

KRVOTVORNÉ KMEŇOVÉ BUNKY II.

(VLASTNOSTI A VYUŽITIE))

HEMATOPOIETIC STEM CELLS II.

(CHARACTERIZATION AND THEIR USE)

MARKULJAK I.

Súhrn: Na základe rôznych štúdií z ostatných 3 desaťročí je regulácia KKB vysoko organizovaný proces pod kontrolou extracelulárnych a intracelulárnych mechanizmov. KKB existujú v špeciálnych miestach („niches“), kde stromálne bunky, rôzne molekuly ako napr. cytokíny, extracelulárna matrix, chemokíny, adhezívne molekuly predstavujú rovnováhu signálov, ktoré chránia pool KKB a zároveň umožňujú ich regulovanú proliferáciu a diferenciáciu. Určenie in vitro podmienok, ktoré umožnia regulovať sebaobnovu a diferenciáciu KKB in vitro je veľkou výzvou v posledných rokoch a v ostatnom čase sa dosiahol určitý úspech v zmnožení KKB. KKB sa javia ako vhodný cieľ pre génovú terapiu. Akýkoľvek pokrok v tejto oblasti by umožnil nový pohľad na vznik hematologických malignít ktoré primárne postihujú KKB. Nové znalosti by mohli prispieť k vývoju efektívnejšej a špecifickejšej terapie rôznych maligných aj nemaligných hematologických ochorení.

Kľúčové slová: Krvotvorné kmeňové bunky, ex vivo expanzia, génová terapia, mobilizácia, usídlenie

Summary: Based on a number of studies performed in the last three decades the regulation of hematopoietic stem cell (HSC) biology is highly integrated process under control of extracellular and intracellular mechanisms. HSC may exist in stem cell niches, where stromal cells and various molecules such as cytokines, extracellular matrix, chemokines, adhesion molecules provide the appropriate balance signals that preserves the HSC pool while permitting controlled proliferation and differentiation. Identification of in vitro conditions that would enable to regulate self-renewal and differentiation in vitro has been a major challenge in the last few years and some success occurred recently in HSC expansion. HSC seem to be a favourite target in attempt to implement gene therapy. Any progress in this area would give new insights into development of some hematological malignancies that are thought to originate at the pluripotent stem cell level. New knowledge could result in the development of more efficient and more specific therapy of various malignant and nonmalignant hematological disorders.

Key words: Hematopoietic stem cells, ex vivo expansion, gene therapy, homing, mobilization

ZACHOVANIE POTENCIÁLU SEBAOBNOVY

Veľkou limitáciou na široké využitie KKB je relatívne nízka úroveň našej znalosti, ohľadom udržania týchto buniek in vitro bez straty ich schopnosti dlhodobého multilíniového rastu a diferenciácie - vlastností potrebných pre ich klinické využitie. Molekuly ktoré udržiavajú stav bunky na úrovni kmeňovej bunky sa len začínajú identifikovať. Patria medzi ne ligandy Notch rodiny receptorov, ktoré pôsobia zvonka a faktory ako PIE-1, ktoré pôsobia zvnútra bunky (1). Poznatky v tejto oblasti rozširujú aj výskumy s embryonálnymi kmeňovými bunkami (ES). Známa črta ES buniek je ich schopnosť udržať v kultúre nediferencovaný stav za prítomnosti vysokých koncentrácií cytokínov IL-6 rodiny, ktorých biologická aktivita je sprostredkovaná receptormi, ktoré majú všetky spoločný retazec - gp-130 (2). Dimerizácia gp-130 faktorom inhibujúcim leukémiu (LIF) indukuje aj MAPK (Ras-mitogen activated protein kinase) aj JAK/STAT cesty. Nedávne výskumy ukazujú, že práve stupeň aktivácie STAT-3 je kritický pre zachovanie blokády diferenciácie ES buniek. Prahová hladina aktivácie je teda esenciálna pre sebaobnovu ES navodenou faktorom inhibujúcim leukémiu (3). Na udržanie blokády diferenciácie musia ES exprimovať ešte transkripčný faktor Oct 4 (4). Zistilo sa, že aktivácia STAT-3 prispieva k onkogenéze a/alebo inhibícii apoptózy. Napr. u väčšiny pacientov s mnohopočetným myelómom je trvalo aktivovaná STAT-3 v bunkách KD. V prípade myelómu aktivácia nastáva prostredníctvom IL-6 - čo indukuje intracelulárny signál - po fosforylácii JAK, STAT-3 dimerizuje, premiestňuje sa do jadra a aktivuje transkripciu cieľových génov. Aktiváciou STAT-3 u myelómu sa zvyšuje rezistencia buniek na apoptózu indukciou Bcl-XL(5).

