



Nádory krvetvorby

Obnovné buněčné populace

Leukemie a lymfomy

Diagnostika

Kontrola hemopoézy a léčba

Využití cytokinů



Sebeobnovné buněčné populace

Obnovné buněčné populace

Hierarchická struktura vývoje tkání:

- kožní epitel
- střevní epitel
- krvevorné systémy
- zárodečné populace

Kmenové totipotentní 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

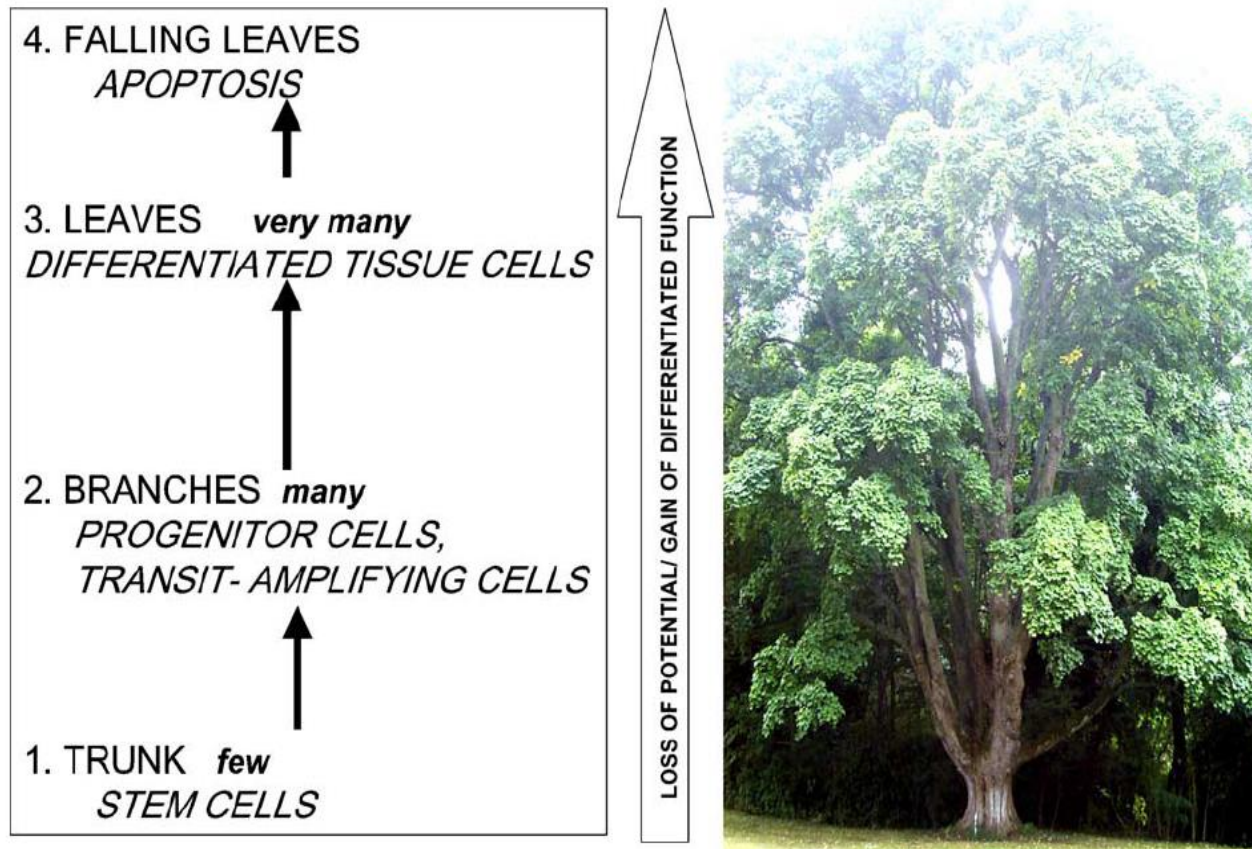
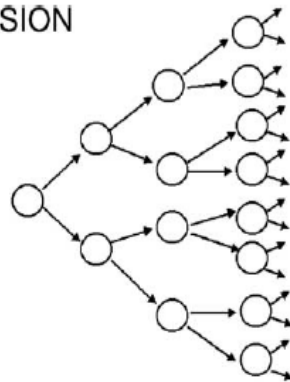


Fig. 1. Stem cell lineages in adult tissues and normal tissue renewal. In analogy to the structure of a tree with a very small trunk, normal tissue stem cells represent a very small proportion of the tissue cells and do not normally proliferate. The differentiating progeny of the tissue-determined stem 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.

