

616.155.191-076.5-079.4

MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ A HEMOPOETICKÉ BUŇKY III. ČÁST

Kpt. MUDr. Stanislav FILIP, ¹MUDr. Jaroslava VOGLOVÁ, RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc., pplk. MUDr. Ladislav JEBAVÝ, CSc.,

²doc. MUDr. Milan BLÁHA, CSc., ²doc. MUDr. Jaroslav MALÝ, CSc.

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

(rektor: plk. prof. MUDr. J. Fusek, DrSc.)

¹Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové

(vedoucí: prof. MUDr. L. Chrobák, CSc.)

²II. interní klinika FN, Hradec Králové

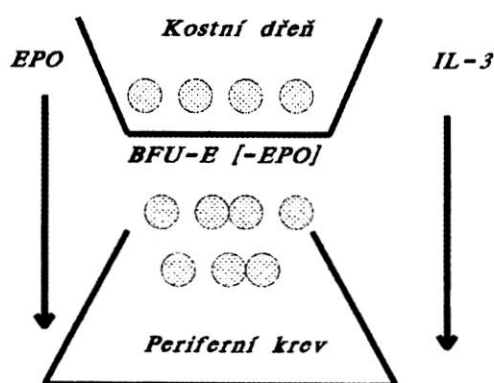
(vedoucí: prof. MUDr. V. Pidrman, DrSc.)

3. Polycythaemia vera

Polycytemie vera (erytremie, Vaquezova-Oslerova choroba, polycythaemia rubra vera) představuje onemocnění, které zařazujeme do skupiny chronických myeloproliferativních onemocnění. Jedná se o progresivní onemocnění klonálního původu charakterizované primárně zvýšenou erytropoézou se zvýšením počtu červených krvinek a zvýšeným objemem cirkulující krve (1, 3, 9).

V současné době víme, že u polycytemie vera jde o bezúčelovou proliferaci hemopoetických kmenových buněk, která je charakterizována hyperplazií kostní dřeně s poruchou erytrocypoezy, granulocypoezy a megakaryocypoezy (5, 8, 15).

Toto myeloproliferativní onemocnění je dále charakterizováno generalizovanými hyperplastickými změnami také erytrocytů, granulocytů a trombocytů v periferní krvi (2). Na patogenezi tohoto onemocnění se uplatňují humorální stimulatory proliferace (obr. 1). Zvýšení erytropoezy není podmíněno zvýšenou hladinou erythropoetinu (EPO) (10, 11). Erythropoetin, který byl kdysi považován za možného kandidáta, stimulatorem rozhodně není (20, 22). V současné době se uvažuje o skupině myelostimulačních faktorů, které se uplatňují v patologické proliferaci kmenových buněk, které jsou klonálně poškozeny (14). U nemocných s polycytemií vera můžeme zachytit jak normální klon erytroidních progenitorových buněk, tak také abnormální klon, který vytváří erytroidní kolonie (7) in vitro



Obr. 1

bez přítomnosti erythropoetinu (4, 12, 16, 17, 21). U polycytemie vera i ve fázi remise nedochází k obnově normálních buněk v cirkulaci (13). Klonální podstata a abnormální odpověď postižených buněk na erythropoetin ukazuje na další souvislost, a to na úrovni receptorů (19).

Průběh tohoto onemocnění můžeme rozdělit do tří období, která jsou závislá na proliferaci patologického klonu. V prvním období dochází k postupnému vzestupu počtu červených krvinek, proliferace patologického klonu je omezená. Druhé období je erytremické, u nemocných dochází k proliferaci patologického klonu, zvyšuje se počet červených krvinek a objem cirkulující krve. Hypervolemie a hyperviskozita vedou k oběhovým poruchám, stáží a také často k trombóze. V třetím období dochází k přechodu v myelofibrózu s leukoerytoblastickou anémií nebo chronickou myeloidní leukémií (6, 18).

Soubor nemocných a metodika

Od ledna 1992 do srpna 1993 jsme na katedře radiobiologie vyšetřili kultivaci CFU-GM a BFU-E z periferní krve 35 nemocných s diagnózou polycytemie vera, z toho 19 žen a 16 mužů ve věku od 26 do 52 let (medián 41,5 roku). 17 nemocných s diagnózou sekundární polyglobulie, z toho 10 žen a 7 mužů ve věku od 32 do 60 let (medián 47,1 roku).

