

OBNOVNÉ BUNĚČNÉ POPULACE

Hierarchická struktura vývoje tkání

- kožní epitel
- střevní epitel
- krevetvorné systémy
- zárodečné populace

KMENOVÉ PLEOPOTENTNÍ BUŇKY? (v kostní dřeni – potenciál vytvářet různé buněčné typy)

KMENOVÉ MULTIPOTENTNÍ BUŇKY (schopné sebeobnovy, zásoba ve tkáních)

PROGENITOROVÉ BUŇKY (transit-amplifying, více diferencované, částečně schopné dělení)

ZRALÉ TERMINÁLNĚ DIFERENCOVANÉ BUŇKY (nedělící se klidové buňky, v G_0 fázi, umírají apoptózou)

Je nutné, aby byla dodržována přísná rovnováha počtu a typů buněk v jednotlivých kompartmentech.

Rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou (mezibuněčné interakce, stimulační a inhibiční signály, diferenciační faktory, viabilitní faktory atd.)

Linie kmenových buněk v dospělé tkáni a normální obnova tkáni

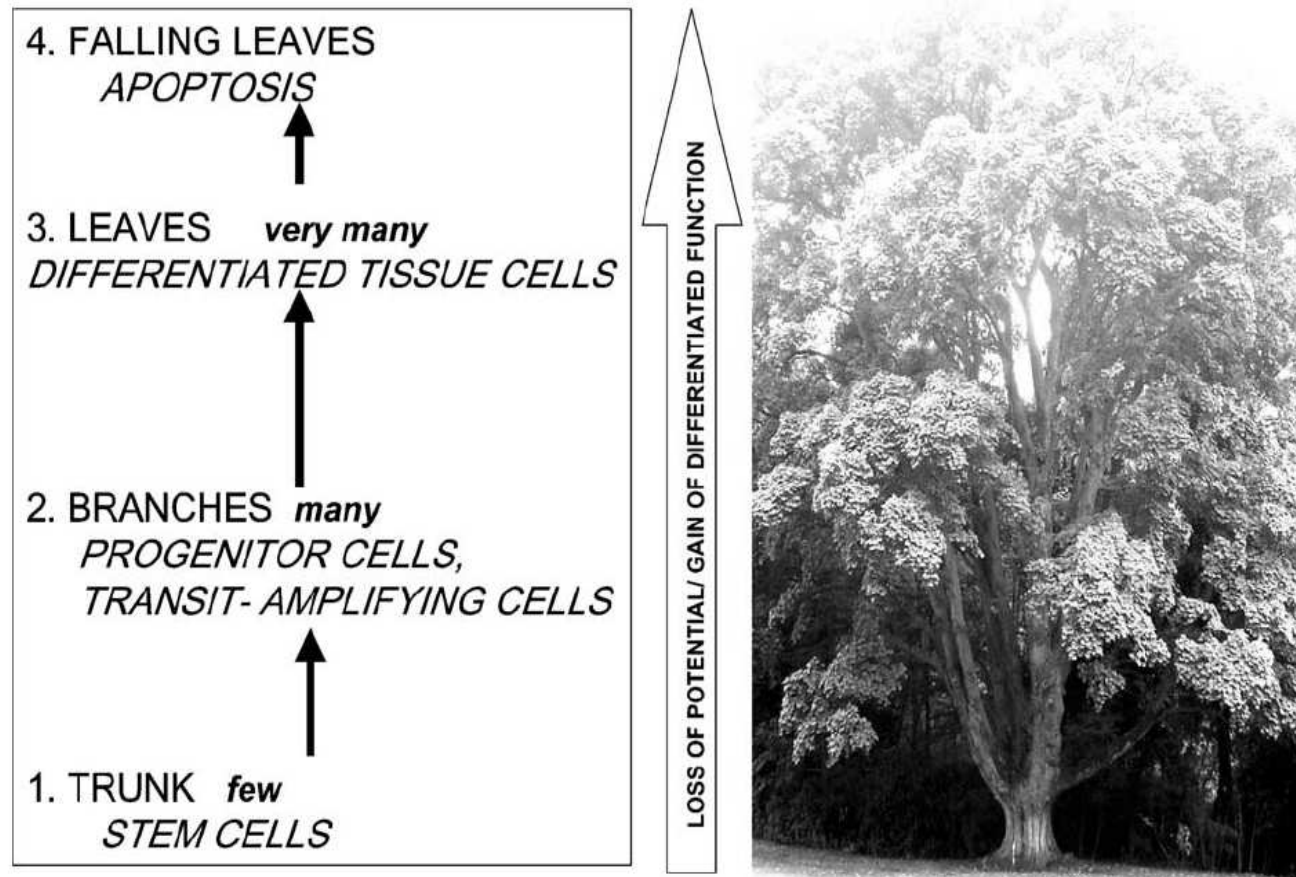


Fig. 1. Stem cell lineages in adult tissues and normal tissue renewal. In analogy to the structure of a tree with a very small trunk, normal tissue stem cells represent a very small proportion of the tissue cells and do not normally proliferate. The differentiating progeny of the tissue-determined stem cells is represented by the branches, which represent lineages of cells eventually giving rise to the terminally differentiated functional parenchymal cells, represented by the leaves. For deciduous trees, loss of the leaves at the end of the year (falling off or apoptosis) occurs in cycles, whereas in animal tissues there is a continuous production and loss of cells. Cancer results when the rate of proliferation increases and the rate of cell loss remains the same or when the rate of proliferation stays the same and/or the rate of loss decreases.

Definice kmenové buňky

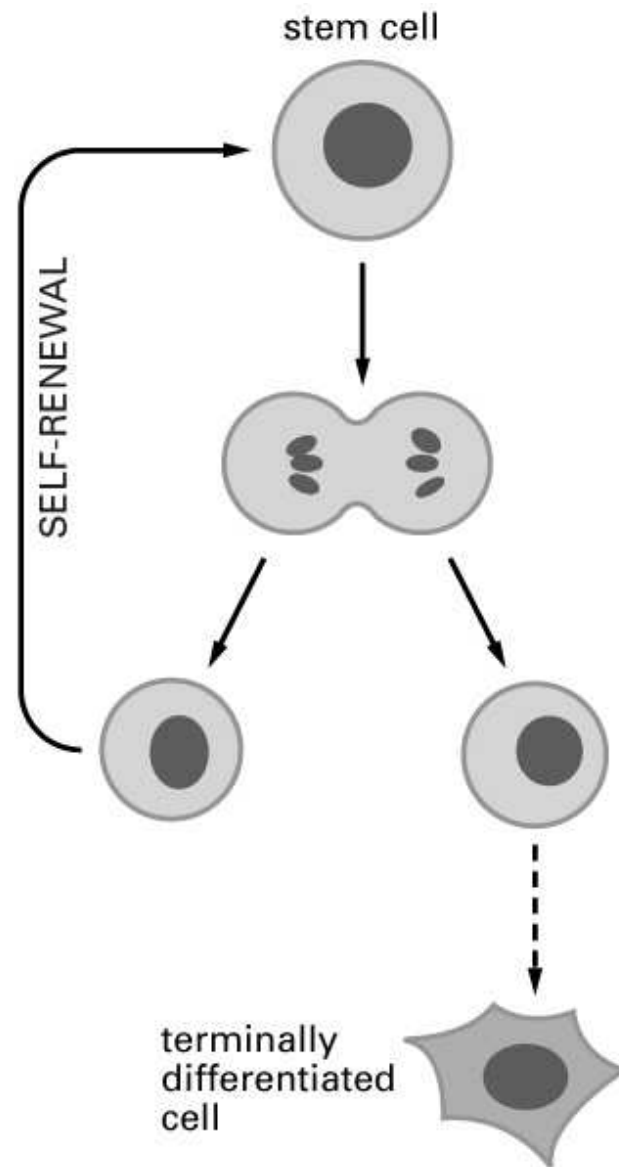


Figure 22-4. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

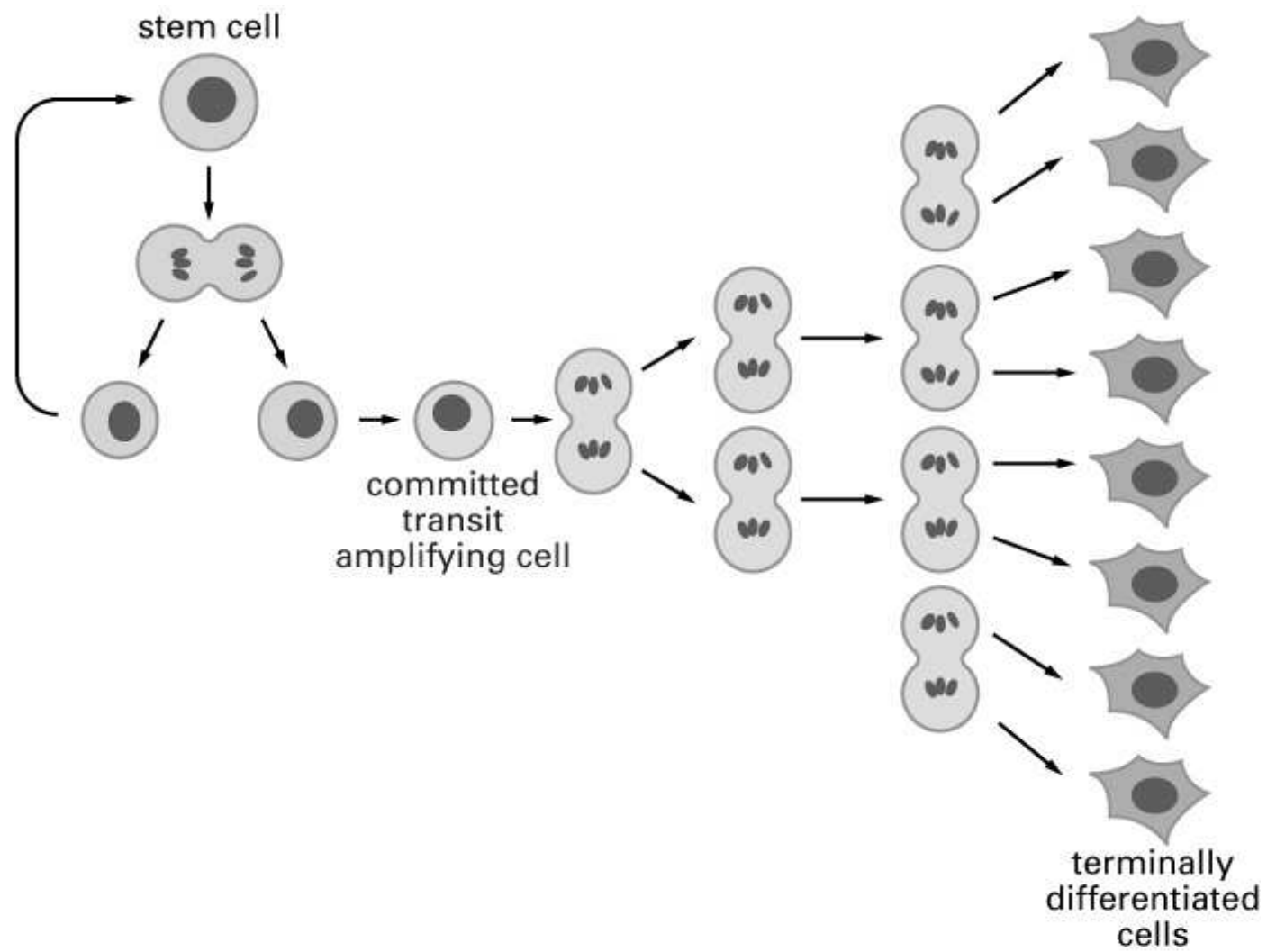
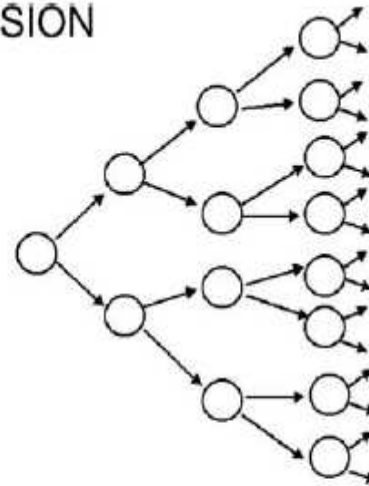


Figure 22-7. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

SYMETRICKÉ A ASYMETRICKÉ DĚLENÍ

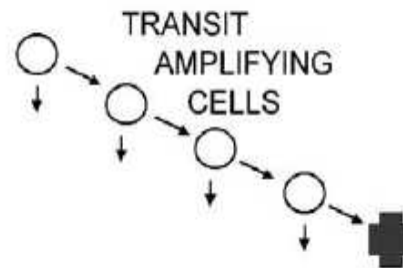
SYMMETRIC DIVISION



EMBRYONAL
STEM CELLS

LOGARITHMIC
EXPANSION

ASYMMETRIC
DIVISION



TRANSIT
AMPLIFYING
CELLS

GERMINAL AND
SOMATIC
STEM CELLS

LINEAR EXPANSION

Fig. 2. Symmetric and asymmetric division. When cells divide symmetrically, each daughter cell is identical and retains the potential of the parental cell. When cells divide asymmetrically, one of the daughter cells remains a stem cell, whereas the other begins the process of determination [310,311]. In adult tissues, the progeny of the tissue stem cells undergoing differentiation (determination) retain the capacity to proliferate (transit-amplifying cells) and comprise the major source of cells for normal tissue renewal.

Předpokládaná diferenciací dráha kmenové buňky kostní dřeně

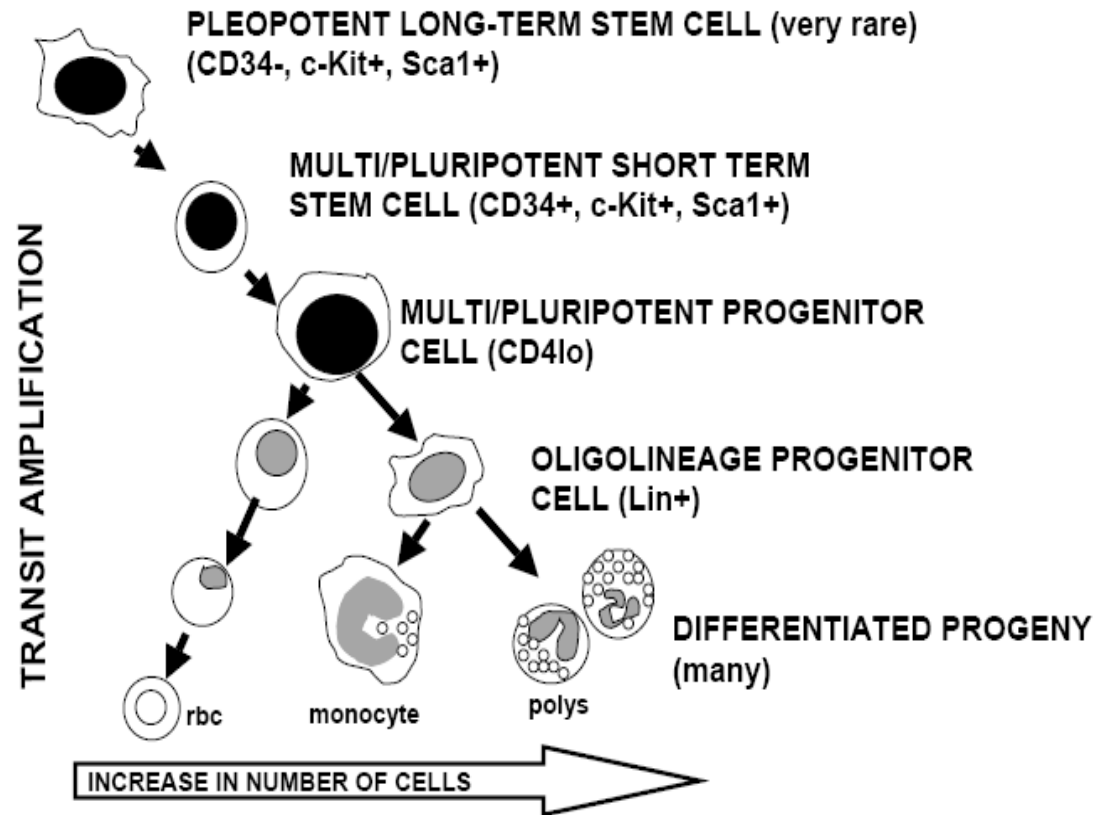


Fig. 9. Hematopoietic Cell Lineage. Suggested differentiation pathway of bone marrow stem cells in the hematopoietic pathway. The multi/pluripotent stem cell is a reserve stem cell and normally proliferates very rarely. The expansion of the cell lineage is accomplished by transit amplifying cells that expand into nine different cell lineages. The number of multi/pluripotent stem cells may be very low, whereas the number of various differentiated cell types is very high.