Symetrické a asymetrické dělení

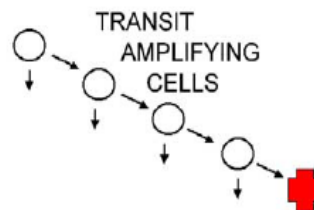
SYMMETRIC DIVISION



EMBRYONAL
STEM CELLS

LOGARITHMIC
EXPANSION

ASYMMETRIC DIVISION



GERMINAL AND
SOMATIC
STEM CELLS

LINEAR EXPANSION

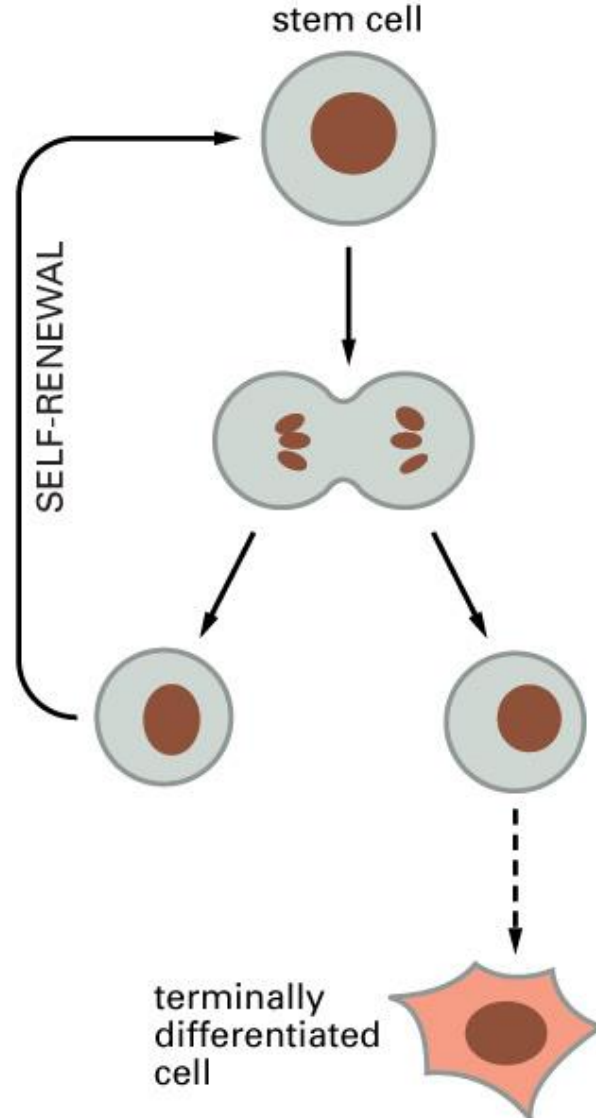
Fig. 2. Symmetric and asymmetric division. When cells divide symmetrically, each daughter cell is identical and retains the potential of the parental cell. When cells divide asymmetrically, one of the daughter cells remains a stem cell, whereas the other begins the process of determination [310,311]. 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.

Symetrické dělení – identické dceřinné buňky, embryonální kmenové buňky, logaritmický nárůst

Asymetrické dělení – 1 dceřinná buňka zůstává kmenová, druhá je základem diferencující populace, sebeobnova tkání