Prevalencia gp-130 sprostredkovaných odpovedí v rôznych systémoch kmeňových buniek, vrátane HSC spolu s dokumentovanou dôležitosťou JAK/STAT signalizácie v hemopo-

éze ukazuje, že regulácia diferenciačného rozhodnutia KKB touto rodinou cytokínov môže byť široko (všeobecne) konzervovaná (2).

Štúdie z posledných rokov poukazujú na to, že permanentná alterácia genetického programu transformovaných buniek, dosiahnutá konštitutívnou aktiváciou STAT proteínov je kritickým krokom v procese malignej transformácie (3). Niektoré JAK a STAT proteíny sú tiež konštitutívne aktivované v hemopoetických bunkách, transformovaných rôznymi onkogénymi tyrozínkinázami, ako aj u rôznych lymfómov a leukémií, vrátane tých, ktoré sú transformované onkogénymi vírusmi (3), viď tab.1.

Porucha na úrovni JAK-STAT môže viesť aj k neopovedavosti nádoru na inhibitor - IFN alfa. Bolo napr. zistené, že u vyšetrených pacientov s CTCL (kožný T-lymfóm) úplne chýbala STAT-1 expresia, čo bolo zistené aj na IFN rezistentnom malignom melanóme (3).

Dôležitú odpoveď na mnohé otázky môže dať štúdium exprese homebox génov v ľudských hemopoetických bunkách. Rôzni členovia homebox rodiny transkripčných faktorov boli zistení v rôznych subpopuláciách CD34+ buniek KD. Zvýšená expresia HOXB4 v myších KB rezultovala v pozoruhodnej expanzii buniek s lymfo-myeloidným dlhodobým repopulačným potenciálom. HOX gény v biológii KB sú zvlášť pozoruhodné, lebo sú skôr známe ako dôležité regulátory v embryogenéze (6).

Hoci sa v poslednom čase objavilo viacero transkripčných faktorov, ako napr. GATA-2, Tcf4, Oct4, Mash1, LH2 a SCL/tal-1, ktoré sa zdajú, že udržiavajú rôzne progenitorové bunky na úrovni kľudového stavu, je potrebné zistiť, ako sú tieto transkripčné faktory regulované a akým mechanizmom pôsobia na kmeňové bunky pri zachovaní ich pluripotentného stavu (4).

Tab. 1: Niektoré malígne ochorenia a konštitutívna aktivácia JAK/STAT u nich zistená.

Lymfóm	aktivovaná STAT alebo JAK
CTCL	JAK 3, STAT 3, 5
MF	STAT 3
Herpesvírus saimiri dependent	STAT 3
EBV-related	STAT 1, 3
Leukémia	
Erytroleukémia	STAT 1, 5
AML	STAT 1, 3, 5
CML	STAT 5
ALL	STAT 1, 5
AML M ₇	STAT 5
HTLV dependent T-cell leukémia	JAK 1, 3STAT 3, 5

Skratky: CTCL - cutaneous T-cell lymphoma, MF - mycosis fungoides, EBV - Epstein-Barr vírus, AML - akútna myeloidná leukémia, ALL - akútna lymfoblastová leukémia, HTLV - human T-leukaemia/lymphoma virus (3).

Nedávno bolo zistené, že expresia telomerázy koreluje s potenciálom sebaobnovy hemopoetických buniek. U KKB bolo zistené postupné skracovanie teloméry s vekom (s každým delením strácajú telomerickú DNA). Takto telomeráza môže regulovať potenciál sebaobnovy redukciami rýchlosti skracovania DNA (7). Teloméry sú nekódujúce sekvencie DNA, charakterizované mnohopočetným opakovaním motívu TTAGGG. Telomeráza je enzým charakteru ribonukleoproteínu, ktorý je schopný predlžovať teloméry (8). U väčšiny normálnych somatických buniek je telomerázová aktivita nízka, alebo chýba a telomerická DNA sa následne stráca po proliferácii in vitro a u deliacich buniek in vivo s vekom. Progredívne skracovanie telomér bolo pozorované u takmer všetkých somatických buniek, vrátane primitívnych KKB z KD dospelého. Tieto pozorovania ukazujú, že expresia funkčnej telomerázy a potreba telomerázy by mohla byť obmedzená na bunky zárodočnej línie a niektoré nádorové línie. Obmedzená životnosť väčšiny krvných buniek vyžaduje trvalú produkciu buniek - u dospelého človeka to môže byť viac ako 10^{12} buniek za deň. Táto ohromná produkcia (do 4×10^{16} buniek počas života) je dosiahnutá proliferáciou a diferenciáciou progenitorových buniek, ktoré pochádzajú z KB s potenciálom sebaobnovy (6). Paradoxne ale, veľká väčšina KB v KD dospelého je v necyklujúcom stave - predpokladá sa teda, že KKB má obmedzený počet delení (teoreticky 4×10^{16} buniek sa vyprodukuje 54 deleniami jednej KB). Zatiaľ nie je známe, koľkokrát sa môže KKB rozdeliť - možno od menej ako 100 až po viac ako 5000 krát (6).

