

MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ A HEMOPOETICKÉ BUNĚKY

I. část

Kpt. MUDr. Stanislav FILIP, pplk. MUDr. Ladislav JEBAVÝ, CSc.,
 1 MUDr. Jaroslava VOGLOVÁ, plk. doc. MUDr. Milan BLÁHA, CSc.
 Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
 (rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)
 1 Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové
 (vedoucí: prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.)

Úvod

Stavy charakterizované poruchou řízení proliferace hemopoetických buněk zařazujeme do skupiny, která se označuje jako myeloproliferativní onemocnění (12, 25, 28). Myeloproliferativní onemocnění můžeme rozdělit na onemocnění akutní - akutní myeloidní leukémie (podle klasifikace FAB 1976 - M1 až M7) (2) a akutní myelofibróza s myeloidní metaplastií. Druhou skupinu tvoří chronická onemocnění - chronická myeloidní leukémie, polycytemie vera, chronická myelomegakaryocytární leukémie, primární trombocytémie a myelofibróza.

Myeloproliferativní onemocnění mají klonální podstatu a dochází u nich k vytvoření buněčného klonu s abnormální proliferací a diferenciací. Tím se klonální poruchy liší od hereditárních geneticky podmíněných chorob, které jsou založeny na genomových lézích v nediferencovaných zárodečných buňkách a přenášejí se na všechny somatické buňky.

Analýza a monitorování myeloproliferativních onemocnění pomocí klonálních metod in vitro upřesní diagnostický a diferenciálně diagnostický postup (8, 9, 10).

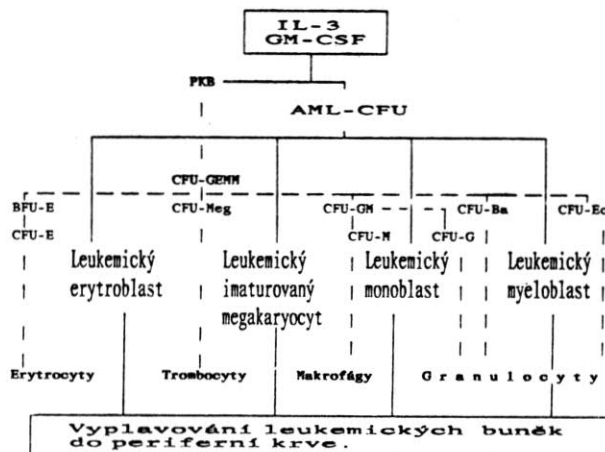
Vzhledem k tomu, že problematika myeloproliferativních onemocnění je obsáhlá, rozhodli jsme se rozdělit náš příspěvek do tří částí: akutní myeloidní leukémie, chronická myeloidní leukémie a polycytemie vera. V každé části jsme se zaměřili především na analýzu onemocnění z hlediska hemopoetických buněk, jejich proliferace, diferenciace a maturace.

1. Akutní myeloidní leukémie

V současné době již existuje celá řada důkazů o klonální podstatě vzniku akutní myeloidní leukémie (AML), kde cívovou buňkou leukemogeneze je pluripotentní kmenová buňka vytvářející kolonie blastů AML-CFU (acute myeloid leukemia-colony-forming unit) (6, 15, 18, 28). Pro indukci leukemogeneze je zapotřebí hemopoetických růstových faktorů, které zásadně ovlivňují proliferaci a diferenciaci leukemických buněk (6, 20). Celý proces leukemogeneze úzce souvisí s normální hematopoézou. Proliferace AML-CFU významně ovlivňuje proliferaci a další diferenciaci normálních hemopoetických buněk (obr. 1).

Proces leukemogeneze můžeme zjednodušeně rozdělit na fáze:

- indukce vzniku leukemického klonu buněk narušením



Obr. 1 Klonální podstata normální hematopoézy a leukemogeneze

PKB: pluripotentní kmenová buňka
 AML-CFU: pluripotentní buňka tvořící kolonie leukemických blastů
 CFU-GEMM: pluripotentní determinovaná buňka pro granulocyty, erythrocyty, makrofágy a megakaryocyty
 BFU-E: raná progenitorová buňka determinovaná pro erythrocyty
 CFU-E: pozdní progenitorová buňka determinovaná pro erythrocyty
 CFU-GM: progenitorová buňka determinovaná pro neutrofilní granulocyty a makrofágy
 CFU-G: progenitorová buňka determinovaná pro neutrofilní granulocyty
 CFU-M: progenitorová buňka determinovaná pro makrofágy
 CFU-Eo: progenitorová buňka determinovaná pro eosinofilní granulocyty
 CFU-Ba: progenitorová buňka determinovaná pro bazofilní granulocyty
 CFU-Meg: progenitorová buňka determinovaná pro megakaryocyty
 IL-3: interleukin-3
 GM-CSF: granulocyto-makrofágový kolonie stimulující faktor

proliferace a diferenciace pluripotentní kmenové buňky (PKB)

- vznik AML-CFU a indukce jejich proliferace
- proliferace a maturace leukemických prekurzorových buněk, tj. vznik leukemických erytroblastů, nezralých megakaryocytů, monocytů a myeloblastů
- indukce další proliferace leukemických buněk - dominantních klonů a inhibice proliferace a maturace normálních hemopoetických buněk
- indukce proliferace leukemických buněk v kostní dřeni a jejich vypavování do periferní krve.