Kontrolní skupinu tvořilo 20 dobrovolných dárců, u kterých jsme též provedli kultivaci CFU-GM a BFU-E z periferní krve.

Vyšetřovaným nemocným jsme odebrali 1 ml periferní krve (venepunkcí). Z odebraného materiálu jsme provedli separaci mononukleárních buněk gradientem na Lymphoprep (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 médium (Iscove s modified Dulbecco's minimum essential medium, ÚHKT Praha, ČR), fetální telecí sérum (ÚHKT Praha, ČR), kondicionované médium 5637

(obsahující především GM-CSF, ÚHKT Praha, ČR), 3% L-glutamin (Serva, SRN), antibiotika (penicilin 100 j.ml⁻¹ a streptomycin 100 g.ml⁻¹, Spofa, ČR), NaHCO₃ 7,5% (Sevac, ČR). 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⁻¹. Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu Haeraeus (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.

Pro kultivaci BFU-E in vitro byl použit 10% albumin hovězí deionizovaný (BSA), hemin, 2-merkaptetanol 10 mM, 3% L-glutamin, antibiotika (penicilin + streptomycin), kondicionované médium (CM-5637), 7,5% NaHCO₃, erythropoetin (Eprex), fetální telecí sérum, jako imobilizační médium byla použita 2,7% metylcelulóza v médiu. Jako kultivační inokulum jsme použili suspenze buněk 10⁶.ml⁻¹. Ke kultivaci byly použity misky o průměru 30 mm (Falcon). Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu Haeraeus při teplotě 37 °C, za 5% CO₂ a 5% O₂ po dobu 14 dnů. Kolonie byly odečítány při 32násobném zvětšení.

Základní koncentrace erythropoetinu v kultivačním médiu byla 2,5 U.ml⁻¹. Další ředění 0,25 U.ml⁻¹... 0,025 U.ml⁻¹...bez EPO.

Hodnocení:

- Normální hodnoty počtu kolonií CFU-GM v periferní krvi < 0,5 až 5 > přepočteno na 1.10⁵ buněk.
- Normální hodnoty počtu kolonií BFU-E v periferní krvi < 5 až 10 > přepočteno na 1.10⁵ buněk.

Erythropoetin: Hladinu erythropoetinu v séru jsme stanovovali metodou RIA (radioimmunoassay) EPO Tarc ¹²⁵I podle standardního protokolu (Incstar Corp. Stillwater, Minnesota, USA). Kontrolní skupinu tvořilo 15 dárců, u kterých byla vyšetřena plazmatická hladina EPO. Normální hodnoty byly v rozmezí 10-15 mU.ml⁻¹ (podle protokolu byly normální hodnoty 15,7 mU.ml⁻¹). Statistické hodnocení výsledků: Výsledky byly hodnoceny statisticky pomocí Studentova t-testu. Na obrázcích jsou znázorněny průměrné hodnoty souborů s p < 0,01.

Výsledky

Kultivaci BFU-E z periferní krve jsme provedli u 35 nemocných s diagnózou polycytemie vera (PV*) a 17 nemocných s diagnózou sekundární polyglobulie (SP*) (tab.1). U 15 nemocných vedených pod diagnózou polycytemie vera (PV1) nebyl při kultivaci s EPO 10⁻¹, EPO 10⁻² a bez EPO zjištěn růst kolonií BFU-E. Další laboratorní a klinickou analýzou bylo zjištěno, že se nejedná o polycytemii vera. Hladina EPO v séru nemocných byla hraničně nad normou až zvýšená (18,5 až

Změny počtu kolonií BFU-E a CFU-GM u nemocných s polycytemií vera a sekundární polyglobulií

Diagnóza	Periferní krev						
	CFU-GM			BFU-E			
	Kolonie	Shluky	K/K+S	Kolonie Epo 2,5 U.ml ⁻¹	Kolonie Epo 0,25 U.ml ⁻¹	Kolonie Epo 0,025 U.ml ⁻¹	Kolonie bez EPO
	(přepočteno na 1.10 ⁵ buněk)						
Polycytemie vera *	3,79 + 3,77	6,29 + 9,54	0,346 + 0,169	35,33 + 5,88	26,33 + 8,46	22,38 + 3,00	17,30 + 5,00
Polycytemie vera ¹	1,21 + 1,79	1,97 + 1,51	0,351 + 0,165	5,83 + 8,55	0,00	0,00	0,00
Sekundární polyglobulie *	1,09 + 0,67	3,53 + 2,00	0,406 + 0,220	9,01 + 6,17	0,00	0,00	0,00
Sekundární polyglobulie ¹	5,17 + 2,92	11,62 + 11,54	0,537 + 0,163	24,22 + 9,64	18,78 + 4,33	13,23 + 0,59	14,00 + 4,10

