivní zdravotní péči s hospitalizací, použití kombinací širokospektrých antibiotik a další náročnou podpůrnou léčbu. Navzdory intenzivní péči o takové pacienty je uváděna jejich až 10% mortalita. Objevení a zavedení do klinické praxe růstových faktorů umožňuje účinnější léčbu neutropenií a snížení počtu rizikových nebo kritických stavů vedoucích k nejasné prognóze. Použití leukocytárních růstových faktorů je indikované v definovaných situacích, ale zároveň finančně nákladné. Pokud by se však objevila metoda efektivnějšího podávání, která by vedla k racionálnějšímu podávání a dávkování, pak by se to jistě odrazilo i v celkových finančních úsporách, umožňujících případně širší indikace podání. Jednou z takových metod je možná chronobiologie - chronoterapie.

Na krátkém shrnutí, které jsme uvedli, je vidět, že množství leukocytů, neutrofilů v periferní krvi a jejich prekurzorů v kostní dřeni je závislé na čase odběru. Jejich proliferace a maturace podléhá cirkadiánním změnám. Stejně tak se ukazuje, i když zatím jen v preklinických studiích, že působení růstových faktorů, v našem případě G-CSF, může mít časově závislou účinnost. Vzhledem k cirkadiánním variacím DNA syntézy buněk kostní dřeni (1) se nabízí řešení otázky redukce toxicity na kostní dřeň fázově specifickými cytostatiky působících v S fázi buněčného cyklu podáním cytostatika nebo

jeho největšího denního procenta dávky, při kontinuální infuzi, v době nejnižší proliferativní aktivity kostní dřeně, což je pozdní večer nebo v noci.

Na druhé straně se může využít doby maximální proliferace hemopoetických buněk kostní dřeně k efektivnější léčbě růstovými faktory jako jsou GM-CSF nebo G-CSF, podáním optimální dávky v optimální dobu, což je dle dosavadních výsledků doba časného odpoledne. Této skutečnosti se dá využít i při sběru periferních kmenových buněk pro autologní a i allogenní transplantace u hematologických, ale i vybraných ostatních maligních onemocnění. Je nutné však uvést, že optimální dobu podání růstového faktoru u lidí dosud neznáme a dosavadní klinické zkušenosti spíše vedou k jeho podání v pozdní odpoledne ke zmírnění projevů vedlejších účinků, které znepříjemňují život pacientů při aplikaci v ranní době. Je však na místě si uvědomit, že je logické i podání ve velmi časných ranních hodinách, ještě před nástupem maximální proliferativní

aktivity hemopoetických buněk v 08.00 hod.. Přesnějších informací se však můžeme dočkat jen po provedení patřičných klinických zkoušek, z nichž některé již probíhají.

Před zavedením pravidel optimální doby podávání růstových faktorů je nutné si uvědomit interindividuální rozdíly mezi jednotlivci, vedoucí k různě vyjádřeným biologickým rytmům. Bude zřejmě nutné zavést nejprve stanovení biologických rytmů daného jedince a teprve potom stanovit individuálně upravenou chronoterapii (tzv. tailored therapy).

Domníváme se, že podávání optimálních dávek v optimální dobu a individuálně upravená léčba pro daného jedince není vědecky fantastickou spekulací, ale v některých případech již i dnes možná. V době, kdy náklady na zdravotní péči rok od roku rostou neúměrně možností společenosti i mnohem produktivnějších než je naše, je pravděpodobně vhodné se zaměřit na nové úspornější způsoby léčby, které chronobiologie a chronoterapie nabízí.