MIKROPROSTREDIE.

Na udržanie a reguláciu hemopoézy sú nevyhnutné regulačné molekuly a lokalizačný fenomén v bunkovej stróme. KB môžu existovať v špeciálnych miestach v mikroprostredí KD in vivo, kde stromálne bunky, zložky špecifickej extracelulárnej matrix, cytokíny - viazané na extracelulárnu matrix alebo stromálne bunky a adhezívne molekuly predstavujú rovnováhu signálov, ktorá chráni pool KB a zároveň riadi ich proliferáciu a diferenciáciu (7, 9). Stromálne bunky predstavujú fibroblasty, adipocyty, endotelové bunky, ako aj hemopoetické bunky - makrofágy. Tieto bunky produkujú množstvo rôznych cytokínov dôležitých v biológii KB (FL, SCF, TPO...). V kultúre stimuluje tieto bunky do produkcie rast stimujúcich molekúl napr. IL-1 a platelet derived growth factor (PDGF) (10).

U dospelého asi 10% buniek KD je organizovaných v kom-

paktných agregátoch - *hematonoch*. V hematone sa nachádzajú mezenchymálne bunky, perivaskulárne lipocyty, endotelové bunky a makrofágy, ktoré sú tu v kontakte s LTC-IC, CAFC, HPP-CFC (high proliferative potential - colony forming cell), CFU-GM, BFU-E. Frakcia buniek z hematonu je 3,7 násobne obohatená o 35 dňové LTC-IC oproti bunkám z buffy coatu, tvorí viac CFU-GM a HPP-CFC v myeloidnej kultúre a viac B-lymfocytov v lymfopoetických kultúrach (11). Dôležitú úlohu má pravdepodobne aj inervácia KD, o čom je zatiaľ málo informácií v literatúre. Podľa Iversena a spol. (12) množstvo LTC-IC buniek u plegických pacientov z denervovanej KD bolo v priemere o polovicu nižšie ako u tých istých pacientov z KD nepostihnutej denerváciou a u kontrolnej skupiny zdravých osôb.

Gupta a spol. (9) zistili že pri kultivácii in vitro O-sulfurované heparan sulfát glykozaminoglykany (HSGAG) produkované stromálnymi bunkami napomáhajú vzniku („niches“) kmeňových buniek lokalizovaním špecifických heparín-viažúcich proteínov s KKB, čím regulujú kontrolovaný rast a diferenciáciu KB. Zistili tiež, že pri kultivácii bez prítomnosti strómy kombinácia špecifických HS GAG s IL-3 a MIP-1 alfa (alebo PF4 - doštičkový faktor 4) je dostatočná na udržanie väčšiny vstupných LTC-IC do 5 týždňov v kultúre. Expanzia je možná pridaním rast podporujúcich RF (9). Ďalšie heparín viažúce proteíny dôležité v biológii KB sú basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), trombospodín, fibronektín. Nie je úplne jasné, ako GAG modulujú udržanie LTC-IC. Predpokladá sa, že GAG lokalizujú cytokíny a proteínovú matrix s KKB a modulujú aktivitu cytokínov (9).

HOMING (USÍDLLENIE).

Homing je schopnosť buniek selektívne nájsť strómu KD, následne sa tam usídlieť a zahájiť hemopoézu (13). Tento proces je nepochybne sprostredkovaný prostredníctvom množstva spoznávacích a adhezívnych udalostí.