Legenda:

Polycytemie vera * (PV*) - vyšetření nemocní s již diagnostikovanou polycytemií vera

Polycytemie vera ¹ (PV1) - vyšetřování nemocní s polycytemií vera, nerostly kolonie BFU-E při EPO (10⁻¹, 10⁻² a -EPO)

Sekundární polyglobulie* (SP*) - vyšetření nemocní s již diagnostikovanou sekundární polyglobulií

Sekundární polyglobulie¹ (SP1) - vyšetřování nemocní se sekundární polyglobulií, u kterých rostly kolonie BFU-E při EPO (10⁻¹, 10⁻² a -EPO)

40 mU. ml⁻¹) (graf 3). Zvýšená hladina EPO v séru potvrdila diagnózu sekundární polyglobulie. U jednoho nemocného (PV*) bylo při vyšetření zjištěno významné zvýšení růstu kolonií CFU-GM v periferní krvi a zároveň normální růstová aktivita BFU-E a normální hladina EPO v séru (graf 3). Tento kultivační nález potvrdil počínající myelofibrózu (tento nemocný byl diagnosticky veden jako polycytemie vera již 4 roky).

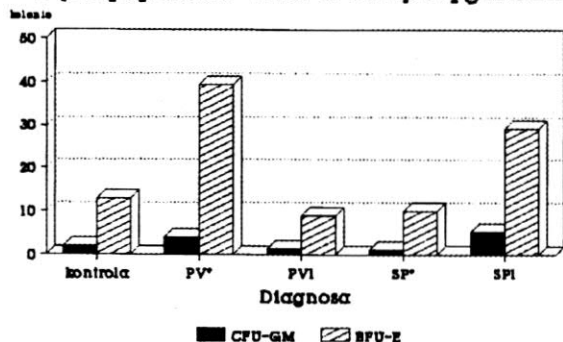
U 7 nemocných vedených pod diagnózou sekundární polyglobulie (SP1), byly při kultivaci s EPO 10⁻¹, EPO 10⁻² a bez EPO nalezeny kolonie BFU-E z periferní krve. Hladina EPO v séru byla v mezích normy až hraničně snižena (diagnóza na základě tohoto zjištění byla dále sledována, t. č. již víme, že se jedná o polycytemii vera) (graf 3). U dvou nemocných (SP1) byla kultivačně zjištěna významně zvýšená růstová aktivita CFU-GM,

významný vzestup počtu shluků a nepoměr K/K+S. Dále kultivačně byla zjištěna normální růstová aktivita BFU-E a normální hladina EPO v séru (diagnosticky se potvrdila myelofibróza).

U nemocných s polycytemií vera (PV*) jsme zjistili statisticky významné zvýšení počtu kolonií BFU-E v periferní krvi ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců, růstová aktivita BFU-E byla také zjištěna při kultivacích s EPO 10⁻¹, EPO 10⁻² a bez EPO. Pokles koncentrace EPO v kultivačním médiu neměl vliv na počet klonů BFU-E in vitro (graf 2). Zároveň jsme zjistili, že zvýšení počtu kolonií BFU-E a CFU-GM můžeme najít u nemocných se zvýšenou proliferací aktivitou patologického klonu BFU-E u polycytemie vera. Nemocní s diagnózou sekundární polyglobulie neměli růstovou aktivitu kolonií BFU-E nezávislých na EPO (graf 2). Při kultivaci CFU-GM z periferní krve jsme zjistili statisticky významné rozdíly růstu ve srovnání s kontrolní skupinou u nemocných s polycytemií vera (graf 1). Růst kolonií CFU-GM u nemocných se sekundární polyglobulií byl v mezích normy (graf 1). U nemocných s myelofibrózou jsme zaznamenali kultivační nález v periferní krvi typický pro toto onemocnění.