Multi/pluripotentní nejprimitivnější hematop. Buňka je klidová kmenová buňka reagující na stres. Z ní vzniká většina proliferujících buněk v kostní dřeni (progenitory) →

Zralé dif. buňky – erytrocyty (rbc) – bez jádra, polymorfonukleární b. – inaktivované jádro

Normální a narušená kontrola produkce z kmenové buňky

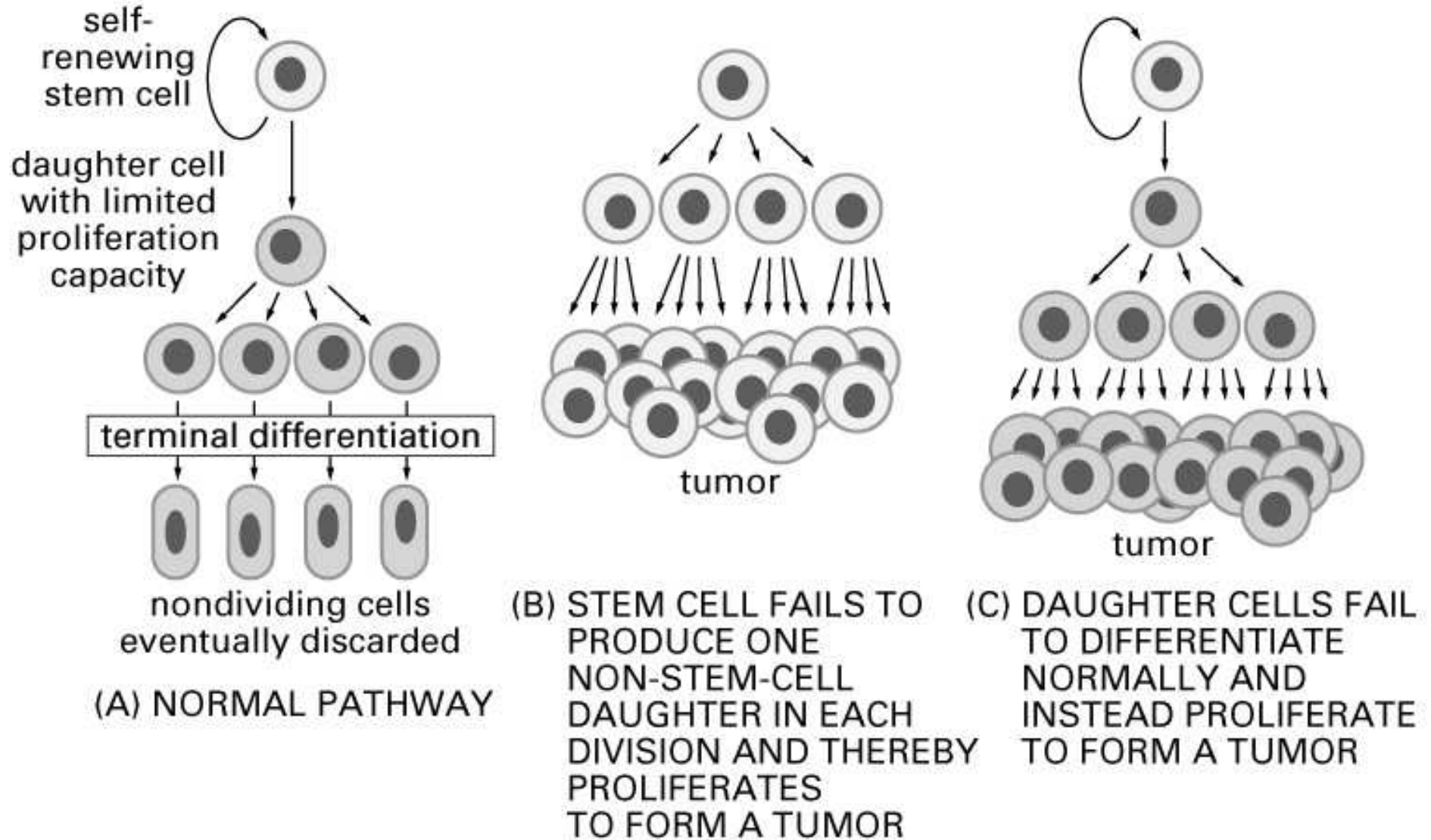
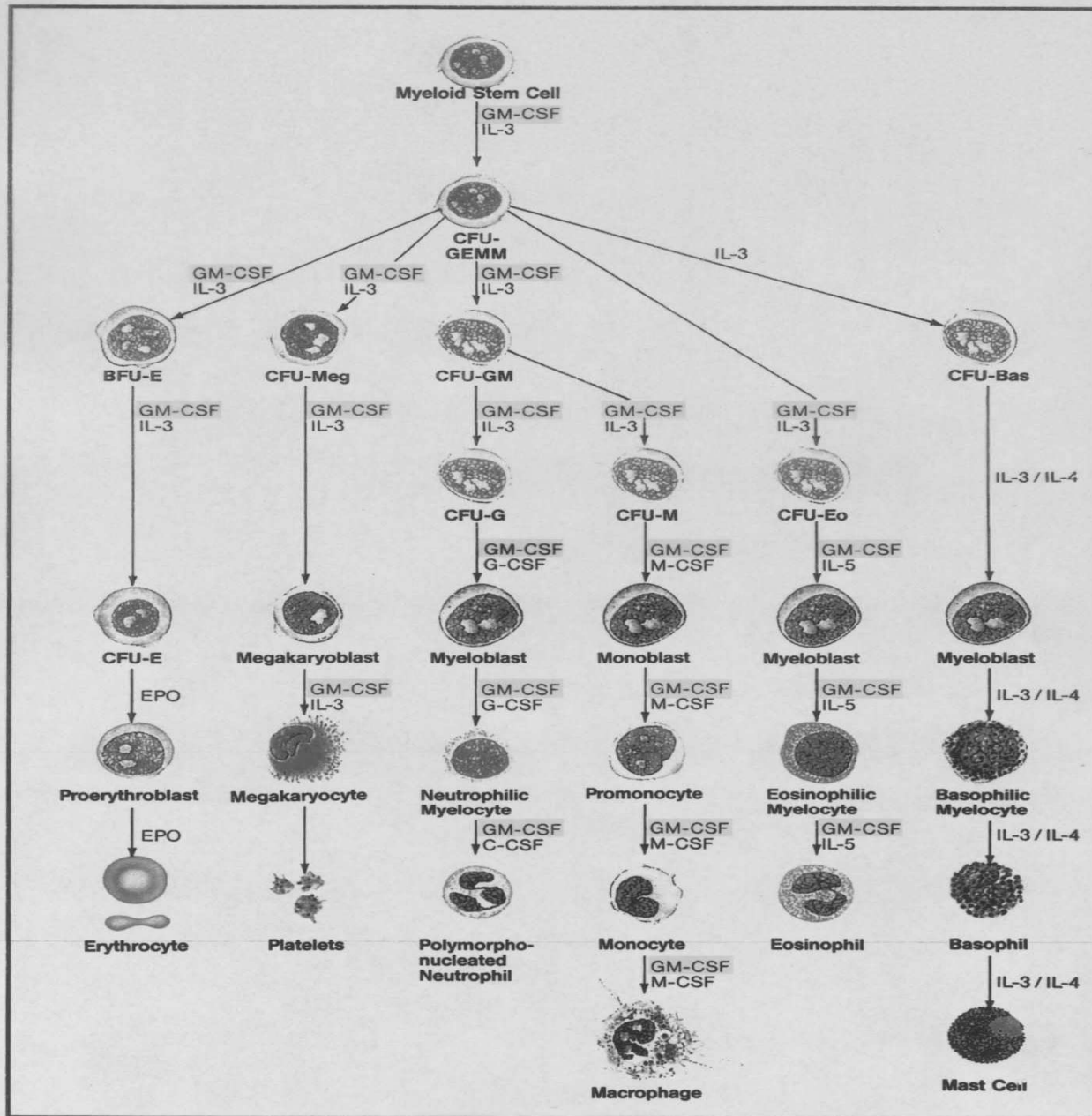


Figure 23–14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

The early acting growth factor which maximises host defense



Změny v počtu buněk je třeba interpretovat jako změny buněčné kinetiky – sledování změn v čase.

Tvorba terminálně diferencovaných buněk z časných buněčných prekurzorů – 4-8 dnů (3-6 mitotických dělení)

Setrvání v periferní krvi – 10 h (neutrofilní leukocyty), 10 dnů (trombocyty), více než 100 dnů (erytrocyty).

Schopnost produkce kmenových buněk – každý den vzniká asi 3×10^{11} funkčních buněk – může se zvýšit až 10x.

Anemie - snížená produkce erytrocytů

Polycytemie – zvýšená produkce erytrocytů

Kvantitativní poruchy se mohou týkat různých úrovní diferenciací erytrocytů

Trombocytopenie a trombocytémie – poruchy produkce trombocytů jsou následkem poruchy tvorby nebo ploidie megakaryocytů

Neutropenie – poruchy granulocytárního systému. Periferní neutropenie mohou být způsobeny zrychleným odbouráváním buněk, poruchou v jejich produkci nebo změnou jejich distribuce.

Neutrofilní leukocytózy – podmíněny nadprodukcí nebo přesunem mezi kompartmenty (CML – příklad klonálně podmíněné leukocytózy).

Lymfopenie a lymfocytózy – poruchy lymfocytů (CLL).

Pancytopenie – kvantitativní porucha několika bun. systémů

Aplastická anemie – snížení hemopoetických buněk v kostní dřeni

Vytvoření kultivačních systémů pro klonální vývoj hemopoetických buněk umožnilo odhalit proteiny, které regulují buněčnou viabilitu, růst a diferenciaci různých hemopoetických linií a také odhalovat molekulární základy normálního a abnormálního vývoje krvetvorných tkání.

Tyto regulátory zahrnují cytokiny zvané faktory stimulující růst kolonií (CSF) a interleukiny. Různé cytokiny indukují viabilitu, množení a diferenciaci a hemopoéza je kontrolována sítí interakcí cytokinů.

Tato multigenová síť zahrnuje pozitivní regulátory jako jsou CSF a IL a negativní regulátory jako TGF beta a TNF-alfa.

Síť cytokinů, která vznikla během evoluce umožňuje značnou flexibilitu závisující na tom, která část sítě je aktivována a na okamžitém zesílení odpovědi na příslušný stimul.

CSF a IL indukují buněčnou viabilitu inhibicí programované buněčné smrti - **apoptózy**. Ta je též regulována geny jako p53, c-myc a bcl-2 a suprese nebo indukce tohoto programu může vyústit v podporu nebo supresi nádoru.

Cytokiny, které regulují normální hemopoézu mohou kontrolovat abnormální růst jistých typů leukemických buněk a potlačovat malignitu indukci diferenciaci. Genetické abnormality, z nichž vzniká malignita jsou tak obcházeny a jejich účinek anulován indukci diferenciaci a apoptózy.

Hemopoetické cytokiny objevené *in vitro* jsou aktivní *in vivo* a jsou klinicky využívány.

LEUKEMIE A LYMFOMY

nekontrolovaná klonální proliferace a expanze hemopoetických buněk, které ztratily schopnost normálně diferencovat do zralých krevních buněk.

Mechanismy iniciace a progresu leukémií souvisejí se změnami v normálním homeostatickém mechanismu, který reguluje produkci krevních buněk.

Vzniká na různých úrovních vývoje hemopoetických buněk.

Základní typy: lymfoidní a myeloidní, mnohdy těžko definovatelné

Preleukemické stavy

vyjadřují jen část plného leuk. fenotypu" buď **expanzi růstu** (myeloproliferační syndromy) nebo **diferenciační blok** (myelodysplasie).

▶ MYELOPROLIFERAČNÍ SYNDROM - expanze růstu

Chronické leukemie (CLL, CML)

▶ MYELODYSPLASIE - porucha diferenciac

Myelodysplastický syndrom

malé počty cirkulujících zralých buněk, asynchronie zrání jádra a cytoplasmy.

Chromosomální abnormality: delece dlouhých ramen 5 a 7 chromosomu

Progrese do

▶ AKUTNÍ LEUKEMIE - porucha proliferace i diferenciac

cirkulující nediferencované lymfoidní (ALL) nebo myeloidní blastové buňky (AML)

Heterogenní onemocnění s odlišnými epidemiologickými, histologickými, cytologickými, imunologickými a genetickými charakteristikami.

Liší se projevy, stupněm malignity a odpovědí na léčbu.

Vyskytují v dětském i dospělém věku

Je nutná klasifikace – různé systémy, důležité pro prognózu a léčbu

Nejdůležitější vyšetření, tzv. imunofenotypizace

Imunofenotyp je soubor povrchových znaků – CD antigenů charakteristický pro určitý typ buněk periferní krve a kostní dřeně.

Stanovení imunohistochemické a imunocytochemické – řezy tkání, nátěry – antigeny se znázorňují protilátkou vizualizovanou zpravidla enzymatickou reakcí. Umožňuje současné stanovení morfologie buněk a vyšetření tkání

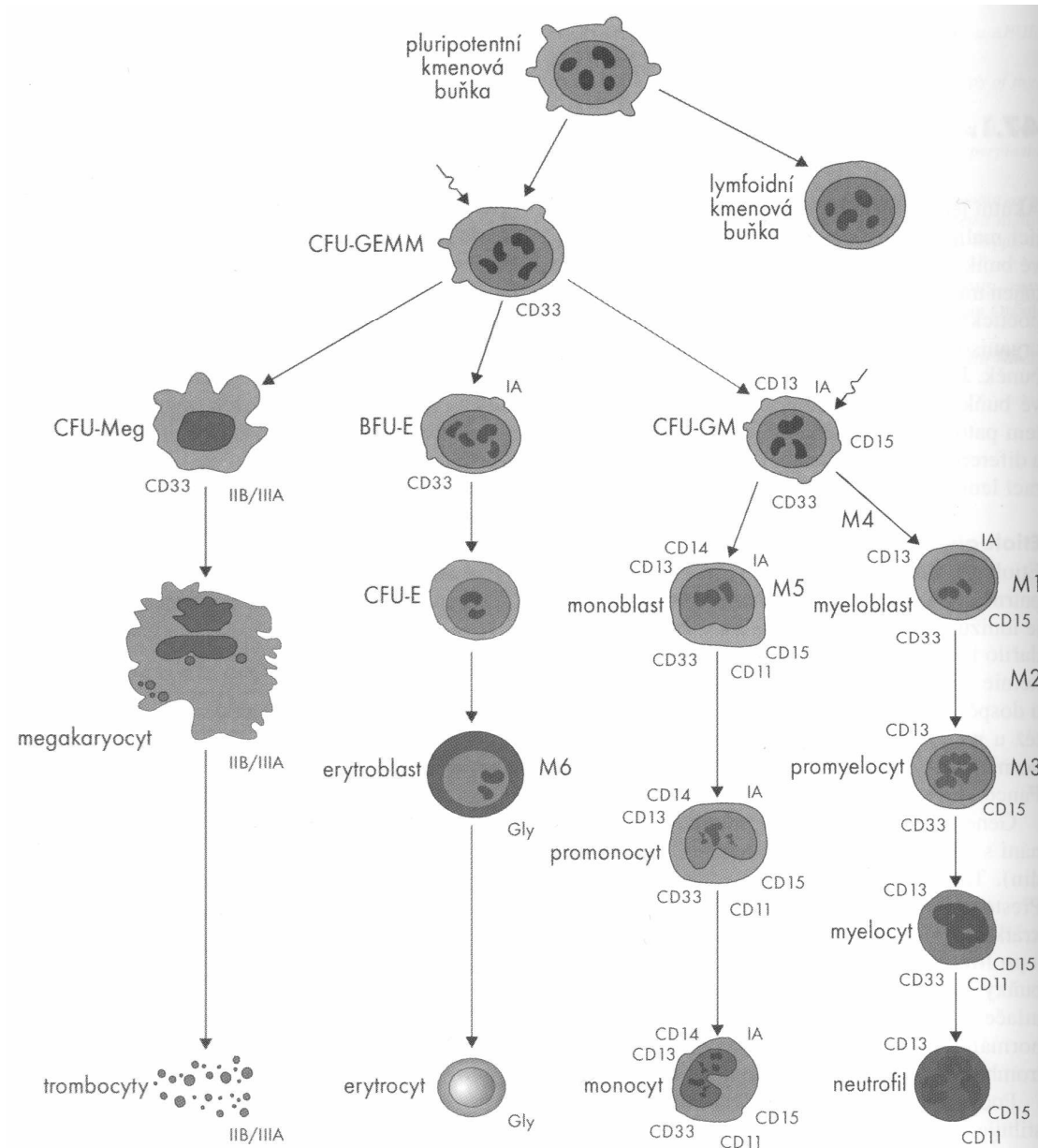
Imunofluorescence - v buněčných suspenzích – krev, kostní dřeň, výpotky, mozkomíšní mok, suspenze ze solidních tkání.

Umožňuje detekovat zkoumané antigeny pomocí specifických fluorescenčně značených protilátek (fluorochromy, imunofluorescence, přímé nebo nepřímé značení). Rychlá metoda, široké spektrum protilátek.

