616.155-006.04-08:615.91:616.419

MONITOROVÁNÍ TERAPEUTICKÉHO EFEKTU HEMOPOETICKÝCH RŮSTOVÝCH FAKTORŮ U NEMOCNÝCH PO CYTOSTATICKÉ LÉČBĚ

[1] MUDr. Stanislav FILIP, [3]doc. MUDr. Milan BLÁHA, CSc., [2]pplk. MUDr. Ladislav JEBAVÝ, CSc., [4]MUDr. Zdeněk SLAVÍK, [4]MUDr. Josef HAK, [3]doc. MUDr. Jaroslav MALÝ, CSc., [1]MUDr. Jaroslav VAŇÁSEK, CSc.
[1]Onkologická a radioterapeutická klinika FN, Hradec Králové
(přednosta: MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)
[2]Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)
[3]II. interní klinika FN, Hradec Králové
(přednosta: prof. MUDr. Vladimír Pidrman, DrSc.)
[4]Dětská klinika FN, Hradec Králové
(přednosta: doc. MUDr. Eva Pařízková, CSc.)

Do skupiny cytokinů, které mají přímý vztah k procesu hematopoézy zahrnujeme kolonie stimulující faktory, a to především faktor označovaný jako SCF (stem cell factor), který stimuluje tvorbu primitivních kmenových buněk, růstový faktor, který stimuluje tvorbu kolonií neutrofilních granulocytů a makrofágů GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), tvorbu kolonií neutrofilních granulocytů G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) a tvorbu kolonií makrofágů M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Dále sem patří skupina interleukinů IL-1 až IL-13 (15, 24, 26, 27).

Cytokiny jsou látky, které mají vlastnosti podobné hormonům. Z pohledu hematologů se o některých cytokinech hovoří jako o hemopoetických růstových faktorech, které regulují proliferaci, diferenciaci a maturaci kmenových buněk krvetvorby, ale zároveň mohou působit na funkční aktivitu zralých myeloidních a lymfoidních buněk (3, 10, 15, 24).

V procesu krvetvorby se dále uplatňují kromě stimulačních faktorů i inhibitory růstu, které jsou

s růstovými faktory ve vzájemné souhře (5, 15, 25). Růstové stimulační i inhibiční faktory se uplatňují jak v regulaci proliferace, diferenciace a maturace buněčných populací, tak i při imunitních reakcích. Mohou také hrát negativní roli v patologické imunitní reakci nebo při růstu nádorových buněk solidních nádorů (24).

Zásadním obratem v možnostech využití cytokinů byla příprava rekombinantních růstových faktorů, které stimulují tvorbu kolonií in vitro (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, erytropoetin). Komerčně se zatím pro klinickou aplikaci vyrábí G-CSF (Neupogen), GM-CSF (Leucomax), rhEPO (Eprex). Z interleukinů především IL-2, IL-3, který zatím nebyl v našich podmínkách klinicky vyzkoušen (11, 15, 24).

Růstové hematopoetické faktory byly zatím s úspěchem použity tam, kde:

- byla chemoterapií navozená neutropenie, jedná se především o nemocné s AML, CML, ALL, Hairy cell leukemia (lukémie z vlasatých buněk) a MDS (především RAEB - refrakterní anémie s excesem blastů)
- byla chemoterapií a zářením navozena neutropenie u nemocných s maligním lymfomem, ale také u některých solidních nádorů, které jsou citlivé na chemoterapii (např. karcinom plic, karcinom tlustého střeva atd.)
- byla chemoterapií a zářením navozená neutropenie a další léčba nemocného je realizována autologní nebo alogenní transplantací kostní dřeně.

V současné době se ukazuje, že z velké skupiny již známých růstových hematopoetických faktorů je nejvíce prostudováno klinické využití rekombinantního lidského GM-CSF, G-CSF, IL-3 a erytropoetinu (EPO). Přímý vztah k reparaci a následné obnově kmenových buněk krvetvorby mají multipotentní růstové faktory GM-CSF a IL-3 a unipotentní růstový faktor G-CSF.

Soubor nemocných

V období od listopadu 1991 do března 1994 jsme hemopoetickými růstovými faktory G-CSF a GM-CSF léčili 65 nemocných. Nemocní byli hospitalizováni na II. interní klinice FN a dětské klinice FN v Hradci Králové (tab. 1, 2).

U všech nemocných jsme prováděli kultivaci progenitorových buněk CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E a monoklonální fenotypizaci antigenu CD34 z periferní krve. Vyšetřování jsme prováděli před zahájením podávání hemopoetického růstového faktoru, 24 hodin po ukončení podávání a následně 5. a 10. den od ukončení podávání.

Vyšetřovaným nemocným, u kterých jsme prováděli kultivaci progenitorových buněk (CFU-GEMM, CFU-GM a BFU-E), jsme odebrali 3 ml periferní krve (venepunkcí). Z odebraného materiálu jsme provedli separaci mononukleárních buněk gradientem na Lymfoprepu (Nyegaard Co., Norway). Počet jaderných buněk jsme určovali na počítači krevních elementů (Coulter Electronics, INC., Hieleah, Florida-USA).