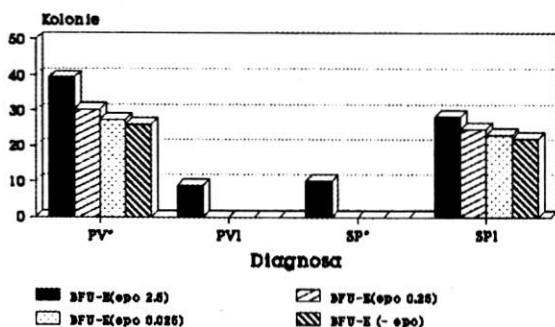
Diskuse

BFU-E a CFU-GM u polycytemie vera a sek.polyglobulie



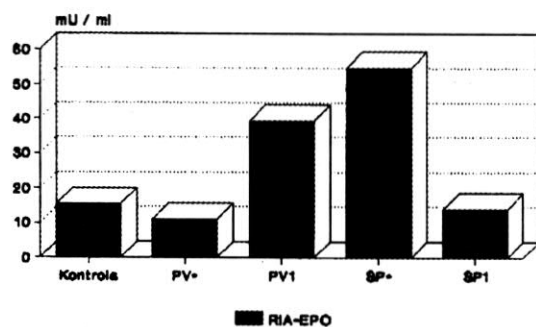
Graf 1

BFU-E a erytropoetin (in vitro)



Graf 2

Hladina EPO v séru polycytemia vera a sek.polyglobulie



Graf 3

U nemocných s polycytemií vera dochází k zvýšené proliferaci prekurzorů, a to nejen pro červenou řadu, ale také pro granulocytární a megakaryocytární řadu. Při kultivaci BFU-E z kostní dřeně a periferní krve dochází k tvoření kolonií i za nepřítomnosti erytropoetinu.

Podle dosavadních znalostí je polycytemie vera monoklonální porucha unipotentní (progenitorové buňky), která je determinovaná pro erytroidní řadu (2, 5, 16). Zatím se stále ještě diskutuje o otázce výskytu jak normálních buněk BFU-E, tak buněk nezávislých na EPO u nemocných s polycytemií vera.

Množství BFU-E nezávislých na EPO koreluje s klinickým stavem nemocného. Důležitým ukazatelem tohoto stavu je také hladina EPO v séru. V současné době, ale stále nevíme proč, dochází u některých nemocných k poruše diferenciaci a maturace především buněk granulocytární řady. Pravděpodobně je to spojeno s prohlubující se klonální poruchou. U těchto nemocných byl zaznamenán významně častější přechod v myelofibrózu (1, 5, 20).

V našich kultivačních vyšetřeních jsme potvrdili, že u nemocných s polycytemií vera dochází k významnému vzestupu počtu kolonií BFU-E bez EPO jak v kostní dřeně, tak i v periferní krvi. Při snižování koncentrace Epo (10^{-1} , 10^{-2}) jsme také zaznamenali růstovou aktivitu BFU-E a počet kolonií se významně neměnil. Zásadně jiný kultivační nálezn byl u nemocných s diagnózou sekundární polyglobulie, kde jsme kolonie BFU-E nezávislé na Epo nenalezli. Nepodařilo se nám prokázat statisticky významný růst CFU-GM i když podle některých autorů by se tento nálezn měl doplňovat se zvýšenou růstovou aktivitou BFU-E. Zajímavý kultivační nálezn jsme dostali u nemocných, kde významné zvýšení růstové aktivity CFU-GM v periferní krvi vedlo k dalšímu diagnostickému vyšetřování a výsledkem bylo zjištění, že se jedná o počínající myelofibrózu. Je otázkou, jestli u tohoto nemocného se již primárně nejednalo o polycytemií vera. Kultivace BFU-E může i podle našich zkušeností významně doplnit soubor vyšetření především v diferenciálně diagnostickém postupu u nemocných s polycytemií vera a sekundární polyglobulií.

Závěr

1. Zavedli jsme metodu kultivace BFU-E z kostní dřeně a periferní krve u nemocných s polycytemií vera a sekundární polyglobulií.
2. Provedli jsme kultivaci BFU-E z periferní krve u 20 zdravých dárců, průměrný počet kolonií je $12,80 \pm 9,14$.
3. U nemocných s polycytemií vera jsme zjistili kultivačně statisticky významně zvýšený růst kolonií BFU-E v periferní krvi při Epo $2,5 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (in vitro) $p < 0,01$. Kultivačně jsme zaznamenali také růst kolonií BFU-E nezávislých na Epo.