Progenitorové bunky KD a PK exprimujú rôzne adhezívne molekuly - integríny, selektíny, selektínové ligandy. Integríny beta₁ VLA-4 a beta₂ LFA-1 sa nachádzajú viac na KB v KD. Sú znížené u cirkulujúcich progenitorov. Endotelové bunky a stromálne bunky exprimujú VCAM-1 a ICAM-1 (adhezívne molekuly patriace do veľkej imunoglobulínovej rodiny), ktoré sú ich ligandy. Protilátky proti VLA-4 a VCAM-1 inhibujú homing KB do KD (14). Bolo zistené, že pri homingu je vysoký stupeň špecificity interakcie, potrebný pre správne „nasmerovanie“ buniek. Za to zodpovedajú komplexné sacharidy. Molekuly, ktoré dekodujú informáciu sprostredkovanú sacharidmi sú proteíny-lektíny. Hardy a spol. (13) uvádza, že rozpoznanie a následná adhézia KKB stromálnymi bunkami je sprostredkovaná homing lektínom s galaktozyl/manozylovou špecificitou (sacharidovo-lektínovou interakciou) (13). O dôležitosti selektínov pri homingu svedčí aj práca (Dercksen a spol.) (15), podľa ktorej počet podaných CD34⁺ buniek exprimujúcich L-selektín pri transplantácii KB koreluje s rýchlosťou obnovy trombopoézy u pacientov po vysokodávkovanej chemoterapii.

Zaujímavá sa naskytá otázka, či sú rôzne molekulové mechanizmy pri usídlení a/alebo prihojení (engraftmente) u KB z rôznych zdrojov (periférnej krvi, KD, pupočnikovej krvi). Transplantabilita buniek z rôznych zdrojov nie je rovnaká a sú potrebné výskumy na zodpovedanie tejto otázky (13).

Pri migrácii a usídlení KKB sa udávajú ako dôležité chemokínové molekuly - napr. stromal derived factor-1 (SDF-1), EB 11 ligand, CK beta-11 (MIP-3 beta) sa zúčastňujú in vitro chemotaktickej migrácie primitívnych buniek KD a pupočnikovej krvi a účinkujú synergicky so SCF (16). Väčšina chemokínov pôsobí na zrelé bunky (napr. IL-8 na granulocyty), ale SDF-1, ktorý je produkovaný stromálnymi bunkami (ale aj bunkami iných tkanív) je chemotaktickým faktorom zároveň pre progenitorové bunky (14). Výskumy na myši „nulovej“

pre chemokínové receptory ako CXCR4 (receptor pre SDF-1), CXCR2 (receptor pre IL-8) a CCR-1 (receptor pre MIP-1 alfa) ukazujú, že tieto chemokínové receptory sa zúčastňujú migrácie primitívnych buniek (16).
Procesu adhézie sa môže zúčastňovať aj RF, naviazaný na povrchu buniek (napr. SCF na stromálnych bunkách) (14). Tohto procesu sa pravdepodobne zúčastňuje aj molekula CD34 naviazaná na povrchu KB - jej ligandom je L-selektín (14).

MOBILIZÁCIA

Presun kmeňových a progenitorových buniek z kostnej drene do periférnej krvi sa nazýva mobilizácia progenitorových a kmeňových buniek (14).

Pozoruhodnou črtou mobilizácie KKB je rôznorodosť stimulačných agensov, ktoré zahŕňujú: RF, cytotoxické látky a niektoré chemokíny. Medzi chemokíny patria MIP-2, IL-8, BB-10010 (geneticky vytvorený MIP-1 alfa). Čiastočný zoznam RF: G-CSF, GM-CSF, IL-7, IL-12, FL, TPO, SCF. Zvláštnosť tejto skupiny je hlavne v rôznorodosti čo sa týka cieľových buniek na ktoré pôsobia. Napr. RF, ktoré predominantne účinkujú na bunky myeloidného radu (G-CSF), na lymfocyty (IL-7), na megakaryocyty (napr. TPO), sú všetky potentné mobilizačné agensy. Spoločné črty pôsobenia RF: 1. Kinetika hemopoetických progenitorových buniek (HPB) je po ich podaní podobná s dosiahnutím vrcholu cirkulujúcich HPB (5-500 násobné zvýšenie počtu oproti hodnote pred mobilizáciou) všeobecne po 7-10 dňoch od začatia mobilizácie RF. 2. Mobilizuje sa široké spektrum HPB vrátane primitívnych pluripotentných buniek, ako aj zadaných myeloidných, erytrocytových a megakaryocytových progenitorov. 3. Mobilizované bunky majú iné črty ako HPBz KD - viac ich je v kludovom stave bunkového cyklu, expresia VLA-4 a c-kit je znížená u mobilizovaných buniek.

Bolo zistené, že mobilizácia G-CSF, Cyklofosfamidom a IL-8 je závislá na G-CSFR (receptor pre G-CSF). Toto ale neplatí pre mobilizáciu FL (18).