Tabulka 1

Soubor nemocných

Celkový počet nemocných:	G-CSF GM-CSF	(Neupogen) (Leucomax)	- 36 (M - 16, Ž - 20) - 29 (M - 19, Ž - 10)
Průměrný věk (roky):	G-CSF GM-CSF		26 ± 19,30 38 ± 11,50
Průměrná dávka:		s. c.	
	G-CSF	-	6,8 ± 3,26 μg . kg^{-1}
	GM-CSF	-	7,7 ± 3,37 μg . kg^{-1}
Průměrná délka podání (dny):		s. c.	
	G-CSF	-	7,6 ± 3,20
	GM-CSF	-	8,9 ± 2,17

Tabulka 2

Přehled terapeutického použití hemopoetických růstových faktorů

Diagnóza	Hemopoetický růstový faktor	
	G-CSF	GM-CSF
ALL	16	0
AML	7	8
M. Hodgkin	10	8
Solidní tumory	3	13

Pro kultivaci CFU-GEMM in vitro byl použit albumin hovězí deionizovaný (BSA) 10% (ÚHKT Praha), hemin 10 nM, 2-merkaptoetanol 10 nM, L-glutamin 3% (Serva, SRN), antibiotika (penicilín 100 j.ml^{-1} a streptomycin 100 g.ml^{-1}, Spofa, ČR), $NaHCO_3$ 7,5% (Sevac, ČR), kondiciované médium 5637 (obsahující především GM-CSF, ÚHKT Praha), erytropoetin Eprex 4000 (Cilag, Švýcarsko), Interleukin 3 (Genzyme, USA), FTS (fetální telecí sérum), metylcelulóza 2,7%. Jako kultivační inokulum jsme použili suspenze buněk 10^6.ml^{-1}. Ke kultivaci byly použity misky o průměru 30 mm (Falcon). Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu Haereus (SRN) při teplotě 37 °C, za 5% CO_2 a 5% O_2 po dobu 18 dnů. Kolonie byly odečítány při 32násobném zvětšení.

Pro kultivaci CFU-GM in vitro bylo použito Iscovo médium (Iscove s modified Dulbecce s minimum essential medium, ÚHKT Praha), FTS, kondiciované médium 5637 (ÚHKT Praha), 3% L-glutamin (Serva, SRN), antibiotika: penicilín 100 j.ml^{-1} a streptomycin 100 g.ml^{-1} (Spofa, ČR), $NaHCO_3$ 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 $2.10^5.ml^{-1}$. Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu Haereus (SRN) při 37 °C za 5% CO_2 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-merkaptoetanol 10 mM, 3% L-glutamin, antibiotika (penicilín + streptomycin), kondiciované médium 5637, 7,5% $NaHCO_3$, erytropoetin Eprex 4000, fetální telecí sérum, jako imobilizační médium byla použita 2, 7% metylcelulóza v médiu. Jako kultivační inokulum jsme použili suspenze buněk $10^6.ml^{-1}$. Ke kultivaci byly použity misky o průměru 30 mm (Falcon). Vlastní kultivaci jsme prováděli v termostatu Haereus při teplotě 37 °C, za 5% CO_2 a 5% O_2 po dobu 14 dnů. Kolonie byly odečítány při 32násobném zvětšení.

Hodnocení:
- Normální počet kolonií CFU-GEMM v periferní krvi: je více než 0,5 v přepočtu na 1.10^5 mononukleárních buněk.
- Normální počet kolonií CFU-GM v periferní krvi: 0,5 až 5 přepočteno na 1.10^5 mononukleárních buněk.
- Normální počet kolonií BFU-E v periferní krvi: 5 až 10 přepočteno na 1.10^5mononukleárních buněk.

Monoklonální fenotypizaci buněk CD34 jsme prováděli z periferní krve. Na vyšetření jsme odebrali 4 ml periferní krve a 20 µl heparinu (25 $j.ml^{-1}$). Separaci mononukleárních buněk provádíme pomocí gradientu na Lymfoprepu (Nyegaard Co., Norway). Oddělené lymfocyty dáme do zkumavky s 1 ml fyziologického roztoku a doplníme do plného objemu dalším fyziologickým roztokem. Promícháme a centrifugujeme při 1000 otáčkách 9 minut. Tento postup opakujeme ještě jednou. Potom supernatant slejeme, buněčný sediment proklepeme, přidáme 1 ml fyziologického roztoku a spočítáme buňky. Opět centrifugujeme, supernatant slejeme a k sedimentu přidáme tolik fyziologického roztoku, aby v 1 ml bylo 1.10^7 buněk ($0,5.10^6$/50 µl) na jamku. Do jamek mikrodestičky nakapeme 20 µl známe protilátky (CD34) a přidáme 50 µl buněčné suspenze, krátce protřepeme a uložíme na 30 minut do lednice. Po ukončení inkubace krátce protřepeme na třepačce a přidáme 175 µl fyziologického roztoku, centrifugujeme při 1200 otáčkách při +4 °C asi 7 minut. Po skončení supernatant vyklepeme, protřepeme, znovu přidáme 175 µl fyziologického roztoku a centrifugujeme. Po druhém promytí přidáme konjugát (antimyší imunoglobulin SwaM/FITC) 20 µl. Inkubujeme v lednici při +4 °C asi 30 minut. Opět provádíme opakovaně promývání. Po promytí protřepeme sediment a naneseme po 20 µl na podložní sklíčko, opatrně překryjeme krycím sklíčkem a uložíme do vlhké komůrky. Hodnocení provádíme ve fluorescenčním mikroskopu (CUE-2, Olympus). Normální hodnoty zastoupení CD34 v periferní krvi jsou 3-5%.