4. U nemocných se sekundární polyglobulií byla normální růstová aktivita BFU-E v periferní krvi, nebyly nalezeny kolonie BFU-E bez přítomnosti Epo.
5. U dvou nemocných jsme zaznamenali kultivační nález charakteristický pro myelofibrózu.

Souhrn

Ve třetí části práce se autoři soustředí především na hodnocení nálezů kultur z periferní krve u pacientů s polycytemií vera z hlediska hemopoetických buněk.

Stručně popisují proces prekurzorů polycytemie vera a jejich možný vliv na růst kolonií in vitro. U 35 pacientů s polycytemií vera byla provedena kultivace CFU-GH a BFU-E z periferní krve. Vývoj změn na úrovni hemopoetických buněk byl úspěšně potvrzen u 80 % pacientů.

Autoři chtějí využívat kultivaci CFU-GM a BFU-E z periferní krve pro hodnocení erytrocytózy z hlediska diferenciální diagnostiky polycytemie vera a sekundárních polycytemií.

Literatura

1. ADAMS, J. A. et al.: Primary polycythaemia, essential thrombocythaemia and myelofibrosis- Three facets of a single disease process? *Acta Haematol.*, 79, 1988, s. 33-37.
2. ADAMSON, J. W. et al.: Polycythemia vera: Stem cell and probable clonal origin of the disease. *New Engl. J. Med.*, 295, 1976, s. 913-917.
3. BERLIN, N. I.: Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin. Hematol.*, 12, 1975, s. 339-342.
4. CASHMAN, J. et al.: Individual BFU-E in polycythemia vera produce both erythropoietin dependent and independent progeny. *Blood*, 61, 1983, s. 876-884.
5. DAI, C.H. et al.: Polycythemia Vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 80, 1992, s. 891-899.
6. DONNER, L.: *Klinická hematologie*. Praha, Avicenum 1985. 448 s.
7. EAVES, C. J. - EAVES, A. C.: Erythropoietin 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.
8. EAVES, C. J. et al.: Abnormal erythropoiesis in the myeloproliferative disorders: an analysis of underlying cellular and humoral mechanisms. *Exp. Hematol.*, 8, 1980, s. 235-247.
9. ERIDANI, S. et al.: Erythroid colony formation in primary proliferative polycythemia, idiopathic erythrocytosis and secondary polycythemia: sensitivity to erythropoietin stimulating factors. *Clin. Labor. Haematol.*, 5, 1983, s. 121-129.
10. GOLDE, D. W. et al.: Polycythemia vera. Hormonal modulation of erythropoiesis in vitro. *Blood*, 49, 1977, s. 399-406.
11. KOEFFLER, H. P. - GOLDWASSER, E.: Erythropoietin radioimmunoassay in evaluating patients with polycythemia. *Ann. Intern. Med.*, 94, 1981, s. 44-47.
12. LACOMBE, C. et al.: Polycythemia vera: In vitro studies of circulating erythroid progenitors. *Br. J. Haematol.*, 44, 1980, s. 189-194.
13. LEMOINE, F. et al.: A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. *Blood*, 68, 1986, s. 996-1002.
14. MOORE, M. A. S.: Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood*, 78, 1991, s. 1-19.
15. NEUWIRT, J. - NEČAS, E.: *Kmenové buňky a krevní choroby*. Praha, Avicenum 1981. 223 s.
16. PRCHAL, J. F. - AXELARD, A. A.: Bone marrow responses in polycythemia vera. *New. Engl. J. Med.*, 290, 1974, s. 1382-1389.
17. PRCHAL, J. F. et al.: Polycythemia vera: The in vitro response of normal and abnormal stem cell lines to erythropoietin. *J. Clin. Invest.*, 61, 1978, s. 1044-1047.
18. ROBAK, T.: Antigen characteristics of erythropoietin dependent and independent erythroid progenitors (BFU-E and CFU-E) in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis defined by monoclonal antibodies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 36, 1988, s. 733-745.
19. SAWADA, K. et al.: Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.*, 142, 1990, s. 219-230.
20. WARD, H. P. - ROBINSON, W. A.: Presence of a myelostimulatory factor in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia. *J. Clin. Invest.*, 51, 1972, s. 100 (Abstr.)
21. 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.
22. ZANJANI, E. D.: Hemopoietic factors in polycythemia vera. *Semin. Hematol.*, 13, 1976, s. 1-12.

Do redakce došlo 25. 3. 1994