

616.155.392.1-076:611-018.46/.5

KULTIVACE CFU-GM Z KOSTNÍ DŘENĚ A PERIFERNÍ KRVE U HEMATOLOGICKÝCH NEMOCNÝCH

Kpt. MUDr. Stanislav FILIP, pplk. MUDr. Ladislav JEBAVÝ, CSc., ¹MUDr. Jana VOGLOVÁ,
²MUDr. Jan HAK, plk. doc. MUDr. Milan BLÁHA, CSc., plk. doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.

Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

¹Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové
(vedoucí: prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.)

²Dětská klinika FN, Hradec Králové
(přednosta: doc. MUDr. Eva Pařízková, CSc.)

Úvod

Klonální kultivace CFU-GM jak z kostní dřeně, tak z periferní krve představuje hematologické vyšetření, které přispívá k diagnostice a monitorování léčby u akutní myeloidní leukémie (AML), chronické myeloidní leukémie (CML) a myelodysplastického syndromu (MDS). U nemocných s AML napomáhá toto vyšetření při určování remise a včasné diagnostiky relapsu. U CML je možno včasné zachytit akcelerační fázi nebo blastický zvrát, obdobně u MDS je možno zachytit transformaci v akutní leukémii (8). Kultivace CFU-GM má svoje opodstatnění i při monitorování léčby některých hematologických onemocnění (např. ALM, CML, MDS, polycytemia vera, aplastická anémie) při jejichž léčbě podáváme růstové faktory (např. IL-3, GM-CSF, G-CSF) a dále k určování viability kostní dřeně při autologních transplantacích.

Důležitým se také jeví využívání metody kultivace CFU-GM i u jiných hematologických onemocnění, jejichž základem není klonální porucha myeloidní větve (např. akutní lymfatická leukémie - určování remise), nebo jde o poruchu hemopoézy (např. aplastická anémie - sledování kvality reparace kostní dřeně, nebo idiopatická myelofibróza).

Domníváme se, že zavedením této metody do naší klinické praxe jsme zřetelně zlepšili jak diagnostiku a prognostiku, tak i monitorování hematologických nemocných (8, 9).

Soubor nemocných a metodika vyšetření

Od září 1990 do července 1991 jsme vyšetřili 122 nemocných, z toho 56 mužů, 62 žen a 4 děti (3 chlapce a 1 dívku) ve věku od 1 - 76 let (median 49,1 roku).

Kontrolní skupinu tvořilo 10 dobrovolných dárců, u kterých jsme provedli kultivační vyšetření z periferní krve, a 10 dárců, kterým byla během operačního výkonu (ortopedická operace) s jejich souhlasem odebrána (trepanobiopsií) zdravá kostní dřeň a provedeno její kultivační vyšetření.

Kultivací CFU-GM z kostní dřeně jsme vyšetřili 30 nemocných s AML, 15 nemocných s CML, 14 nemocných s MDS, 6 nemocných s ALL a 5 nemocných s diagnózou aplastická anémie. Kultivační vyšetření z periferní krve jsme provedli u 23 nemocných s CML, 15 nemocných s AML, 10 nemocných s MDS a 4 nemocných s idiopatickou myelofibrózou.

Vyšetřovaným nemocným jsme odebrali 0,5 - 1 ml kostní dřeně (sternální punkcí) a 2 - 3 ml periferní krve (venepunkcí). Z odebraného materiálu jsme provedli separaci mononukleárních buněk. U kostní dřeně za použití 10% dextranu a u periferní krve gradientem na Lymphoprep (Nyegaard Co. Norway). Počet jaderných buněk jsme určili v Burkerově komůrce standardní metodou.

Pro kultivaci CFU-GM in vitro bylo použito Iscove medium (Iscove's modified Dulbecco's minimum essential medium, ÚHKT Praha, ČSFR), fetální telecí sérum (Lactiform-Hustopeče u Brna, ČSFR), kondicionované médium 5637 (obsahující růstový faktor multi-CSF/IL-3, ÚHKT Praha, ČSFR), 3% L-glutamin (Serva, SRN), antibiotika (penicilin 100 j/ml a streptomycin 100 µg/ml - Spofa, ČSFR), NaHCO₃ 7,5% (Sevac, ČSFR). K stabilizaci pH Iscova média jsme použili HEPES (Sigma, USA). Jako imobilizační médium jsme použili 3,3% Bacto-agar (Difco, USA). Ke kultivaci CFU-GM byly použity misky o průměru 30 mm (Falcon, Švýcarsko). Jako kultivační inokulum jsme používali suspenze buněk 2.10⁵ buněk/ml. Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu při 37°C za 5% pCO₂ po dobu 7 dní. Při odečítání počtu kolonií a shluků jsme provedli fixaci pomocí 2% kys. octové a počítali při 32násobném zvětšení.