Tzv. kokteily protilátek – jedním fluorochromem značeno více protilátek,

Kombinace více protilátek proti různým epitopům jednoho antigenu

Stanovení - fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie



Obr. 47.1. Schéma myeloidní diferenciacce s vyznačením povrchových markerů umožňujících identifikaci jednotlivých maturačních stupňů (předpokládaná leukemická transformace je vyznačena šipkou). M1–M7 = typy AL vznikající proliferací příslušné populace

Becton Dickinson Instruments (BD) – since 1974 BD has been the leading provider of innovative technology in flow cytometry

-recent models



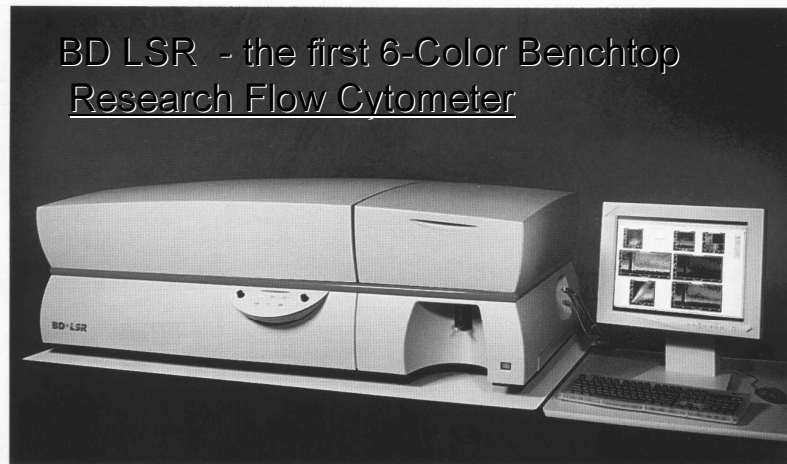
The FACSCalibur is the first a 4-colour, dual laser,

benchtop system capable of both cell analysis and sorting fully integrated multiparameter system, wide range of research and clinical applications

High performance, high speed cell sorter FACSDiVa (Vantage)



Flow sorting instrument for the research laboratory



BD LSR - the first 6-Color Benchtop Research Flow Cytometer

It has combined benchtop easy-of-use with the flexibility and performance of high-end flow cytometers

Building on the easy-of-use standard set by the FACSCalibur, the BD LSR offers software instrument Control, push button fluids, and fine-adjust sample flow-rate control

FACSCalibur



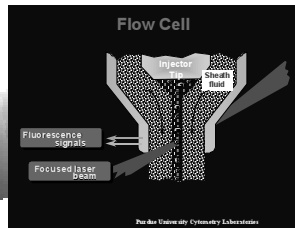
Laboratory
of **cyt**okinetics

Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic

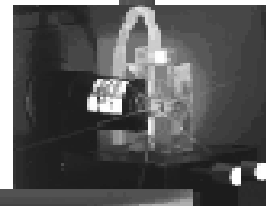
BASICS of FLOW CYTOMETRY

Represent:

FLUIDS



OPTICS



ELECTRONICS

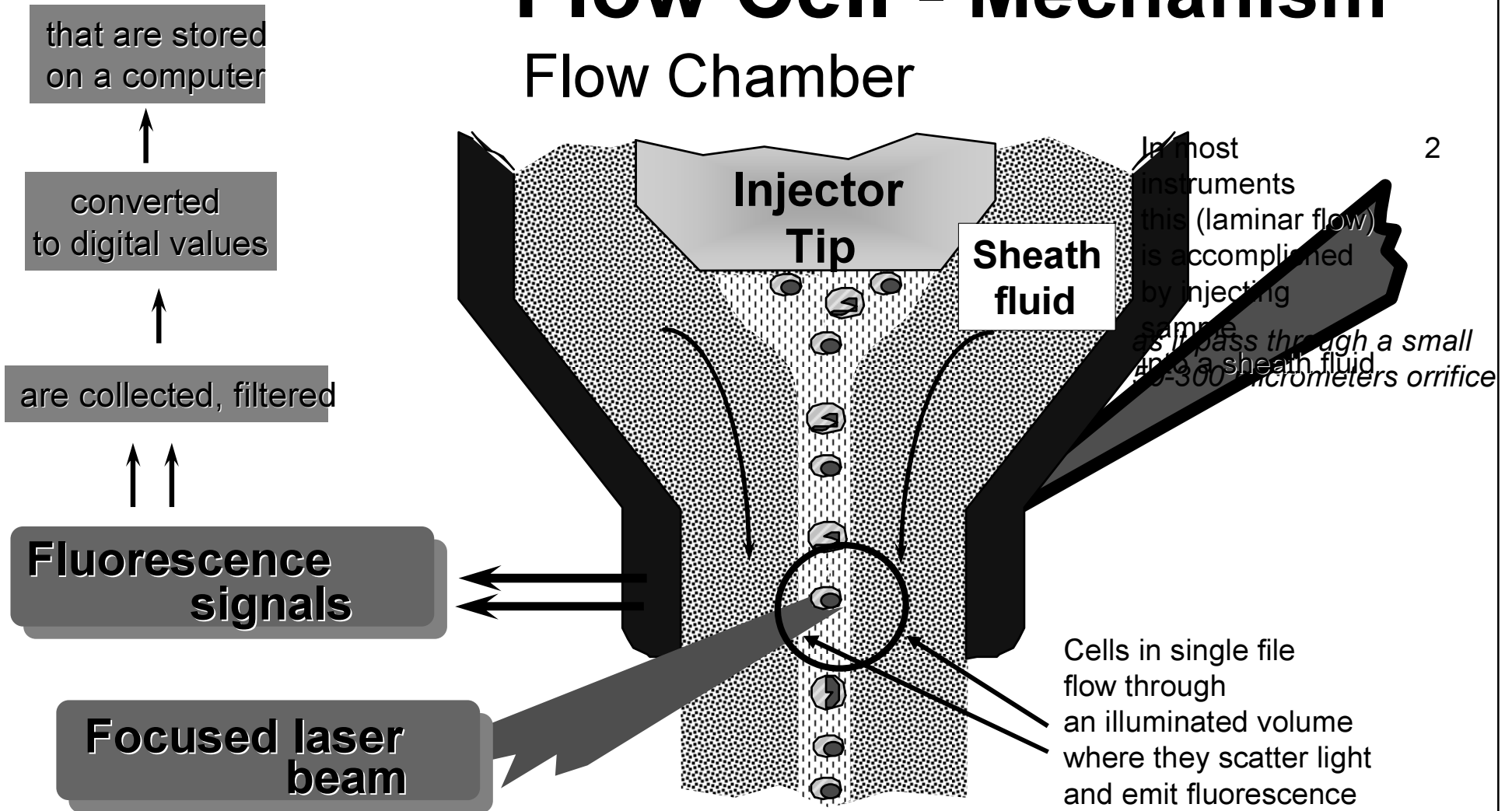


Laboratory
of **cytokinetics**

Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic

Flow Cell - Mechanism

Flow Chamber



...need to have cells in suspension !!!

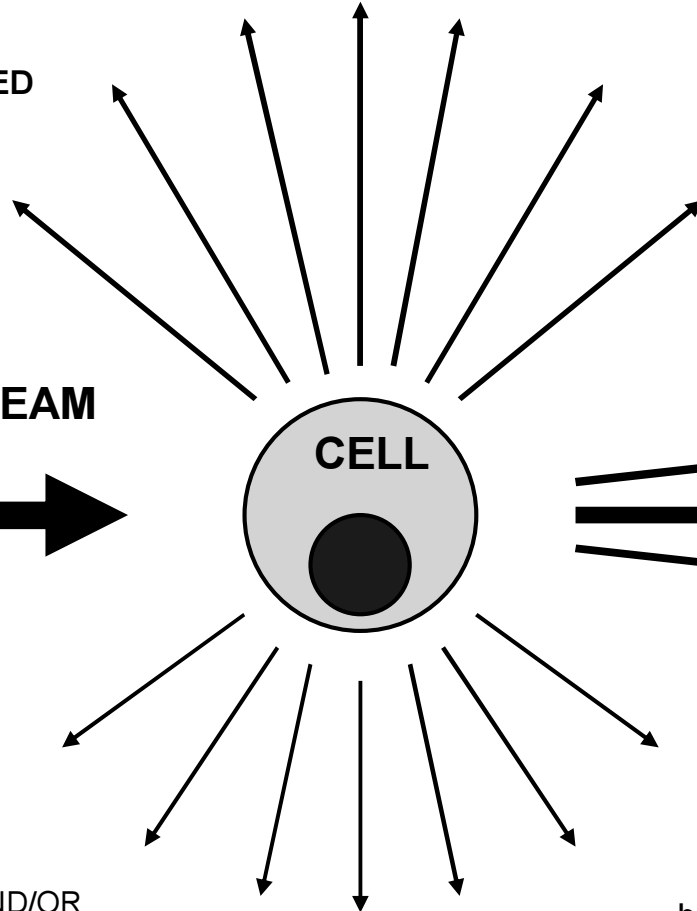
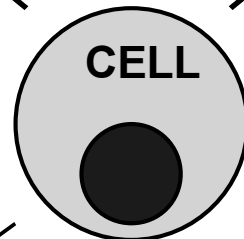
The speed of flowing cells
 Optimum for immunophenotyping: 1000 cells/s
 Optimum for DNA analysis: 200-300 cells/s

INTERACTION OF LIGHT WITH THE CELL

Fluorescence is emitted, and light scattered, in all directions.

THE AMOUNT OF LIGHT SCATTERED AT LARGE ANGLES (15 - 150°) INCREASES WITH CELLS' INTERNAL GRANULARITY AND SURFACE ROUGHNESS

INCIDENT LIGHT BEAM



EXTINCTION, I. E., THE LIGHT LOSS FROM THE INCIDENT BEAM, REPRESENTS THE SUM OF LIGHT ABSORBED AND LIGHT SCATTERED BY THE CELL

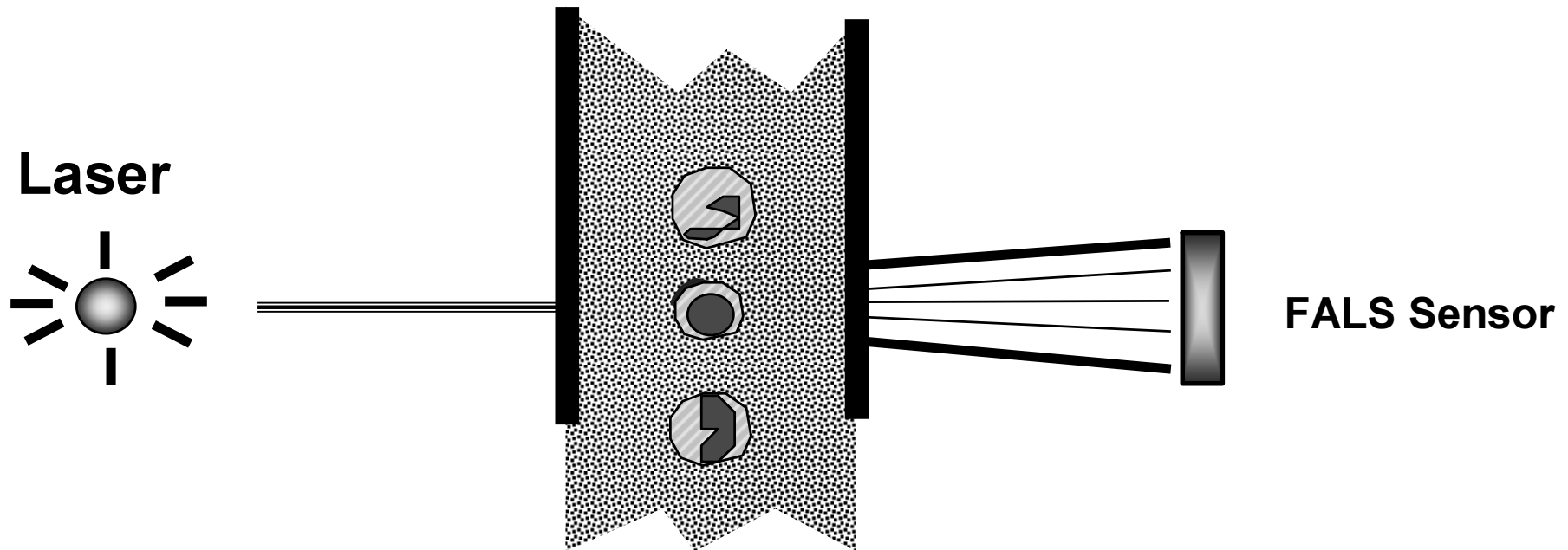
THE AMOUNT OF FLUORESCENCE EMITTED MUST BE LESS THAN THE AMOUNT OF LIGHT ABSORBED, AND IS GENERALLY PROPORTIONAL TO THE AMOUNT(S) OF INTRINSIC AND/OR EXTRINSIC FLUORESCENT MATERIAL(S) IN OR ON A CELL

THE AMOUNT OF LIGHT SCATTERED AT SMALL ANGLES (0.5 - 5°) GIVES A ROUGH MEASURE OF CELL SIZE

but is affected by other factors, such as refractive index

How Forward Angle Light Scatter is collected

The intensity of forward scatter is proportional to the
Size
Shape
Optical homogeneity
of cells (or other particles)



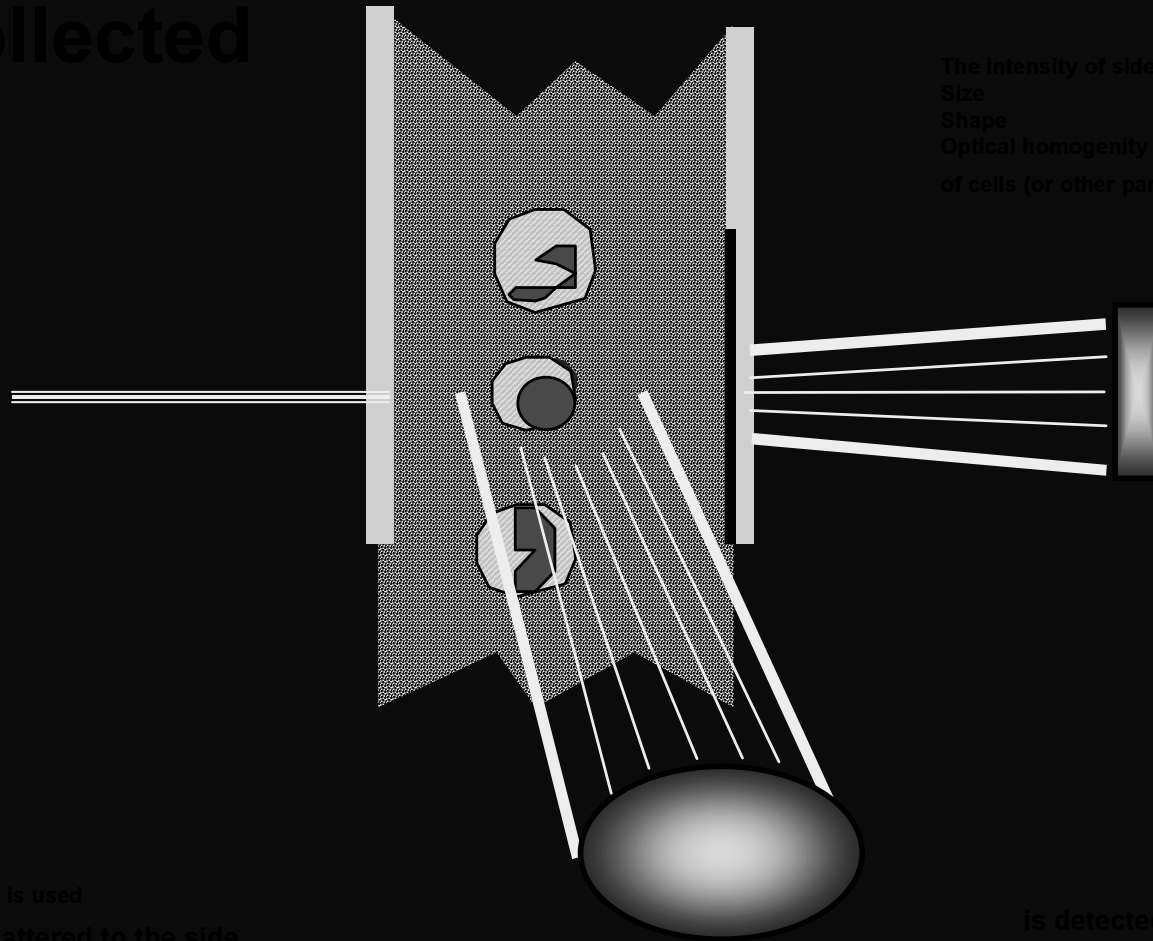
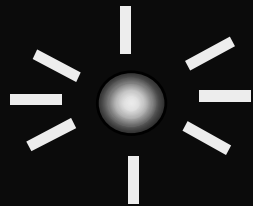
When a laser light source is used

The amount of light scattered in the Forward direction
*(along the same axis
That the laser light is traveling)*

is detected
in the forward scatter channel

How 90 Degree (side) Light Scatter is collected

Laser



The intensity of side scatter is proportional to the
Size
Shape
Optical homogeneity
of cells (or other particles)

FALS Sensor

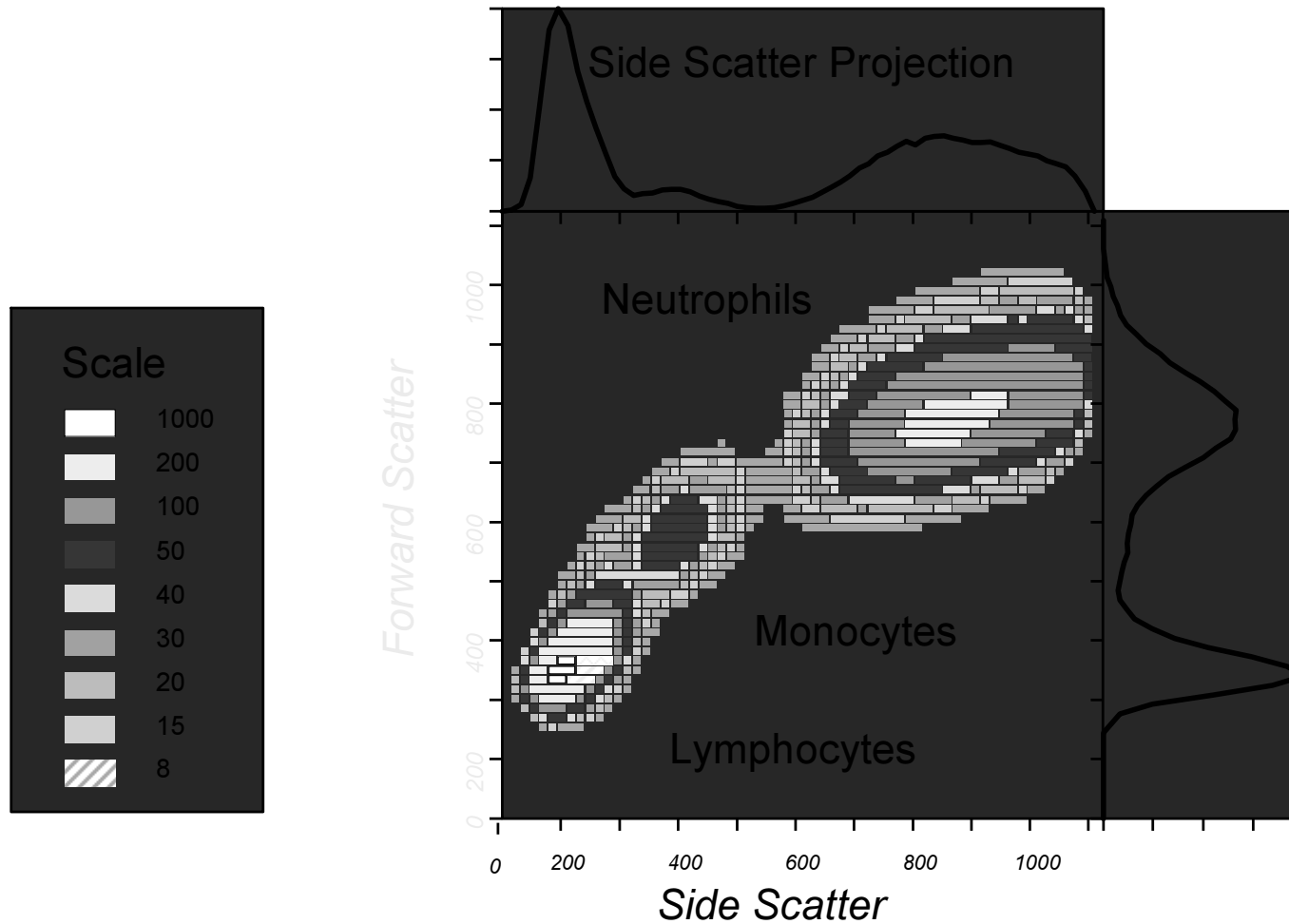
90LS Sensor

1
When a laser light source is used
the amount of light scattered to the side
(perpendicular to the axis
that the laser light is traveling)