Obecně lze říci, že růst hemopoetických buněk u nemocných s AML je výrazně abnormální. Základním rysem je ne-

schopnost leukemických prekurzorů vytvářet normální kolonie při klonálních kultivacích in vitro (3, 14, 27). Kultivace CFU-GM, BFU-E a CFU-GEMM nám významně napomáhá při včasné diagnostice remise a relapsu AML.

Soubor nemocných a metodika vyšetření

Od září 1990 do května 1992 jsme na katedře radiobiologie VLA JEP vyšetřili 36 nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML) v různých fázích onemocnění,

tj. v období prvních příznaků a při utváření diagnózy (AML*), po první indukční cytostatické léčbě (5. až 10. den po ukončení indukční léčby) - AML(1), v období remise AML(2) a v období relapsu AML(3), podrobněji viz tabulka 2.

U 11 nemocných jsme provedli kultivaci CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve ve všech sledovaných fázích AML. Po indukční cytostatické léčbě jsme vyšetřili 33 nemocných. V období remise AML jsme vyšetřili 17 nemocných a zároveň jsme u těchto nemocných provedli další kultivační monitorování z periferní krve s cílem

Tabulka 2

Výsledky kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML v různých fázích onemocnění

Poř. číslo pacienta	Dg.	Počet jad. bb v KD	Počet jad. bb v PK	Kostní dřeň (KD)			Periferní krev (PK)		
				Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie	Shluky	K/K+S
		(x.10 ⁶ .l ⁻¹)		(přepočteno na 1.10 ⁵ buněk)					
1.	AML(M1)*	40,8	11,6	1,02	8,20	0,110	0,21	1,25	0,143
	(1)	17,2	1,6	0,50	1,40	0,263	0,00	0,50	0,000
	(2)	12,5	6,2	18,77	29,40	0,389	0,76	1,90	0,285
		13,5	7,2	-	-	-	0,57	1,02	0,358
		15,6	5,2	-	-	-	1,30	2,69	0,325
		19,9	10,1	-	-	-	0,30	8,60	0,034
	(3)	29,6	17,1	0,20	19,60	0,010	0,00	11,30	0,000
2.	AML(M1)*	20,6	13,4	2,01	12,06	0,142	0,50	1,50	0,250
	(1)	11,8	2,5	4,50	6,76	0,399	0,14	0,96	0,127
	(2)	9,6	5,1	22,70	33,20	0,406	0,96	1,05	0,477
		16,8	10,3	-	-	-	0,21	3,90	0,051
	(3)	39,9	19,5	0,70	11,40	0,057	0,00	0,00	0,000
3.	AML(M1)*	21,5	3,6	8,21	36,23	0,184	0,50	5,03	0,090
	(1)	6,2	0,9	2,80	11,21	0,199	0,00	1,00	0,000
	(3)	44,8	17,9	0,50	10,00	0,048	0,00	0,00	0,000
4.	AML(M1)*	35,7	10,2	5,85	33,40	0,149	0,11	2,30	0,045
	(1)	15,7	2,6	3,20	9,50	0,251	0,09	0,70	0,113
	(2)	21,2	7,6	11,90	45,00	0,254	0,00	12,80	0,000
	(3)	28,6	15,3	1,40	34,50	0,038	0,00	6,70	0,000
5.	AML(M1)*	30,0	19,9	2,02	15,05	0,058	0,35	8,30	0,040
	(1)	9,0	0,8	4,20	17,30	0,195	0,60	5,00	0,107
	(2)	14,4	4,2	31,60	44,40	0,415	1,04	3,50	0,229
		13,6	5,8	-	-	-	3,80	7,83	0,326
		14,1	4,7	-	-	-	1,32	4,89	0,212
		19,8	6,8	-	-	-	2,00	5,30	0,274
		15,9	4,9	-	-	-	1,20	4,30	0,207
	(3)	34,6	12,7	10,80	46,90	0,187	0,30	11,80	0,025
6.	AML(M1)*	48,0	14,2	1,02	8,67	0,105	0,35	1,05	0,250
	(1)	7,5	1,8	7,90	21,50	0,268	0,60	2,50	0,193
	(2)	12,6	7,7	26,33	78,60	0,250	3,20	11,60	0,216
		25,9	17,8	-	-	-	0,13	4,90	0,025
	(3)	35,8	10,9	3,60	21,70	0,142	0,20	7,90	0,024
7.	AML(M1)*	5,0	2,3	2,50	14,00	0,151	0,00	3,20	0,000
	(1)	5,9	3,1	1,90	3,70	0,339	0,45	2,90	0,134
	(3)	22,5	8,9	0,00	5,20	0,000	0,10	0,00	0,000
8.	AML(M1)*	29,0	12,8	3,06	11,20	0,214	0,13	2,30	0,053
	(1)	8,1	2,1	14,20	21,50	0,397	0,80	1,90	0,296
	(2)	13,6	5,6	33,50	41,50	0,446	2,40	8,30	0,224
		14,8	3,9	-	-	-	1,90	3,10	0,380
		16,1	6,3	-	-	-	2,06	3,70	0,357
9.	AML(M1)*	23,9	8,2	4,90	23,10	0,175	0,15	1,07	0,122
	(1)	9,3	1,9	2,01	10,30	0,163	0,33	0,90	0,268
	(2)	13,2	4,6	28,80	33,50	0,462	2,20	15,60	0,123
		18,9	10,7	-	-	-	0,50	7,90	0,059
	(3)	39,6	17,2	1,50	22,10	0,063	0,00	2,50	0,000
10.	AML(M1)*	25,6	9,9	1,47	8,33	0,150	0,12	1,05	0,102
	(1)	9,1	2,6	7,10	11,45	0,382	0,60	2,10	0,222
	(2)	11,3	7,0	-	-	-	0,70	2,50	0,218
11.	AML(M1)*	19,4	1,8	0,99	5,97	0,142	0,00	13,20	0,000
	(1)	4,7	0,9	1,70	3,50	0,326	0,10	2,00	0,048
	(2)	11,9	3,4	17,90	26,50	0,403	0,80	1,70	0,320
12.	AML(M1)*	6,3	1,4	14,30	31,50	0,312	1,30	5,20	0,200
	(1)	5,1	0,9	3,00	7,60	0,283	0,20	1,40	0,125