Tabulka 1

Výsledky kultivace CFU-GM v kostní dřeni

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk (·10 ⁶)	Kolonie		
			(přepočteno na 105 buněk)		
1.	kontrola	13,3	23,12	5,52	0,80
2.	kontrola	9,6	28,64	6,03	0,83
3.	kontrola	14,4	33,17	9,55	0,78
4.	kontrola	7,2	35,22	19,35	0,65
5.	kontrola	13,9	39,49	18,46	0,68
6.	kontrola	8,6	29,80	26,80	0,53
7.	kontrola	16,9	42,36	24,14	0,64
8.	kontrola	15,3	36,45	51,87	0,41
9.	kontrola	13,6	56,32	50,53	0,53
10.	kontrola	11,9	30,53	57,37	0,34

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk (·10 ⁶)	Kolonie		
			(přepočteno na 105 buněk)		
11.	AML (M1)	40,8	1,02	8,20	0,11
12.	AML (M1)	20,6	2,01	12,06	0,14
13.	AML (M1)	11,5	8,21	36,23	0,18
14.	AML (M1)	15,7	5,85	23,40	0,20
15.	AML (M1)	30,0	2,02	5,05	0,28
16.	AML (M1)	48,0	1,02	8,67	0,11
17.	AML (M2)	5,0	5,50	14,00	0,28
18.	AML (M2)	29,0	3,06	11,22	0,21
19.	AML (M2)	3,9	0,49	1,98	0,19
20.	AML (M2)	25,6	1,47	8,33	0,15
21.	AML (M2)	19,4	0,99	5,97	0,14
22.	AML (M2)	6,3	4,00	27,00	0,13
23.	AML (M2)	15,1	3,31	10,43	0,24
24.	AML (M2)	12,6	1,16	25,30	0,04
26.	AML (M2)	5,6	0,50	2,20	0,19
27.	AML (M2)	23,6	0,53	46,70	0,01
28.	AML (M2)	11,4	1,70	11,75	0,13
29.	AML (M2)	11,8	1,39	18,30	0,07
30.	AML (M2)	2,7	2,26	17,60	0,11
31.	AML (M2)	10,6	7,18	29,90	0,19
32.	AML (M2)	11,2	21,30	33,85	0,30
33.	AML (M3)	9,5	1,60	12,90	0,07
34.	AML (M3)	3,6	9,18	31,50	0,23

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk ($\cdot 10^6$)	Kolonie	Shluky	K/K+S
			(přepočteno na 10^5 buněk)		
35.	AML (M4)	78,0	4,28	18,72	0,19
36.	AML (M4)	5,0	2,00	9,00	0,18
37.	AML (M4)	2,6	3,01	16,58	0,15
38.	AML (M4,5)	4,2	7,03	33,67	0,17
39.	AML (M5)	5,1	8,54	39,70	0,17
40.	AML (M5)	3,9	8,04	35,18	0,19
41.	AML (M5)	2,2	1,51	9,09	0,14
42.	CML	19,4	0,50	2,00	0,20
43.	CML	11,3	8,58	14,64	0,36
44.	CML	6,6	5,53	15,08	0,26
45.	CML	3,1	4,53	11,05	0,29
46.	CML	2,8	1,50	8,54	0,15
47.	CML	2,9	7,50	22,00	0,25
48.	CML	2,4	1,17	11,65	0,09
49.	CML	3,8	1,16	13,60	0,08
50.	CML	5,6	0,50	0,67	0,46
51.	CML	11,3	15,39	43,20	0,26
52.	CML	3,1	1,17	18,52	0,06
53.	CML	17,2	0,81	93,46	0,01
54.	CML	6,3	3,18	26,11	0,11
55.	CML	3,2	2,60	18,10	0,13
56.	CML	4,5	9,30	44,50	0,17
57.	MDS (CMML)	2,9	7,50	22,00	0,25
58.	MDS (RAEB)	7,1	13,13	54,04	0,20
59.	MDS (RAEB)	12,2	9,50	38,50	0,20
60.	MDS (RAEB)	13,6	10,60	48,48	0,18
61.	MDS (RA)	72,0	3,48	5,47	0,38
62.	MDS (CMML)	33,4	1,00	6,50	0,13
63.	MDS (CMML)	6,3	1,00	14,00	0,07
64.	MDS (CMML)	11,5	2,00	13,00	0,13

65.	MDS (RA)	5,7	1,25	2,30	0,35
66.	MDS (RA)	11,7	1,16	1,33	0,47
67.	MDS (CMML)	10,8	0,52	2,92	0,15
68.	MDS (RA)	14,3	1,67	1,51	0,53
69.	MDS (CMML)	12,9	0,50	7,79	0,06
70.	MDS (RA)	7,6	3,50	8,90	0,28
71.	ALL	16,1	1,86	2,48	0,42
72.	ALL	9,5	1,01	2,01	0,33
73.	ALL	29,6	1,00	6,00	0,14
74.	ALL	3,7	0,50	1,00	0,33
75.	ALL (B-Ly)	79,6	2,70	4,25	0,39
76.	ALL (B-Ly)	36,5	7,10	11,60	0,38
77.	Aplas- tická anémie	0,5	0,80	48,00	0,01
78.		2,3	0,50	7,03	0,07
79.		1,4	1,60	5,00	0,24
80.		1,7	0,60	0,50	0,54
81.		3,4	0,33	0,49	0,40

