

KRVOTVORNÉ KMEŇOVÉ BUNKY I.

(DEFINÍCIA, IDENTIFIKÁCIA A REGULÁCIA)

HEMATOPOIETIC STEM CELLS I.

(DEFINITION, IDENTIFICATION AND REGULATION)

MARKULJAK I.

HEMATOLOGICKÉ ODDELENIE, NEMOCNICA F. D. ROOSEVELTA, BANSKÁ BYSTRICA.

Súhrn: Krvotvorné kmeňové bunky (KKB) sú predmetom zvýšeného záujmu pre ich biologické vlastnosti a potencionálne medicínske využitie. Využitie KKB sa neustále zvyšuje v liečbe rôznych malígnych a nemalígnych ochorení. Identifikácia a charakteristika KKB je nevyhnutná pre rozvoj nových postupov v zmnožení (expanzii) a transplantácii KKB. Identifikácia a izolácia KKB je založená na ich biologických, fyzikálnych, imunologických a funkčných vlastnostiach. V ostatnom čase bolo objavených niekoľko účinných stimulačných faktorov ako napr. FLT-3 ligand (FL) a Stem cell factor (SCF), ktoré sú dôležité v regulácii KKB. Lepšie pochopenie regulačných mechanizmov KKB môže prispieť k vývoju nových terapeutických prístupov rôznych zatiaľ nevyliečiteľných ochorení.

Kľúčové slová: Krvotvorné kmeňové bunky, rastové faktory, identifikácia

Summary: Hematopoietic stem cells (HSC) are a subject of increasing interest because of their biological properties and potential medical importance. HSC are being increasingly used for treatment of various malignant and nonmalignant disorders. Identification and characterization of HSC is essential in order to achieve new developments in stem cell expansion and HSC transplantation. Identification of HSC is based on their biological, physical, immunological and functional properties. Recently several potent stimulating factors have been discovered e.g. FLT-3 ligand (FL) and Stem cell factor (SCF) that influence HSC fate. Better understanding of regulatory mechanisms in HSC biology may contribute to the developments of new therapeutic approaches of various so far incurable disorders.

Key words: Hematopoietic stem cells, growth factors, identification

KMEŇOVÉ BUNKY

Kmeňové bunky (KB) sú definované ako klonogénne bunky schopné sebaobnovy a viačlíniovej diferenciácie (1).

Najvčasnejšie kmeňové bunky v ontogenéze sú totipotentné KB prechádzajúce zo zygoty do vnútornej bunkovej masy blastocysty. Následne dajú totipotentné KB vzniknúť somatickým kmeňovým/progenitorovým bunkám a primitívnym KB zárodočným (1).

KB dospelého organizmu sú relatívne pomaly sa deliace bunky schopné odpovedať na špecifické signály prostredia a byť regenerovať nové KB alebo sa diferencovať. Keď KB dostanú signál na diferenciáciu, často najprv vstúpia do prechodného štádia rýchlej proliferácie. Po vyčerpaní proliferatívneho potenciálu dočasne proliferujúca bunka ukončí cyklus a vydá sa na cestu terminálnej diferenciácie (2).

KB dospelého organizmu sú často lokalizované v špecifických miestach („niches“), kde reagujú na rôzne vonkajšie a vnútorné signály (2).

Populácia hemopoetických KB je prevdepodobne najlepšie charakterizovaná populácia KB (1). Len v roku 1955 preukázalo nezávisle niekoľko výskumníkov, že v kostnej dreni sú prítomné krvotvorné bunky, ktoré sú schopné sebaobnovy a repopulácie v KD poškodennej ožiarením. V roku 1962 bolo zistené, že rovnaké KB sú prítomné aj v periférnej krvi (PK) a boli nazvané „krvné kmeňové bunky“ (3).

Len nedávno bola znovuobjavená nervová KB (objav brzdila dogma, že toto tkanivo nie je schopné regenerácie a donedávna teda mozog nebol považovaný za systém KB). Nie je však ešte jasné, či všetky neurálne KB sú schopné tvoriť všetky druhy neurónov, ktoré sa nachádzajú v dospelom centrálnom

a periférnom nervovom systéme (4). Je známa existencia ďalších KB - gonád, kože, epitelia intestinálnych krypt, čuchového epitelia (2, 4). Niektoré KB sa predpokladajú, ale ešte neboli izolované - napr. endodermálne KB (z ktorých sa vyvíja črevo, pečeň, endokrinný a exokrinný pankreas). Predpokladá sa, že existuje hepatálna KB, keďže tkanivo pečene sa dokáže regenerovať ako odpoveď na poškodenie. Nebola ale doposiaľ izolovaná (1, 2). Je známa mezenchymálna KB, izolovaná z kostnej drene, z ktorej sa vyvíjajú osteoblasty, bunky hladkej svaloviny, chondrocyty, adipocyty. V poslednej dobe stúpa záujem o túto KB v súvislosti s novými postupmi pri transplantácii KKB (5).