Sell S., Crit Rev Oncol Hematol 51, 2004:1-28

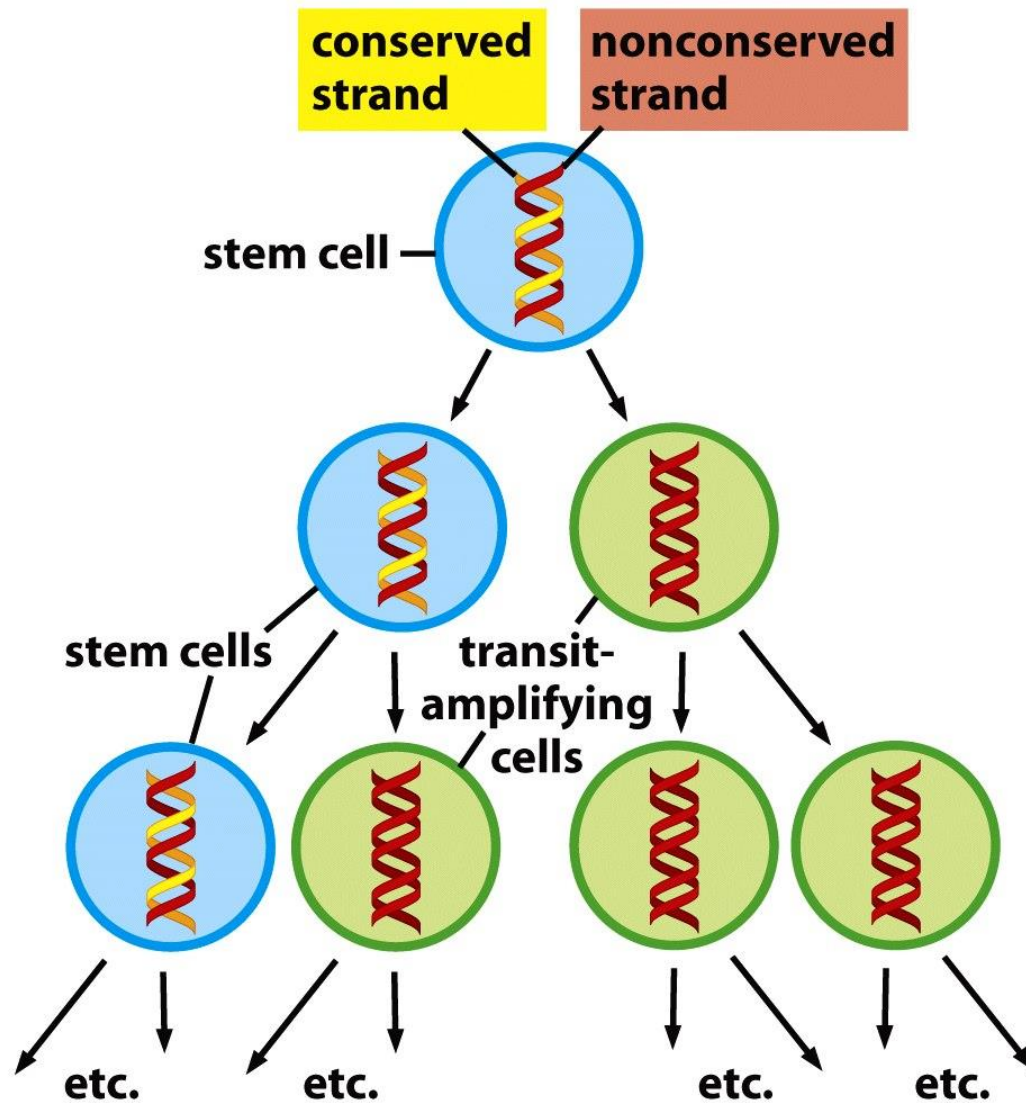
Definice kmenové buňky



Asymetrické dělení:
2 různé dceřinné buňky
zajišťující sebeobnovu a
diferenciaci

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

Replikace DNA kmenové buňky



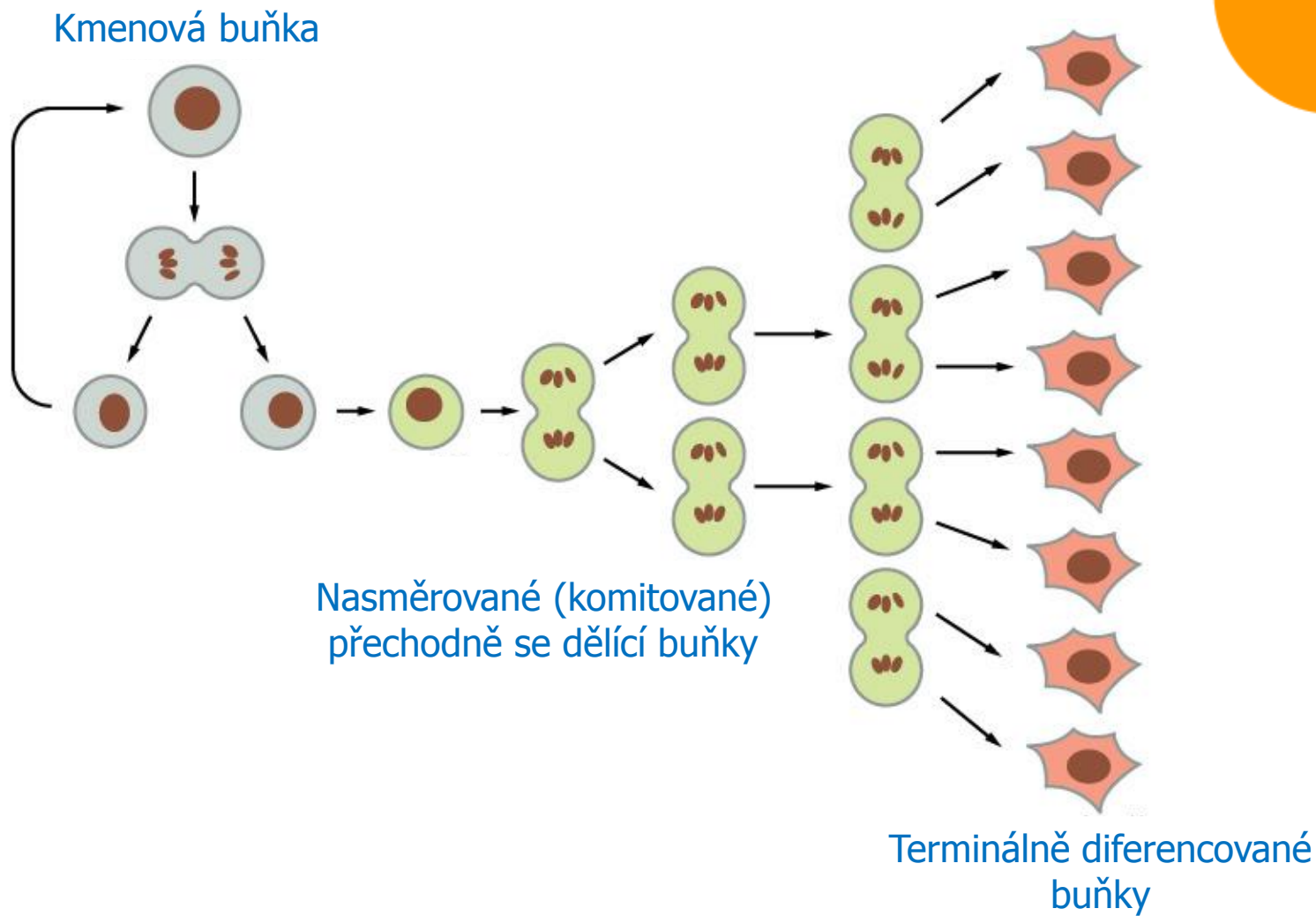
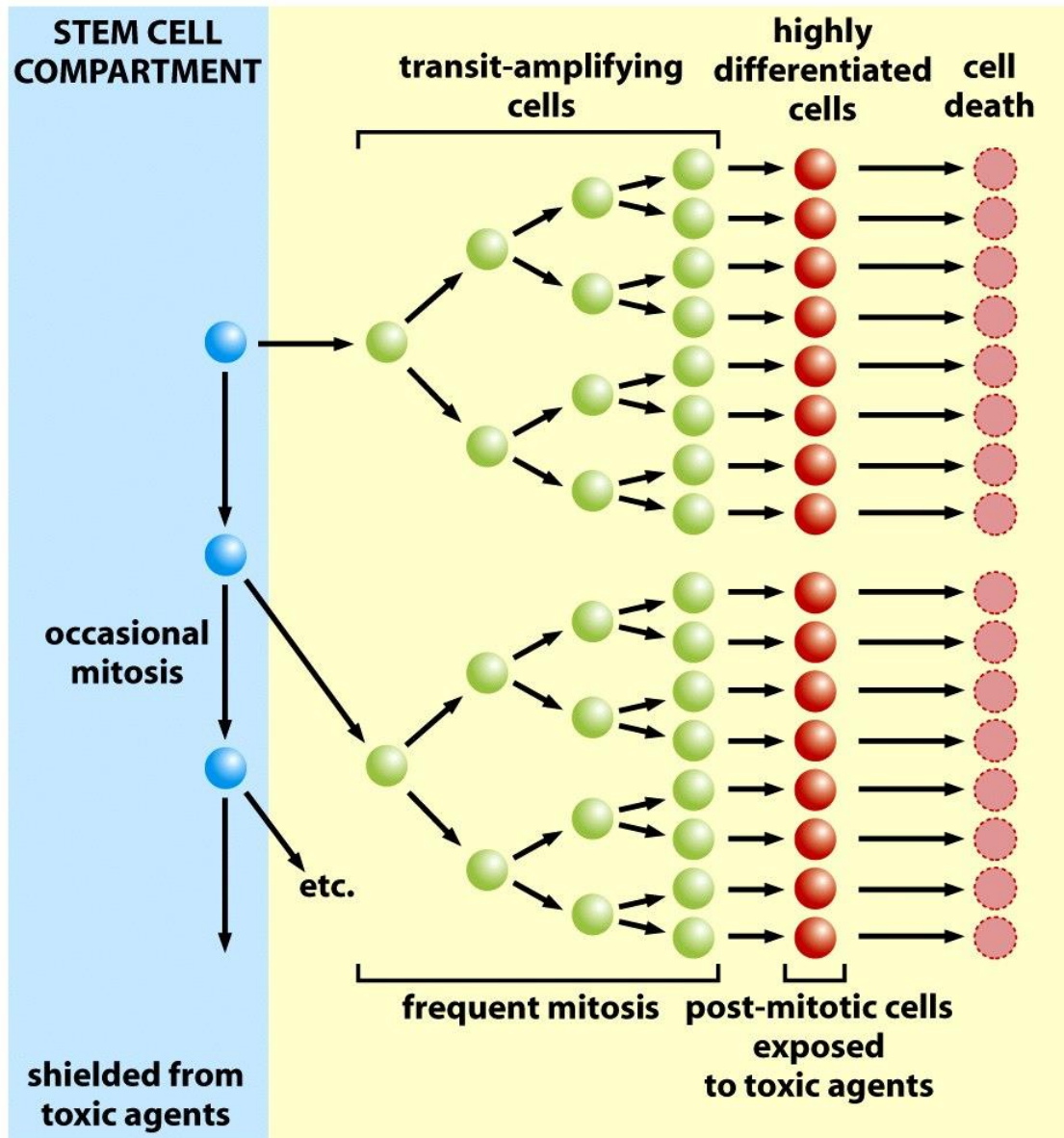
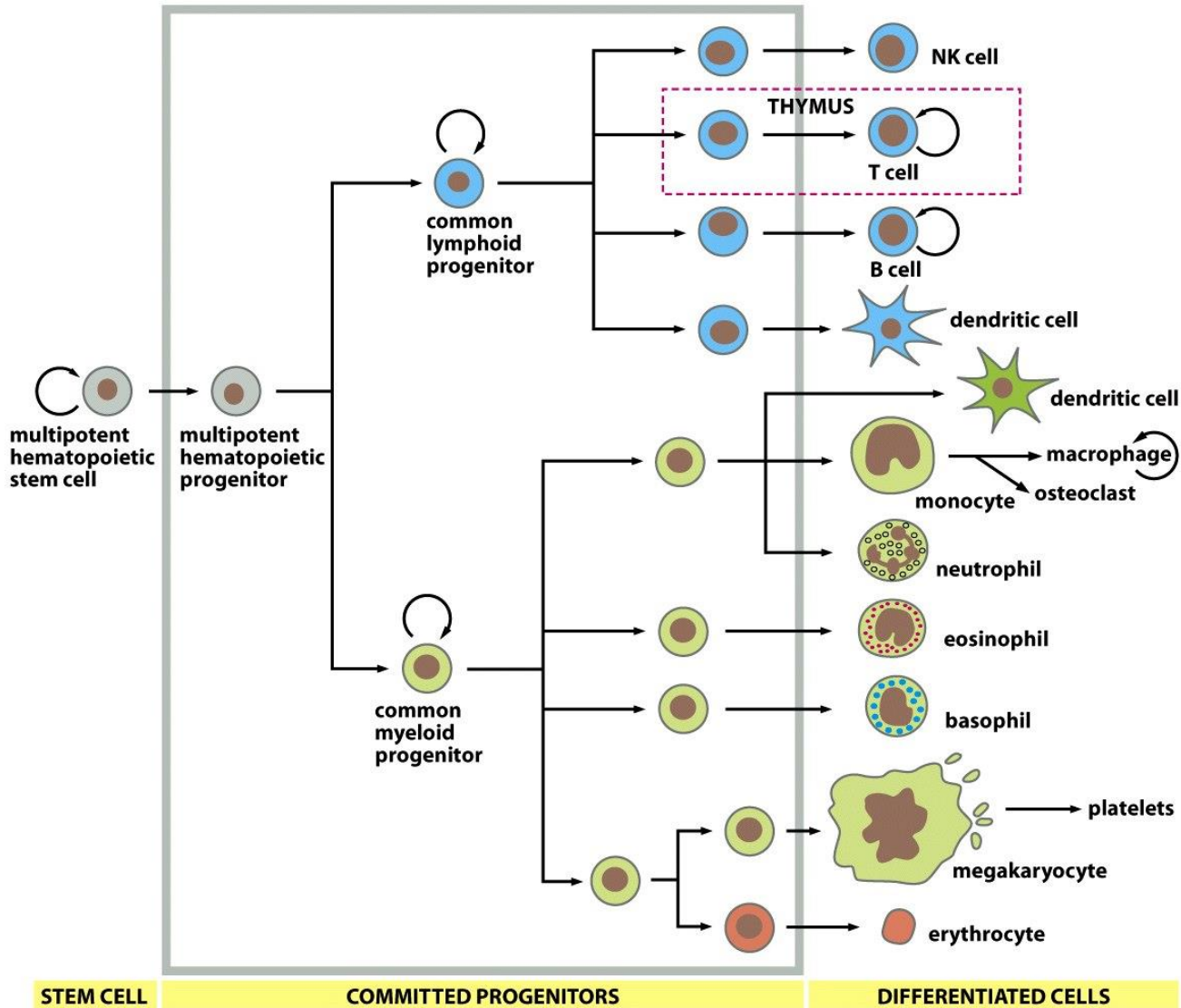