Tabulka 2

Výsledky kultivace CFU-GM z periferní krve

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk ($\cdot 10^6$)	Kolonie	Shluky	K/K+S
			(přepočteno na 10^5 buněk)		
1.	kontrola	2,7	0,67	1,33	0,34
2.	kontrola	7,1	3,00	1,67	0,64
3.	kontrola	2,3	1,67	2,00	0,46
4.	kontrola	2,9	3,00	2,33	0,56
5.	kontrola	3,9	1,33	0,67	0,67
6.	kontrola	4,2	2,00	4,00	0,33
7.	kontrola	6,2	1,00	2,00	0,50
8.	kontrola	7,3	1,00	1,67	0,37
9.	kontrola	12,1	6,00	5,00	0,55
10.	kontrola	3,6	1,00	2,33	0,33
11.	CML	9,6	1,00	4,50	0,18
12.	CML	3,8	36,31	47,37	0,43

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk ($\cdot 10^6$)	Kolonie	Shluky	K/K+S
			(přepočteno na 10^5 buněk)		
13.	CML	3,1	6,45	82,26	0,07
14.	CML	6,5	12,62	8,08	0,61
15.	CML	45,2	0,51	27,78	0,18
16.	CML	7,8	0,51	9,09	0,05
17.	CML	2,4	0,50	36,68	0,01
18.	CML	4,0	0,50	10,00	0,05
19.	CML	3,6	11,62	40,40	0,22
20.	CML	7,4	0,53	1,58	0,25
21.	CML	7,1	6,06	23,74	0,20
22.	CML	2,9	15,66	49,49	0,24
23.	CML	3,9	17,17	55,56	0,23
24.	CML	4,3	10,61	48,99	0,17
25.	CML	5,2	9,60	34,85	0,21
26.	CML	2,1	1,00	23,00	0,03
27.	CML	6,7	0,50	3,48	0,13
28.	CML	1,3	11,74	42,38	0,27
29.	CML	15,8	0,50	14,20	0,03
30.	CML	30,1	0,17	18,52	0,01
31.	CML	2,6	0,85	3,12	0,21
32.	CML	2,8	0,16	3,65	0,26
33.	CML	2,4	0,17	1,65	0,09
34.	AML (M1)	1,6	0,21	1,25	0,14
35.	AML (M1)	3,4	0,50	1,50	0,25
36.	AML (M1)	3,6	0,50	5,03	0,09
37.	AML (M1)	2,6	2,40	19,23	0,11
38.	AML (M1)	0,8	27,00	43,00	0,38
39.	AML (M2)	4,2	0,53	1,05	0,34
40.	AML (M2)	2,3	0,52	8,42	0,06
41.	AML (M2)	1,9	1,58	10,00	0,14
42.	AML (M2)	2,8	1,05	5,26	0,17
43.	AML (M2)	2,6	0,56	1,11	0,34
44.	AML (M2)	1,8	1,39	8,33	0,14
45.	AML (M2)	1,4	0,70	1,75	0,29

Pořadové číslo pacienta	Diagnóza	Počet jaderných buněk ($\cdot 10^6$)	Kolonie	Shluky	K/K+S
			(přepočteno na 10^5 buněk)		
46.	AML (M3)	1,0	0,33	1,00	0,25
47.	AML (M3)	2,6	0,16	25,30	0,01
48.	AML (M5)	3,2	0,50	15,60	0,03
49.	MDS (CMML)	7,8	4,21	30,52	0,12
50.	MDS (RAEB)	6,0	0,30	1,30	0,18
51.	MDS (RAEB)	2,0	0,30	3,00	0,09
52.	MDS (RAEB)	2,4	0,16	1,82	0,08
53.	MDS (RA)	4,3	0,67	0,51	0,57
54.	MDS (CMML)	2,9	0,17	1,18	0,13
55.	MDS (RA)	1,7	0,16	0,33	0,33
56.	MDS (RA)	2,6	1,00	2,00	0,50
57.	MDS (CMML)	3,6	3,60	17,30	0,17
58.	MDS (CMML)	1,7	1,25	3,50	0,26
59.	Idiopatická myelofibróza	4,2	0,90	28,70	0,03
60.		12,2	0,40	6,70	0,05
61.		3,1	2,30	11,50	0,17
62.		1,7	0,50	7,50	0,06

Hodnocení: kolonie - 40 a více buněk
shluky - 3 až 39 buněk
Poměr: kolonie/kolonie+shluky (K/K+S)

Statistické hodnocení výsledků

Výsledky byly hodnoceny statisticky pomocí Studentova t-testu. Na obrázcích jsou znázorněny průměrné hodnoty souborů s 95% intervalem spolehlivosti průměru. Statistická významnost rozdílu srovnaných souborů byla hodnocena na počítači TNS AT (Slušovice, ČSFR) a je popsána v textu pro $P=0,05$.

Výsledky

V naší práci jsme v kontrolní skupině deseti zdravých dárců vyšetřili kostní dřeň, kde průměrný počet kolonií byl (v přepočtu na 10^5 jaderných buněk) $35,53 \pm 6,55$ a poměr počtu kolonií a shluků (K/K+S) $0,61 \pm 0,12$ (tab. 3). U kontrolní skupiny deseti zdravých dárců, kterým jsme odebrali periferní krev, byl průměrný počet kolonií $2,07 \pm 1,15$ a poměr K/K+S byl $0,47 \pm 0,10$ (tab. 3).