Výsledky

Nemocným s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) jsme podávali hemopoetický růstový faktor G-CSF (Neupogen). Celkově jsme podávali tento faktor u šestnácti nemocných v období iatrogenní neutropenie po cytostatické léčbě (tab. 2, 3). Statisticky významný vzestup ve srovnání před zahájením podávání G-CSF jsme zaznamenali u progenitorvých buněk CFU-GM a buněk CD34 již 24 hodin po ukončení s. c. podávání neupogenu (tab. 3, graf 1, 5a). Normalizace počtu progenitorových buněk a buněk CD34 v periferní krvi byla ukončena po 5. dnu. Další vzestup počtu CD34 pozitivních buněk v periferní krvi až do 10. dne přikládáme jak reparaci hematopoézy, tak možné mobilizaci těchto buněk z marginálního poolu. Významný efekt G-CSF na CFU-GEMM jsme jednoznačně neprokázali (graf 1). Vzestup počtu BFU-E byl ukončen 10. den. Další vzestup počtu kolonií BFU-E jsme již nezaznamenali. V současné době nevíme, jestli sledovaný vzestup počtu kolonií BFU-E byl výsledkem účinku G-CSF, nebo důsledkem reparace hematopoézy.

U akutní myeloidní leukémie (AML) jsme podávali s. c. G-CSF (Neupogen) 7 nemocným a GM-CSF (Leucomax) 8 nemocným v období iatrogenní neutropenie a protokolu intenzifikace cytostatické léčby (tab. 2, 3). U nemocných, kterým byl podáván G-CSF, jsme zaznamenali statisticky významný vzestup počtu progenitorových buněk CFU-GM a buněk CD34 ve srovnání s jejich počtem před zahájením podávání tohoto růstového faktoru již 24 hodin po ukončení podávání neupogenu (tab. 4, graf 2a, 5a). Dále jsme však pozorovali pokles progenitorvých buněk a buněk CD34 již 5. a 10. den a postupnou normalizaci jejich počtu v periferní krvi (graf 2a, 5a). Podáváním GM-CSF docházelo k postupnému zvyšování počtu progenitorových buněk CFU-GM, BFU-E a buněk CD34, které přetrvávalo ještě 10. den po ukončení podávání leucomaxu (graf 2b, 5b). Z uvedených výsledků je patrné, že efekt neupogenu je největší především 24 hodin po ukončení jeho podávání, kdežto efekt leucomaxu je postupný s maximem okolo 10. dne po ukončení jeho podávání. Pro iatrogenní neutropenii jsme neprokázali jednoznačně lepší terapeutický efekt neupogenu nebo leucomaxu v námi používaném dávkovém rozmezí (tab. 1).

Neupogen jsme podávali u 10 nemocných s Hodgkinovým lymfomem a leucomax u 8 nemocných v období iatrogenní neutropenie po cytostatické léčbě (tab. 2, 5). Statisticky významný vzestup počtu progenitorových buněk CFU-GM a buněk CD34 ve srovnání před podáním těchto růstových faktorů jsme zaznamenali 24 hodin a 5. den po ukončení podávání G-CSF a GM-CSF (tab. 5, graf 3a, 3b, 5a, 5b). Normalizace počtu progenitorových buněk a buněk CD34 v periferní krvi byla zjištěna již 5. den po ukončení podávání růstových faktorů (graf 3a, 3b, 5a, 5b). Neprokázali jsme významný efekt G-CSF a GM-CSF na

Tabulka 3

Akutní lymfatická leukémie

G-CSF (Neupogen)											
Kultivace progenitorových buněk z periferní krve											
CFU-GEMM				CFU-GM				BFU-E			
Kolonie (x.10^5 jaderných buněk)											
před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den
					(***)	(***)					
0,00	0,06	0,11	0,19	0,07	1,93	2,07	3,01	2,78	4,00	6,12	9,03
	± 0,02	± 0,03	± 0,07	± 0,07	± 0,34	± 0,12	± 1,22	± 1,00	± 2,11	± 2,45	± 4,15

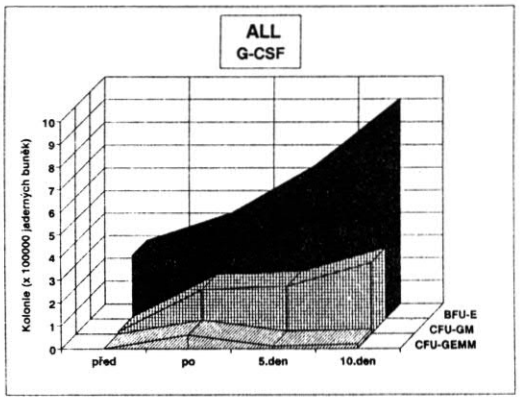
CD34 - periferní krev (%)			
před	po	5. den	10. den
	(***)	(***)	
0,06	1,07	6,45	9,21
± 0,02	± 0,14	± 0,92	± 1,17

(***) - $p < 0,001$

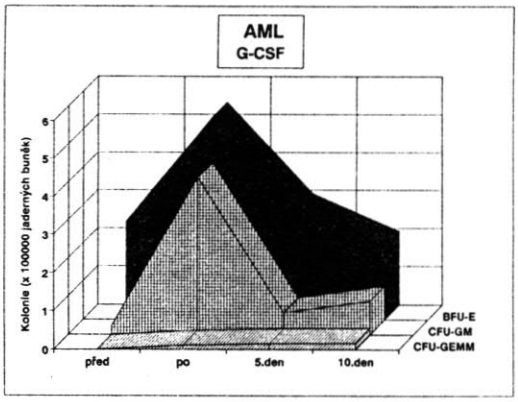
CFU-GEMM (graf 3a, 3b). Také jsme neprokázali rozdílný terapeutický efekt neupogenu nebo leucomaxu.