KRVOTVORNÁ KMEŇOVÁ BUNKA (KKB)

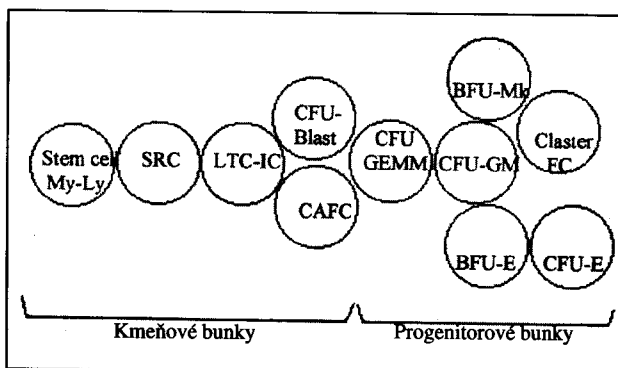
Štruktúrna a funkčná integrita hemopoetického systému je udržiavaná kmeňovými bunkami, ktoré podľa definície predstavujú relatívne malú bunkovú populáciu, lokalizovanú hlavne v KD, ktorá je schopná jednak **sebaobnovy** - t. j. produkcie KB a jednak **diferenciácie**, t. j. bunka sa ireverzibilne zadá do jednej z línií a je schopná vytvoriť klonus do 10^5 línií zodaných buniek, ktoré vyzrievajú do špecializovaných buniek (6).

Hemopoéza je v ontogenéze spočiatku lokalizovaná extraembryonálne - v krvných ostrovoch žltkového vaku. KKB sú odvodené od hemangioblastu, ktorý je mezodermálneho pôvodu a je spoločným „predchodcom“ KKB a endotelových buniek v embryogenéze. Prostredie žltkového vaku umožňuje vývoj len erytropoézy a táto môže byť nesenzitívna na erytropoetín (EPO). Prostredie žltkového vaku nie je vhodné na vývoj iných línií. Finálnym produktom sú jadrové erytrocyty (7). Počas embryonálneho vývoja prebiehajú najmenej 2 mobilizácie

KKB - z embryonálnych lokusov do fetálnej pečene a z fetálnej pečene do sleziny a kostnej drene (KD) (1). V slezine a vo fetálnej pečeni dominuje erytropoéza a čiastočne je prítomná aj granulopoéza. Tu pretrvávajú hemopoéza do pôrodu a krátko po ňom. V kostnej dreni prevažuje granulopoéza (7).

Podľa Atkinsona (8) sa v KD nachádza 1 KKB na 2000 buniek. Niektorí autori stotožňujú KB s tzv. LTC-IC (long term culture-initiating cell) bunkou (9), avšak táto bunka je dokázateľná len *in vitro* a iba dlhodobé *in vivo* repopulačné esaje detekujú bunky, ktoré sú esenciálne pre udržanie hemopoézy po transplantácii krvotvorných kmeňových buniek (TKKB). V ostatných rokoch nastal veľký pokrok vo vývoji *in vitro* a *in vivo* testov s cieľom izolovať a purifikovať hemopoetické bunky. Aj napriek tomu dodnes nie je známy spoľahlivý test na detekciu KB. Všetky doteraz známe testy na kvantifikáciu ľudských KB sú len približné, schopné produkovať nepriame odhady a nemerajú počet aktuálne repopulujúcich buniek. Na základe rôznych týchto testov *in vivo* a *in vitro* sú hemopoetické KB a progenitorové bunky zoradené hierarchicky na základe ich schopnosti sebaobnovy a diferenciácie do zrelších progenitorov (10). Obr. 1.

Obr. 1: Bunková organizácia hemopoézy (hierarchia kmeňových a progenitorových buniek) (6, 10). Vysvetlenie skratiek v texte.