Tabulka 3

Významné změny růstu CFU-GM v kostní dřeni a periferní krvi

CFU - GM				
Diagnóza	Kostní dřeň		Periferní krev	
	Průměrný počet kolonií	K/K+S	Průměrný počet kolonií	K/K+S
	$(\bar{x} \pm SD)$		$(\bar{x} \pm SD)$	
Kontrolní skupina	35,53±6,55	0,61±0,12	2,07±1,15	0,47±0,10
AML	4,00±1,62	0,16±0,05	2,53±3,90	0,18±0,07
CML	4,22±2,47	0,19±0,07	6,27±3,85	0,18±0,06
MDS	4,06±2,56	0,24±0,09	1,18±1,07	0,24±0,12
ALL	2,36±2,57	0,33±0,10		
Apl. anémie	0,77±0,62	0,25±0,27		
Idiop. myelofibróza			1,03±1,60	0,08±0,12

Statisticky významný rozdíl v počtu kolonií u zdravých dárců byl zaznamenán v periferní krvi (graf 1 a 3), kde počet kolonií CFU-GM byl asi 10násobně nižší (tab. 3 a 4) než u kultivace z kostní dřene.

Normu pro hodnocení výsledků jsme získali statistickým vyhodnocením kultivací CFU-GM od zdravých dobrovolných dárců. Získaný výsledek (stanovenou normu) jsme porovnali s laboratoří ÚHKT Praha (MUDr. J. Jelínek, CSc.). Pro kostní dřeň normální hodnota odpovídá počtu kolonií od 30 do 100 kolonií (přepočteno na 10^5 jaderných buněk). Pro periferní krev je norma v intervalu od 1 do 5 kolonií. Poměr K/K+S jsme určili stejně jak pro kostní dřeň, tak pro periferní krev $> 0,33$.

U nemocných s AML jsme v kostní dřeni (graf 1) zaznamenali statisticky významné snížení počtu kolonií u 96,6 procenta nemocných a jenom u 3,4 % (vyšetření bylo provedeno v období remise) jsme zaznamenali normální počet kolonií. Stejný výsledek byl u K/K+S, kde kulturační nález vyjadřoval nepoměr počtu kolonií a shluků také v 96,6 % (graf 2) ve srovnání s kontrolní skupinou dárců (tab. 4). Průměrný počet kolonií u nemocných s AML byl $4,0 \pm 1,62$ a poměr K/K+S $0,16 \pm 0,05$ (tab. 3).

V periferní krvi u nemocných s AML byl zaznamenán statisticky významný pokles počtu kolonií oproti kontrolní skupině (tab. 4) u 66,7 % vyšetřených. U 26,7 % byl normální počet kolonií a jenom u 6,6 % byl zaznamenán

Tabulka 4

Statistické hodnocení kulturačních nálezů u sledovaných onemocněných a kontrolní skupiny zdravých dárců z kostní dřene a periferní krve

Kostní dřeň					
Kolonie			K/K+S		
test	hodnota	významnost	test	hodnota	významnost
Kontrolní skupina - AML:					
F	16,347546	0,000000	F	4,938272	0,000464
T	15,069522	0,000000 ^(*)	T	11,324467	0,000000 ^(*)
Kontrolní skupina - CML:					
F	7,032159	0,000712	F	2,938776	0,034634
T	14,446873	0,000000 ^(*)	T	9,992450	0,000000 ^(*)
Kontrolní skupina - MDS:					
F	6,546402	0,001366	F	1,777778	0,167439
T	14,426730	0,000000 ^(*)	T	8,648284	0,000000 ^(*)
Kontrolní skupina - ALL:					
F	6,495556	0,026537	F	1,306122	0,403062
T	14,285917	0,000000	T	4,720357	0,000328 ^(*)
Kontrolní skupina - AA:					
F	111,609001	0,000193	F	5,062500	0,020461
T	16,6333426	0,000000 ^(*)	T	2,844273	0,036065
Periferní krev					
Kontrolní skupina - CML:					
F	11,207940	0,000380	F	2,777778	0,024403
T	-4,765635	0,000049 ^(*)	T	8,527488	0,000002 ^(*)
Kontrolní skupina - AML:					
F	11,500945	0,000438	F	269,897959	0,000000
T	-0,429653	0,672547	T	5,190728	0,000407 ^(*)
Kontrolní skupina - MDS:					
F	1,155123	0,416714	F	91,840278	0,000000
T	1,791720	0,090006	T	5,004972	0,000533 ^(*)
Kontrolní skupina - INF:					
F	1,935728	0,194405	F	100,000000	0,001476
T	1,382735	0,191937	T	5,410402	0,000297 ^(*)

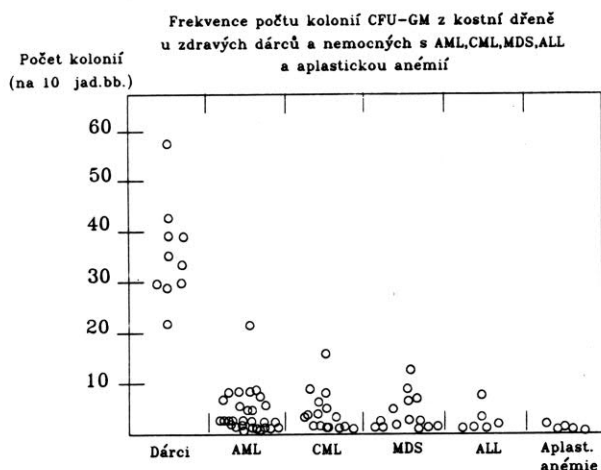
(*) - označení statisticky významných rozdílů ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců

výrazně zvýšený počet kolonií (graf 3). Poměr K/K+S vyjadřující nepoměr počtu kolonií a shluků byl u 80 % a normální nález byl u 20 % vyšetřených (graf 4). Průměrný počet kolonií v periferní krvi byl $2,53 \pm 3,90$ a poměr K/K+S $0,18 \pm 0,07$ (tab. 3).