Leucomax jsme podávali u 13 nemocných a neupogen u 3 nemocných se solidním tumorem v období iatrogenní neutropenie po cytostatické léčbě (tab. 2, 6). Statisticky významný vzestup počtu progenitorových buněk CFU-GM a buněk CD34 ve srovnání před zahájením podávání růstových faktorů jsme zaznamenali 24 hodin a 5. den po ukončení podávání G-CSF a GM-CSF (tab. 6, graf 4a, 4b, 5a, 5b). U leucomaxu jsme pozorovali také statisticky významný vzestup progenitorových buněk BFU-E, a to 5. den po ukončení podávání tohoto růstového faktoru (graf 4b). Další vzestup počtu kolonií BFU-E jsme již nepozorovali. Z uvedených výsledků však nemůžeme jednoznačně říci, zda tento vzestup počtu BFU-E byl dán nastupující reparací hematopoézy, nebo v důsledku působení GM-CSF. U G-CSF a GM-CSF jsme neprokázali významný efekt na CFU-GEMM (graf 4a, 4b).

Některé nejasné výsledky získané při kultivaci progenitorových buněk (především BFU-E) a monoklonální fenotypizaci povrchového antigenu CD34 u nemocných s ALL, AML, morbus Hodgkin a solidními tumory nás opravňují k diskusi, zda G-CSF a GM-CSF u některých onemocnění (především morbus Hodgkin a solidní tumory) nepůsobí také na erytropoézu. Při další analýze jsme však neprokázali statisticky významný vzestup počtu kolonií BFU-E v periferní krvi 20. a 30. den po ukončení podávání růstového faktoru.



Graf 1



Graf 2a

Tabulka 4

Akutní myeloidní leukémie

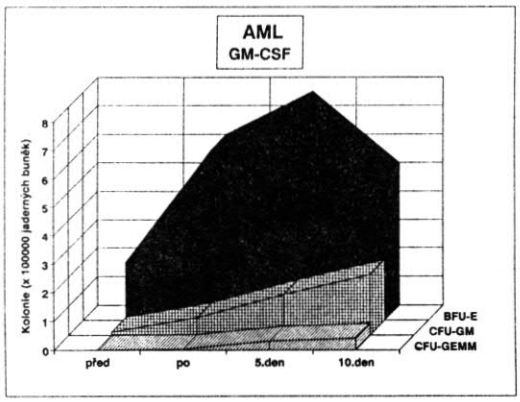
G-CSF (Neupogen)											
Kultivace progenitorových buněk z periferní krve											
CFU-GEMM				CFU-GM				BFU-E			
Kolonie (x.10^5 jaderných buněk)											
před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den
					(* * *)						
0,00	0,01	0,14	0,16	0,21	4,11	0,56	0,87	2,55	5,32	2,90	1,93
	± 0,01	± 0,09	± 0,07	± 0,09	± 0,14	± 0,12	± 0,22	± 1,02	± 1,11	± 0,45	± 0,15

GM-CSF (Leucomax)											
CFU-GEMM				CFU-GM				BFU-E			
							(* * *)				
0,00	0,03	0,30	0,40	0,10	0,60	1,40	2,10	2,00	6,00	7,50	5,00
	± 0,01	± 0,18	± 0,20	± 0,05	± 0,30	± 0,30	± 0,20	± 1,00	± 1,60	± 2,00	± 0,60

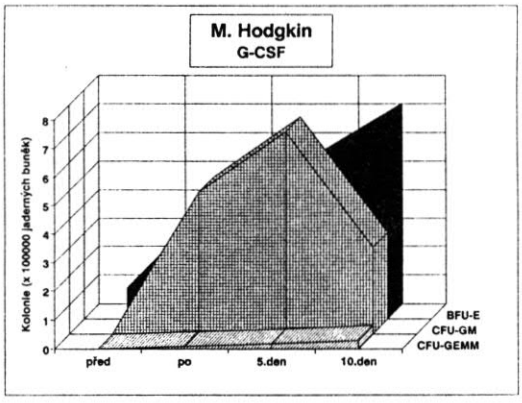
G-CSF (Neupogen)			
CD34 - periferní krev (%)			
před	po	5. den	10. den
	(* * *)		
0,00	6,27	3,34	1,37
	± 2,04	± 1,44	± 0,56

GM-CSF (Leucomax)			
	(* * *)	(* * *)	(* * *)
0,00	3,20	6,70	10,05
	± 1,00	± 1,60	± 1,70

(* * *) - $p < 0,001$



Graf 2b



Graf 3a

Tabulka 5

M. Hodgkin

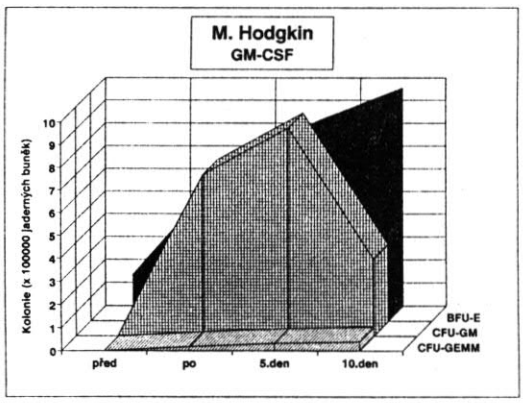
G-CSF (Neupogen)											
Kultivace progenitorových buněk z periferní krve											
CFU-GEMM				CFU-GM				BFU-E			
Kolonie (x.10^5 jaderných buněk)											
před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den
					(***)	(***)					
0,00	0,09	0,17	0,29	0,01	4,98	7,07	3,01	1,08	4,11	5,22	7,03
	± 0,07	± 0,09	± 0,11	± 0,01	± 1,13	± 4,12	± 0,20	± 0,66	± 0,45	± 3,05	± 1,15