Poř. číslo pacienta	Dg.	Počet jad. bb v KD	Počet jad. bb v PK	Kostní dřev (KD)			Periferní krev (PK)		
				Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie	Shluky	K/K+S
		($\times 10^9 \cdot l^{-1}$)		(přepočteno na $1 \cdot 10^9$ buněk)					
13.	AML(M1)*	25,1	12,7	3,31	10,43	0,240	0,26	0,90	0,224
	(1)	3,0	0,7	1,09	3,20	0,254	0,00	0,60	0,000
14.	AML(M1)*	22,6	9,2	1,16	25,30	0,043	0,11	0,80	0,120
	(1)	5,1	1,9	1,30	3,80	0,250	0,44	2,70	0,140
	(3)	18,1	11,2	0,70	2,10	0,250	0,00	4,70	0,000
15.	AML(M1)*	42,5	19,9	3,80	17,32	0,179	0,16	4,90	0,031
	(1)	11,5	3,1	2,60	5,90	0,305	0,40	7,20	0,052
	(2)	14,5	4,7	19,40	26,90	0,534	0,70	3,20	0,179
		12,6	5,7	-	-	-	0,50	2,13	0,380
		14,6	3,2	-	-	-	1,30	8,10	0,138
		12,9	9,2	-	-	-	0,64	5,30	0,107
	(3)	18,9	4,2	8,90	53,20	0,143	0,00	11,80	0,000
16.	AML(M1)*	15,6	9,9	6,50	12,70	0,338	0,32	2,90	0,099
	(1)	6,5	1,1	2,60	5,90	0,305	0,11	4,00	0,027
17.	AML(M1)*	54,0	21,0	0,20	0,90	0,181	0,05	0,30	0,142
	(1)	19,6	3,3	1,60	7,30	0,179	0,31	1,21	0,203
	(3)	22,1	10,4	4,60	32,20	0,125	0,15	3,90	0,037
18.	AML(M1)*	11,4	8,9	12,60	45,70	0,216	0,32	6,60	0,046
	(1)	6,7	2,1	5,70	12,30	0,316	0,80	3,00	0,210
	(2)	8,5	3,2	7,80	13,90	0,359	0,90	4,10	0,180
		11,2	4,7	21,20	33,50	0,387	2,26	11,70	0,161
		18,4	6,8	-	-	-	0,67	7,10	0,086
	(3)	17,1	8,2	12,20	48,90	0,199	0,15	3,05	0,046
19.	AML(M1)*	29,4	17,5	3,40	22,30	0,132	0,40	16,90	0,023
	(1)	16,4	4,2	44,90	79,20	0,361	1,22	5,00	0,196
	(2)	19,2	6,7	32,60	71,50	0,313	2,60	11,90	0,179
		20,3	5,6	21,50	54,20	0,280	2,90	18,90	0,133
	(3)	33,5	14,6	5,60	35,67	0,136	0,32	21,77	0,014
20.	AML(M1)*	18,9	7,2	2,40	13,50	0,150	0,22	8,00	0,026
	(1)	7,8	3,0	1,50	2,01	0,427	0,00	0,00	0,000
	(2)	9,2	4,1	7,90	21,40	0,269	0,54	6,70	0,074
		18,4	7,7	15,70	61,70	0,202	0,60	9,70	0,058
		14,6	9,2	-	-	-	0,32	7,90	0,038
	(3)	16,9	11,3	2,30	16,80	0,124	0,04	0,70	0,054
21.	AML(M1)*	10,6	8,2	7,18	29,90	0,193	0,28	3,92	0,066
	(1)	6,4	1,3	1,03	2,30	0,309	0,00	1,07	0,000
		19,6	7,4	0,90	1,57	0,364	0,00	2,90	0,000
	(3)	9,0	17,9	0,30	12,40	0,024	0,00	23,60	0,000
22.	AML(M1)*	11,2	6,6	21,30	33,85	0,300	0,20	7,00	0,027
	(1)	5,6	2,1	11,20	18,20	0,379	0,30	4,70	0,060
	(2)	9,0	4,7	18,42	37,40	0,329	2,65	11,30	0,189
		12,3	5,7	-	-	-	2,45	9,10	0,212
		13,2	4,1	-	-	-	1,90	5,20	0,267
23.	AML(M1)*	9,5	7,8	1,60	12,90	0,070	0,00	3,70	0,000
	(1)	4,8	0,9	0,33	0,76	0,302	0,04	1,02	0,037
	(3)	7,7	21,5	0,00	0,45	0,000	0,00	0,90	0,000
24.	AML(M1)*	3,7	1,7	1,21	4,20	0,274	0,16	0,70	0,186
25.	AML(M1)*	36,8	19,7	4,34	22,50	0,161	0,21	1,77	0,106
	(1)	18,5	4,4	5,70	13,20	0,301	1,07	5,40	0,165
	(2)	12,5	5,6	19,90	23,50	0,458	4,20	10,30	0,289
		14,2	6,7	-	-	-	3,20	8,70	0,268
		16,1	7,2	-	-	-	1,30	7,70	0,144
		19,0	5,3	-	-	-	0,60	8,90	0,063
	(3)	34,2	16,9	2,34	34,20	0,064	0,07	0,65	0,097
26.	AML(M1)*	7,3	2,4	4,60	8,00	0,365	-	-	-
27.	AML(M1)*	8,9	7,2	15,70	56,80	0,216	0,63	3,90	0,139
	(1)	4,6	0,9	1,02	3,30	0,236	0,05	0,50	0,100
28.	AML(M2)*	15,6	9,0	3,50	12,40	0,220	0,22	1,14	0,161
	(1)	8,7	4,7	5,10	8,90	0,364	0,88	1,50	0,369
	(2)	10,4	6,6	25,60	14,60	0,636	3,40	12,20	0,217
		16,7	9,6	-	-	-	1,07	22,30	0,045
29.	AML(M2)*	14,5	5,6	15,70	61,30	0,201	0,45	9,90	0,048
	(1)	5,3	1,1	5,60	25,10	0,182	0,00	0,30	0,000
30.	AML(M2)*	6,5	4,1	2,40	14,50	0,142	0,70	2,06	0,253
31.	AML(M2)*	17,2	10,2	12,30	31,80	0,278	0,56	4,00	0,122
	(1)	6,2	3,1	4,50	15,40	0,226	0,32	7,50	0,040
	(2)	9,8	4,3	7,70	12,40	0,383	0,50	2,50	0,166
		17,5	4,9	-	-	-	1,23	6,40	0,192