Ku kmeňovým bunkám patria:

SRC bunka (SCID repopulating cell). Táto bunka je schopná rozsiahlej proliferácie a viacliniovej repopulácie v kostnej dreni SCID myši. Bunka je detekovateľná výhradne v CD34+CD38- frakcii a má biologicky odlišné vlastnosti od CFC (colony forming cell) a väčšiny LTC-IC (6). SCID (severe combined immunodeficiency) myši majú ťažký kombinovaný imunodeficit, nemajú ani T ani B lymfocyty, NOD/SCID myši majú ešte navyše funkčný defekt NK buniek. Aby sa optimalizovali podmienky výskumu, keďže prostredie cudzej KD je bariérou engraftmentu, implantujú sa týmto myšiam ľudské kostné, alebo thýmové fragmenty (11).

LTC-IC bunka (long term culture initiating cell) - je bunka schopná udržať hemopoézu na týždne *in vitro* v tzv. dlhodobej kultúre. Princíp tejto kultúry spočíva v kultivácii vrstvy stromálnych buniek KD, ktorá slúži ako „pôda“ pre testované bunky. Po 5-8 týždňoch kultivácie sa vyhodnocuje počet CFU-GM (colony forming unit - granulocyte macrophage) vyprodukovaných v kultúre. Ich počet je závislý na vstupnom počte LTC-IC (9, 12, 13, 14). Ich výskyt v KD sa v priemere udáva 4 na 2×10^5 buniek KD a 3 na 1 ml periférnej krvi (13). **CAFC** (Cobblestone area forming cell). Dokazuje sa v CAFC teste. Používa predpripravenú strómu ako podporu hemopoézy, primitívne bunky sú vyhodnocované priamo. Proliferujú za prítomnosti vrstvy stromálnych buniek a tvoria charakteristické kolónie, ktoré pripomínajú dlaždice (cobblestones). CAFC kultúry, rovnako ako aj dlhodobé kultúry pretrvávajú niekoľko týždňov. Veľké arey prítomné po 28. dni kultúry sa pokladajú za odvodené z primitívnych progenitorových buniek (9).

CFU-S (colony forming unit - spleen). CFU-S test test slezinných kolónií u myši bol prvým kvantitatívnym merítkom primitívnych progenitorových hemopoetických buniek (15). Princíp spočíva v i. v. podaní hemopoetických buniek letálne ožiarenej myši. Z týchto buniek vznikajú v slezine viacliniové kolónie. Každá kolónia pochádza z jednej bunky - CFU-S. Populácia CFU-S je ale heterogénna a nepredstavuje len populáciu KKB, ale aj zrelších buniek (9).

CFU-blast (colony forming unit - blast).

Progenitorové bunky :

CFU-GEMM (colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte).

CFU-GM (colony forming unit - granulocyte, macrophage).

BFU-meg (burst forming unit - megakaryocyte).

BFU-E (burst forming unit - erythrocyte).

CFU-E (colony forming unit erythrocyte).

Cluster FC (cluster forming cell).

Všetky tieto progenitorové bunky je možné dokázať v krátkodobých *in vitro* kultúrach v semisolidnom médiu s rastovými faktormi (RF).

IZOLÁCIA A IDENTIFIKÁCIA KKB

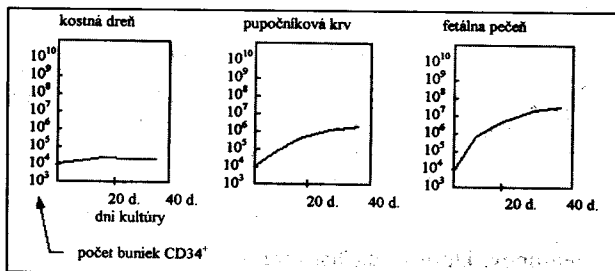
Mnoho pokusov o izoláciu a identifikáciu populácie KKB je založených na kombinácii fyzikálnych, biologických, imunofenotypických a funkčných vlastností cieľových buniek.

Fyzikálne vlastnosti: Pri spracovávaní myšej kostnej drene sa používali rôzne hustotné gradienty. Tieto experimenty ukázali, že KKB sa purifikovali spolu s lymfocytmi, čo viedlo k úvahe, že pluripotenentné kmeňové bunky sú morfológicky neodlíšiteľné od lymfocytov (9).