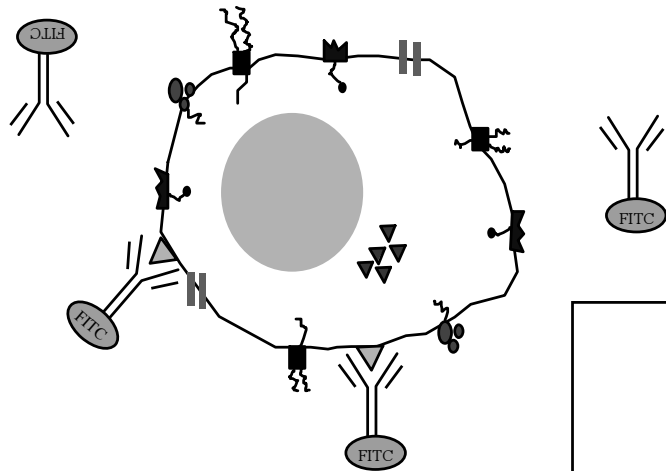
is detected
in the side or 90°
scatter channel

10

Light Scatter Gating



CELLULAR ANTIGENS



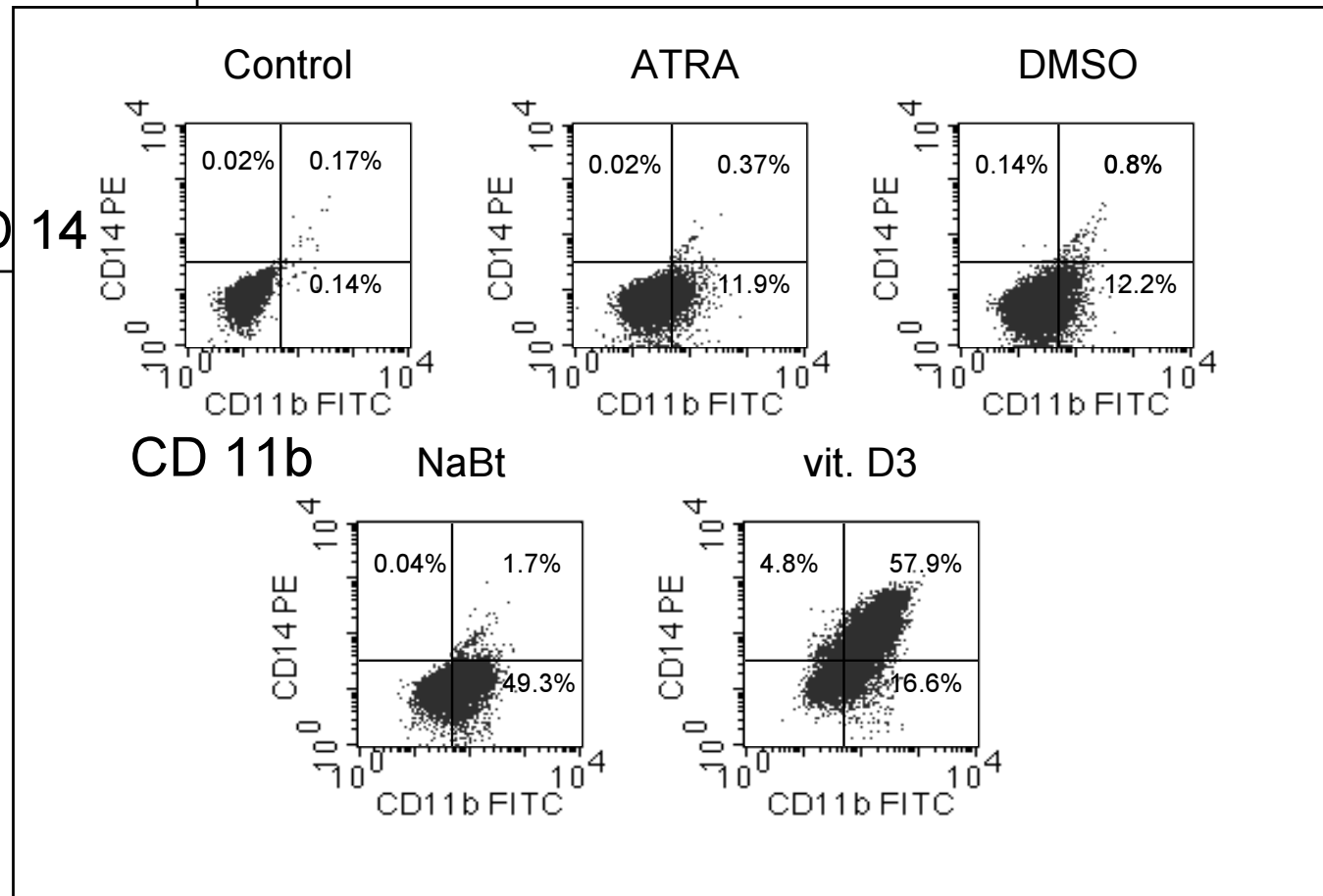
CD 14

Two-parametric analysis of cell surface antigens

(HL-60 human leukemic cells treated with agents of differentiation)

CD11b (granulocyte/ monocyte marker)

CD14 (monocytic marker)



Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic

CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKEMIE (CLL)

Lymfoproliferativní onemocnění – klonální proliferace lymfocytů na určité úrovni maturačního procesu s postupnou akumulací nefunkčních lymfocytů v lymfatické tkáni (slezina, uzliny, játra, kostní dřeň) i periferní krvi

B-CLL - nejčastější forma, zástava mezi pre-B a zralými B-lymfocyty

T-CLL – méně častá, v etiologii infekce retrovirem HTVL-1, horší prognóza a odpověď na léčbu

PROLYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE (PLL)

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE (CML)

je klonální myeloproliferativní onemocnění pluripotentní progenitorové buňky. Zahrnuje myeloidní, eryteroidní, megakaryocyt, B- někdy T-lymfoidní elementy, ale ne fibroblasty kostní dřeně (KD). Nemoc je silně heterogenní, má 2 až 3 fázový průběh, nejčastěji u osob nad 50 let.

Specifická cytogenetická abnormalita - Philadelphia (Ph) chromozom.

Molekulární marker bcr-abl zfúzovaný gen, translokace t(9;22)

V minulosti byla prognóza pacientů s CML velmi špatná (stř. doba přežití 3 roky). Nyní se prognóza zlepšila díky včasné diagnóze, zlepšující se terapii a podpůrné léčbě.

Léčba hydroxyureou a busulfanem podporovaná IFN a autologní transpl. KD. Nyní je stř. doba přežití asi 60-65 měsíců.

S IFNalfa 20-25% pacientů přežívá. Vedlejší účinky - horečka, nechutenství, svalové bolesti, dlouhodobější - ztráta váhy, deprese, nespavost atd.

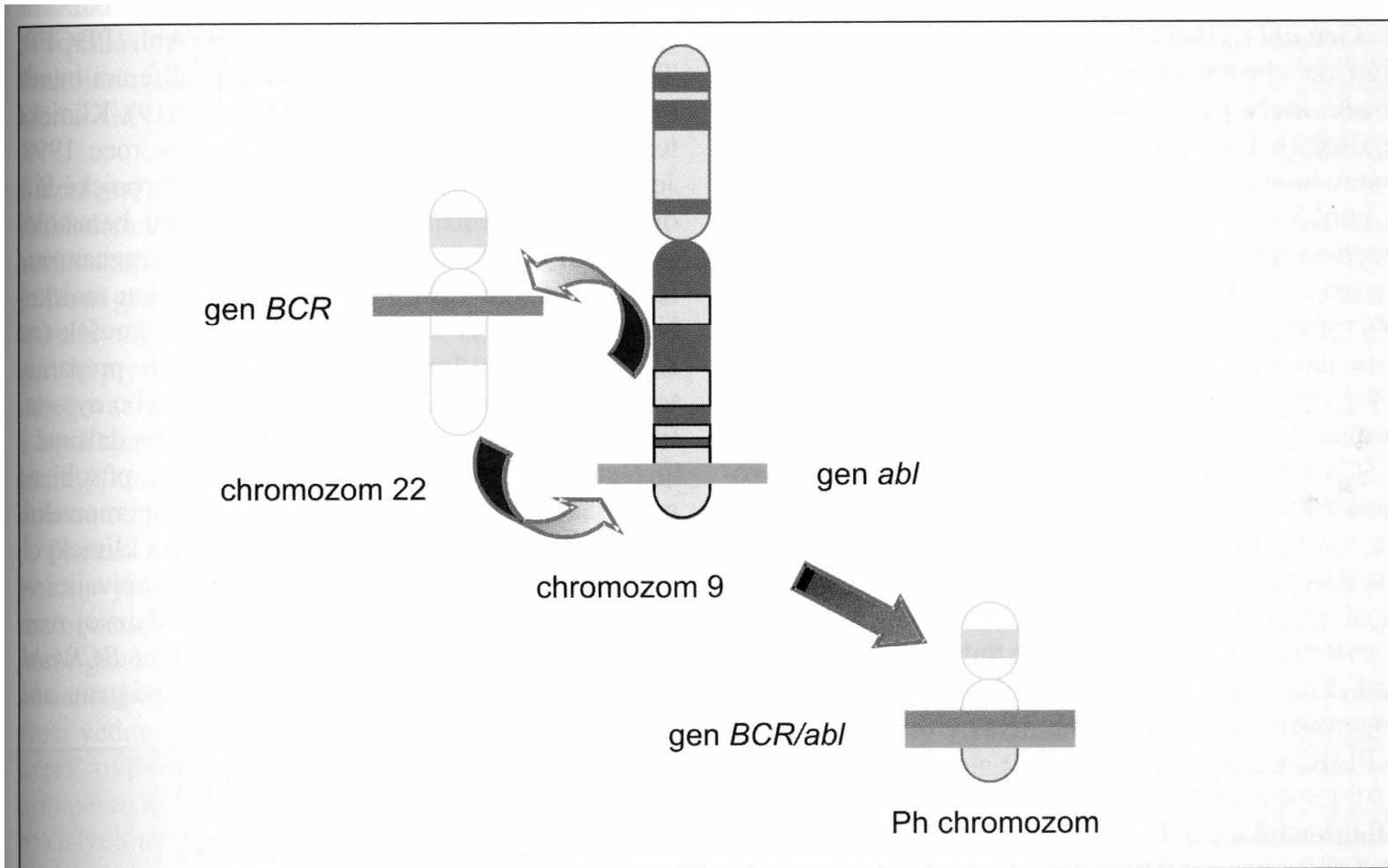
Charakteriky různých typů leukemií ilustrují vztah ke stadiu zástavy diferenciaci.

Typické genetické změny ovlivňující jak proliferaci (aktivované kinázy) tak apoptózu (Bcl-2)

Table 2
Some gene rearrangements in leukemias and lymphomas

Leukemia/lymphoma	Gene rearrangement		Gene activated
CML	t9:22	bcr/abl	Tyrosine phosphorylase
AML	t8:21	IL-3R	Tyrosine kinase
APL	t15:17	PML/RAR α	Retinoic acid receptor, blocks diff.
ALL	t12:22	TEL/MN1	Transcription factors
	t9:12	TEL/abl	Tyrosine phosphorylase
Burkitt's (B-cell)	t8:14	IgG/myc	c-myc (transcription)
B-cell lymphoma	t14/18	IgG/bcl2	bcl-2, blocks apoptosis
CLL	?	?	blocks apoptosis

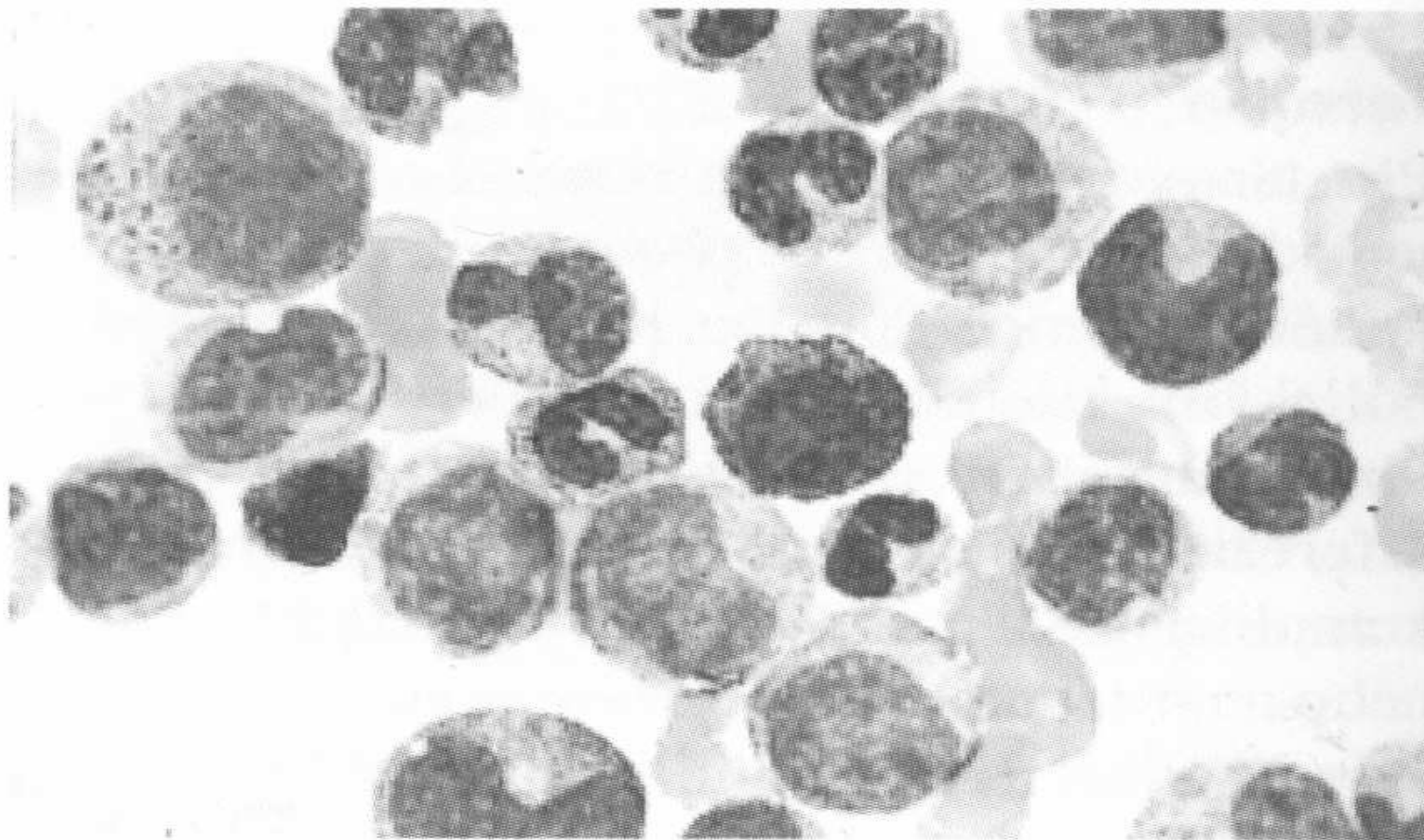
Listed are only a few of the many gene rearrangements found in leukemias and lymphomas. These rearrangements frequently result in translocation of a promoter and a structural gene, resulting in activation of expression of the rearranged gene. The two major classes are those that activate kinases and cause proliferation, and those that activate genes (such as *bcl-2*), that block apoptosis. Examples of how these gene rearrangements are manifested in leukemias and lymphomas are presented in Figs. 10 and 11.



Obr. 2.17 Ph chromozom je produktem translokace $t(9;22)(q34;q11)$. Na Ph chromozomu vzniká fúzní gen *BCR/abl*, který se významně podílí na maligní transformaci hematopoetických prekurzorů.

Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková:
 Obecná onkologie a podpůrná léčba

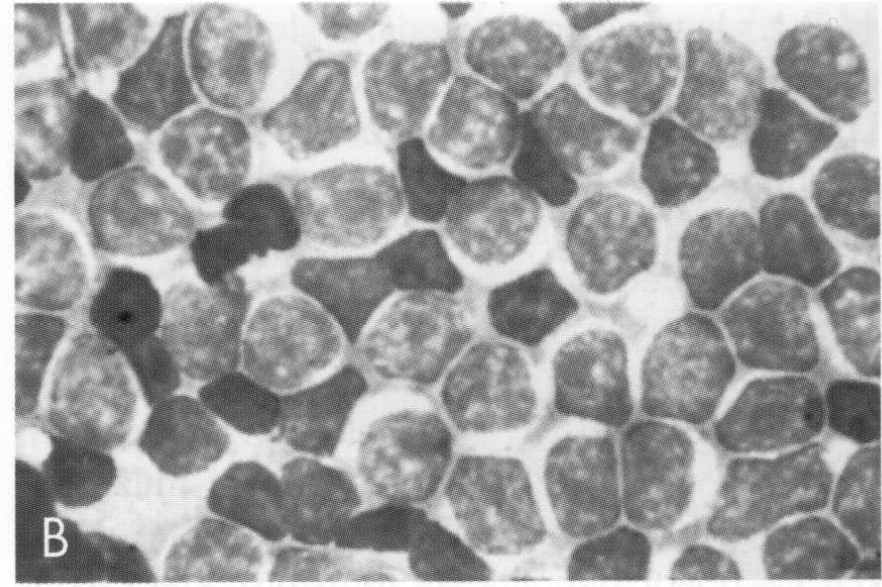
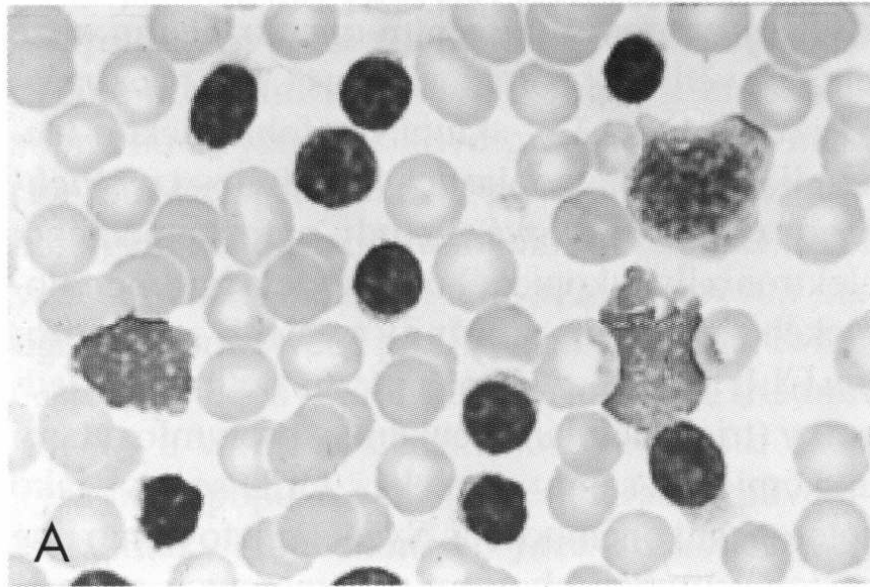
CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE



Obr. 47.6. Kostní dřeň nemocného s CML

P. Klener:
Klinická onkologie

CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKEMIE (CLL)



Obr. 47.7. A – obvodová krev u CLL; B – kostní dřeň u nemocného s CLL

P. Klener:
Klinická onkologie

AKUTNÍ LEUKEMIE

Akutní lymfoblastické leukemie (ALL) – akumulace nezralých lymfoidních buněk v KD

převážně u dětí – asi 80% všech leukemií dětského věku a asi 25% všech dětských nádorů. Prognóza je relativně příznivá.

U dospělých staršího věku asi 20% všech akutních leukemií – méně příznivá prognóza.

Dva základní typy – B-ALL nebo T-ALL

Akutní myeloidní leukemie (AML) – nejčastější leukemické onemocnění dospělých – až 85% AL u osob starších 20 let. Prognóza se v posledních letech zlepšila.

NON-HODGKINSKÉ LYMFOMY (maligní lymfomy, NHL)

Vznikají nádorovou transformací buněk lymfoidních tkání.

Klasifikace obtížná, někdy není rozdíl mezi leukemií a lymfomem jasný.

U dětí asi 12% u dospělých 3-4% všech zhoubných nádorů

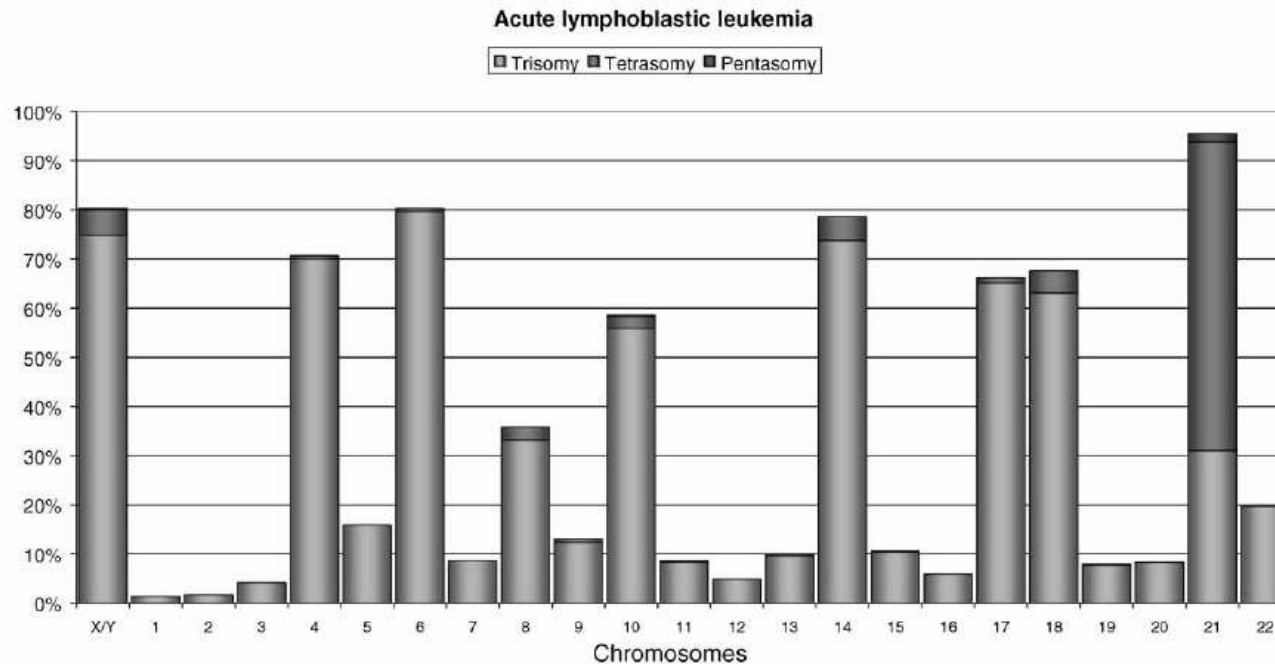


Fig. 1. Pattern of whole chromosome gains in massively hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia without concomitant structural chromosome changes. The most frequent polysomies are those of chromosomes 21 (most often tetrasomy), X, 6, 14, 4, 18, 17, and 10.

ALL – řada subtypů lišících se v odpovědi k terapii a riziku relapsu v závislosti na diagnostickém karyotypu.

POLYSOMIE

25-30% - více než 50 chromozomů (hyperdiploidie) bez dalších struktur. karyotypových abnormalit

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a heterogeneous disease characterized by the accumulation of immature lymphoid cells in the bone marrow. Subtypes of the disease differ markedly in their response to therapy and subsequent risk of relapse, not least depending on the diagnostic karyotype which is today used routinely for accurate risk assessment and therapy tailoring [22]. The most common cytogenetic subgroup of childhood ALL (25–30%) is defined by the presence of more than 50 chromosomes (massive hyperdiploidy) in the leukemic cells, mostly without concomitant structural karyotypic abnormalities; this cytogenetic feature is associated with a good prognosis given state-of-the-art treatment [22].

AML – gen. změny vedoucí ke konstitutivní aktivaci receptoru pro IL-3 – aktivace tyrosin kináz a proliferace.

Aktivace IL-3 receptoru podporuje růst všech typů myeloidní řady

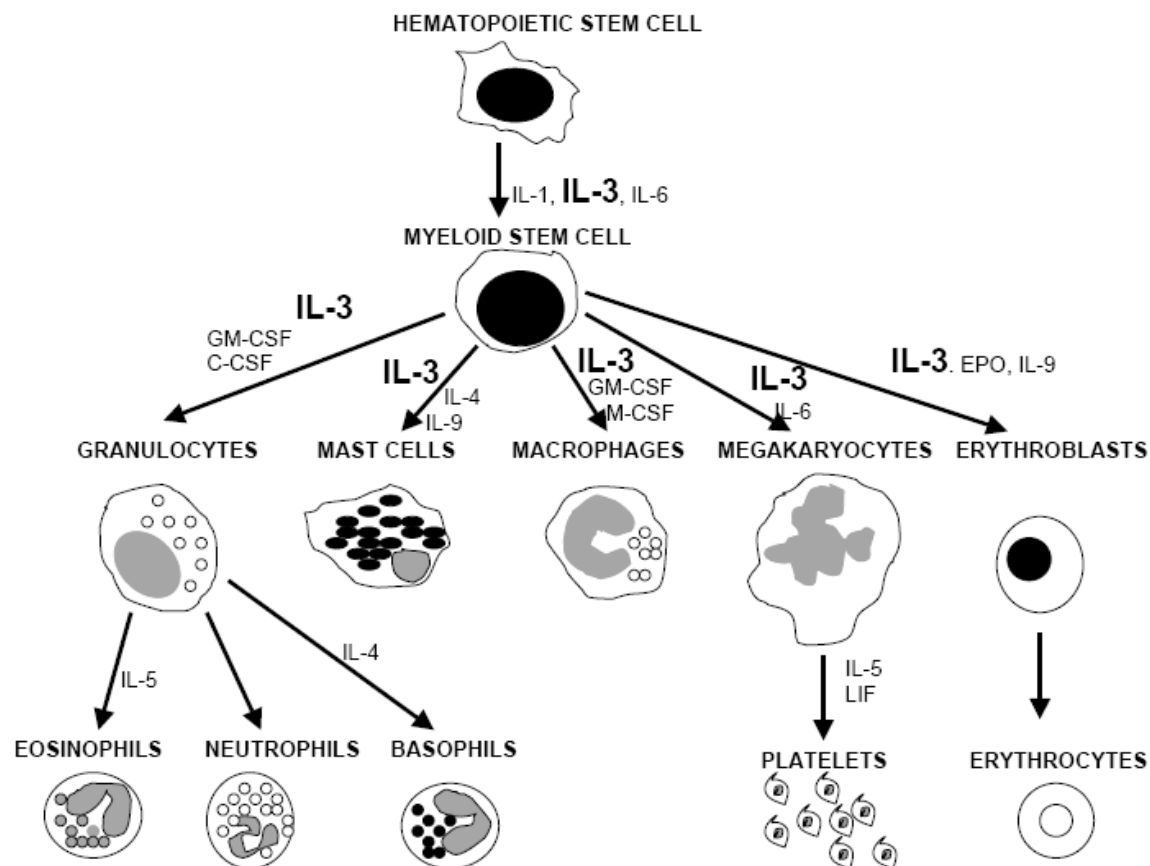


Fig. 10. Constitutive activation of the IL-3 receptor causes myelogenous leukemia. IL-3 is active in the proliferation and differentiation of all cells in the myeloid series, including polymorphonuclear leukocytes, monocytes, megakarocytes (platelets), and erythrocytes. Thus, constitutive activation of the IL-3 receptor results in an increase in the precursors of all of these cell types, a characteristic of acute myelogenous leukemia. Modified from [316].

B-lymfomy, Burkittův lymfom

Translokace a aktivace imunoglobulinového (Ig) promotoru spojená s aktivací genů *c-myc* (podpora proliferace) a *Bcl-2* (blok apoptózy)

Rychlý nárůst nezralých B buněk, které neumírají

Genetická změna v kmenové buněce, ale růst nádoru je určen stadiem maturace, kde dojde k aktivaci Ig promotoru.

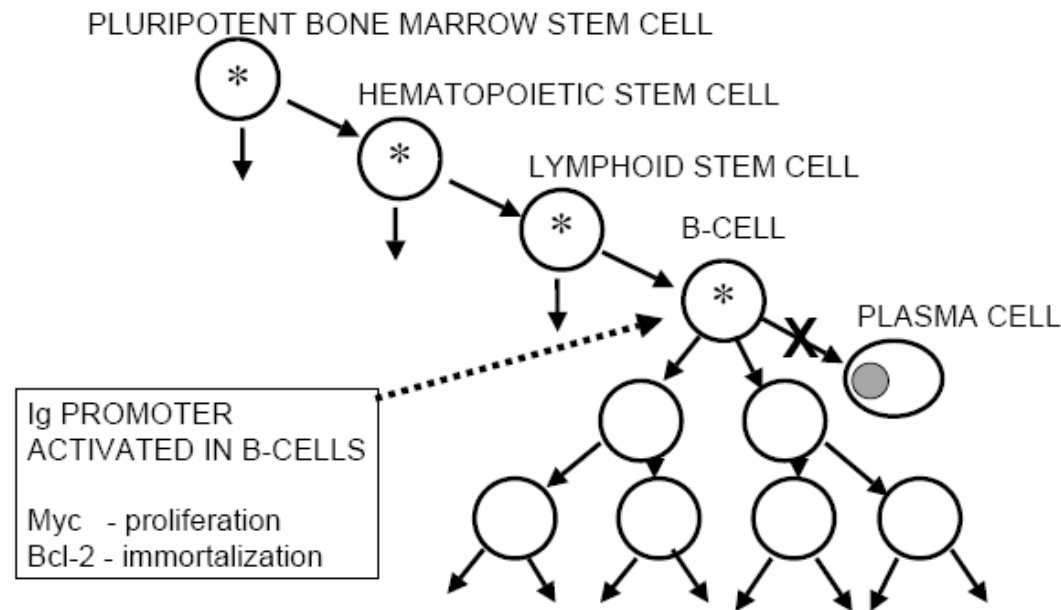
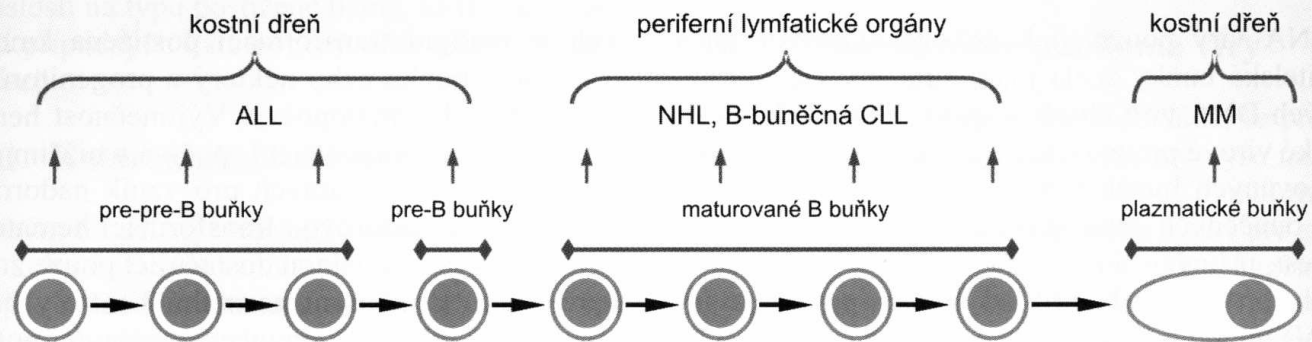
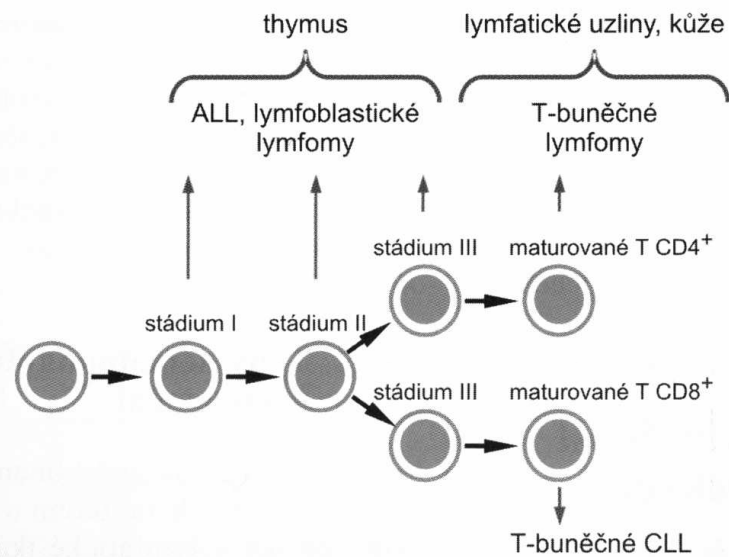


Fig. 11. Activation of immunoglobulin promoter linked to oncogene (*c-Myc*) and/or apoptosis blocking gene (*Bcl-2*) produces B-cell cancer in transgenic mouse model of Burkitt's lymphoma. B-cell lymphomas occur when the immunoglobulin gene promoter is linked to an oncogene (*c-Myc*) and/or a gene that codes for the apoptosis blocker, *Bcl-2*. Although the Ig-promoter/oncogene translocation is present in every cell in the animal, the promoter is only activated in B-cells, so that other cells in the lymphocytic lineage are not affected.