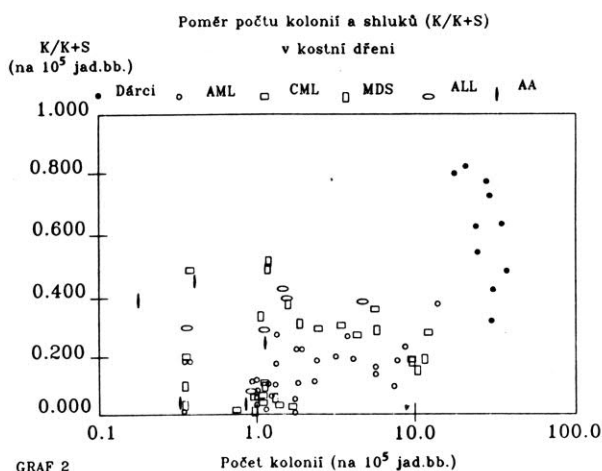
Při kultivaci kostní dřene u nemocných s CML jsme zjistili statisticky významné snížení počtu kolonií u všech vyšetřovaných ve srovnání s kontrolní skupinou dárců (graf 1, tab. 4), K/K+S vyjadřoval nepoměr počtu kolonií

a shluků u 86,6 % a jenom u 13,4 % byl kultivační nález odpovídající normálnímu zastoupení kolonií a shluků (graf 2). Průměrný počet kolonií byl $4,22 \pm 2,47$ a poměr K/K+S byl $10,19 \pm 0,07$ (tab. 3).

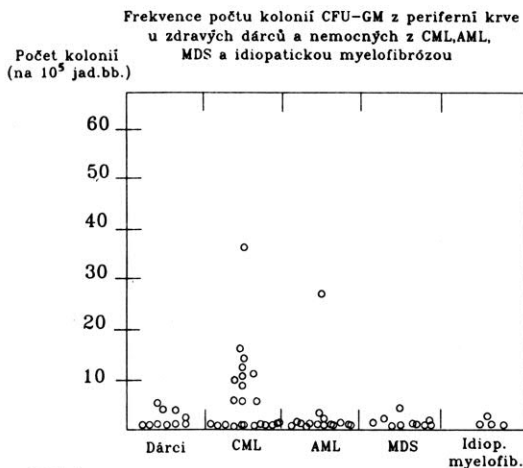
V periferní krvi jsme u CML při vyšetření zaznamenali statisticky významný vzestup počtu kolonií oproti kontrole (tab. 4) u 47,8 %, 43,5 % vyšetřovaných mělo statisticky významný pokles a u 8,7 % byl normální počet kolonií



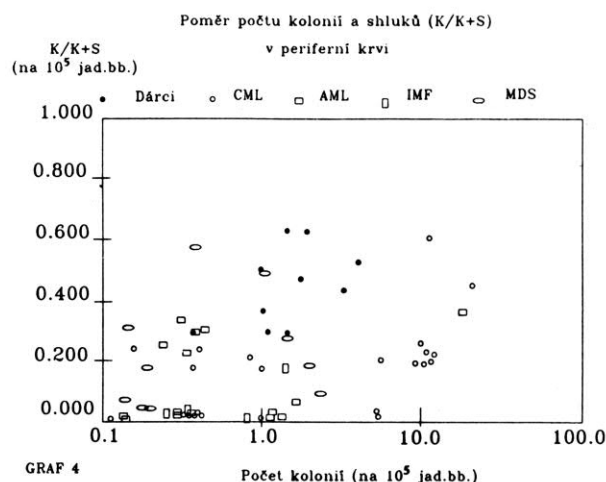
GRAF 1



GRAF 2



GRAF 3



CFU-GM (graf 3). K/K+S vyjadřoval nepoměr počtu kolonií a shluků u 91,3 %, 8,7 % bylo v normě (graf 4). Průměrný počet kolonií byl $6,27 \pm 3,85$ a K/K+S byl $0,18 \pm 0,06$ (tab. 3).

Kultivační vyšetření CFU-GM z kostní dřeně u nemocných s MDS u všech vyšetřených zaznamenal statisticky významný pokles počtu kolonií oproti kontrolní skupině (graf 1, tab. 4), K/K+S vyjadřující nepoměr počtu kolonií a shluků byl u 71,4 %, 28,6 % vyšetřených mělo normální zastoupení počtu kolonií a shluků (graf 2). Průměrný počet kolonií byl $4,06 \pm 2,26$ a poměr K/K+S $0,24 \pm 0,09$.