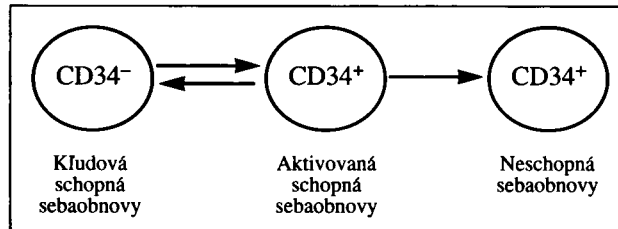
KKB vykazujú nízky predný a bočný rozptyl svetla (10). Z ďalších techník sa pri izolácii a identifikácii KKB využíva elektroforéza, ktorá izoluje KKB na základe elektrického náboja, separácia na hustotnom gradiente, ktorá využíva, že KKB patria medzi bunky s nízkou hustotou. Na izoláciu KKB sa využíva dnes kombinácia rôznych postupov (9, 11).

Biologické vlastnosti: Skutočnosť, že väčšina KB je v G_0 fáze bunkového cyklu možno tiež využiť pri ich izolácii. Napr. cyklus-spezifické látky sa používajú v rámci purifikácie KKB. Tieto látky ako napr. 4-hydroperoxycyklofosfamid alebo 5-fluorouracil eliminujú proliferujúce bunky ale ušetria necyklujúce bunky (9). Vlastnosti KKB sú však rozdielne na základe zdroja, odkiaľ pochádzajú. Mobilizované KKB sú vo veľkej väčšine v necyklujúcom stave (len 1% v S fáze), na rozdiel od buniek KD (34% v S fáze), čo je aj v súlade s fenotypom buniek. Príčina tohoto javu nie je zatiaľ známa (16). Biologické vlastnosti KKB sa menia aj v priebehu ontogenézy. Vyššiu proliferáciu aktivitu a slabšie reakcie na inhibitory hemopoézy majú KKB ontogeneticky mladšie (napr. KKB fetálnej pečene a pupočnikovej krvi) oproti KKB dospelého jedinca (17). Príkladom je práca na obr. 2. (18).

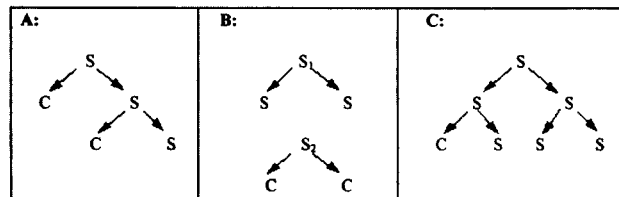
Obr. 2. Porovnanie proliferatívneho potenciálu ľudských hemopoetických buniek z rôznych zdrojov z rôznych štádií ontogenézy (porovnanie *in vitro* produkcie CD34+ koloniformných buniek z CD34+ CD45RAlo CD71lo „kandidátov“ na kmeňové bunky purifikované z kostnej drene dospelého človeka, pupočnikovej krvi a fetálnej pečene): Bunky boli kultivované v tekutej kultúre bez séra s RF (EPO, SCF, IL-3, IL-6) 5 týždňov. Po 5 týždňoch sa celkový počet CD34+ v kultúre buniek KD výrazne nezmenil, počet CD34+ buniek pupočnikovej krvi sa zvýšil 31 až 250 násobne, počet CD34+ buniek fetálnej pečene vzrástol 490 až 3200 násobne (18).



Obr. 3: Aktivácia KKB. Podľa prác na myšiach sa predpokladá podobný model aj u človeka, že CD34 je marker aktivácie KKB. Aktivované CD34⁺ bunky môžu byť konvertované do CD34⁻ buniek, alebo sa môžu začať diferencovať, čím stratia schopnosť sebaobnovy (20).



Obr. 4.: Možné typy delenia KB: S = kmeňová bunka, C = zadaná bunka.



Adherencia: Primitívne hemopoetické progenitory možno tiež odlišiť od zrelších progenitorov tým, že prvé adherujú lepšie ku stromálnym bunkám a na plast v tkanivových kultúrach (9). Znížená absorpcia rhodamínu: Rhodamín¹²³ je mitochondriálne farbivo, jeho absorpcia koreluje so sebaobnovovacou kapacitou (8).

Imunofenotyp: Antigen CD34 exprimuje približne 0,5-2% buniek kostnej drene, 0,01-0,1% mononukleárných buniek v periférnej krvi a 0,1-0,4% mononukleárných buniek pupočníkovej krvi (6). CD34 je monomérny transmembránový glykoproteín. Predpokladá sa, že hrá úlohu v intercelulárnej adhezii. Jeho ligandom je L-selektín (19). Niektoré pramene udávajú, že by mohol byť prejavom aktivácie KKB a že sa nenachádza na všetkých KKB (20, 21) Obr. 3. Cytoplazmatická časť molekuly obsahuje niekoľko potenciálnych fosforylačných miest pre rôzne proteinkinázy, čo poukazuje na to, že CD34 sa môže zúčastňovať transdukcie signálu vo vnútri bunky (9). CD34⁺ populácia obsahuje takmer všetky lymfoidné a myeloidné progenitorové bunky a LTC-IC bunky (9).