Poř. číslo pacienta	Dg.	Počet jad. bb v KD	Počet jad. bb v PK	Kostní dřeň (KD)			Periferní krev (PK)		
		(x.10 ⁹ .l ⁻¹)	(x.10 ⁹ .l ⁻¹)	Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie	Shluky	K/K+S
				(přepočteno na 1.10 ⁵ buněk)					
32.	AML(M3)*	44,1	19,5	1,04	14,60	0,066	0,00	2,30	0,000
	(1)	9,2	1,2	3,50	12,40	0,220	0,00	0,20	0,000
33.	AML(M3)*	21,4	17,2	2,34	24,70	0,086	0,34	6,70	0,048
	(1)	14,5	4,5	6,70	29,00	0,187	0,26	5,00	0,049
	(3)	37,1	19,3	1,30	14,20	0,083	0,14	2,00	0,065
34.	AML(3)*	17,5	8,7	3,20	20,00	0,137	0,20	10,00	0,019
	(1)	5,6	1,3	1,20	3,60	0,250	0,00	0,20	0,000
35.	AML(M4)*	37,7	12,1	2,30	11,60	0,165	0,12	3,66	0,031
	(1)	9,1	2,4	0,44	0,66	0,400	0,05	0,19	0,208
36.	AML(M5)*	12,3	5,4	1,05	5,60	0,157	0,11	9,70	0,011
	(1)	7,8	2,9	3,90	10,50	0,271	0,10	0,90	0,100

odhalit nastupující změny růstu kolonií a shluků v období nástupu relapsu AML. U 17 nemocných jsme provedli kultivaci CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve již diagnostikovaného relapsu AML.

Vyšetřili jsme 19 mužů a 17 žen, ve věku 25-63 let (median 40,2 roku).

Kontrolní skupinu tvořilo 20 dobrovolných zdravých dárců, u kterých jsme provedli kultivaci CFU-GM z kostní dřeně, a 20 dárců, u nichž jsme provedli kultivaci CFU-GM z periferní krve (tab. 1.).