Literatura:

1. Abrahamson, J. F., Smaaland, R., Sandberg, S. et al.: Circadian variation in serum cortisol and circulating neutrophils are markers for circadian variation of bone marrow proliferation in cancer patients. *Eur. J. Haematol.* 50, 1993, 206-212.
2. Bacigalupo, A.: The clinical benefits of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of cancer patients. *Eur. J. Cancer* 30A, 1994, Suppl 3, 26-29.
3. Balazovich, K.J., Almeida, H.I., Boxer, L.A.: Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. *J. Lab. Clin. Med.* 118, 1991, 576-584.
4. Baumann, I., Testa, N.G., Lange, C. et al.: Haemopoietic cells mobilised into circulation by lenograstim as alternative to bone marrow for allogeneic transplants. *Lancet* 341, 1993, 369.
5. Bregni, M., Siena, S., Nicola, M.D. et al.: Comparative effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor after high-dose cyclophosphamide cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 14, 1996, 628-635.
6. Demetri, G.D., Griffin, J.D.: Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 1991, 2791-2808.
7. Dérer, L.: O periodické účinnosti chlóralkylamínu, rtg ožiarenia a ACTH při leukemii. *Bratislavské lekárska listy* 8, 1953, 545-551.
8. Dérer, L.: Concealed Macroperiodicity in the reactions of the human organism. *Review of Czechoslovak medicine* 4, 1956, 277-287.
9. Dérer, L.: O leukocytárnej makroperiodike. *Spomínková práca lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Košiciach, 1959, II (1-2), 3-13.*
10. Dérer, L., Čáp, J.: Prípád periodickej neutropénie. *Bratislavské lekárska listy* 1961, 540-551.
11. Dérer, L., Menkyna, R., Nepelová, L. et al.: O rytme vyvolanom cytostatikami (II.časť). *Bratislavské lekárska listy* 5, 1954, 477-483.
12. Evans, W.E.: Clinical pharmacodynamics of anticancer drugs: a basis for extending the concept of dose-intensity. *Blut* 56, 1988, 241-248.
13. Gabrilove, J.L., Jakubowski, A.: Granulocyte colony-stimulating factor. Preclinical and clinical studies. In: Golde, D.W., guest editor. *Hematopoietic growth factors. Hematology/oncology clinics of North America* 3, 1989, 427-440.
14. Garrey, W.E., Bryan, W.R.: Variations in white blood cell counts. *Physiol. Rev.* 15, 1935, 597-638.
15. Gisselbrecht, C., Prentice, H.G., Bacigalupo, A. et al.: Placebo-controlled phase III trial of lenograstim in bone-marrow transplantation. *Lancet* 343, 1994, 696-700.
16. Hattori, K., Shimizu, K., Takahashi, M., et al.: Quantitative in vivo assay of human granulocyte colony-stimulating factor using cyclophosphamide-induced neutropenic mice. *Blood* 75, 1990, 1228-1233.
17. Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J. et al.: Chronobiology in hematology and immunology. *Am. J. Anatomy* 168, 1983, 467-517.
18. Herrman, F., Lindemann, A., Mertelmann, R.: G-CSF and GM-CSF: From molecular biology to clinical application. *Biotherapy* 2, 1990, 315-324.
19. Hryniuk, W., Bush H.: The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2, 1984, 1281.
20. Hryniuk, W., Figueredo A., Goodyear M.: Application of dose intensity to problems in chemotherapy of breast and colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 14, 1987, Suppl 4.
21. Kohno, A., Takeyama, K., Narabayashi, M. et al.: Low-dose granulocyte colony-stimulating factor enables the efficient collection of peripheral blood stem cells after disease-oriented, convectional-dose chemotherapy for breast cancer, malignant lymphoma and germ cell tumor. *Bone Marrow Transplantation* 15, 1995, 45-54.
22. Maurer, A.M.: Diurnal variation of proliferative activity in the human bone marrow. *Blood* 26, 1965, 1-7.
23. Mayer J., Vorlíček J.: Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových krvetvorných buněk v komplexní léčbě zhoubných nádorů. *Vydala Masarykova univerzita v Brně* 1, 1997, 70.