GM-CSF (Leucomax)											
CFU- GEMM				CFU-GM				BFU-E			
					(***)	(***)					
0,00	0,17	0,31	0,39	0,05	7,06	9,11	3,32	2,00	6,16	8,09	9,55
	± 0,08	± 0,20	± 0,17	± 0,02	± 2,77	± 2,45	± 0,78	± 1,07	± 3,01	± 3,18	± 3,15

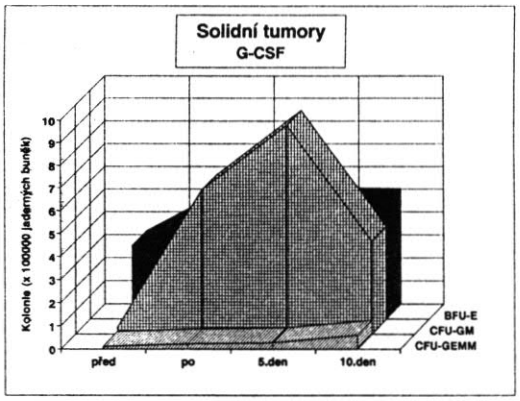
G-CSF (Neupogen)			
CD34 - periferní krev (%)			
před	po	5. den	10. den
	(***)	(***)	
0,06	3,00	6,05	4,01
± 0,02	± 0,54	± 1,12	± 1,67

GM-CSF (Leucomax)			
	(***)	(***)	
0,00	7,11	4,05	3,01
	± 2,14	± 1,10	± 0,87

(***) - p < 0,001



Graf 3b



Graf 4a

Tabulka 6

Solidní tumory

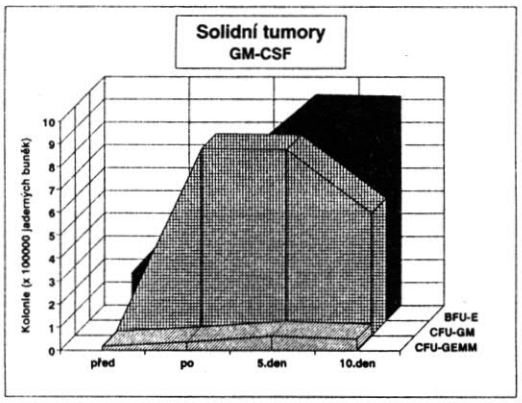
G-CSF (Neupogen)											
Kultivace progenitorových buněk z periferní krve											
CFU-GEMM				CFU-GM				BFU-E			
Kolonie (x.10^5 jaderných buněk)											
před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den	před	po	5. den	10. den
					(***)	(***)					
0,10	0,21	0,27	0,59	0,30	6,28	9,13	4,01	3,18	5,11	5,07	5,03
± 0,06	± 0,10	± 0,19	± 0,26	± 0,10	± 2,43	± 2,12	± 1,02	± 0,26	± 0,55	± 3,35	± 2,85

GM-CSF (Leucomax)											
CFU- GEMM				CFU-GM				BFU-E			
					(***)	(***)					
0,17	0,37	0,61	0,49	0,22	8,14	8,11	5,32	2,06	6,06	9,23	9,15
± 0,10	± 0,18	± 0,30	± 0,17	± 0,15	± 3,27	± 2,05	± 0,58	± 1,00	± 1,01	± 3,44	± 3,65

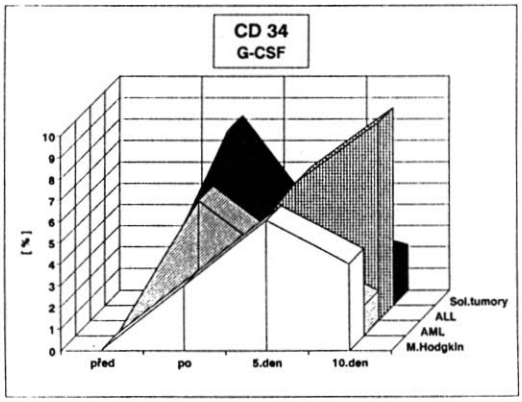
G-CSF (Neupogen)			
CD34 - periferní krev (%)			
před	po	5. den	10. den
	(***)		
0,03	8,17	3,15	2,01
± 0,03	± 3,17	± 0,78	± 0,69

GM-CSF (Leucomax)			
	(***)	(***)	
0,00	12,04	9,35	8,22
	± 4,74	± 3,12	± 3,08

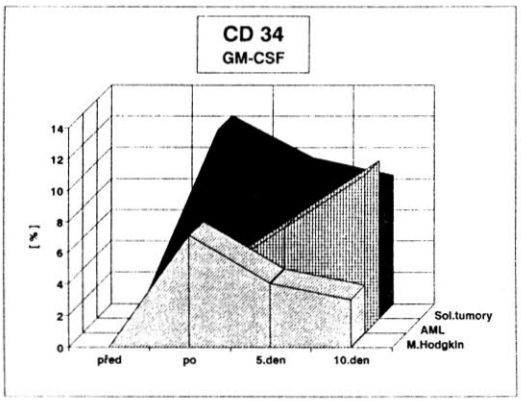
(***) - $p < 0,001$



Graf 4b



Graf 5a



Graf 5b

Diskuse

Existence stimulátorů a inhibitorů proliferace, diferenciace a maturace hemopoetických buněk byla předpokládána již před půl stoletím. Rozvoj technik kultivace hemopoetických buněk in vitro a monoklonální fenotypizace buněk umožnil bližší poznání patofyziologie krvetvorby a identifikaci některých růstových faktorů (15, 18).