EX VIVO ZMNOŽENIE (EX VIVO EXPANZIA)

Transplantácia KKB je definitívne kuratívna metóda pre rôzne malígne a vrodené ochorenia a zabezpečuje obnovu myeloepózy pre pacientov po vysokodávkovanej chemoterapii. Transplantácia KKB je však limitovaná viacerými faktormi:

1. Na získanie dostatočného množstva KB sú potrebné náročné procedúry - operačne zber KB z KD alebo aferézy.
2. Aj za týchto podmienok je počet požadovaných buniek limitovaný.
3. Kinetika regenerácie zrelých krvných buniek po transplantácii KB nie je ideálna, preto tieto bunky majú malý priamy terapeutický efekt na obdobie od 1 do 3 týždňov (19).

V ostatnej dobe je snaha tieto limitácie odstrániť zvýšením počtu proliferácií primitívnych hemopoetických buniek pred ich podaním prostredníctvom ich kontrolovanej ex vivo kultúry. Tieto techniky zapadajú do termínu **ex vivo expanzia (zmnoženie) KB**.

Dodnes nie sú definované podmienky, za ktorých môžu byť tieto manipulácie využité, ani mechanizmy účinku na celulárnej úrovni. V poslednej dobe sa pri zmnožení KKB dosiahol určitý úspech (2). Napr. Kanai a spol. (20) dosiahol zmnoženie SRC kultiváciou so stromálnou líniou MS-5 a kombináciou cytokínov FL a TPO. Dôvod, prečo niektorí autori začali mať v tomto smere úspech môžu byť v spoločných rysoch metodológie ich postupov. K nim patrí:

- iniciácia kultúry s relatívne nízkou koncentráciou buniek, ktoré sú obohatené o HSC
- častá výmena média
- interakcia HSC so zvláštnymi stromálnymi bunkami
- použitie veľmi vysokých koncentrácií niektorých cytokínov (2).

Objav a klonovanie rôznych RF otvorilo cestu k rôznym postupom manipulovania hemopoézy pre klinické využitie. Boli

vyvinuté rôzne bunkové stromálne línie, ktoré podporujú hemopoézu (20). Tieto bunkové línie imitujú prostredie KD a v kultúrach s týmito bunkami dochádza podobne ako in vivo k interakcii KKB a stromálnych buniek. Je dôležité zahájiť kultiváciu purifikovanou frakciou napr. CD34⁺ buniek (21). Pri niektorých ochoreniach ako napríklad CML (chronická myeloidná leukémia), plazmocytóm, atď. je táto frakcia kontaminovaná nádorovými bunkami, preto sa pri týchto ochoreniach odporúča selektovať ešte primitívnejšie subfrakcie - CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ u myelómu a CD34⁺HLA-DR⁻ u CML (7).

Ex vivo zmnoženie môže prebiehať aj bez prítomnosti stromálnych buniek s využitím kombinácie RF. Existuje veľa možností kombinácií RF ako aj ich koncentrácií. Rôzni autori udávajú preto rôzne „optimálne“ podmienky. Väčšina autorov používa FL, SCF, IL-3, z ďalších RF sa využívajú včasne pôsobiace - napríklad IL-11, IL-6, G-CSF, TPO, GM-CSF (20, 21).

Ex vivo zmnoženie sa využíva aj u zrejších hematopoetických buniek - napr. na zmnoženie cytotoxických efektorových buniek, buniek prezentujúcich antigén (APC), dendritických buniek - za účelom imunoterapie nádorov ex vivo manipulovanými cytotoxickými bunkami alebo v expanzii APC - buniek schopných zahájiť proces imunitnej odpovede (7).

GÉNOVÁ TERAPIA

Počas ostatných 2 dekád sa vyvinulo veľké úsilie za účelom liečby ľudských chorôb nahradením nefunkčných génov v bunkách alebo opravou mutácií, ktoré spôsobujú chorobu. Úspešná aplikácia týchto metód by mohla viesť ku efektívnej terapii rôznych genetických a získaných chorôb, z ktorých mnoho je dnes nevyliciteľných.

Gény môžu byť vpravené do buniek buď pomocou vírusových vektorov, lebo majú schopnosť preniesť DNA do hostiteľskej bunky, alebo nevirusových metód, ktoré sú však menej efektívne v tomto smere (22). Bežnou technikou je využitie retrovírusu, v ktorom vírusový štruktúrny gén je nahradený klonovaným génom, ktorý chceme „preniesť“ do cieľových buniek. Zmenený vírus je potom použitý ako vektor, ktorý premiestni klonovaný gén do kultivovaných buniek. Vzhľadom na vlastnosti retrovírusov sa rekombinantná DNA integruje do celulárneho genómu s vysokou frekvenciou. Alternatívnou metódou je komplexovanie s kalcium fosfátom. Komplex kalcium fosfát-DNA pomaly precipituje do buniek a DNA sa premiestni do malého percenta buniek. Iná transfekčná metóda je elektroporácia, pri ktorej elektrický náboj vytvára póry v membránach buniek, cez ktoré je klonovaná DNA premiestnená do bunky. U posledne menovaných metód dochádza k prenosu do evidentne náhodných miest v DNA malého počtu buniek (23). KKB sú vzhľadom na svoje vlastnosti vhodným terčom v pokusoch o génovú terapiu. KKB môžu byť čiastočne purifikované z PK, KD, pupečníkovej krvi, transdukované s génmi a potom vrátené naspäť do organizmu. Hocijaké genetické ochorenie, ktoré odpovedá na alogénnu TKD, by malo odpovedať na génovú terapiu.