CD34 antigén sa nachádza aj na nehematologických bunkách, napr. na bunkách endotelu a embryonálnych fibroblastoch (22). Asi 40% prípadov akútnej myeloidnej leukémie (AML) exprimuje CD34 antigén, podobne aj in vitro kultivované progenitory u chronickej myeloidnej leukémie (CML). 70% prípadov B-akútnej lymfoblastovej leukémie (B-ALL) u detí má CD34 pozitivitu blastov, pri T-ALL je to len menšina. U pacientov s AML sa nachádza hlavne pri ochorení s myelodysplastickými črtami a karyotypom a u sekundárnych AML asociovaných s terapiou alkylačnými látkami (22).

Objav tohoto antigénu viedol ku vzniku rôznych systémov, založených na pozitívnej selekcii použitím monoklonových protilátok proti CD34 antigénu za účelom purifikácie KKB. CD34⁺ bunky možno izolovať aj negatívnou selekciou - odstránením CD34 negatívnych buniek pomocou monoklonových protilátok proti povrchovým antigénom zreých buniek.

Morfologicky sa CD34⁺ bunky javia ako zmes buniek podobných malým lymfocytom a blastickým bunkám, čo je dôkaz ich diferenciácie. Funkčne zahŕňujú všetky progenitorové bunky, ktoré tvoria kolónie v in vitro kultúrach. Kvôli tejto heterogenite veľa autorov charakterizovali CD34⁺ bunky na základe prítomnosti alebo absencie ďalších povrchových antigénov. CD34 silno pozitívne (CD34^{bright}) sa považujú za primitívnejšie, ako CD34 slabozitívne (CD34^{dull}). Fenotyp KKB je: CD34^{bright}, Thy-1⁺, CD38⁻, CD45RO⁻, Rhodamine 123^{dull}, Lin⁻ (bez líniov špecifických znakov). Táto podskupina predstavuje menej ako 10% všetkých CD34⁺ buniek (9). LTC-IC

sa nachádzajú vo viac ako 10% v subfrakcii buniek: CD34⁺, CD71⁻, CD38⁻, CD45RA⁻ (23).

Mobilizované periférne kmeňové bunky (PKB) exprimujú menej CD117 (c-kit) a CD71 a viac HLA-DR a CD38 ako kmeňové bunky kostnej drene. Mobilizované PKB majú aj nižšiu expresiu adhezívnych molekúl VLA-4 a LFA-1 ako KKB z KD. Rozdiel medzi primitívnymi kmeňovými bunkami kostnej drene a pupočníkovej krvi sa udáva hlavne v expresii HLA-DR, bunky pupočníkovej krvi sú HLA-DR⁺, bunky KD HLA-DR⁻ alebo slabozitívne (17).

CD34 pozitivita klesá s postupným vyzrievaním bunky. Najzrelšie progenitory (CFU-E, CFU-G, CFU-M) majú slabozitívnu alebo negatívnu expresiu CD34. Na zrejších bunkách sa CD34 antigén nenachádza. Najvyššie CFU (CFU-blast) ako prvé koexprimujú HLA-DR a CD38 a sú CD33⁻. Expresia CD33 je najskôr detekovateľná na CFU-GEMM, niektorých BFU-E a väčšine CFU-GM. CFU-GM preferenčne exprimujú CD13, ktorého expresia sa zvyšuje vyzrievaním v granulocytovej a makrofágovej rade, preto monocyty a bunky všetkých granulocytových línii exprimujú CD13 vo veľkom množstve, zatiaľčo erytroidné progenitory sú CD13 negatívne. HLA-DR⁺ a CD38⁺ bunky predstavujú viac ako 85% CD34⁺ buniek kostnej drene. 10% CD34⁺ buniek KD exprimuje zároveň CD41 a c-kit (24).