Hemopoetické růstové faktory se i přes krátkou dobu jejich používání v klinické praxi staly pro některé situace nepostradatelnou součástí léčby. Výsledky publikované v dostupné literatuře vyvolaly náš zájem o prověření a zavedení hemopoetických růstových faktorů do léčebného postupu v našich klinických podmínkách. V současné době nám byly komerčně dostupné tři faktory: granulocyte-colony-stimulating factor, G-CSF (Neupogen, Hoffman la Roche), granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor, GM-CSF (Leucomax, Sandoz/Schering-Plough) a erytropoetin EPO (Eprex Cilag).

Nejpoužívanější jsou hemopoetické růstové faktory v léčbě dřeňového útlumu po agresivní cytostatické léčbě. Myelotoxicita velmi často limituje účinnou chemoterapii, v důsledku čehož dochází buď ke snižování dávek cytostatik, nebo k prodloužení intervalu mezi jednotlivými cykly chemoterapie. Obojí má za následek nedostatečnou protinádorovou účinnost léčby (8, 14, 18).

Počáteční klinické studie byly zaměřeny na mechanismus působení jak G-CSF, tak GM-CSF (9, 10, 19, 24). U nemocných bez předchozí chemoterapie nastává vzestup leukocytů již druhý den, maximálního počtu bývá dosaženo až 4. dne při pravidelné denní aplikaci. Nástup úpravy po chemoterapii může být pozdější. Výsledné množství leukocytů závisí na dávce hemopoetického růstového faktoru až do vyčerpání hemopoetických buněk v cirkulačním a marginálním poolu. Další zvyšování dávky hemopoetického růstového faktoru potom vede jen k větším projevům jeho toxicity (14, 18). GM-CSF působí na vývojově mladší buňku než G-CSF, takže po jeho aplikaci dochází i ke zmnožení eosinofilů a monocytů (16, 21). V periferní krvi i kostní dřeni se zvyšuje po jejich aplikaci počet pluripotentních a unipotentních kmenových buněk (7, 12, 14, 17, 22, 23). Do této doby byla provedena řada studií s použitím G-CSF a GM-CSF u maligních lymfomů, při terapii nádorů plic, močových cest, mammy, ovaria, kolorektálního karcinomu, myelomu a dalších (1, 14, 17, 18).

Používání hemopoetických růstových faktorů vede u nemocných po cytostatické léčbě k významně rychlejší reparaci kostní dřeně, doplňovaní marginálního a cirkulačního poolu kmenových buněk. Při monitorování nemocných sledovaných v období po cytostatické léčbě s hematologickými malignitami jsme prokázali velmi dobrý efekt růstových faktorů jak na krvetvorbu, tak také na snížení četnosti sekundárních infekčních komplikací. V naší studii jsme vycházeli z doporučovaných dávkových schémat pro G-CSF a GM-CSF, která byla dána protokolem pro klinické použití těchto růstových faktorů.

Monitorováním pomocí klonální kultivace a monoklonální fenotypizace buněk jsme doplnili chybějící část laboratorního ověřování účinků hemopoetických růstových faktorů. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky jiných autorů (1, 14). Přínosem je nový pohled na účinek G-CSF a GM-CSF ve smyslu ovlivnění krvetvorby. Pokusili jsme se najít odpověď na několik otázek, které souvisejí s proliferací, diferenciací a maturací hemopoetických buněk. Nepodařilo se nám jednoznačně určit, který z dvojice růstových faktorů (G-CSF a GM-CSF) je pro námi sledované nemocné vhodnější. Dalším problémem, který je nutno respektovat, je podstata onemocnění, a to ve smyslu klonální, či neklonální poruchy. U nemocných s klonální poruchou je aktivita a účinek růstového faktoru podstatně jiný než u nemocných, kteří tuto klonální poruchu nemají. Celá řada prací poukazuje na možnou stimulaci, např. leukemického klonu buněk po podání hemopoetických růstových faktorů (2, 4, 6, 13, 20). V našem souboru nemocných jsme u jednoho nemocného pozorovali po podání G-CSF, že došlo k akceleraci akutní leukémie. Naopak u nemocných s neklonální poruchou krvetvorby dochází k daleko rychlejší reparaci krvetvorby a nebyl zatím popsán případ transformace neklonální poruchy na klonální poruchu po podání růstového faktoru. V současné době není také jednotný názor na opakované používání růstových faktorů u nemocných, kde chceme zachovat léčebný protokol cytostatické léčby. Zde se jedná především o problém ovlivnění distribuce kmenových buněk v cirkulačním poolu a následovnému snižování aktivity proliferačního a maturačního poolu kmenových buněk v kostní dřeni. Zvyšování dávky růstového faktoru vede paradoxně k prohlubování leukopenie a snížení cirkulace kmenových buněk v periferní krvi. V naší studii jsme zaznamenali tuto situaci u dvou nemocných s akutní myeloidní leukémií (8).