Najvhodnejšou indikáciou na transdukciiu génov do KKB sa javí korekcia vrodených ochorení. Tabuľka 2. ukazuje ochorenia úspešne liečené alogénnou TKB:

Tab. 2. Niektoré vrodené ochorenia úspešne liečené alogénnou transplantáciou KKB (22).

Línia najviac postihnutá	Ochorenie
Lymfocytová	SCID
Erytron	Talassémia major
Erytron	Košáčikovitá anémia
Granulocytová	Chronická granulomatózna choroba
Trombocytová	Wiscott-Aldrichov syndróm
Makrofágová	Gaucherova choroba
Osteoklasty	Osteopetróza

Dalšími potencionálnymi indikáciami pre génový transfer sú korekcie získaných defektov, zvlášť tých, ktoré vedú k neoplázii a liečba niektorých infekčných ochorení - napríklad AIDS. „Vloženie“ génu, ktorý buď pôsobí proti onkogénu alebo poškodzuje jeho mRNA by mohol byť takýmto terapeutickým prístupom. Experimentálne bola táto metóda skúšaná vložení protismerných génov, ktoré neutralizujú produkt onkogénu ako napr. bcr/abl, alebo prostredníctvom ribozómu, ktorý štiepi prekážajúci transkript. Gény, ktoré produkujú inhibitory HIV by mohli byť prístupom v liečbe AIDS.

Použitím hoci aj moderných zberových techník, ktoré mobilizujú KKB, ich počet predstavuje len malé percento KKB v tele. Keďže KKB sú prevažne nedeliace sa bunky, pravdepodobnosť prenosu je nízka. Preto počet transdukovaných kmeňových buniek je veľmi nízky v pomere k celkovému počtu KKB v organizme. Len malé množstvo buniek by mohlo mať dobrý efekt u pacientov napr. s chronickou granulomatóznou chorobou (CHGD) a deficitom adenozyndeaminázy. Napr. u CHGD sa odhaduje, že iba 5% plne funkčných neutrofilov by mohlo udržať rozhodujúcu ochranu proti infekcii a oxidázová aktivita iba v 3-5% buniek je združená s miernym fenotypom (22).

PATOLOGICKÉ KMEŇOVÉ BUNKY.

Viaceré hematologické maligne ochorenia sa pokladajú za ochorenia KKB - napr. chronická myeloidná leukémia (CML) (24), väčšina akútnych myeloidných leukémií (AML) s výnimkou M3 FAB (25), 5q- syndróm (26)...

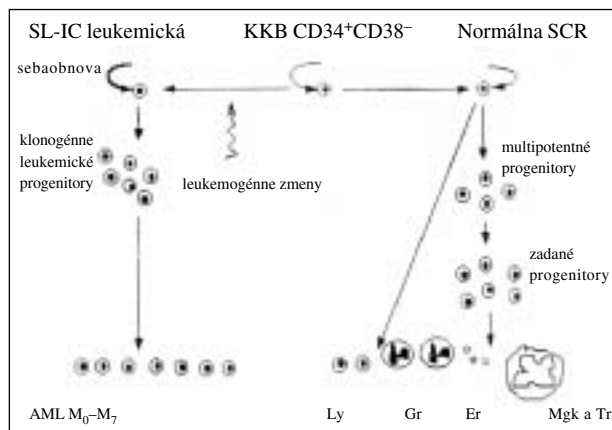
U 5q- syndrómu u niektorých pacientov veľká frakcia pro-B (CD34+CD19+) progenitorov bola súčasťou 5q- klonu. KKB s lymfo-myeloidným potenciálom sa teda zdajú byť primárnym terčom postihnúť v 5q- syndrómu. U MDS s trizómiou 8 a monozómiou 7 veľký počet FISH štúdií ukázalo, že lymfocyty sú len v málo prípadoch postihnuté. Vyšetrenie lymfocytov však nemusí byť odpoveďou na to, či je postihnutá pluripotentná KB, keďže niektoré patologické KB môžu mať zablokované vyzrievanie do tohoto radu. U všetkých pacientov s 5q- syndrómom FISH analýza purifikovaných CD34⁺CD38⁻ buniek (v tejto frakcii sa nachádza väčšina KKB) ukázala, že takmer všetky bunky mali 5q deléciu (26).