Figure 22-7. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Sebeobnovná buněčná populace



Sebeobnovná krvetvorná tkáň



Předpokládaná diferenační dráha kmenové buňky kostní dřeně

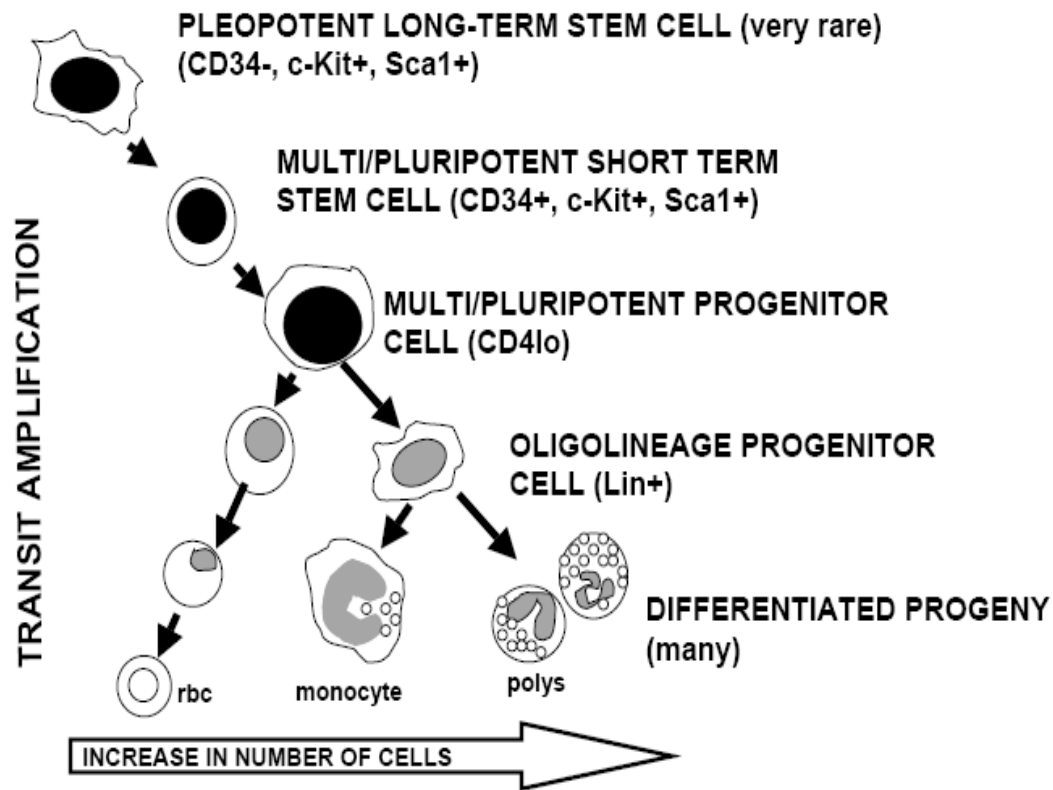
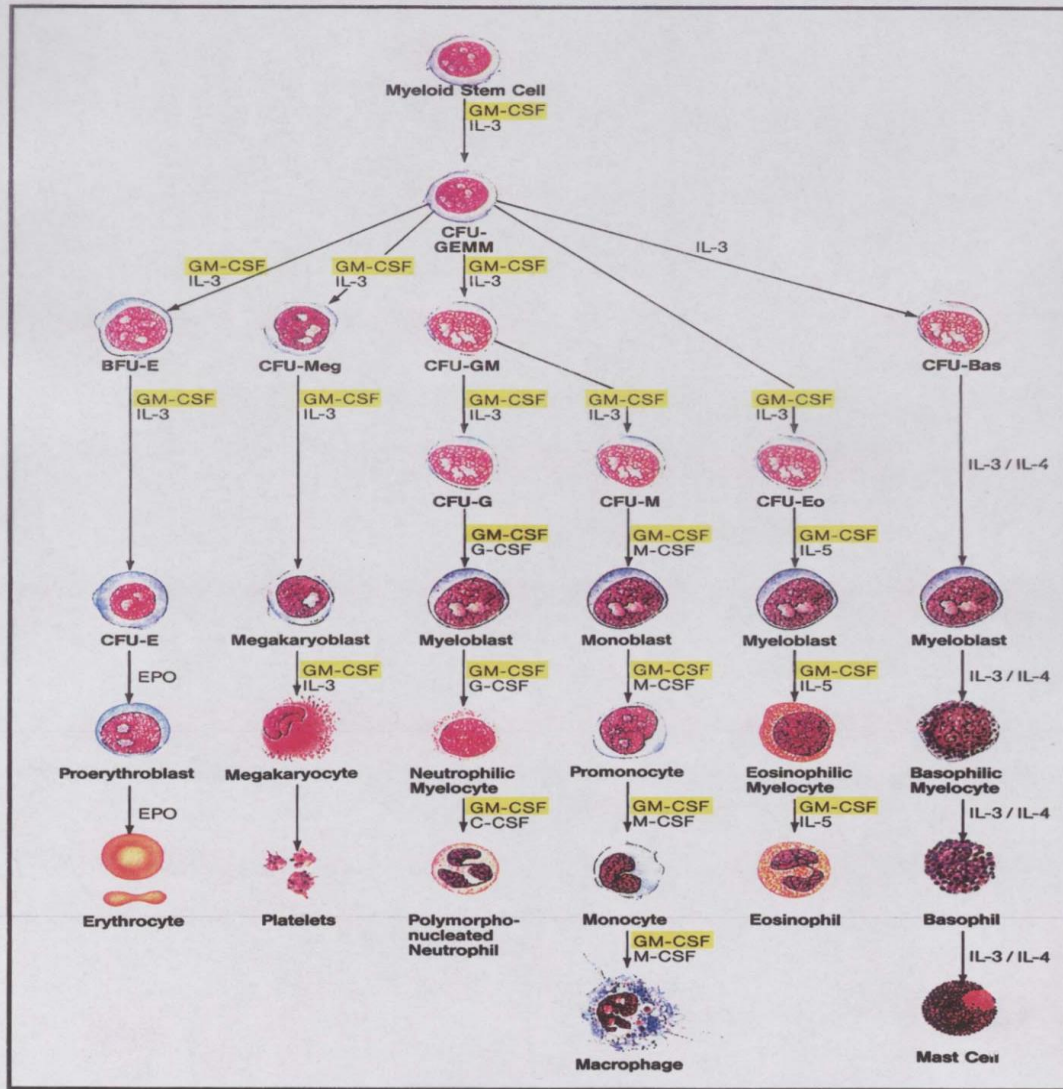


Fig. 9. Hematopoietic Cell Lineage. Suggested differentiation pathway of bone marrow stem cells in the hematopoietic pathway. The multi/pluripotent stem cell is a reserve stem cell and normally proliferates very rarely. The expansion of the cell lineage is accomplished by transit amplifying cells that 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 hematopoetická buňka je klidová kmenová buňka reagující na stres. Z ní vzniká většina proliferujících buněk v kostní dřeni (**progenitory**)
Zralé diferencované buňky – erytrocyty (rbc) – bez jádra,
 polymorfonukleární b. – inaktivované jádro