(obsahující především GM-CSF, 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/ml. Vlastní kultivaci jsme prováděli

Tabulka 1

Výsledky kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u zdravých dárců

Poř. čís. pacienta	Dg.	Počet jad. bb v KD	Počet jad. bb v PK	Kostní dřeň (KD)			Periferní krev (PK)		
		(x.10 ⁹ .l ⁻¹)	(x.10 ⁹ .l ⁻¹)	Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie	Shluky	K/K+S
				(přepočteno na 1.10 ⁵ buněk)					
1.		13,3	4,7	23,12	5,52	0,807	0,67	1,33	0,335
2.	K	9,6	7,1	28,64	6,03	0,826	3,00	1,67	0,642
3.	o	14,4	5,3	33,17	9,55	0,776	1,67	2,00	0,455
4.	n	7,2	4,9	35,22	19,35	0,645	3,00	2,33	0,562
5.	t	13,9	6,9	39,49	18,46	0,681	1,33	0,67	0,665
6.	r	8,6	4,2	29,80	26,80	0,526	2,00	4,00	0,333
7.	o	16,9	6,2	42,36	24,14	0,618	1,00	2,00	0,500
8.	l	15,3	7,3	36,87	51,87	0,415	1,00	1,67	0,374
9.	n	13,6	10,1	56,32	50,53	0,527	6,00	5,00	0,545
10.	f	11,9	3,9	30,53	57,37	0,347	1,00	2,33	0,300
11.		16,6	9,8	49,28	51,30	0,489	3,60	4,18	0,462
12.		14,7	5,9	52,70	66,30	0,442	4,11	7,20	0,363
13.	s	11,6	4,4	48,20	57,00	0,458	0,49	0,96	0,337
14.	k	15,8	7,7	21,33	40,10	0,347	0,50	0,70	0,416
15.	u	17,2	8,8	44,50	56,80	0,439	1,90	0,90	0,678
16.	p	11,8	5,8	39,00	44,90	0,464	2,60	1,10	0,702
17.	i	12,5	4,3	22,00	12,30	0,641	0,70	1,20	0,368
18.	n	9,3	5,2	48,20	21,30	0,693	0,82	0,90	0,476
19.	a	17,3	6,6	32,50	18,30	0,643	2,50	1,30	0,657
20.		10,8	4,7	29,70	11,90	0,713	1,90	0,60	0,760

Vyšetřovaným nemocným jsme odebrali 0,5-1 ml kostní dřeně (sternální punkcí nebo při trepanobiopsii) a 1 ml periferní krve (venepunkcí). Z odebraného materiálu jsme provedli separaci mononukleárních buněk. U kostní dřeně za použití roztoku COLIPK a u periferní krve gradientem na Lymfoprepu (Nyegaard Co. Norway). Počet jaderných buněk jsme určovali na počítací krevních elementů (Coulter Electronics, INC., Hialeah, Florida - USA).

Pro kultivaci CFU-GM in vitro bylo použito Iscovo medium (Iscoves modified Dulbeccos minimum essential medium, ÚHKT Praha, ČSFR), fetální telecí sérum (ÚHKT Praha, ČSFR), kondicionované médium 5637

v termostatu Haereaus (SRN) při 37 °C za 5% CO₂ po dobu 7 dní. Při odečítání počtu kolonií a shluků jsme provedli fixaci pomocí 2% kyseliny octové a počítali při 32násobném zvětšení.

Hodnocení: kolonie - 40 a více buněk
shluky - do 40 buněk
a. mikroshluky - 3 až 20 buněk
b. makroshluky - 20 až 39 buněk
K/K+S - kolonie/kolonie + shluky

Statistické hodnocení výsledků: Výsledky byly hodno-

ceny statisticky pomocí Studentova t-testu. Na obrázcích jsou znázorněny průměrné hodnoty souborů s 95% intervalem spolehlivosti průměru. Statistická významnost rozdílu srovnávaných souborů byla hodnocena na počítači Tandon LT/286 (Japonsko) a je popsána v textu pro $p < 0,05$.

Normální hodnoty počtu kolonií a poměru počtu kolonií k počtu kolonií a shluků (K/K+S):

Kostní dřeň: počet kolonií 20-100 (přepočteno na 10^5 jaderných buněk)
K/K+S > 0,333

Periferní krev: počet kolonií 0,5-5 (přepočteno na 10^5 jaderných buněk)
K/K+S > 0,333

Normální zastoupení makroshluků při kultivaci CFU-GM v kostní dřeni < 10 % a periferní krvi < 5 % z celkového počtu shluků.

Výsledky

U nemocných v období prvních příznaků a v době určování diagnózy (AML*) jsme zaznamenali významný pokles počtu kolonií a vzestup počtu shluků z kostní dřene a periferní krve ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců (graf 1a, 1b, tab. 3). Zastoupení makroshluků z kostní dřene nebylo větší než 45 % a z periferní krve