V periferní krvi u MDS byl počet kolonií snížen oproti kontrolní skupině (tab. 4) u 60 % a 40 % vyšetřených mělo normální zastoupení kolonií a shluků (graf 3), K/K+S vyjadřující nepoměr počtu kolonií a shluků byl u 70 % a 30 % vyšetřených mělo normální zastoupení počtu kolonií a shluků (graf 4). Průměrný počet kolonií byl $1,18 \pm 1,07$ a K/K+S $0,24 \pm 0,12$ (tab. 3).

Klonální kultivaci CFU-GM z kostní dřeně jsme dále prováděli u nemocných s ALL a aplastickou anémií. V obou případech jsme zaznamenali statisticky významný pokles počtu kolonií oproti kontrolní skupině (graf 1, tab. 4), ale poměr K/K+S byl u ALL normální v 83,3 % a u aplastické anémie byl normální u 40 % vyšetřených (graf 2).

Periferní krev jsme vyšetřili u nemocných s idiopatickou myelofibrózou, zaznamenali jsme v 60 % statisticky významný pokles počtu kolonií ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 3), K/K+S u všech vyšetřených vyjadřoval nepoměr počtu kolonií a shluků (graf 4).

Dalším statistickým hodnocením se ukázalo, že při klonální kultivaci CFU-GM z kostní dřeně dochází u AML, CML, MDS, ALL a aplastické anémie k statisticky významnému poklesu počtu kolonií ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců (graf 1, tab. 4). Při sledování K/K+S bylo nejvyšší procento normálního zastoupení kolonií a shluků u ALL a aplastické anémie.

Při kultivaci CFU-GM z periferní krve jsme zjistili statisticky významný rozdíl u nemocných s CML, kdy u tohoto onemocnění došlo k významnému zvýšení počtu kolonií ve srovnání jak s kontrolní skupinou, tak i s ostatními uvedenými diagnózami (graf 3, tab. 4).

Diskuse

Při některých hematologických onemocněních (např. AML, CML, MDS, aplastická anémie, idiopatická myelofibróza nebo také polycytemia vera) ztrácí hemopoetické progenitorové buňky (CFU-GM, CFU-E a BFU-E) schopnost vytvářet v klonálních kulturách kolonie. Klonální porucha těchto buněk se projevuje dále narušením proliferační aktivity a progresí, např. blastické populace buněk, výsledkem je zvýšené tvoření shluků buněk (21, 32). Nejvýznamnějším onemocněním, kde se v rozhodující míře uplatňuje porucha buněčného hemopoetického klonu, je AML (3, 17), a proto právě u tohoto onemocnění bylo poprvé klinicky sledováno tvoření kolonií a shluků CFU-GM in vitro (19).

Typickým obrazem při kultivaci CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u AML je významné snížení počtu kolonií a zároveň významné zvýšení počtu shluků (6, 18, 19).

Kultivační nález z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML vyšetřených na katedře radiobiologie (VLA JEP) odpovídal statisticky významnému poklesu počtu kolonií a vzestupu počtu shluků u 96,6 %, 3,4 % vyšetřených mělo normální počet kolonií, normální zastoupení počtu kolonií a shluků (jednalo se o nemocné, u kterých v průběhu monitorování byla dosažena remise onemocnění). Je známo, že v období remise AML dochází k normalizaci růstu CFU-GM a poměr počtu kolonií a shluků v kostní dřeni i periferní krvi může být také normální (6, 31). Důležitým kultivačním nálezem při monitorování nemocných s AML v periferní krvi a posléze i v kostní dřeni je snižování počtu kolonií a prohlubování nepoměru počtu kolonií a shluků při relapsech AML (15, 20), což může přispět k dotváření názoru na další léčebný postup a prognózu základního onemocnění (6, 8, 9, 19, 21).

Nejnápadnější změnou u CML je zvýšení počtu kolonií CFU-GM v periferní krvi (10). V kostní dřeni je počet kolonií snížený (22). Počet shluků je zvýšený jak v kostní dřeni, tak v periferní krvi, čehož důsledkem je výrazný nepoměr počtu kolonií a shluků. Výsledky kultivací progenitorových buněk z kostní dřeně a periferní krve ukázaly, že nejcitlivějším markerem u hemopoetického systému při CML jsou CFU-GM (12, 27). My jsme u nemocných s CML při kultivaci kostní dřeně zjistili statisticky významný pokles počtu kolonií, a naopak v periferní krvi jsme zaznamenali vzestup počtu kolonií oproti kontrole jenom u 47,8 % vyšetřených. U převážné většiny vyšetřených byl zaznamenán nepoměr počtu kolonií a shluků. Tento výsledek je rozdílný od závěrů publikovaných jinými autory, a to patrně proto, že udáváme výsledky kultivací v rozdílných fázích klinického průběhu CML. 19 % nemocných bylo vyšetřeno čerstvě po diagnóze, 60 % nemocných v pozdější fázi CML a 20 % nemocných bylo vyšetřeno v období klinické remise CML. Ve většině případů umožňuje pravidelné sledování nemocných s CML včasné odhalení akcelerační fáze, resp. blastického zvratu, dříve než nastanou typické změny v krevním obraze (8, 9, 28).

Další skupinou onemocnění, kde se ukázala kultivace progenitorových buněk jako prospěšná metoda, je MDS (2, 26, 29).