PROLIFERÁCIA VERSUS DIFERENCIÁCIA

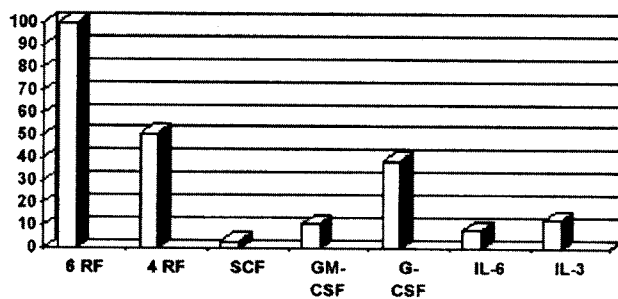
Popri sebaobnove a diferenciácii sú kmeňovým bunkám pripisované aj ďalšie vlastnosti ako napríklad vysoký migračný potenciál, schopnosť asymetrického delenia, schopnosť existovať v mitoticky neaktívnej forme a schopnosť vo veľkom rozsahu regenerovať rôzne typy buniek, z ktorých pozostáva tkanivo, v ktorom existujú (6).

Na základe rôznych štúdií počas ostatných 3 desaťročí sa predpokladá, že regulácia sebaobnovy, diferenciácie, proliferácie, maturácie a prežívania je vysoko integrovaný proces pod kontrolou extracelulárnych a intracelulárnych mechanizmov (6). Už len s viac ako 2000 purifikovanými a klonovanými rastovými faktormi (RF) na konci milénia (2) sa zdá byť tento proces bežnejšie komplexný. Intracelulárne mechanizmy predstavujú - protoonkogény, tumor supresorické gény, transkripčné faktory. Extracelulárne predstavujú regulačné molekuly a mikroprostredie.

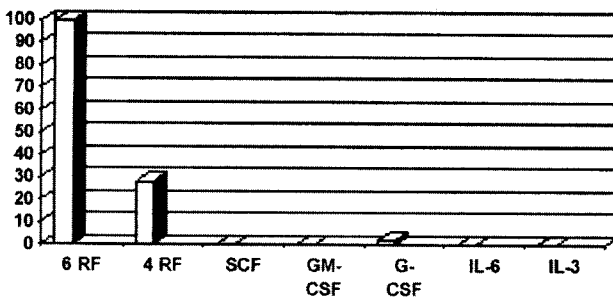
Extracelulárne: rastové faktory, sú molekuly - glykoproteíny s Mr. 18-90 kDa. Biologická aktivita celej skupiny je v pg až ng/ml koncentracii. Ich bazálna koncentrácia je za normálnych podmienok veľmi nízka, produkcia sa zvyšuje po indukci signálu. Ich tvorba sa môže zvýšiť 100 a 1000 násobne. Majú dve nezvyklé črty: sú produkované viacerými druhmi buniek a odpovedajú na ne tiež viaceré druhy buniek (10). Ich vzájomný účinok pôsobenia je rôzny (synergia, antagonizmus, „recruitment“...). Medzi hlavné cytokíny ktoré podporujú proliferáciu „spiacich“ progenitorov patria: IL-3, IL-6, IL-4, IL-11, IL-12, granulocyte - colony stimulating factor (G-CSF), leukemia inhibitory factor (LIF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), SCF, FL a trombopoetín (TPO) (25, 26). Zvlášť pozoruhodný je synergický účinok niektorých RF, obr. 5., 6.

Flt-3 ligand (FL - ligand receptora Flt-3/flk-2) sa hodnotí ako najdôležitejší stimulátor zmnoženia primitívnych progenitorov. Maximálne zmnoženie KB si vyžaduje prítomnosť ešte ďalších cytokínov - SCF a IL-3. Pôsobí cez tyrozínkinázový receptor (26). V praxi sa skúša mobilizácia PKB pomocou FL. Na rozdiel od SCF, pri mobilizácii FL nedochádza k degranulácii mastocytov po jeho podaní (16). Pôsobí na vývoj dendritických buniek (28). Podľa nedávno publikovanej práce (Zandstra a spol.) (29), KB boli kultivované s FL, SCF a IL-3 v rôznych koncentráciách - vysokých a nízkych. Výsledný počet buniek vyprodukovaných v oboch kultúrach bol približne rovnaký, v prvej skupine bol však mnohonásobne vyšší počet LTC-IC. Na základe viacerých podobných výsledkov

Obr. 5. CD34+RhHiCD38++(zrelšia populácia)



Obr. 6. CD34+RhLoCD38-(nezrelia populácia)