nepřesáhlo 32 % při dalším hodnocení jednotlivých kulti-vačních nálezů u vyšetřovaných nemocných. Poměr K/K+S byl pro kostní dřeň a periferní krev významně pod normou (tab. 3). Nemocní vyšetřeni v období po indukční cytostatické léčbě AML(1) měli významně snížený počet kolonií v kostní dřeni (graf 1a) a poměr K/K+S byl hraničně v normě (tab. 3). Zastoupení makroshluků nepřesáhlo 26 %. V periferní krvi nebyl pokles počtu kolonií tak výrazný (graf 1b), naopak poměr K/K+S byl významně pod normou (tab. 3). Zastoupení makroshluků nepřesáhlo 17 %. K významným kulti-vačním změnám došlo u nemocných v období remise AML(2). Počet kolonií z kostní dřene u 82,4 % vyšetřených byl v mezích normy (graf 1a). Poměr K/K+S u 70,9 % byl také v mezích normy (tab. 3). Zastoupení makroshluků nepřesáhlo 19 %. Opakovaným vyšetřováním periferní krve jsme prováděli monitorování nemocných (graf 1b). U 64,7 % nemocných jsme takto zjistili nástup změn na úrovni hemopoetických buněk dříve (1-3 měsíce), než nastaly změny v krevním obrazu a diferenciálním počtu buněk v periferní krvi. V období relapsu AML(3) jsme zjistili statisticky významný pokles počtu kolonií a vzestup počtu shluků v kostní dřeni (graf 1a, tab. 3). Poměr K/K+S byl významně pod normou (tab. 3). V periferní krvi byl zaznamenán významný pokles počtu kolonií a vzestup počtu shluků, a to ve srovnání s kontrolní skupinou a také ve srovnání se začátkem onemocnění (AML*) u všech sledovaných nemocných (graf 1b, tab. 3). Zastoupení makroshluků bylo v kostní dřeni nad 92 % a v periferní krvi nad 78 %.

V naší studii jsme se dále zaměřili na přesnější popis kulti-vačních nálezů u nemocných s AML, a to u ještě neléčených nemocných a nemocných v období relapsu. Při klonální kultivaci CFU-GM z kostní dřene a periferní krve jsme u neléčených nemocných dostali tyto kulti-vační nálezy:

1. Kostní dřeň - U 72 % nemocných jsme zjistili významně sníženou růstovou aktivitu CFU-GM, vysoké zastoupení mikroshluků. U 28 % nemocných jsme zjistili významně sníženou růstovou aktivitu CFU-GM, vysoké zastoupení makroshluků.

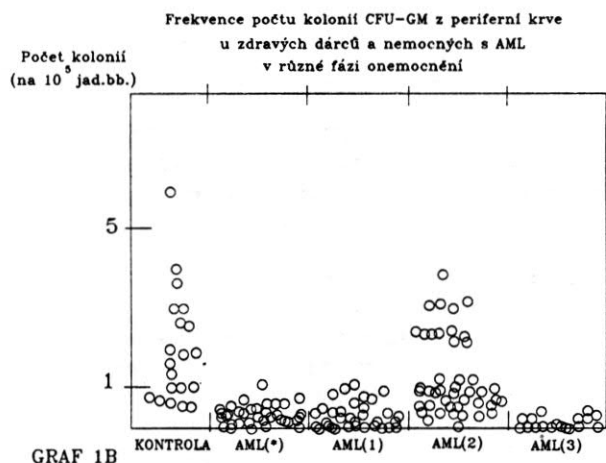
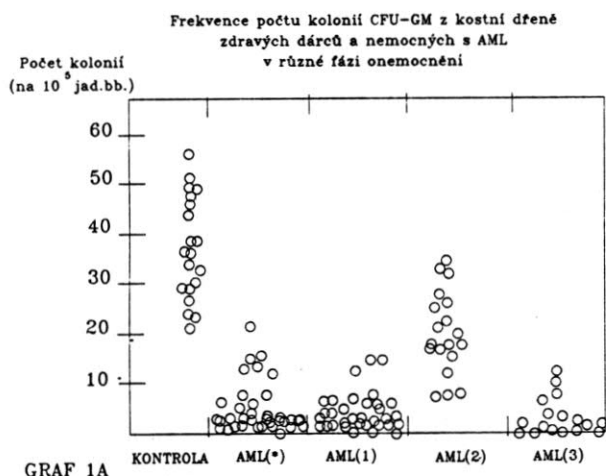
2. Periferní krev - U 11,1 % nemocných se nevytvářejí kolonie, ale jen mikroshluky. U 88,9 % ojedinelé kolonie a významně zvýšený počet shluků (mikroshluků a makroshluků).

Kulti-vační nálezy v období relapsu AML:

1. Kostní dřeň - U 11,7 % nemocných se nevytvářejí kolonie, ale zvýšený počet makroshluků. U 88,3 % nemocných ojedinelé kolonie a významně zvýšený počet shluků (mikroshluků a makroshluků).

2. Periferní krev - U 11,8 % nemocných se nevytvářejí ani kolonie, ani shluky, pouze jednotlivé buňky, které jsou často odumřelé. U 23,5 % nemocných se nevytvářejí kolonie, ale jsou patrné mikroshluky. U 64,7 % nemocných se vytvářejí ojedinelé kolonie a významně zvýšený počet shluků (mikroshluků a makroshluků).