Sell S., Crit Rev Oncol Hematol 51, 2004:1-28

The early acting growth factor which maximises host defense



V jednotlivých fázích krvetvorby a u různých typů krevních buněk se uplatňují **specifické růstové a viabilní faktory** (kolonie stimulující faktory – CSF, erythropoetin a interleukiny -IL)

Normální a narušená kontrola produkce z kmenové buňky

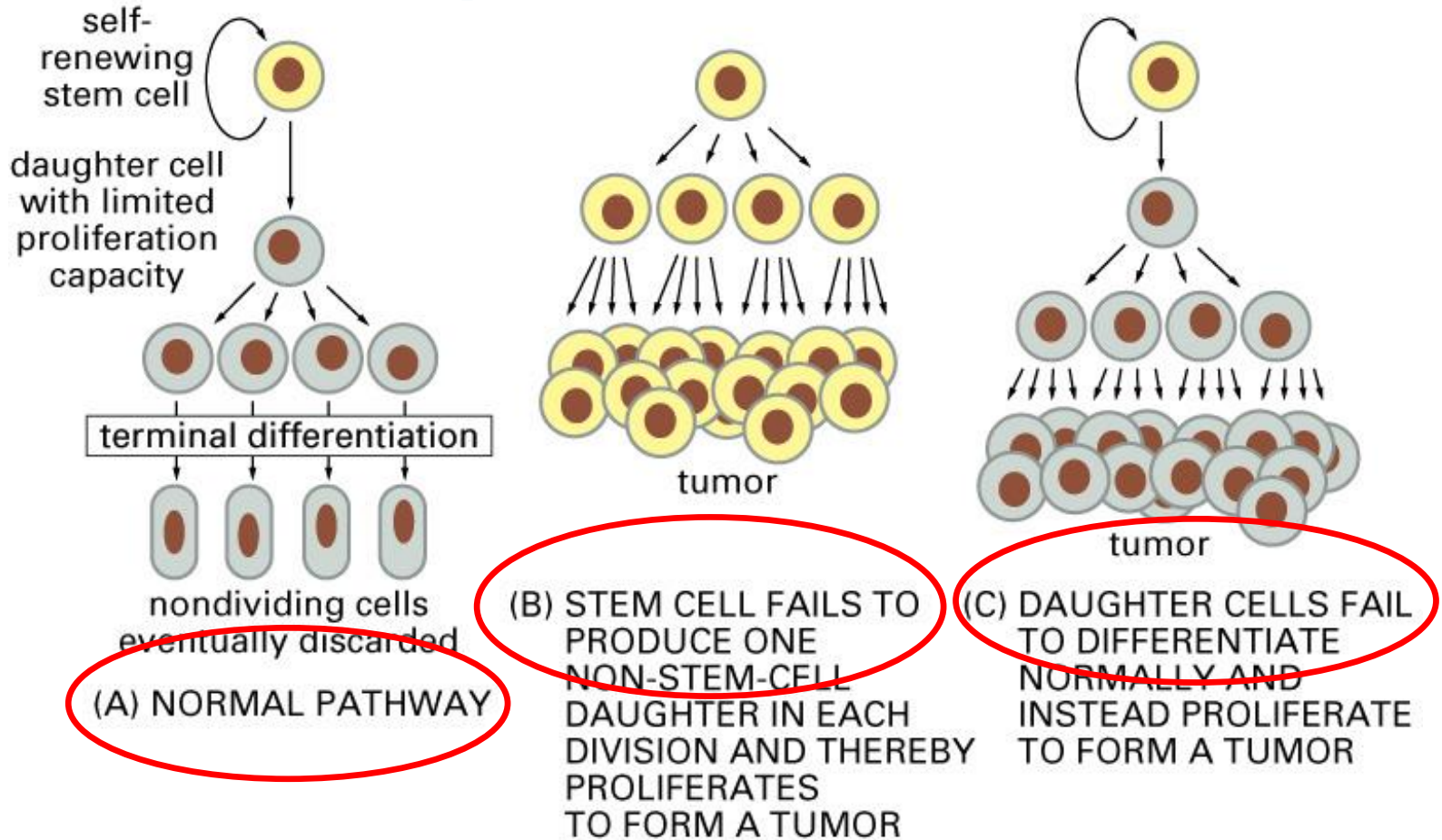


Figure 23–14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tvorba nádorů:

- Kmenová buňka produkuje jen nové kmenové buňky
- Dceřinná buňka není schopna normální diferenciace

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.

Poruchy krvetvorby

Anemie - snížená produkce erytrocytů

Polycytemie – zvýšená produkce erytrocytů

Kvantitativní poruchy se mohou týkat různých úrovní diferenciací erytrocytů

Trombocytopenie a **trombocytemie** – 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



Leukemie a lymfomy

Vznikají nekontrolovanou klonální proliferací a expanzí hemopoetických buněk, které ztratily schopnost normálně diferencovat do zralých krevních buněk.