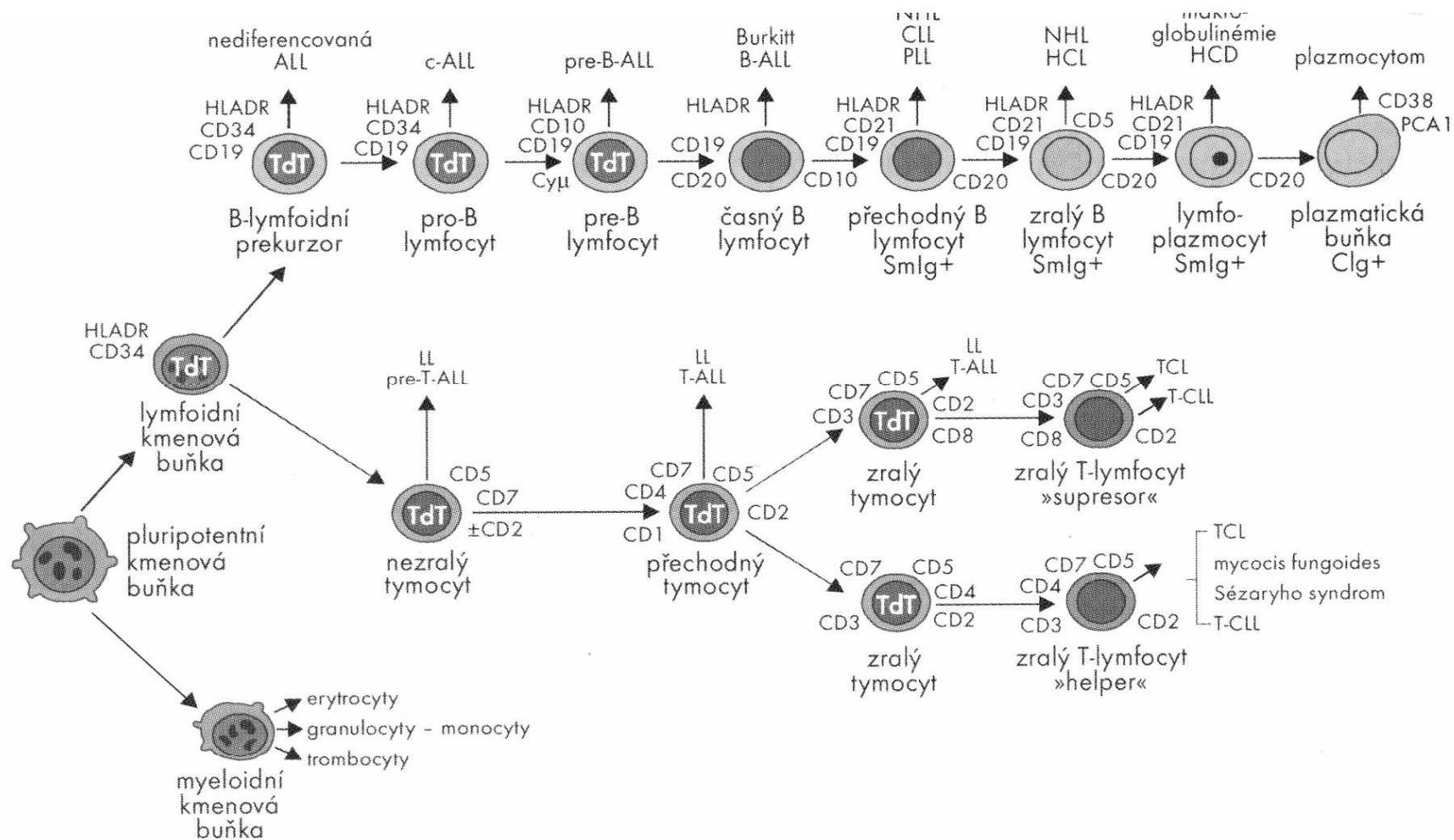
1) MALIGNÍ TRANSFORMACÍ POSTIŽENÁ B-BUNĚČNÁ ŘADA:



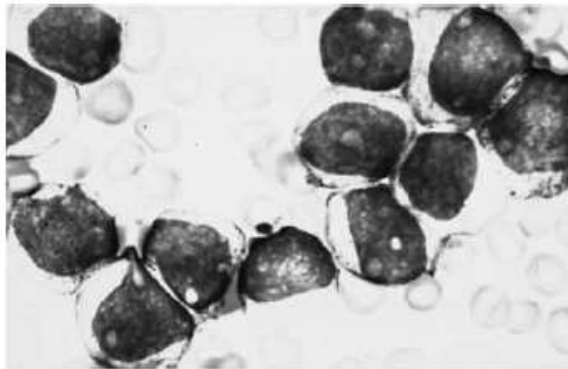
1) MALIGNÍ TRANSFORMACÍ POSTIŽENÁ T-BUNĚČNÁ ŘADA:



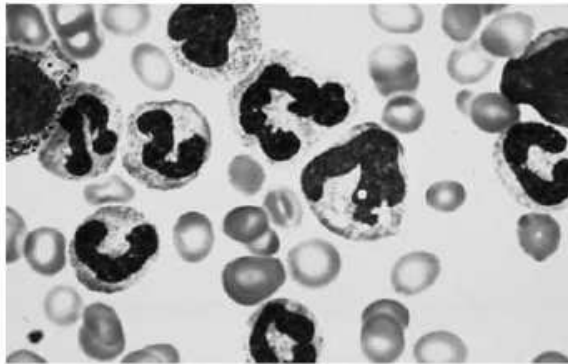
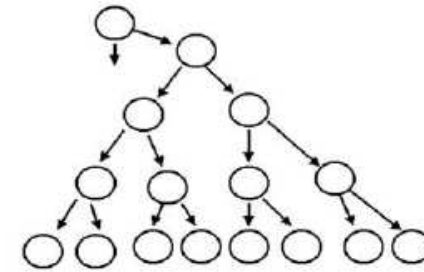
Obr. 2.15 Typ hematoonkologického onemocnění, které se bude vyvíjet, závisí na vývojovém stadiu lymfoidní prekursorové buňky zasažené maligní transformací.



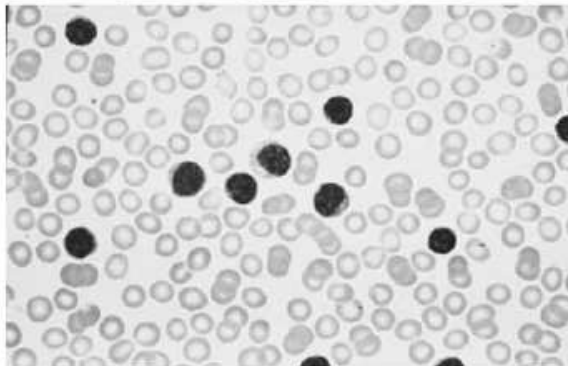
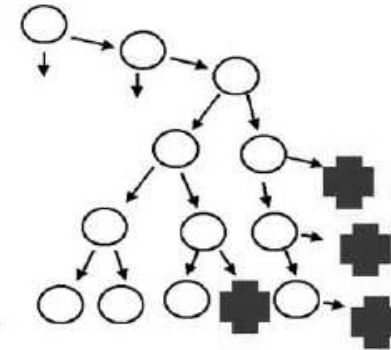
Obr. 47.4. Schéma lymfoidní diferenciace s vyjádřením vztahu k různým lymfoproliferačním onemocněním. Tato onemocnění mohou vznikat maligní transformací lymfocytu v kterémkoliv stadiu jeho postupného vyžívání. Fenotyp buněk v patologické populaci se podobá fenotypu jejich normálních protějšků. ALL – akutní lymfoblastická leukémie; PLL – prolymfocytární leukémie; HCL – trichocelulární leukémie; CLL – chronická lymfatická leukémie; NHL – ne Hodgkinský lymfom; HCD – choroba z těžkých řetězců; LL – lymfocytární lymfom; Smlg – povrchový imunoglobulin; TdT – terminální deoxynukleotidyltransferáza; Clg – cytoplazmatický imunoglobulin; cALLA – společný leukemický antigen



UNDIFFERENTIATED/BLASTIC
 ACUTE MYELOGENOUS
 GROWTH FRACTION: >9:10
 TIME TO DEATH: MONTHS
 CELL DO NOT ENTER G_0



MODERATELY DIFFERENTIATED
 CHRONIC MYELOGENOUS
 GROWTH FRACTION: 1:10
 TIME TO DEATH: YEARS
 SOME CELLS DIFFERENTIATE



WELL DIFFERENTIATED
 CHRONIC LYMPHOCYTIC
 GROWTH FRACTION: <1:1000
 TIME TO DEATH: DECADES
 VERY LOW GROWTH FRACTION
 CELLS DO NOT DIE

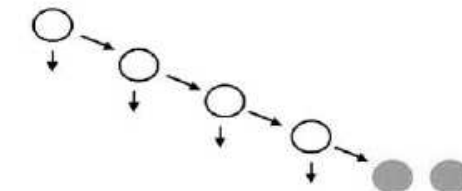
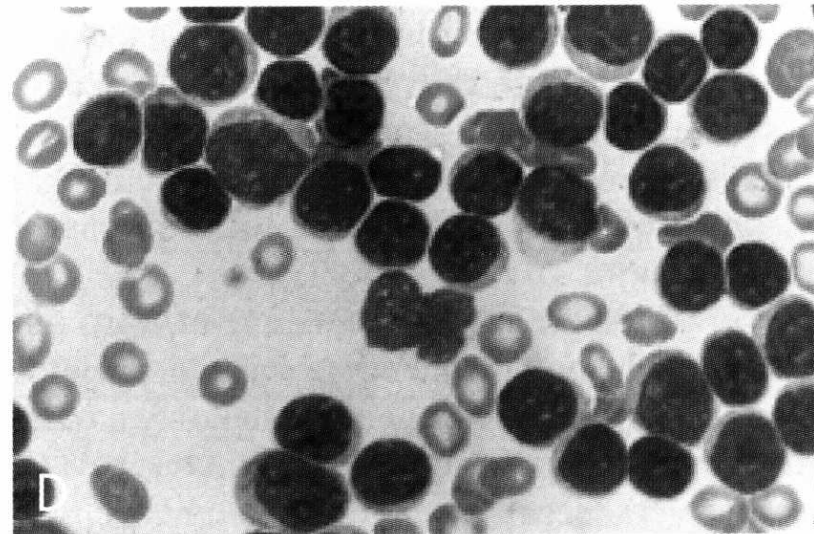
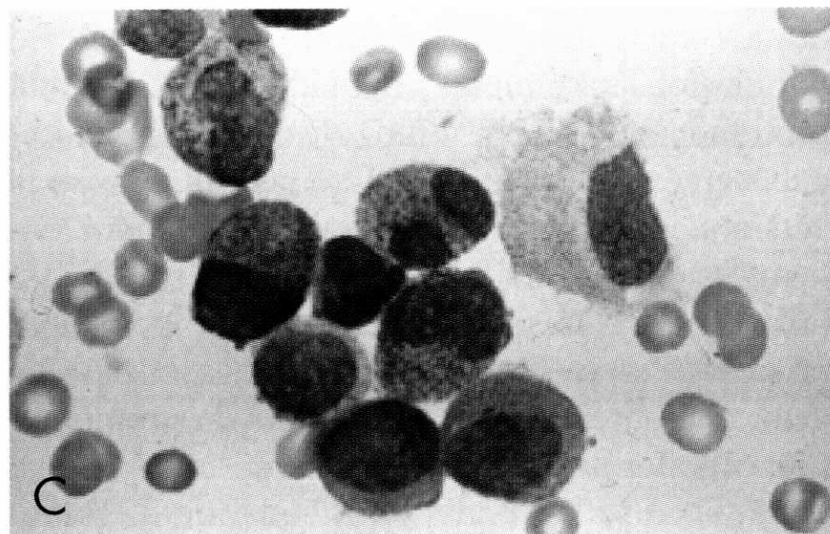
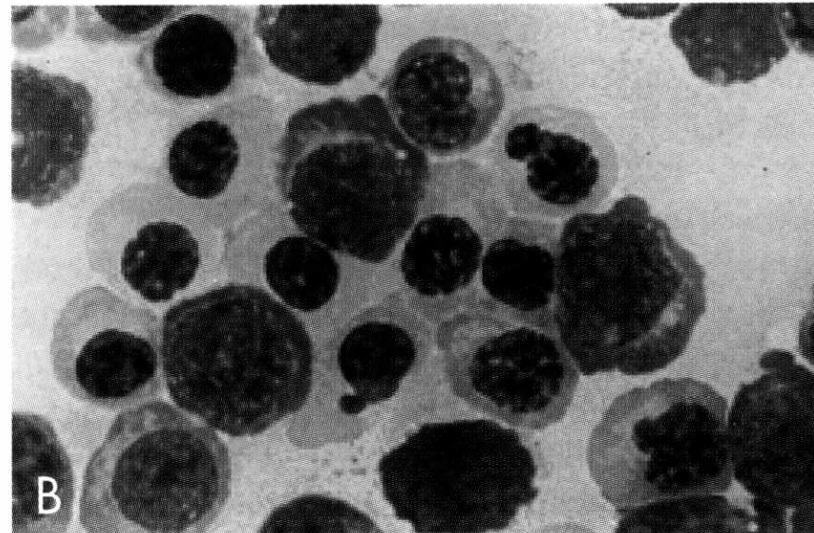
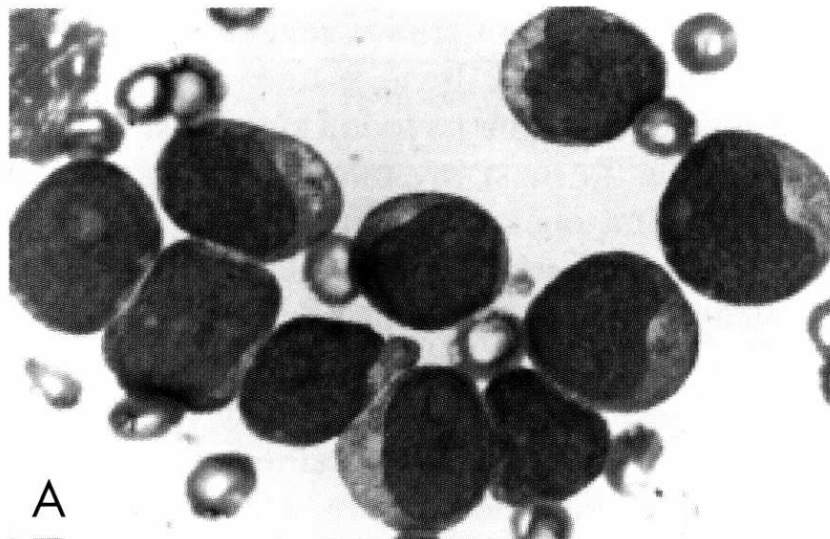
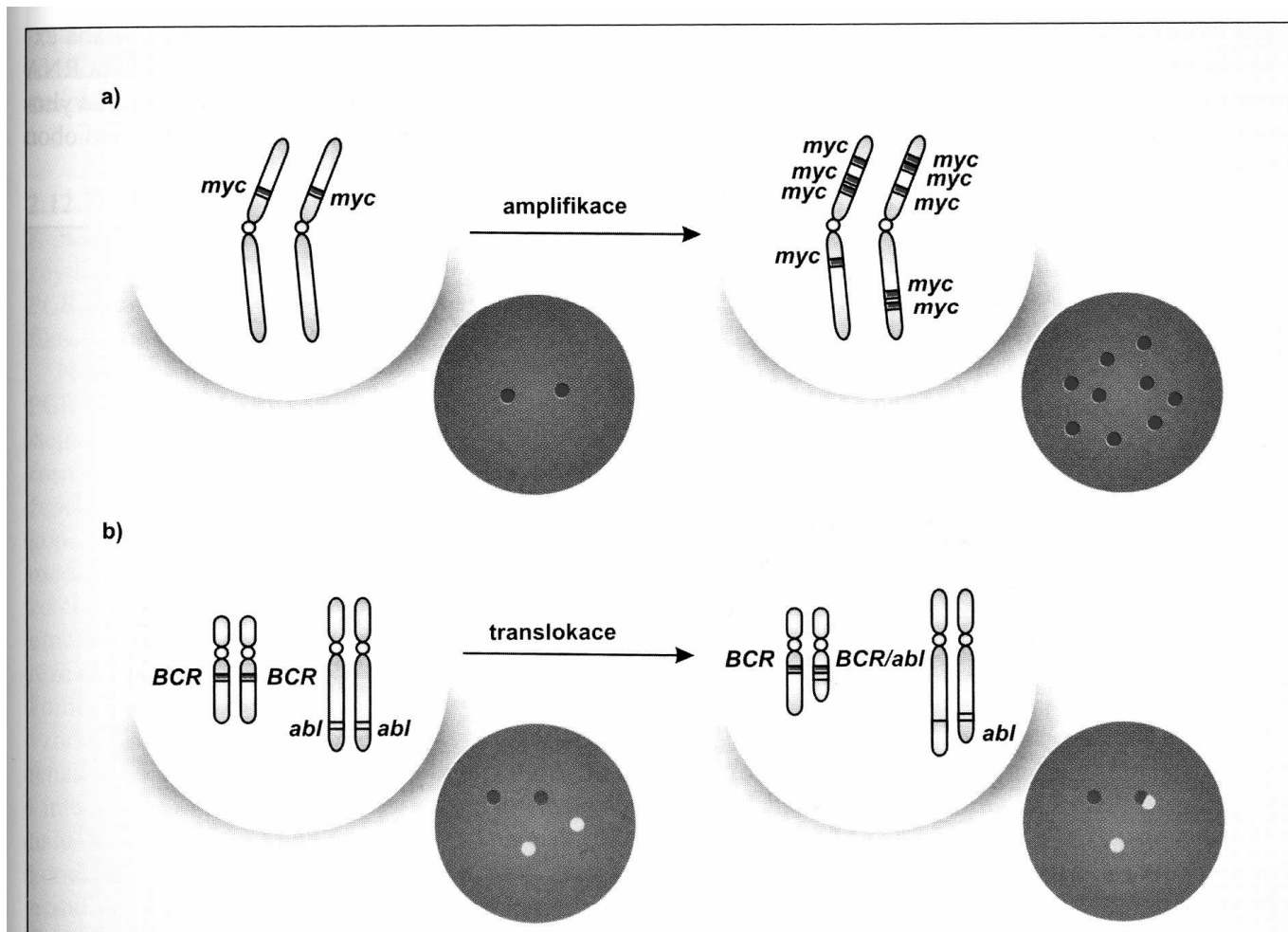


Fig. 12. Growth fractions, morphology, and clinical course of three selected leukemias. In acute myelogenous leukemia, the tumor cells are arrested in an active growth phase: cells that divide and do not enter G_0 , but pass directly into the next cell cycle. Few, if any, differentiated cells are seen; the tumor is made up of blast cells. The growth fraction is very high, the expansion of cells is essentially exponential, and the time to death, if the disease is not treated, is within a few months. In chronic myelogenous leukemia, the arrest is at the level of the transit-amplifying cells. The number of cycling cells is much smaller, and a much higher proportion of the tumor cells undergoes differentiation so that many cells at various stages of differentiation are seen. The growth fraction is small, and the time to death is years. In chronic lymphocytic leukemia, maturation arrest occurs in small non-dividing cells. The functional change is a lack of cell death. The vast majority of the cells are in G_0 , so that the growth fraction is vanishing small, and the time to death is decades. Modified from [317].