Hemopoetické růstové faktory a jejich klinické použití znamená v hematologii nesporně krok dopředu, ale jak víme podle zkušeností s jinými revolučními léky, i zde je zapotřebí zvažovat jejich podávání. Indikace k podání růstového faktoru má být jasná. K této úvaze nás přivádí především skutečnost, že dávky růstových faktorů, které používáme, představují stonásobek až tisícinásobek jejich hladiny v organismu. Snad nejzávažnějším problémem je to, že nevíme, jak objektivně určit zbytkovou reparační schopnost organismu, a tudíž nevíme, do jaké míry byly hemopoetické růstové faktory úspěšné. Při monitorování účinku však můžeme zprostředkovaně sledovat nástup a kvalitu reparace. V současné době ještě nedokážeme dobře postihnout distribuci kmenových buněk v organismu, ale můžeme určit buňky, které jsou nositeli proliferační a maturační aktivity. Pro celkový pohled na taktiku léčby je tento aspekt rozhodující.

Ze všech těchto úvah je jasné, že popis účinku růstových faktorů není lehký, navíc když uvážíme, že svoji roli zde hrají také inhibiční a modulační faktory krvetvorby. Před námi je celá řada nejasností a otázek. Důležité však je, že pomocí růstových faktorů můžeme významně zkrátit období iatrogenní neutropenie a tím významně snížit riziko sekundárních infekčních komplikací. Dále můžeme významně urychlit reparaci cytostatiky a zářením poškozené kostní dřeně, i když celou řadu dějů, které se při tom uplatňují, zatím neznáme nebo je jenom tušíme.

Závěr

Indikací pro použití G-CSF a GM-CSF bylo především období iatrogenní neutropenie. U sledovaných nemocných, které jsme léčili růstovými faktory po chemoterapii, jsme zaznamenali úpravu počtu progenitorových buněk a CD34 pozitivních buněk v periferní krvi v průběhu týdne, neměli v té době závažné infekční komplikace a mohla být dodržena další cytostatická léčba. U jednoho nemocného s akutní myeloidní leukémií jsme po podání G-CSF zaznamenali akceleraci základního onemocnění. Víme, že akutní myeloidní leukémie představuje prognosticky závažné onemocnění a indukční léčbu velmi často limituje a komplikuje nežádoucí délka a tíže myelosuprese, infekční komplikace, rezistence leukemických buněk na chemoterapii a u starších nemocných navíc i zhoršená snášenlivost ze strany ostatních tkání a orgánů, které bývají často postiženy i jiným základním onemocněním. Proto i vzhledem k tomuto nálezu si myslíme, že růstové faktory by měly být používány i v případě zvýšeného rizika aktivace leukemického klonu. Navíc v současné době je známo, že růstové faktory mohou také významně ovlivnit citlivost leukemických buněk na cytostatika. Studie, které využívají vlastnosti růstových faktorů ve vhodné kombinaci s cytostatickou léčbou ukazují, že růstové faktory působí návrat klidových klonogenních leukemických buněk do buněčného cyklu, a podá-li se následně účinné cytostatikum, je pak podstatně účinnější. Kombinace růstového faktoru a cytostatika však vyžaduje optimální časovou návaznost.

U nemocných s ALL, morbus Hodgkin a solidními tumory podáváním G-CSF a GM-CSF došlo k vzestupu leukocytů, vzestup hemoglobinu a trombocytů jsme neprokázali jako důsledek přímého účinku růstových faktorů. Monitorováním počtu progenitorových buněk a zastoupení CD34 pozitivních buněk v periferní krvi jsme prokázali významný efekt na proliferaci a maturaci hemopoetických buněk. U nemocných s ALL jsme neprokázali po podání růstového faktoru akceleraci onemocnění.

U sledovaných nemocných nám podávání růstového faktoru umožnilo intenzifikovat cytostatickou léčbu u 83 %. Sekundární komplikace v průběhu podávání růstového faktoru jsme zaznamenali pouze u jednoho nemocného s AML a u dvou nemocných s ALL.

Reparace krvetvorby po cytostatické léčbě byla zaznamenána již 5. den podávání růstového faktoru u 87,5 % nemocných.

V naší studii jsme nezjistili zásadní rozdíl mezi G-CSF a GM-CSF v účinku na reparaci krvetvorby.

Souhrn

Podávání hemopoetických růstových faktorů u hematologických a onkologických nemocných umožňuje především zintenzívnit cytostatickou léčbu. G-CSF a GM-CSF významně snižují období trvání neutropenie, přispívají k rychlejší reparaci kostní dřeně a v důsledku toho dochází k minimalizaci sekundárních komplikací po cytostatické léčbě.

Problém reparace kostní dřeně nás vedl k vypracování protokolu monitorování, kde sledujeme růst kolonií progenitorových buněk (CFU-GEMM, CFU-GM a BFU-E) in vitro a zastoupení CD34 pozitivních buněk cirkulujících v periferní krvi. Podávání růstového faktoru bylo zahajováno při poklesu leukocytů na $1.10^9.l^{-1}$ celkem u 65 nemocných. Růstový faktor byl podáván vždy s. c. Monitorování jsme zahajovali vstupním vyšetřením před podáním G-CSF nebo GM-CSF, potom 24 hodin po ukončení podávání, dále 5. a 10. den po ukončení podávání růstového faktoru.

U sledovaných nemocných nám podávání růstového faktoru umožnilo intenzifikovat cytostatickou léčbu u 83 % nemocných.