Pri malígnom myelóme sa viacerými štúdiami zistilo, že najmenej diferencované bunky malígneho klonu (CD34⁺/CD19⁺, CD19⁺/PGP⁺- P-glykoproteín) v periférnej krvi môžu reprezentovať hlavný rezervoár patologických kmeňových buniek, ktoré sú rezistentné na liečbu (27).

Bonnet a spol. (25) dosiahol prihojenie AML leukemických buniek u SCID myši len purifikovanou frakciou leukemických buniek CD34⁺CD38⁻. Purifikovanou frakciou CD34⁻ buniek alebo CD34⁺CD38⁺ buniek k prihojeniu v žiadnom prípade nešlo. Išlo o blasty AML M1 - M5 FAB. Výnimku z týchto podtypov AML bola M3, ktorej blasty nedokázali engraftovať SCID myši a najprimitívnejšia frakcia AML M3 blastov bola CD34⁺CD38⁺, čo je frakcia zrelších, už zadaných buniek. Bunky zodpovedné za prihojenie boli nazvané SCID leukemia-initiating cell (SL-IC). Tieto bunky engraftovali SCID myši aj v prípadoch, keď počet CD34⁺ buniek z populácie blastov bol veľmi nízky - napr. vo vzorke pacienta s AML-M4 bolo CD34⁺ buniek len 2% (25). SL-IC dokázali v myšiach vyzrievať do blastov, čo poukazuje na hierarchickú organizáciu leukemického klonu (obr. 1.).

U CML sa na základe dlhodobých kultúr zistilo, že patologické LTC-IC proliferujú pomalšie ako normálne LTC-IC, ale

Obr. 1. Model porovnávajúci organizáciu normálneho a AML hemopoetického systému.



Podľa Bonnet a spol. (25) leukemogénna udalosť (udalosti) vzniká na úrovni primitívnej KKB. Dôsledkom toho bunka zvyšuje svoju schopnosť sebaobnovy a naruší sa jej normálny vývojový program tak, že sa normálne línie nevyvíjajú. Táto leukemická KB je dokázateľná v SL-IC esaji na báze iniciácie AML po transplantácii NOD/SCID myši. SL-IC produkuje klonogénne leukemické progenitory (AML-CFU), ktoré produkujú leukemické bunky. Tento model ukazuje, že AML klon je organizovaný hierarchicky s mnohými podobnosťami s normálnym systémom. Skratky: Ly-lymfocyty, Gr-granulocyty, Er-erytrocyty, Mgk-megakaryocyty, Tr-thrombocyty, AML-akútna myeloidná leukémia.

proliferujú na rozdiel od normálnych trvale a je teda porucha regulácie ich sebaobnovy. Zistilo sa, že patologické kmeňové bunky u CML nereagujú na inhibíciu MIP-1 alfa ako normálne KB. Na TGF reagujú ale podobne ako normálne KKB (24).

ZÁVER

Konečný cieľ pre molekulárnu medicínu je nasmerovať multipotentné ľudské bunky s vysokou proliferáčnou kapacitou do špecifických diferenciačných programov v organizme. Ak sa toto stane možné v blízkej budúcnosti a všetko nasvedčuje tomu, že to možné bude, otvorí sa množstvo terapeutických postupov. Ako zdroj buniek by mohli byť ES, čo je ale významný etický problém čo sa týka ľudských buniek. Jedna možná cesta, ako obísť tento problém je začať s multipotentnými KB izolovanými z tkanív dospelého človeka a „nasmerovať“ ich in vitro do špecifických línií a pritom zachovať ich proliferáčny potenciál (4). Využitie v praxi by mohlo byť napr. v generácii rôznych typov neurónov pri liečbe Alzheimerovej choroby, poraneniach miechy, alebo Parkinsonovej chorobe, produkciu buniek srdcového svalu pre pacientov po prekonaní infarktu myokardu, produkcia inzulín-sekretujúcich buniek pankreasu pri liečbe niektorých typov diabetes mellitus, alebo dokonca v generácii dermálnej papily alebo KB vlasového folikulu za účelom liečby niektorých typov alopecie (2). Produkcia prakticky neobmedzeného množstva rôznych typov krvných buniek, vrátane KKB, by mohla znamenať prevratné zmeny v liečbe hematologických ochorení.