Obr. 5, 6.: Produkcia myeloidných progenitorových kolónií (CFU-GM) z FACS izolovaných CD34+ Rhodamine 123^{bright}, CD38⁺⁺ buniek (obr. 5) a CD34⁺, Rhodamine 123^{low}, CD38⁻ buniek (obr. 6). Obe skupiny boli kultivované v 0,9% metylcelulóze a stimulované buď 6 RF (IL-1, IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF, všetky v koncentrácii 10 ng/ml), alebo 4 RF (IL-3, IL-6, G-CSF, SCF, všetky v koncentrácii 10 ng/ml), alebo sólo RF. Kolónie boli počítané 14. deň od zahájenia kultivácie, výsledky sú udané proporcionálne, vzhľadom na maximálny výsledok (pri 6 RF = 100%) (27).

bola vyslovená tzv. „prahová teória“, ktorá hovorí, že existuje určitý prah počtu ligand - receptorových komplexov. Ak je tento prah prekročený, napríklad zvýšenou koncentráciou RF, KB uprednostní sebaobnovu. Po znížení hladiny RF pod prahovú hodnotu sa zvyšuje pravdepodobnosť diferenciácie. Je známe, že sérové hladiny FL sú dysregulované pri leukemogénze a transplantácii (29).

Dalším dôležitým včasne pôsobiacim cytokínom je SCF (stem cell factor, Steel factor, c-kit ligand). Pôsobí cez tyrozínkinázový receptor c-kit, ktorý reguluje prežívanie, rast a diferenciáciu hemopoetických KB, mastocytov, zárodočných buniek a melanocytov (30). SCF má na rozdiel od FL účinok aj na CFC - teda zrelšie hemopoetické progenitory (23). Produjú ho fibroblasty (31). SCF sa nachádza aj na povrchu stromál-

ných buniek KD a fibroblastov ako membránovo viazaná molekula (30).

IL-3 (Interleukín-3 alebo multi CSF) - je tvorený T-lymfocyty, nie je tvorený stromálnymi bunkami KD (27). Okrem už uvedených účinkov na KB má synergické účinky s rôznymi inými RF pri stimulácii progenitorov a prekursorov viacerých hemopoetických línií (napr. s EPO v erytroidnom rade a s IL-4 na vývoj mastocytov atď.) (32).

INHIBÍCIA

Počas ostatných troch dekád bolo objavených mnoho inhibičných faktorov ako fyziologických regulátorov hemopoézy. Niekoľko z nich si zaslúži pozornosť, lebo pôsobia vo veľmi nízkych koncentráciách. Patria sem interferóny (IFN), tumor necrosis factor-alfa (TNF alfa), transforming growth factor-beta (TGF beta) a macrophage inflammatory protein 1 - alfa (MIP-1 alfa). IFN a TNF alfa sú líniovo nešpecifickými inhibičnými faktormi, lebo pôsobia na progenitory vo všetkých vývojových štádiách. Na rozdiel od nich, TGF beta pôsobí inhibične na veľmi včasné štádiá hemopoézy. Podobne aj MIP-1 alfa inhibuje proliferáciu primitívnych progenitorov (25). TGF-beta znižuje expresiu receptorov na primitívnych hemopoetických bunkách (receptor pre IL-6, FL, SCF, TPO) a tým znižuje aj odpovedavosť na ligandy týchto receptorov. Má antiproliferatívne aj antidiferenčné účinky na KB (33). Zistilo sa, že primitívne hemopoetické progenitory TGF-beta aj autokrinne produkujú a exprimujú receptor CD 105 (receptor pre TGF beta1 a TGF beta3). Produkcia TGF beta zvyšuje expresiu bcl-2, p53, c-myc v týchto bunkách. Diferencujúce progenitory znižujú expresiu týchto génov. Tieto gény, ako aj bcl-xL udržiavajú nediferencovaný stav primitívnych progenitorov (34). Neutralizácia alebo supresia TGF-beta spôsobí prechod týchto buniek zo „spiacieho“ stavu a bunka zahájí program diferenciácie. TGF-beta odďaľuje prechod z G0/G1 do S fázy indukciou inhibítorov CDK (cyclus dependent kinaze) kináz p15, p27 a p21 a udržiava retinoblastómový proteín a p107 v hypofosforylovanom stave (34).

ZÁVER

Pre ďalší pokrok v transplantácii KKB je nutná presnejšia identifikácia a charakterizácia hemopoetických kmeňových buniek.

Hoci sa v ostatných rokoch dosiahol určitý pokrok v identifikácii faktorov vplyvujúcich na osud KKB, naše znalosti sú v tejto oblasti stále nízke.

Aj malý pokrok v tejto oblasti by mohol mať veľký význam v praxi napr. pri transplantácii KKB alebo génovej terapii alebo v rozvoji iných nových terapeutických postupov.