Sekundární komplikace v průběhu podávání růstového faktoru jsme zazanamenali pouze u jednoho nemocného s AML a u dvou nemocných s ALL.

Reparace krvetvorby po cytostatické léčbě byla zaznamenána již 5. den podávání růstového faktoru u 87,5 % nemocných.

V naší studii jsme nezjistili zásadní rozdíl mezi G-CSF a GM-CSF v účinku na reparaci krvetvorby.

Literatura

1. ADAM, Z. - SYSLOVÁ, D. - VORLÍČEK, J.: Přínos leukocytárních růstových faktorů pro onkologicky nemocné. Vnitř. Lék., 39, 1993, č. 9, s. 876-881.
2. AGLIETTA, M. et al.: In vivo effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the kinetics of human acute myeloid leukemia cells. Leukemia, 5, 1991, č. 11, s. 979-984.
3. ANDREEF, M. - WELTE, K.: Hematopoietic colony-stimulating factors. Semin. Oncol., 16, 1989, č.3, s. 211-229.
4. BHALLA, K. et al.: The effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) on 3 -azido-3 - deoxythymidine (AZT)-mediated biochemical and cytotoxic effects on normal human myeloid progenitor cells. Exp. Hematol., 17, 1989, č.1, s. 17-20.
5. BOT, F. J. et al.: Synergic effects betwen GM-CSF and G-CSF or M-CSF on highly enriched human marrow progenitor cells. Leukemia, 4, 1990, č. 5, s. 325-328.
6. BUCHNER, W. et al.: Recombinant human GM-CSF following chemotherapy in high-risk AML. Bone Marrow Transplant., 6, 1990, s. 131-134.
7. De WITTE, T. et al.:Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in bone marrov transplantation (BMT).In: Scarffe, J. H.: Breakthrough in cytokinine therapy: an overview of GM-CSF. Oxford, Alden Press 1991, s. 45-54.
8. FILIP, S. - VÁVROVÁ, J. - JEBAVÝ, L. - BLÁHA, M.: Hemopoetické růstové faktory. Voj. Zdrav. Listy, 61, 1992, č. 1/2, s. 100-108.
9. GABRILOVE, J. L. JAKUBOWSKI, A.: Granulocyte colony-stimulating factor: Preclinical and clinical studies. Hematol. Oncol. Clin. North Amer., 3, 1989, č.3, s. 427-440.
10. GABRILOVE, J. L.: ntroduction and ovreview of hematopoietic growth factors. Semin. Hematol., 26, 1989, suppl. 2, s. 1-4.
11. Genzyme catalog: Cytokine Research Products. American Academy of Arts and Sciences, 1991, s. 5-153.
12. GERHARTZ, H. H. et al: Treatment of neutropenia in patients undergoing cancer chemotherapy. In: Gorin, N. C.: Molgramostim GM-CSF: possibilities and perspectives. Oxford, Alden Press 1992, s. 27-41.
13. KELLEHER, C. et al.: Synergism between recombinant growth factors, GM-CSF and G-CSF, acting on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. Blood, 69, 1987, č. 5, s. 1498-1503.
14. LAVER, J. - MOORE, M. A. S.: Clinical use of recombinant human hematopoietic growth factors. J. Natl. Cancer Inst., 81, 1989, č. 10, s. 1370-1382.
15. LECHNER, K. et al.: Haematology Trends 93. Schattauer, Stuttgart-New York 1993, s. 331.
16. LIESCHKE, G. J. - BURGESS, A. W.: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. (First of two parts). N. Engl. J. Med., 327, 1992 (July 2), s. 28 - 35.
17. LIESCHKE, G. J. - BURGESS, A. W.: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. (Second of two parts). N. Engl. J. Med., 327, 1992, (July 9), s. 99-106.
18. MOORE, M. A. S.: Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. Blood, 78, 1991, s. 1-19.
19. MORSTYN, G. et al.: Early clinical trials with colony-stimulating factor. Cancer Invest., 7, 1989, č. 5, s. 443-456.
20. POTHIER, O. N. et al.: IL-3 inhibits the binding of GM-CSF to AML blasts, but the two cytokines act synergistically in supporting blast proliferation. Leukemia, 4, 1990, s. 329-336.
21. SCARFFE, J. H.: Emerging clinical uses for GM-CSF. Eur. J. Cancer, 27, 1991, č. 11, s. 1493-1504.
22. SHERIDAN, W. P.: The role of colony-stimulating factors in bone marrow transplantation. Cancer Invest., 9, 1991, č. 2, s. 221-228.
23. SHERIDAN, W. P. et al.: Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy.Lancet, 339, 1992, March 14, s. 640-644.
24. THOMSON, A. W. et al.: The cytokine handbook. London, Academic Press 1991. 419 s.
25. TUBIANA, M: Inhibitors of hemopoiesis: The accomplishments and the prospects. Inhib. of Hematopoiesis, A. Najman, Inserna, 162, 1987, s. 351-354.
26. ZSEBO, K. M. et al.: Stem cell factor is encoded at the SI locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. Cell, 63, 1990, č. 1, s. 213-224.
27. ZSEBO, K. M. et al.: Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. Cell, 63, 1990, č. 1, s. 195-201.

Klíčová slova: Hemopoetické růstové faktory; Léčba; ALL - AML; Maligní lymfomy; Solidní tumory; Progenitorové buňky; CD34.

Do redakce došlo 18. 8. 1994