Hoci efektívna génová terapia u ľudí bola len unikajúcim cieľom, posledné pokroky v tejto oblasti nás vedú k nádeji, že tento cieľ bude realizovaný v priebehu nasledujúcich niekoľkých rokov (22).

Literatúra

- Morrison S. J., Shah N. M., Anderson D. J.: Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. Cell, 88, 1997, 287-298.
- Zandstra P. W., Lauffenburger D. A., Eaves C. J.: A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. Blood, 96, 2000, 1215-1222.
- Ward A. C., Tow I., Yoshimura A.: The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. Blood, 95, 2000, 19-29.

- Fuchs E., Segre J. A.: Stem Cells: A New Lease on Life. Cell, 100, 2000, 143-15.
- Kawamura Ch., Kizaki M., Yamato K. et al.: Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT-3. Blood, 96, 2000, 2005-2011.
- Landsorp P. M.: Molecular Aspects of Stem Cell Renewal. In: Thomas E. D., Blume K. G., Forman S. J.: Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell science, 1999, 58-62.

7. Aglietta M., Bertolini F., Carlo-Stella C., et al.: Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use. *Hematologica*, 83, 1998, 824-848.
8. Kleiner P.: Protinádorová chemoterapie. Galén: 1996, 614.
9. Gupta P., Oegema T. R. Jr., Brazil J. J. et al.: Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when Interleukin-3 and single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interactions of heparan sulphate with early-acting cytokines and matrix proteins. *Blood*, 95, 2000, 147-185.
10. Sutherland H. J., Hogge D. E., Eaves C. J.: Characterization, quantitation and mobilization of early hematopoietic progenitors: Implications for transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 18, 1996, S1-S4.
11. Blazsek I., Chagraoui J., Peault B. et al.: Ontogenic emergence of the hematopoietic stromal unit that supports multipotential hematopoietic progenitors in mouse bone marrow. *Blood*, 96, 2000, 3763-3771.
12. Iversen P. O., Hjeltne N., Holm B. et al.: Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood*, 96, 2000, 2081-2083.
13. Hardy Ch. L., Megason G. C.: Specificity of hematopoietic stem cell homing. *Hematological Oncology*, 14, 1996, 17-27.
14. Kanz L., Brugger W.: Mobilization and Ex Vivo Manipulation of Peripheral Blood progenitor Cells for Support of High-Dose Cancer Therapy. In: Thomas E. D., Blume K. G., Forman S. J.: *Hematopoietic Cell Transplantation*. Blackwell science, 1999, 455-468.
15. Dercksen M. W., Gerritsen W. P., Rodenhuis S. et al.: Expression of Adhesion Molecules on CD 34+ cells: CD 34+L-Selectin+ Cells Predict a Rapid Platelet Recovery After Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Blood*, 85, 1995, 3313-3319.
16. Broxmeyer H. E., Smith F. O.: Cord Blood Stem Cell Transplantation. In: Thomas E. D., Blume K. G., Forman S. J.: *Hematopoietic Cell Transplantation*. Blackwell science, 1999, 431-443.
17. Baumheuter S., Singer M. S., Henzel W., et al.: Binding of L-Selectin to the Vascular Sialomucin CD34. *Science*, 262, 1993, 436-438.
18. Liu F., Poursine-Laurent J., Link D. C.: Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood*, 95 2000, 3025-3031.
19. Emerson S. G.: Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood*, 87, 1996, 3082-3088.
20. Kanai M., Hirayama F., Yamaguchi M.: Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity. *Bone Marrow Transplantation*, 26, 2000, 837-844.
21. Haylock D., Simmons P., To L. B., Juttner Ch.: Growth Factors and Ex Vivo Expansion of Hemopoietic Cells. In: Morstyn G., Sheridan W. eds. *Cell Therapy*. Cambridge. Cambridge University Press, 1996, 221-237.
22. Beutler E.: Gene therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 5, 1999, 273-276.
23. Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A.: *KUBY Immunology*. W. H. Freeman and Company, 2000, 670.
24. Eaves C., Udomsaki C., Cashman J. et al. The Biology of Normal and Neoplastic Stem Cells in CML. *Leukemia and Lymphoma*, 11, 1993, Suppl. 1, 245-253.
25. Bonnet D., Dick J. E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3, 1997, 730-737.
26. Nilsson L., Astraud-Grundstrom I., Arvidson I.: Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q- deleted MDS: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood*, 96, 2000, 2012-2021.
27. Lemoli R. M., Fortuna A.: C-kit ligand (SCF) in Human Multiple Myeloma Cells. *Leukemia and Lymphoma*. 20, 1996, 457-464.