Literatúra

- Weissman I. L.: Stem Cells: Units of development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. Cell, 100, 2000, 157-168.
- Fuchs E., Segre J. A.: Stem Cells: A New Lease on Life. Cell, 100, 2000, 143-155.
- Indrák K.: Od atomové bomby k transplantácii kostnej drene aneb 50 let převratných změn v hemato-onkologii. Hematolgia a transfuziologie, 9, 1999, 9-18.
- Morrison S. J., Shah N. M., Anderson D. J.: Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. Cell, 88, 1997, 287-298.
- Koc O. N., Lazarus H. M.: Mesenchymal stem cells: heading into clinic. Bone Marrow Transplantation, 27, 2001, 235-239.
- Aglietta M., Bertolini F., Carlo-Stella C., et al.: Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use. Hematologica, 83, 1998, 824-848.
- Tavassoli M.: Embryonic and Fetal Hemopoiesis: An Overview. Blood Cells, 1, 1991, 269-281.
- Atkinson K.: The BMT Data Book. Cambridge University Press, 1998, 582.
- Scott M. A.: In search of haemopoietic stem cell. British Journal of Haematology, 90, 1995, 738-743.
- Metcalfe D.: Mechanisms of Human Hematopoiesis. In: Thomas E. D., Blume K. G., Forman S. J.: Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell science, 1999, 48-57.

- Shizuru J. A., Weissman I. L.: Isolation and Characterization of Hematopoietic Stem Cells. In: Thomas E. D., Blume K. G., Forman S. J.: Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell science, 1999, 63-78.
- Dexter T. M., Allen T. D., Lajtha L. G.: Conditions Controlling the Proliferation of Hemopoietic Stem Cells In Vitro. Journal of Cellular Physiology, 91, 1977, 335-344.
- Eaves C. J.: Assays of hemopoietic progenitor cells. Williams Hematology, McGraw-Hill, Inc., 1995, L22-L26.
- Eaves C. J., Cashman J. D., Eaves A. C.: Methodology of long-term culture of hemopoietic cells. Journal of Tissue Culture Methods, 13, 1991, 55-62.
- Till J. E., McCulloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res. 14, 1961, 213-222.
- 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.
- 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.
- Lansdorf P. M., Dragowska W., Mayani H.: Ontogeny-related Changes in Proliferative Potential of Human Hematopoietic Cells. Journal of Experimental Medicine, 178, 1993, 787-791.
- Baumheuter S., Singer M. S., Henzel W. et al.: Binding of L-Selectin to the Vascular Sialomucin CD34. Science, 262, 1993, 436-438.

20. Goodell M. A.: CD34+ or CD34-: Does it really matter? *Blood*, 94, 1999, 2545-2547.
21. Sato T., Laver J. H., Ogawa M.: Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, 94, 1999, 2548-2554.
22. Krause D. S., Fackler M. J., Civin C. I. et al.: CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood*, 87, 1996, 1-13.
23. 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.
24. Sawada K. I.: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukaemia and Lymphoma*, 22, 1996, 43-52.
25. Ogawa M.: Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Cells. *Blood*, 81, 1993, 2844-2853.
26. Audet J., Zandstra P. W., Eaves C. J., et al.: Advances in hematopoietic stem cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 1998, 146-151.
27. Haylock D., Simmons P., To L. B. et al.: Growth Factors and Ex Vivo Expansion of Hemopoietic Cells. In: Morstyn G., Sheridan W. eds. *Cell Therapy*. Cambridge University Press, 1996, 221-237.
28. Klener P., Trněný M.: Nové cytokíny a jejich možné uplatnění v podpůrné léčbě. *Vnitřní lékařství*, 45, 1999, 238-242.
29. 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.
30. Gommerman J. L., Sittaro D., Klebasz et al.: Differential stimulation of c-kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood*, 96, 2000, 3734-3742.
31. Klener P. a kol.: *Cytokíny ve vnitřním lékařství*. Grada publishing: 1997, 264.
32. Buc M. a kol.: *Imunológia*. Vydavatelstvo Univerzity Komenského: 1999, 248.
33. Fortunel N. O., Hatzfeld A., Hatzfeld J. A.: Transforming growth factor beta-pleiotropic role in regulation of hematopoiesis. *Blood* 96, 2000, 2022-2036.
34. Pirelle L., Marone M., Bonanno G. et al.: Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-beta-1 is a cell-cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* 95, 2000, 3001-3010.