Při kultivačním vyšetření CFU-GM z kostní dřeně

nemocných s MDS nacházíme výsledky podobné jako u AML (26). Kultivačním vyšetřením kostní dřeně a periferní krve jsme zjistili statisticky významný pokles počtu kolonií a v převážné většině jsme také zaznamenali nepoměr počtu kolonií a shluků. Ani v jednom případě se nejednalo o vstupní vyšetření, převahu tvořili nemocní s diagnózou refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB) (3 nemocní) a chronická myelomonocytmie leukémie (CMML) (6 nemocných). Zásadní význam může mít kultivace CFU-GM při včasné diagnostice blastické transformace MDS v akutní leukémii (8, 9, 21).

Klonální kultivace progenitorových buněk u ALL může přispět jak k diagnostice remise, tak i relapsu onemocnění (4, 14, 16, 25), i když u ALL se nejedná o klonální poruchu myeloidní větve hemopoetických buněk (21). U nemocných s ALL jsme při vyšetření kostní dřeně zaznamenali statisticky významný pokles počtu kolonií, ale naopak normální zastoupení počtu kolonií a shluků. Vzhledem k tomu, že jsme nevyšetřili periferní krev a progenitorové buňky BFU-E (v kostní dřeni a periferní krvi) a jednalo se o početně malou skupinu vyšetření, bude nutné nadále pokračovat v ověřování tohoto kultivačního nálezu.

U aplastické anémie dochází k defektu v proliferaci a další diferenciaci především determinovaných progenitorových buněk (1, 5). Kultivační vyšetření CFU-GM a BFU-E má svoje místo i v diferenciální diagnostice různých preleukemických stavů (30). Při kultivačním vyšetření CFU-GM z kostní dřeně u nemocných s aplastickou anémií jsme nedostali typický kultivační nález. Celkové snížení počtu kolonií a shluků v kostní dřeni a nepoměr počtu kolonií a shluků u 60 % vyšetřených neodpovídalo kultivačnímu obrazu aplastické anémie. Sledováním nemocných v dalším období a upřesněním diagnózy jsme zjistili, že jenom u dvou nemocných šlo o aplastickou anémii, u ostatních nemocných se jednalo o preleukemický stav.

Při vyšetření periferní krve u idiopatické myelofibrózy jsme očekávali kultivační nález ve smyslu vzestupu počtu kolonií (13, 24). Celkový kultivační výsledek byl modifikován tím, že nemocní byli v terminální fázi tohoto onemocnění.

Naše výsledky tedy v převážné většině odpovídají některým jiným pracím (7, 11, 19, 21, 23).

Závěr

- Byla zavedena metoda klonální kultivace progenitorových buněk CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve.

- Metoda byla ověřena na souboru deseti zdravých dárců, kterým byla odebrána kostní dřeň, periferní krev a provedeno kultivační vyšetření CFU-GM in vitro.

- Statistickým hodnocením celého souboru vyšetřených jsme určili normální intervaly počtu kolonií a poměru počtu kolonií a shluků (K/K+S) jak pro kostní dřeň, tak pro periferní krev.

- Z kultivačních výsledků kostní dřeně a periferní krve vyplývá, že u nemocných s AML, CML, MDS, ALL, aplastickou anémií a idiopatickou myelofibrózou dochází k statisticky významným změnám jak v počtu kolonií, tak i v poměru počtu kolonií a shluků.

- Klonální kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní

krve má svoje opodstatnění zejména při včasné diagnostice relapsu AML, ALL, akcelerační fáze, resp. blastického zvratu CML a blastické transformace MDS v akutní leukémii.

Souhrn

Klonální kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve představuje důležité vyšetření, které má svoje nezastupitelné místo v klinické hematologii.

Autoři sledovali kultivační nálezy z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML, CML, MDS, ALL, aplastickou anémií a idiopatickou myelofibrózou. Získané výsledky srovnávali s kontrolní skupinou deseti zdravých dárců, kterým byla odebrána kostní dřeň, a deseti zdravých dárců, kterým byla odebrána periferní krev. Provedli 122 vyšetření, 70 z kostní dřeně a 52 z periferní krve.

Kultivační výsledky získané u jednotlivých sledovaných hematologických onemocnění byly použity k diferenciální diagnostice, zvláště AML a CML, přispěly k diagnostice remise AML, CML a ALL, vytvořily vstupní informaci pro možnosti včasné diagnostiky relapsu AML a ALL, akcelerační fáze, resp. blastického zvratu CML a blastické transformace MDS.

Zvládnutím této metody byly vytvořeny předpoklady pro sledování viability buněk kostní dřeně a periferní krve při autologních transplantacích a rozšířeny možnosti monitorování léčby.