Obr. 47.2. Kostní dřeň u akutních leukémií. A – akutní myeloblastová leukémie (M_1); B – akutní myeloblastová leukémie (M_2); C – akutní promyelocytární leukémie (M_3); D – akutní lymfoblastická leukémie

P. Klener:
Klinická onkologie

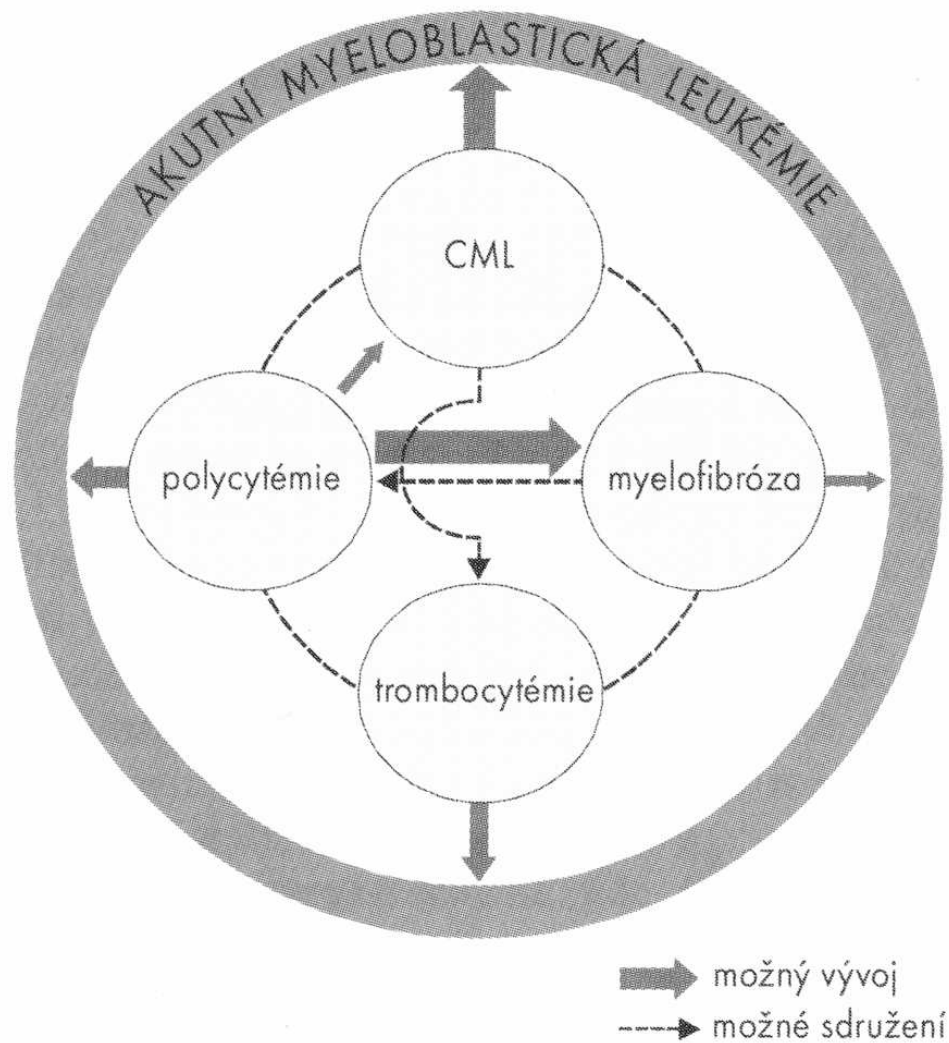


Obr. 2.20 Dva příklady využití techniky fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

- a) Analýza amplifikace genu *myc*. V normální buňce se sonda specifická pro gen *myc* naváže pouze na dvě kopie genu na obou chromozomech a při analýze FISH dává pouze dva signály. Po amplifikaci genu se sonda naváže také na všechny nově vzniklé kopie a při analýze FISH poskytuje odpovídající počet signálů.
- b) Detekce translokace *BCR/abl*. Použijeme dvě odlišně značené sondy pro oba analyzované geny. Při analýze normální buňky dostáváme dva a dva oddělené signály, zatímco v buňce, ve které proběhla translokace, dostáváme směsný signál v důsledku emise fluorescence ze sond lokalizovaných v těsném sousedství.

Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková:
Obecná onkologie a podpůrná léčba

P. Klener:
Klinická onkologie



Obr. 47.5. Vzájemné vztahy myeloproliferačních onemocnění

Všechny elementy krve a lymfy jsou odvozeny během fetálního a dospělého života od pluripotentní hemopoetické kmenové buňky. Nachází se v malém počtu v kostní dřeni a většina z nich se aktivně nedělí.

Pokrok v izolaci a charakterizaci pluripotentní kmenové buňky pomáhá k poznání s ní souvisejících malignit.

Lidské kmenové buňky nesou povrchový znak CD34 a jsou schopny tvořit řadu kolonií v semisolidním prostředí v odpověď na různé specifické růstové faktory. Jisté lidské leukemické buňky jako chronická myeloidní leukémie (CML) nebo akutní myeloidní leukémie (AML), které představují velmi nezralé kmenové buňky nebo prekursorů jednotlivých linií, se jen velmi obtížně kultivují *in vitro*, přesto, že v pacientech rostou velmi rychle. Chybí asi specifické faktory dodávané mikroprostředím kostní dřene.

V současné době byl objeven nový tzv. **steel faktor** produkovaný stromálními buňkami a jeho receptor **c-kit** přítomný na řadě hemopoetických buněk. U myši byly definovány **dva genetické lokusy regulující vývoj kmenové buňky - steel (SL) a white-spotting (W)**.

W lokus kóduje c-kit onkogen, což je člen třídy onkogenů pro tyrosin kinázové receptory. Je to receptor pro produkt genu Sl mající růstově promoční aktivitu pro mnoho hemopoetických linií a vykazující synergii s dalšími růstovými a diferenc. faktory jako GM-CSF, Epo a IL-7. Sl faktor je považován za kritický pozitivní efektor růstu a vývoje kmenových buněk. Proto je věnována pozornost jeho roli v růstové rsgulaci u leukemií, které představují primitivní typy kmenových buněk.

Poměrně dobře je objasněna úloha stromatu kostní dřeně v regulaci normální krvinek.

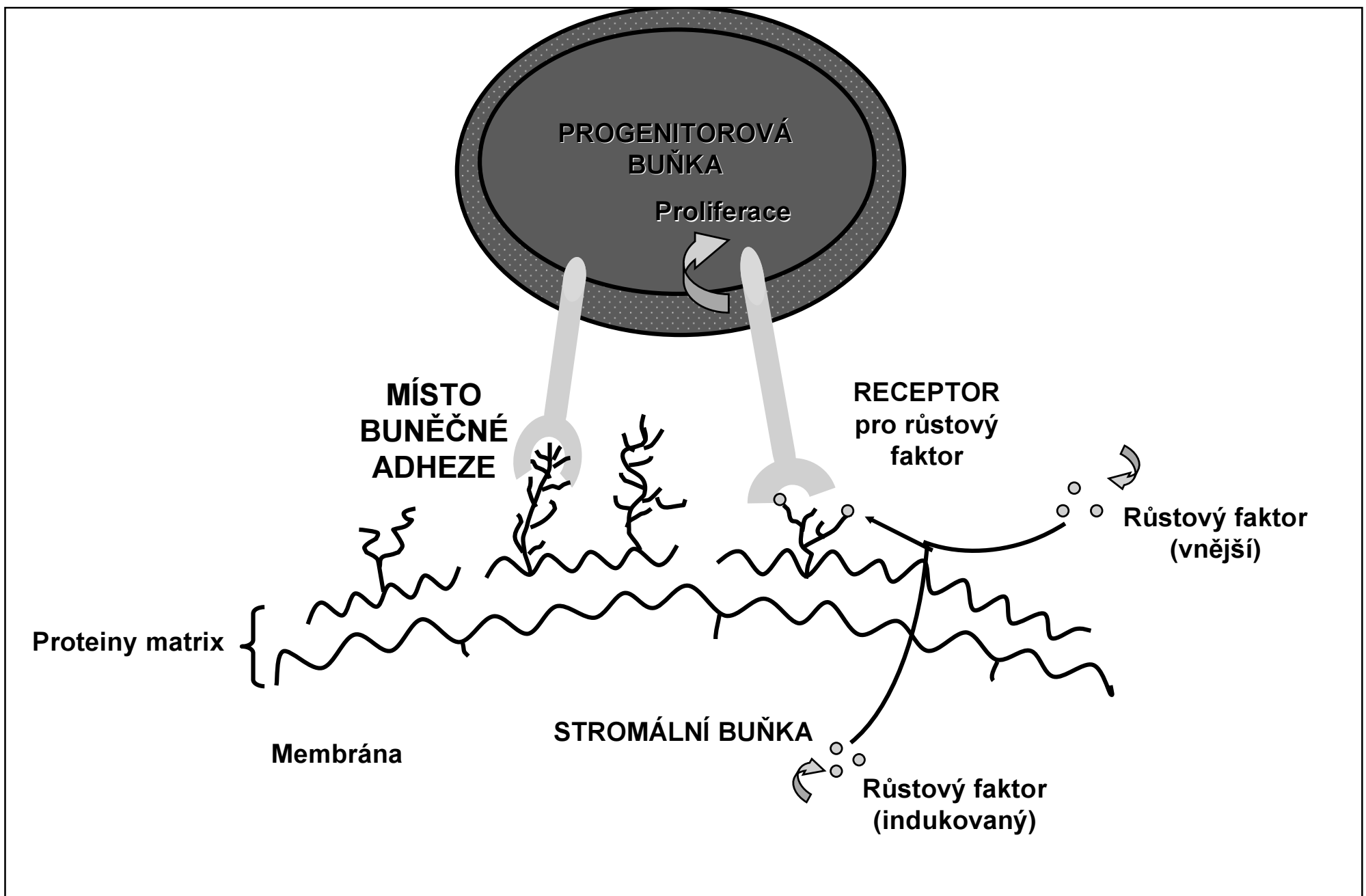
Byly vytvořeny dlouhodobé kultury pro myeloerytroidní a lymfoidní vývoj.

Řada údajů předpokládá, že vzájemné kontakty buněk a specifické účinky extracelulární matrix pomáhají regulovat vývoj kmenové buňky.

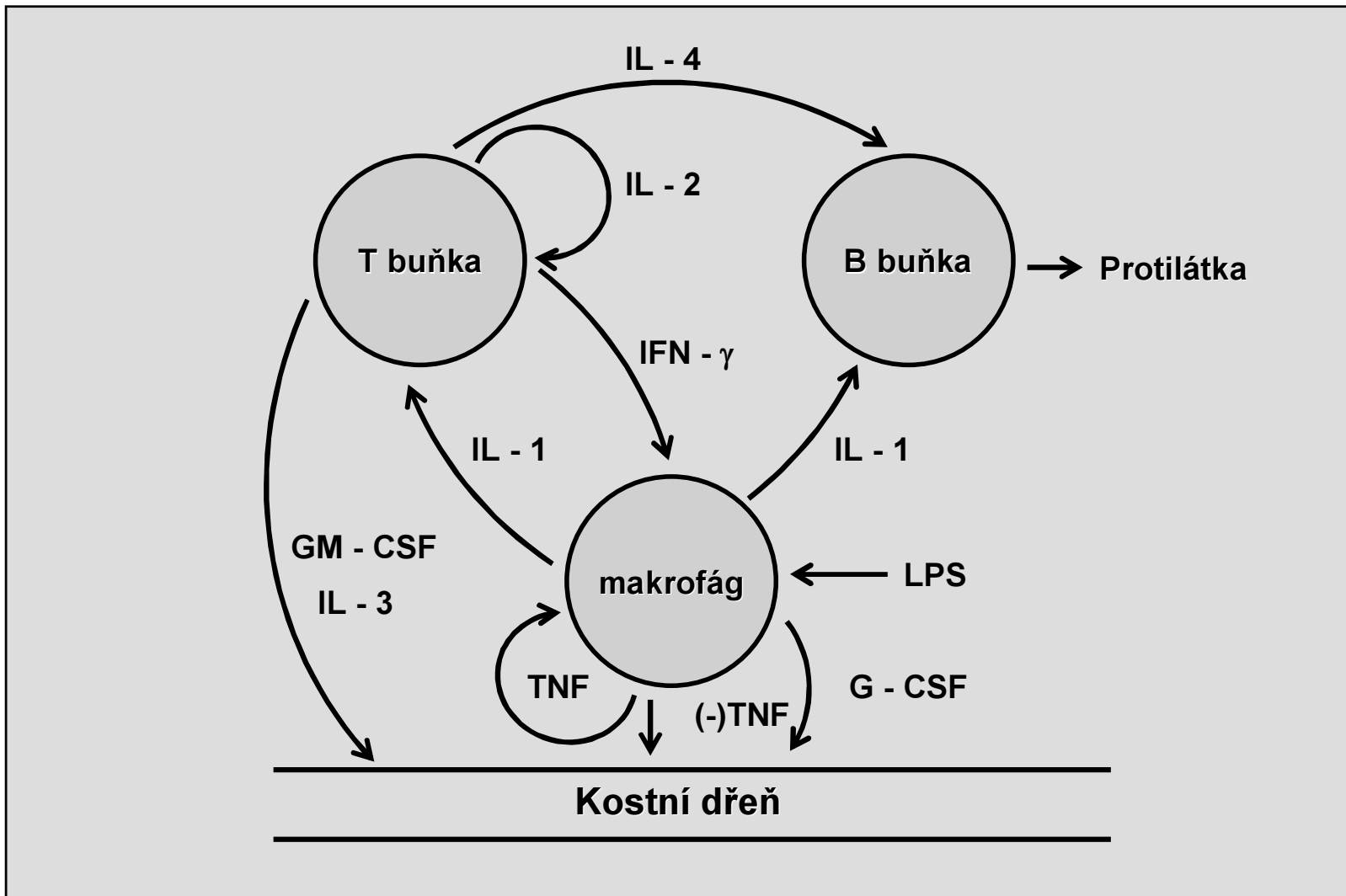
Různé typy leukémií se mohou lišit od normálních protějšků tím, že nevyžadují dále blízký buněčný kontakt pro růstovou expanzi a cirkulaci v krvi.

Při vývoji buněk kostní dřeně existuje kontrola a rovnováha, která limituje celkovou buněčnost a odpověď na stresy jako záření, krvácení a pod. Existují údaje o negativních regulátorech kmenových i líniově specifických buněk, např. TGF beta produkovaný stromálními buňkami.

Pozornost věnována tomu jak kmenové buňky a různé leukemie unikají této negativní kontrole.