U 17 % nemocných v období relapsu jsme při klonální



Tabulka 3

Změny počtu kolonií CFU-GM, shluků a K/K+S z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML v různých fázích onemocnění

Diagnóza	Kostní dřeň (KD) [$\pm$ SD]			Periferní krev (PK) [$\pm$ SD]		
	Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie	Shluky	K/K+S
	(přepočteno na $1 \cdot 10^5$ buněk)					
Kontrolní skupina	37,15 $\pm 10,08$	32,49 $\pm 19,75$	0,575 $\pm 0,145$	1,99 $\pm 1,39$	2,10 $\pm 1,39$	0,497 $\pm 0,142$
AML*	5,01 $\pm 5,09$	20,01 $\pm 13,94$	0,178 $\pm 0,076$	0,29 $\pm 0,25$	4,49 $\pm 3,85$	0,092 $\pm 0,077$
(1)	4,08 $\pm 3,61$	10,56 $\pm 8,79$	0,284 $\pm 0,071$	0,31 $\pm 0,34$	2,24 $\pm 2,06$	0,109 $\pm 0,098$
(2)	20,48 $\pm 7,85$	37,00 $\pm 18,27$	0,378 $\pm 0,103$	1,45 $\pm 1,07$	7,24 $\pm 4,61$	0,192 $\pm 0,112$
(3)	3,16 $\pm 3,71$	23,42 $\pm 15,74$	0,094 $\pm 0,071$	0,08 $\pm 0,10$	6,29 $\pm 7,03$	0,020 $\pm 0,028$

kultivaci z kostní dřeně a periferní krve zaznamenali nález velkého počtu buněk, které netvořily kolonie ani shluky (podle histologického vyšetření šlo o blasty).

Diskuse

U akutní myeloidní leukémie se klonální porucha hemopoetických buněk může projevit změnou proliferace a maturace těchto buněk in vivo, ale také in vitro (3, 6, 15, 24). Další poruchou maturace hemopoetických buněk dochází k vytváření leukemických prekurzorů, které přímo působí na normální hemopoetické, ale i maturované buňky (1, 4, 12, 28). Leukemické prekurzory nemají schopnost vytvářet morfologicky normální kolonie. Při in vitro kultivaci se v převážné většině vytvářejí makroshluky, jejichž přítomnost významně zhoršuje další prognózu onemocnění. Také při kultivaci progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a CFU-GEMM z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML in vitro byly zaznamenány typické kultivační změny růstu kolonií (17, 21, 22, 26).

V naší práci jsme se zaměřili na kultivaci CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s AML ve fázi remise a relapsu. Všeobecně se usuzuje, že existuje určitá korelace mezi typem růstu kolonií in vitro, navozením remise a přechodem do relapsu (21, 22, 25). U nemocných v období prvních příznaků a utváření diagnózy dochází k významnému poklesu počtu kolonií, a naopak k vzestupu počtu shluků, a to v kostní dřeni a periferní krvi (7, 16, 23). Nemocní, u kterých nebyly nalezeny kolonie, a naopak byl nalezen významně zvýšený počet makroshluků v kostní dřeni, mají prognózu horší než nemocní, u kterých byla minimální růstová aktivita a zvýšený počet mikroshluků (13, 19, 21, 25). Byla také popsána určitá závislost mezi růstovou aktivitou CFU-GM v kostní dřeni a možností navození remise pomocí cytostatické léčby (25). Nemocní, kteří mají v průběhu prvních příznaků sníženou růstovou aktivitu nebo u nichž také nebyly nalezeny kolonie CFU-GM v kostní dřeni, ale normální zastoupení shluků, mají méně sekundárních komplikací a navození remise je kvalitativně lepší (8, 9, 10).

Při kultivačním hodnocení v období remise dochází k normalizaci růstu kolonií v kostní dřeni a periferní krvi. Dalším monitorováním nemocných v období remise můžeme včas zachytit změny, které předcházejí relapsu AML (5, 11, 14, 17). Při nástupu relapsu dochází v první řadě k poklesu počtu kolonií a vzestupu počtu shluků už v periferní krvi. K tomuto kultivačnímu nálezu se také zařazuje vzestup procenta makroshluků (více než 50 %). U nemocných v klinicky rozvinutém relapsu AML je již počet kolonií minimální a dochází k významnému vzestupu počtu shluků, kde zastoupení makroshluků převyšuje 90 %. Dalším důležitým kritériem pro včasnou diagnostiku relapsu je komplexní posuzování kultivačních nálezu na začátku onemocnění a v období remise.

Obecně platí pravidlo, že čím rychlejší je navození remise, tím celkově relativně lepší je další průběh onemocnění. V klonálních kultivacích CFU-GM při relapsu dochází k tvorbě mikroshluků a makroshluků a nevytváření kolonií v kostní dřeni a periferní krvi. Tyto změny předcházejí klinickým a hematologickým známkám relapsu. Zřetelný rozdíl mezi normálním a leukemickým růstem in vitro dovoluje časnou detekci remise v průběhu indukční léčby a časnou diagnostiku relapsu u nemocných, kteří jsou podle jiných kritérií v kompletní remisi.

Závěr

Kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve má především význam při upřesnění diagnostiky remise, může přispět k včasné diagnostice relapsu AML.

Z našich kultivačních výsledků z kostní dřeně a periferní krve vyplývá, že u nemocných s AML dochází k statisticky významným změnám v počtu kolonií a shluků ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců. Při pravidelném kultivačním monitorování nemocných ve fázi remise AML můžeme zachytit v případě nástupu relapsu změny růstu kolonií a shluků již při vyšetření periferní krve.

Souhrn

Autoři se v první části práce především zaměřili na posouzení kultivačních nálezů z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML) z pozice hemopoetických buněk. Stručně popsali proces leukemogeneze, proliferační aktivitu leukemických prekursorů a jejich možný vliv na tvorbu kolonií in vitro.