Literatura

1. BARRET, A. J. et al.: Bone marrow culture in aplastic anemia. *J. Clin. Path.*, 32, 1979, s. 660-665.
2. COUTINHO, C. G. et al.: Functional studies of bone marrow haematopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *Br. J. Haematol.*, 75, 1990, s. 16-25.
3. DEMETRI, G. D. - GRIFFIN, J. D.: Hemopoietins and leukemia. *Hematology-oncology clinics of North Am.*, 3, 1989, s. 535-553.
4. DUTTERA, M. J. et al.: Serial in vitro bone marrow culture in acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 42, 1973, s. 687-699.
5. EAVES, C. J. - EAVES, A. C.: Erythropoietin (Ep) dose response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human marrow and in patients with polycythemia vera. *Br. J. Haematol.*, 52, 1978, s. 1196-1210.
6. ERIDANI, S. et al.: Haematopoietic patterns of acute leukemia in remission: CFU-E and CFU-GM colony formation. *Acta Hematol. (Basel)*, 70, 1983, s. 11-18.
7. ESTROV, Z. et al.: Clinical utility of marrow cell tissue cultures in acute leukemia of childhood. *AM. J. Hematol.*, 23, 1986, s. 51-58.
8. FILIP, S. et al.: Možnosti využití kultivace hemopoetických buněk in vitro v klinické hematologické praxi. *Voj. zdrav. Listy*, 60, 1991, č. 4, s. 167-174.
9. FILIP, S. et al.: The cultivation CFU-GM of hematological patients (our initial experience). *European stem cell meeting. Prague*, 4. - 6. June 1991.
10. GOLDMAN, J. M. et al.: Circulating granulocytic and erythroid progenitor cells in chronic granulocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 46, 1980, s. 7-13.
11. GRONDA, M. et al.: In vitro change in CFU-GM chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Its implication in the dysfunction of the hematologic barrier. *Sange (Barc.)*, 33, 1988, s. 277-281.
12. HARA, H. et al.: Pluripotent, erythrocytic and granulocytic hemopoietic precursors in chronic granulocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 9, 1981, s. 871-877.
13. HIBBIN, J. A. et al.: Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.*, 57, 1984, s. 495-503.
14. CHERVINSKY, D. S. et al.: The significance of the ratio of blood to marrow hematopoietic progenitors (CFU-GM and CFU-GEMM) in relation to disease of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res.*, 13, 1989, s. 483-489.
15. JEHN, U. - WACHOLZ, K.: CFU-GM colony formation of peripheral blood and bone marrow in adult acute leukemia at presentation, during remission and at relapse. *Int. J. Cell. Cloning*, 3, 1985, s. 199-213.
16. MANGALIK, A. et al.: Granulopoietic studies in acute lymphoblastic leukemia. *Blut*, 34, 1977, s. 77-88.
17. McCULLOCH, E. A. et al.: Normal and leukemic hemopoiesis compared. *Cancer*, 42, 1978, s. 842-853.
18. MESSNER, H. A.: Human stem cells in culture. *Clinics in Haematol.*, 13, 1984, s. 393-404.
19. MOORE, M. A. S. et al.: Agar culture studies in 127 cases of untreated acute leukemia: The prognostic value of reclassification of leukemia according to in vitro growth characteristics. *Blood*, 44, 1974, s. 1-18.
20. MOORE, M. A. S.: Prediction of relapse and remission in AML way bone marrow culture criteria. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells*, 17, 1976, s. 109-124.
21. NEUWIRT, J. - NEČAS, E.: Kmenové buňky a krevní choroby. *Praha, Avicenum* 1981.
22. OLFSSON, T. - NILSSON, B.: Defective recloning capacity of granulocyte-macrophage colony-forming cell in chronic myeloid leukemia. *Scand. J. Haematol.*, 36, 1986, s. 168-175.
23. PARAN, M. et al.: In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemia and non-leukemia patients. *Proc. Natl. Ac. Scien.*, 3, 67, 1970, s. 1542-1549.
24. PARTANEN, S. et al.: Circulating haematopoietic progenitors in myelofibrosis. *Scand. J. Haematol.*, 29, 1982, s. 325-330.
25. RAGAB, A. H. et al.: The culture of colony forming units from the peripheral blood and bone marrow of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 34, 1974, s. 663-669.
26. RUUTU, T. et al.: Erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. *Scand. J. Haematol.*, 32, 1984, s. 395-402.
27. SHIK, L. Y. et al.: In vitro culture studies of blood and marrow cells in chronic myeloid leukemia at different phases of the disease. *Blut*, 57, 1988, s. 125-130.
28. SPITZER, G. et al.: Significance of PHA-induced clonogenic cells in chronic myeloid leukemia and early acute myeloid leukemia. *Blood Cells*, 2, 1976, s. 149-159.
29. TENNANT, G. B.: Undetectable peripheral blood CFU-GM as a prognostic indicators in myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.*, 12, 1988, s. 961-962.
30. VERMA, D. S. et al.: In vitro agar culture patterns in preleukemia and their clinical significance. *Leuk. Res.*, 3, 1979, s. 41-49.
31. VINCENT, P. C. et al.: Marrow culture studies in adult acute leukemia at presentation and during remission. *Blood*, 49, 1977, s. 93-912.
32. ZANJANI, E. D. et al.: Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro. Dependence on erythropoietin. *J. Clin. Invest.*, 59, 1977, s. 841-848.

Klíčová slova: CFU-GM; Kostní dřeň; Periferní krev; AML, CML, MDS, ALL; Aplastická anémie; Idiopatická myelofibróza.

Poděkování: Autoři děkují MUDr. Jaroslavu Jelínkovi, CSc. z ÚHKT Praha za významnou pomoc při zavádění metody klonálních kultivací hemopoetických progenitorových buněk a podnětné rady a připomínky.