Model prostorové organizace hemopoetických kmenových buněk a růstových faktorů v mikroprostředí kostní dřeně



Sít' interakce cytokinů, pozitivní a negativní zpětná vazba

IFN- γ , interferon gamma

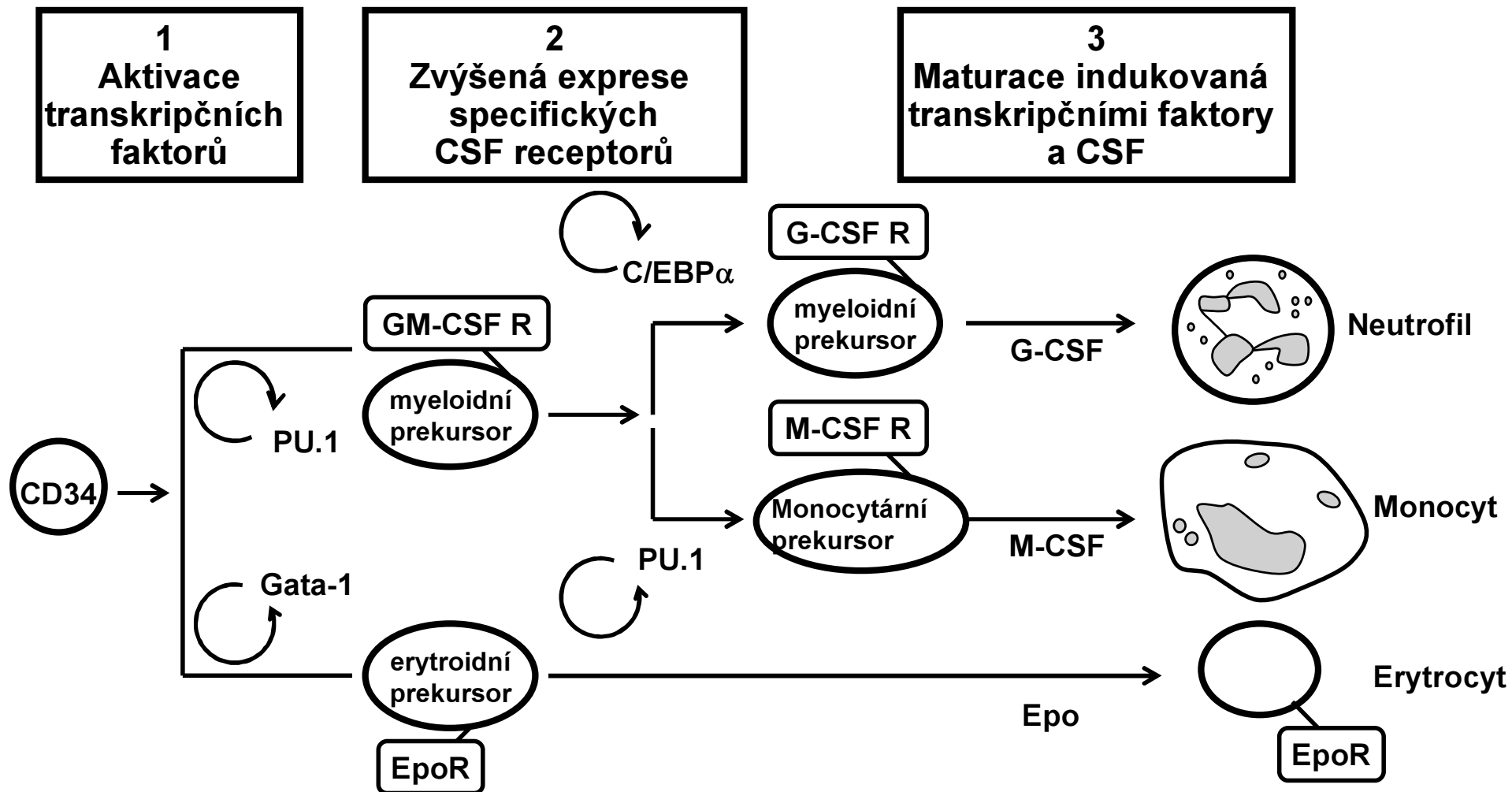
LPS, lipopolysacharide

TNF, tumor necrosis factor

Línie výzkumů mechanismů působení retroviru indukujícího erytroleukémii vedlo k odhalení, že virové proteiny mohou stimulovat růst hostitelských buněk tím, že působí jako pseudoligandy pro receptory růst. faktorů.

U lidských i živočišných leukémií byly identifikovány geny homologní se známými transkripčními aktivátory. Některé hrají roli v diferenciaci hemop. buněk, protože jsou homologní nebo identické s geny dříve identifikovanými v jiných experim. systémech jako geny ovlivňující vývoj a diferenciaci.

Existuje tedy vazba mezi onkogenezí a transkripční deregulací.



Model indukce hematopoetické diferenciace specifickými transkripčními faktory.

Transkripční faktory jsou málo exprimovány u kmenových buněk CD34. Působením blíže nedefinovaných signálů, jako je vliv interakce ve stromatu nebo signály růstových faktorů, dochází k upregulaci specifických tr. faktorů např. GATA-1 or PU.1. To vede k jejich autoregulaci a upregulaci specifických receptorů pro růstové faktory, což má za následek vzestup proliferace, diferenciace a supresi apoptózy specifických linií. Downregulace specifických faktorů (jako je GATA-1 během myeloidního vývoje) může také hrát důležitou úlohu.

V normální buňce je **rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, protože to souvisí s regulací buněčného cyklu**, který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci.

V nádorové buňce je v důsledku změn v signálních drahách organizace buněčného cyklu narušena.

Buňka je vybavena také **zpětnovazebnými mechanismy**, které mohou působit proti neobvyklým změnám v procesu bun. dělení.

Patří k nim např. **programovaná buněčná smrt - apoptóza**, schopnost buňky spáchat za určitých podmínek sebevraždu, tj. jestliže její základní komponenty jsou porušeny nebo jestliže je její kontrolní systém deregulován.

Tak působí např. poškození chromozomální DNA. V tomto procesu se účastní také specifické geny např. p53 nebo bcl-2. Mutace těchto genů pak způsobují poruchy apoptózy.

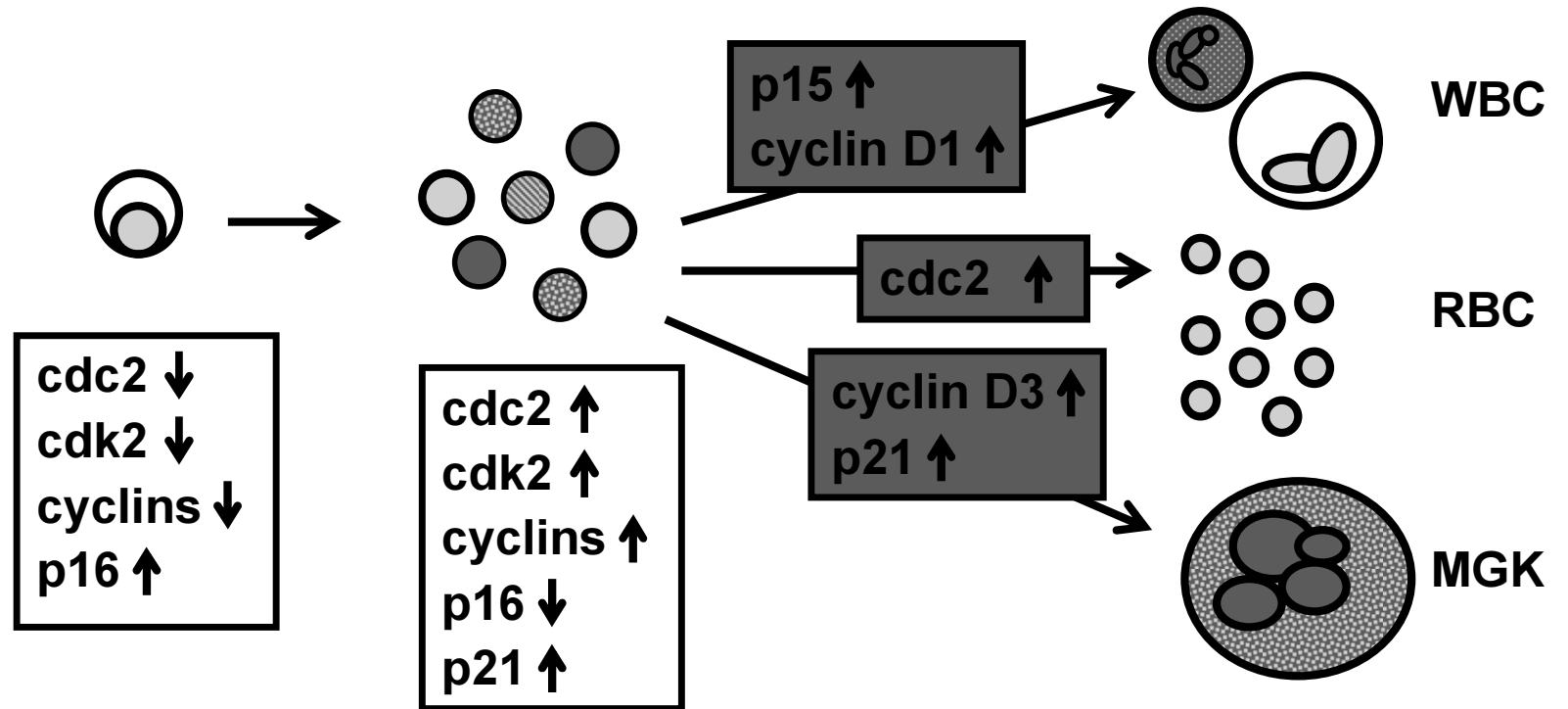
Neschopnost apoptózy přispívá ke vzniku nádorů a k jejich rezistenci k terapii.

Cell Cycle Control Genes in Haematopoiesis

Differentiation

Cell type: Stem cells Committed progenitors Morphologically-identifiable cells

Function: Self renewal Blood pool expansion Terminal differentiation



Cell cycle status:

G0/G1 arrest
(slow cycling)

S-phase entry
(active cycling)

G0/G1 arrest
(differentiated)

Expresse genů kontrolujících buněčný cyklus v jednotlivých stádiích hematopoetické diferenciace a její vztah k funkčnímu stavu.

TERAPEUTICKÉ ASPEKTY VYUŽITÍ CYTOKINŮ

Identifikace řady protoonkogenů jako růst. faktorů nebo jejich receptorů a důležité účinky těchto proteinů na hemopoetické buňky vedly k hledání dysregulace růst. faktorů a jejich receptorů u leukémií.

Biologická terapie s využitím cytokinů a růstových faktorů představuje zcela nový přístup.

Hemopoéza může být ovlivňována buď hemopoetickými růstovými faktory nebo negativními regulátory, které mohou zabránit poškození kmenové buňky během chemoterapie. Na základě poznatků o autokrinních mechanismech růstu mohou být klidové maligní buňky uvedeny do buněčného cyklu svými růstovými faktory, čímž se stanou citlivější k chemoterapii.

Vědomosti o **biologické terapii** jsou teprve na počátku, zvláště pokud se týče všech aspektů **propojené sítě cytokinů**.

Cytokiny a růstové faktory přenášejí signály mezi hemopoetickým a imunitním systémem buď samotné nebo indukcí uvolňování dalších cytokinů.

KONTROLA HEMOPOÉZY A LÉČBA

- ▶ pozitivní regulace - využití hemopoetických tzv. kolonie stimulujících růstových faktorů (CSF): erythropoetin, G-CSF - granulocytární růst. faktor, M-CSF - monocytární růst. faktor, GM-CSF - granulocytární-makrofágový růst. faktor, interleukin3 (IL-3)
- ▶ negativní regulace hemopoézy - prevence poškození kmenových buněk při chemoterapii - TGF β
- ▶ autokrinní růst - blokáda přenosu růstových signálů antagonisty růstových faktorů, receptorů a inhibitory dalších stupňů přenosu signálů (inhibitory PKC, lipidového metabolismu, “antisense” látky, atd.)
- ▶ imunomodulační látky - ovlivnění imunitního systému hostitele (IL-2, interferon alfa a gama)

Hemopoéza je regulována více než 20 dobře charakterizovanými faktory definovanými jako kolonie stimulující faktory, interleukiny a cytokiny. Některé z těchto faktorů jsou běžně používány, ale potenciální klinické využití není úplně objasněno. První byl využit **erythropoetin**. Ovlivňování pacientů cytokiny podléhá zcela jiným pravidlům, nežli působení cytotoxickými látkami.

Cytokiny mají široké spektrum účinků *in vivo* jako je modulace imunitní odpovědi, stimulace hemopoézy, přímá regulace buněčného růstu a diferenciaci, toxicita pro nádorové buňky, účinky na vaskularizaci nádorů apod.

Navíc nevykazují jen primární účinky, ale spouštějí kaskádu sekundárních účinků.

Erythropoetin

- ▶ stimulace erythropoézy po chemoterapii a transplantaci KD
- ▶ u některých lymfoproliferačních poruch jako jsou mnohočetné myelomy a chronická lymfocytární leukémie
- ▶ u anémií spojených s chronickým onemocněním (nádory, AIDS)
- ▶ v programech autologního odběru krve

CSF (colony stimulating factors, GM-CSF, G-CSF)

- ▶ prevence a ovlivnění myelosuprese
- ▶ intenzifikace chemoterapeutických programů s nebo bez autologní podpory progenitorů z kostní dřeně (KD) nebo periferní krve
- ▶ rekonstituce krvetvorby po chemo- a radioterapii a autogenní nebo allogenní transplantace KD
- ▶ podpora a expanze progenitorů periferní krve
- ▶ stimulace hemopoézy u syndromů poruch v KD jako je cyklická neutropenie, aplastická anémie
- ▶ aktivace efektorových buněčných funkcí (AIDS, poruchy funkce leukocytů)
- ▶ zvýšení účinnosti cytotoxických léčiv vybuzením klidových leukemických buněk

Kostní dřeň obsahuje asi 0.001% pravých kmenových buněk, 10x víc “multilineage” progenitorů a 100x víc líniově specifických progenitorů. U dospělců cirkuluje v perif. krvi asi 5-10% počtu progenitorových buněk v KD. Představují asi 0.1% mononukleární frakce perif. krve. Vyvinuty metody zvýšení cirkulujících progenitorů aplikací specif. cytokinů.

CD34+ je glykosylovaný povrchový antigen exprimovaný především kmenovými a méně progenitorovými buňkami.

Byla vyvinuta řada metod pro selekci buněk s tímto znakem. S vývojem metod *in vitro* kultivace lze tyto buňky namnožit s pomocí synergického působení kombinace cytokinů (steel faktor + další), pak reinfuze.

Využití vysokých dávek chemoterapeutik, které účinně působí na citlivé nádory je omezeno vedlejšími účinky s hematologickou toxicitou.

Jednou z cest jak překonat tyto obtíže je

metoda transplantace kmenových buněk z periferní krve (PBSC),
která je alternativou k transplantaci kostní dřeně (KD) a je stále více využívána.

Výhody:

- ▶ sběr PBSC leukaferézou probíhá mimo pacienta bez potřeby anestézie a možnosti autograftu v případě ovlivnění KD infiltrací nádoru, fibrózou nebo hypoplasií po chemo- a radioterapii
- ▶ dochází k rychlejšímu obnovení granulocytopoézy a megakaryocytopoézy
- ▶ redukována možná kontaminace transplantantu maligními buňkami.

MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM (MDS)

je získaná klonální porucha kostní dřeně charakterizovaná kvantitativními i kvalitativními poruchami v hemopoéze (hodně u starších lidí - není možná drastická terapie)

Řada léčebných protokolů je zaměřena na využití diferenciacních látek k podpoře zrání blokových buněk.

Existují *in vitro* modely, kde je možno pomocí retinové kyseliny, DMSO nebo vit D3 příp. G-CSF, GM-CSF navodit diferenciaci. Avšak v praxi u pacientů nepřinášejí žádoucí výsledky.

Kyselina all-trans retinová (ATRA) je nyní efektivním lékem při léčbě akutní promyelocytární leukémie (APL).

Na MDS má však malý účinek (genetický důvod - absence translokace 15,17 důležité pravděp. pro klinický účinek ATRA).

Rekombinantní růst. faktory jako GM-CSF a IL-3 jsou u MDS pacientů úspěšně využívány ke zvýšení počtu cirkulujících bílýchrvinek a destiček.

Diferenciace myeloidních leukemických buněk do nemaligních zralých makrofágů nebo granulocytů

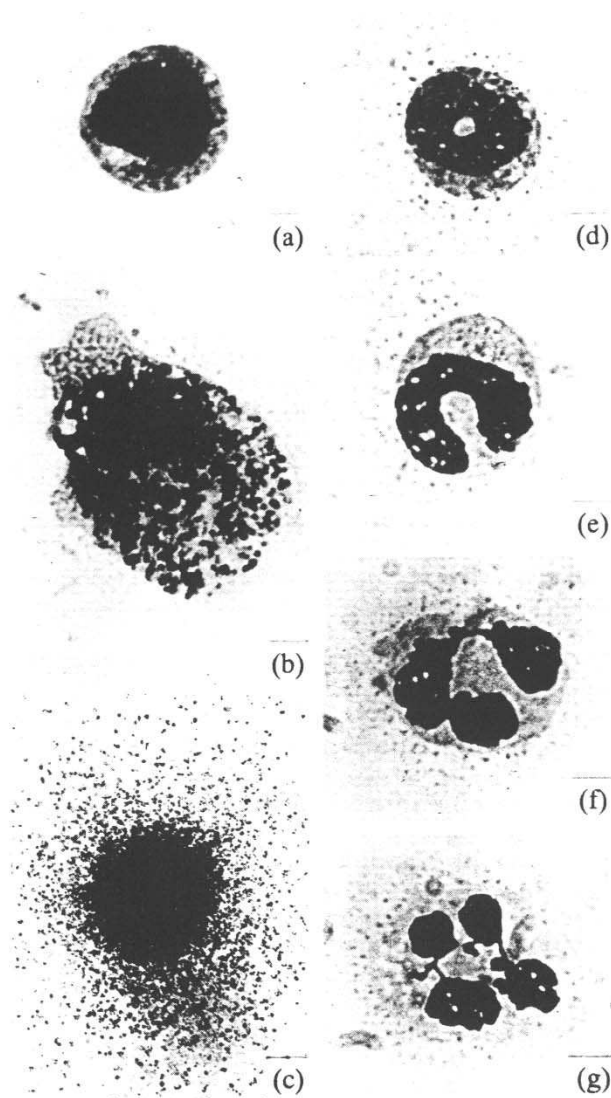


Figure 5. Differentiation of myeloid leukaemic cells to non-malignant mature macrophages or granulocytes by normal myeloid differentiation-inducing protein IL-6. (a) Leukaemic cell; (b) macrophage; (c) colony of cells with macrophages; (d-g) stages in differentiation to granulocytes [74].