24. Metcalf, D.: Colony Stimulating Factors. *Discovery, development and clinical applications. Cancer* 65, 1990, 2185-2195.
25. Moormeier, J.A., Williams, S.F., Kaminer, L.S. et al.: High-dose tri-alkylator chemotherapy with autologous stem cell rescue in patients with refractory malignancies. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1990, 29.
26. Nasse : *Einfluss der Nahrung auf das Blut.* Marburg, 1850.
27. Platzer, E., Welte, K., Gabrilove, J.L. et al.: Biological activities of a human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor on normal and leukemic cells. *J. Exp. Med.* 162, 1985, 788-801.
28. Roche, H., Chevallier, B., Chollet, P. et al.: Lenograstim rHuG-CSF prevents morbidity from FEC-HD chemotherapy for inflammatory breast cancer. *Annals of Oncology* 9, 1994, Suppl 5, 457.
29. Sabin, F.R., Cunningham, R.S., Doan, C.A. et al.: The normal rhythm of white blood cells. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 37, 1925, 14-67.
30. Seymour, A.M., De Campos, E., Thatcher, N. et al.: A single-blind, randomised, vehicle-controlled, dose finding study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF; lenograstim) in patients undergoing chemotherapy for solid cancers and lymphoma. *Eur. J. Cancer* 31, 1995, 2157-2163.
31. Shaw, A.F.B.: The diurnal tides of the leucocytes of man. *J. Path. Bact.* 30, 1927, 1-19.
32. Sletvold, O., Smaaland, R., Laerum, O.D.: Cytometry and time-dependent variations in peripheral blood and bone marrow cells: A literature review and relevance to the chronotherapy of cancer. *Chronobiol. Internat.* 8, 1991, 235-250.
33. Smaaland, R., Laerum, O.D., Lote, K. et al.: DNA synthesis in human bone marrow is circadian stage dependent. *Blood* 12, 1991, 2603-2611.
34. Smaaland, R., Laerum, O.D., Sothorn, R.B. et al.: Colony-forming unit-granulocyte-macrophage and DNA synthesis of human bone marrow are circadian stage-dependent and show covariation. *Blood* 79, 1992, 2281-2287.
35. Smaaland, R., Sothorn, R., Lote, K. et al.: Circadian phase relationships between peripheral blood variables and bone marrow proliferative activity in clinical health. *In Vivo* 9, 1995, 379-390.
36. Smith, L.C., McDowell, A.M.: Normal rhythm of white blood cells in women. *Arch. Int. Med.* 43, 1929, 68-84.
37. Tamura, M., Matsumoto, M., Yoshino, T., et al.: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the mice receiving bone marrow transplantation following lethal irradiation: acceleration of recovery of the peripheral blood neutrophils and potentiation of anti-Pseudomonas resistance. *Exp. Hematol.* 19, 1991, 18-23.
38. Trk, W.: Vorlesung über Klin. Haematol. *Klin. Wchnschr.* 15, 1912, 2, 715, 749.
39. Vyzula, R., Martynowicz, M., Sigurdsson, B. et al.: Circadian dependent effectiveness of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). *Third Annual Meeting Society for Research on Biological Rhythms.* Amelia Island, USA, 1992 (abstr.).
40. Watts, M.J., Sullivan, A.M., Jamieson, E. et al.: A single apheresis algorithm for PBSC. *Brit. J. Haemat.* 89, 1995, Suppl 1, 79.
41. Welte, K., Bonilla, M.A., Gillio, A.P. et al.: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates. *J. Exp. Med.* 165, 1987, 941-948.
42. Williams, M.E., Quesenberry, P.J.: Hematopoietic growth factors. *Hematol. Path.* 6, 1992, 105-124.
43. Yong, K., Cohen, H., Khwaja, A. et al.: Lack of effect of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors on cultured human endothelial cells. *Blood* 77, 1991, 1675-1680.
44. Zirm, K.L., Bauermeister, W.: ber physiologische Tagesschwankungen der Leucocyten. *Ztschr. F. Klin. Med.* 125, 1933, 282-293.