Provedli kultivaci CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u 36 nemocných s AML v různých fázích onemocnění. Dále se autoři zaměřili na možnosti monitorování nemocných v období remise a relapsu AML. U 64,7 procent nemocných se podařilo zjistit nástup změn na úrovni hemopoetických buněk o několik měsíců dříve, než nastaly změny v krevním obrazu a diferenciálním počtu buněk v periferní krvi. Kultivační výsledky získané u těchto nemocných mohou napomáhat k včasné diagnostice relapsu už při kultivačním vyšetření periferní krve.

Literatura

1. AYE, M. T. et al.: Studies of leukemic cell populations in culture. *Blood*, 44, 1974, s. 205-219.
2. BEMMET J. M. et al.: Proposals for the classification of acute leukemias: French-American-British (FAB) cooperative group. *Br. J. Haematol.*, 33, 1976, s. 451-455.
3. BROXMEYER, H. E. et al.: In vitro regulation of granulopoiesis in human leukemia. Application of an assay for colony-inhibiting cells. *Blood*, 47, 1976, s. 389-402.
4. BUICK, R. N. et al.: Colony assay for proliferative blast cells circulating in myeloblastic leukaemia. *Lancet*, 11, 1977, s. 862-863.
5. CURTIS, J. E. et al.: Acute leukemia in adults: Assessment of remission induction with combination chemotherapy by clinical and cell-culture criteria. *Can. Med. Assoc. J.*, 113, 1975, s. 289-294.
6. DEMETRI, G. D. - GROFFOM, J. D.: Hemopoietins and leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. of North America*, 3, 1989, s. 535-553.
7. ERIDANI, S. et al.: Haemopoietic patterns of acute leukemia in remission: CFU-E and CFU-GM colony formation. *Acta Haematol.*, 70, 1983, s. 11-18.
8. FILIP, S. et al.: Možnosti využití kultivace hemopoetických buněk in vitro v klinické hematologické praxi. *Voj. zdrav. Listy*, 60, 1991, s. 167-174.
9. FILIP, S. et al.: The cultivation CFU-GM of hematological patients. *European stem cell meeting. Prague* 4.-6. June 1991.
10. FILIP, S. et al.: Kultivace CFU-GM z kostní dřeně a periferní krve u hematologických nemocných. *Voj. zdrav. Listy*, 60, 1991, s. 198-205.
11. Galbraith, P. R.: Remission of acute myeloid leukemia: Studies of in vitro colony formation by bone marrow cells. *Can. Med. Assoc. J.*, 110, 1974, s. 1147-1150.
12. GUNZ, F. W. - HENDERSON, E. S.: USA, New York, Grune & Stratton. G & S. Inc. 1983. 989 s.
13. GUSTAVSSON, A. et al.: The prognostic significance of in vitro bone marrow growth pattern in acute non-lymphocytic leukemia. *Scand. J. Haematol.*, 26, 1981, s. 364-377.
14. HARRIS, J. - FREIREICH, E. J.: In vitro growth of myeloid colonies from bone marrow of patients with acute leukemia in remission. *Blood*, 36, 1970, s. 61-63.
15. HOWELL, A. L. et al.: Induction of differentiation in blast cells and leukemia colony-forming cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 3, 1990, s. 721-729.
16. 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.
17. KEATING, M. J. et al.: Factors related to length of complete remission in adult acute leukemia. *Cancer*, 45, 1980, s. 2017-2029.
18. McCULLOCH, E. A. et al.: Normal and leukemic hemopoiesis compared. *Cancer*, 42, 1978, s. 845-853.
19. MERTERLSMANN, R. et al.: Diagnostic and prognostic significance of the CFU-C assay in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 41, 1981, s. 4844-4848.
20. METCALF, D.: Editorial comment: How reliable are in vitro clonal cultures? Some comments based on hemopoietic cultures. *Int. J. Cell Cloning*, 4, 1986, s. 287-294.
21. 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.
22. MOORE, M. A. S.: Prediction of relapse and remission in AML by bone marrow culture criteria. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells*, 17, 1976, s. 109-124.
23. MOORE, M. A. S. et al.: In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: Interaction between colony-forming and colony-stimulating cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 1973, s. 591-602.
24. MORRIS, T. C. M. et al.: Inhibition of normal human in vitro colony forming cells by cells from leukaemic patients. *Br. J. Cancer*, 31, 1975, s. 641-648.
25. NEUWIRT, J. - NEČAS, E.: Kmenové buňky a krevní choroby. Praha, Avicenum 1981. 224 s.
26. TILLY, H. et al.: Daily evaluation of circulating granulocyte-monocyte progenitors during bone marrow recovery from induction therapy in acute leukemia. *Leukemia Res.*, 3, 1986, s. 353-356.
27. VINCENT, P. C. et al.: Marrow culture studies in adult acute leukemia at presentation and during remission. *Blood*, 6, 1977, s. 903-912.
28. WILLIAMS, W. J. et al.: Hematology. 3. vyd. USA, McGraw-Hill Book Company 1983. 1728 s.

Klíčová slova: CFU-GM; Myeloproliferativní onemocnění; Akutní myeloidní leukémie; Remise; Relaps; Diagnostika.

Do redakce došlo 6. 10. 1992