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

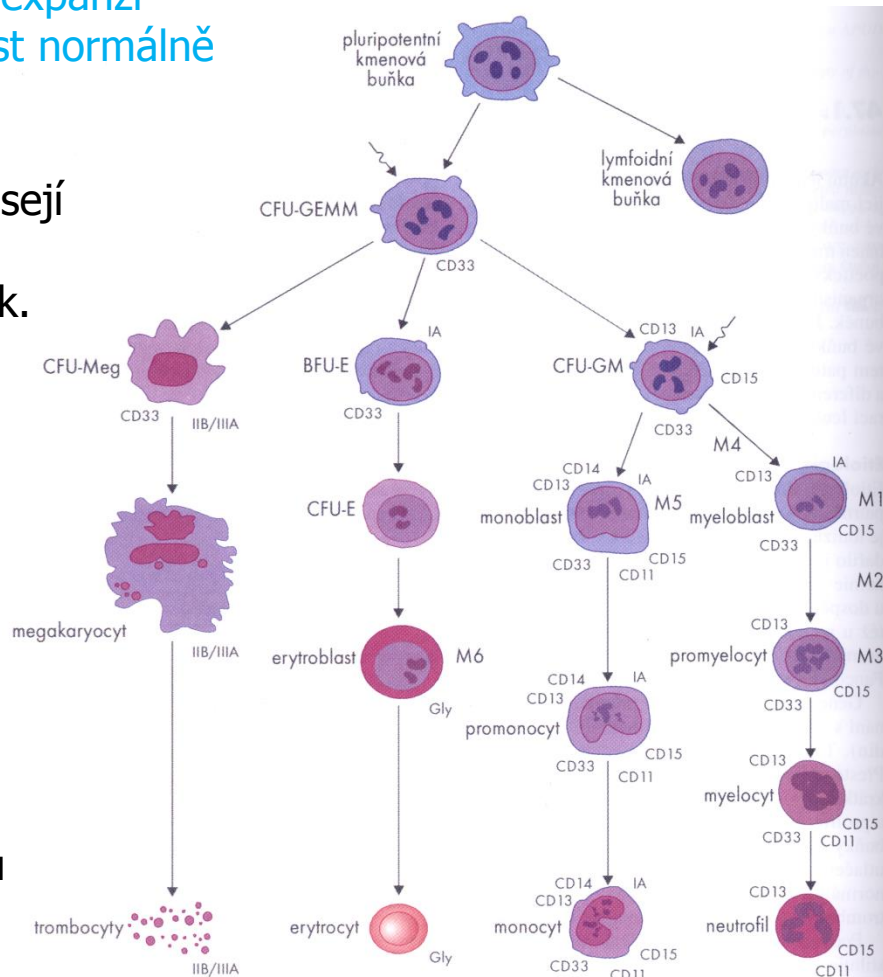
Vzniká na různých úrovních vývoje hemopoetických buněk.

Základní typy: lymfoidní a myeloidní, mnohdy těžko definovatelné.

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

CD (cluster of differentiation, stejný epitop) systém charakteristických povrchových antigenů (markerů).



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

Preleukemické stavy

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

- **myeloproliferační syndrom** - expanze růstu **chronické leukemie** (CLL, CML)
- **myelodysplasie** - porucha diferenciace

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

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

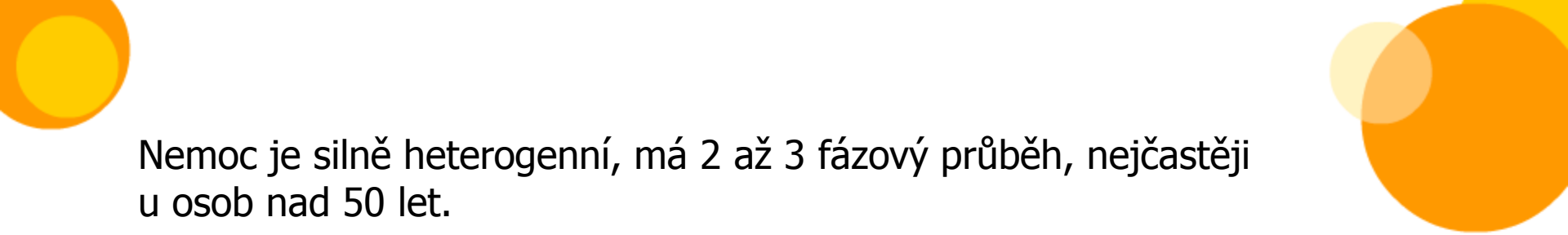
- **B-CLL** - nejčastější forma, zástava mezi pre-B a zralými B-lymfocyty
- **T-CLL** – méně častá, v etiologii infekce retrovirem HTVL-1, horší prognóza a odpověď na léčbu

Prolymfocytární leukemie (PLL)

Chronická myeloidní leukemie (CML)

je klonální myeloproliferativní onemocnění pluripotentní progenitorové buňky.

Zahrnuje myeloidní, erytroidní, 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.

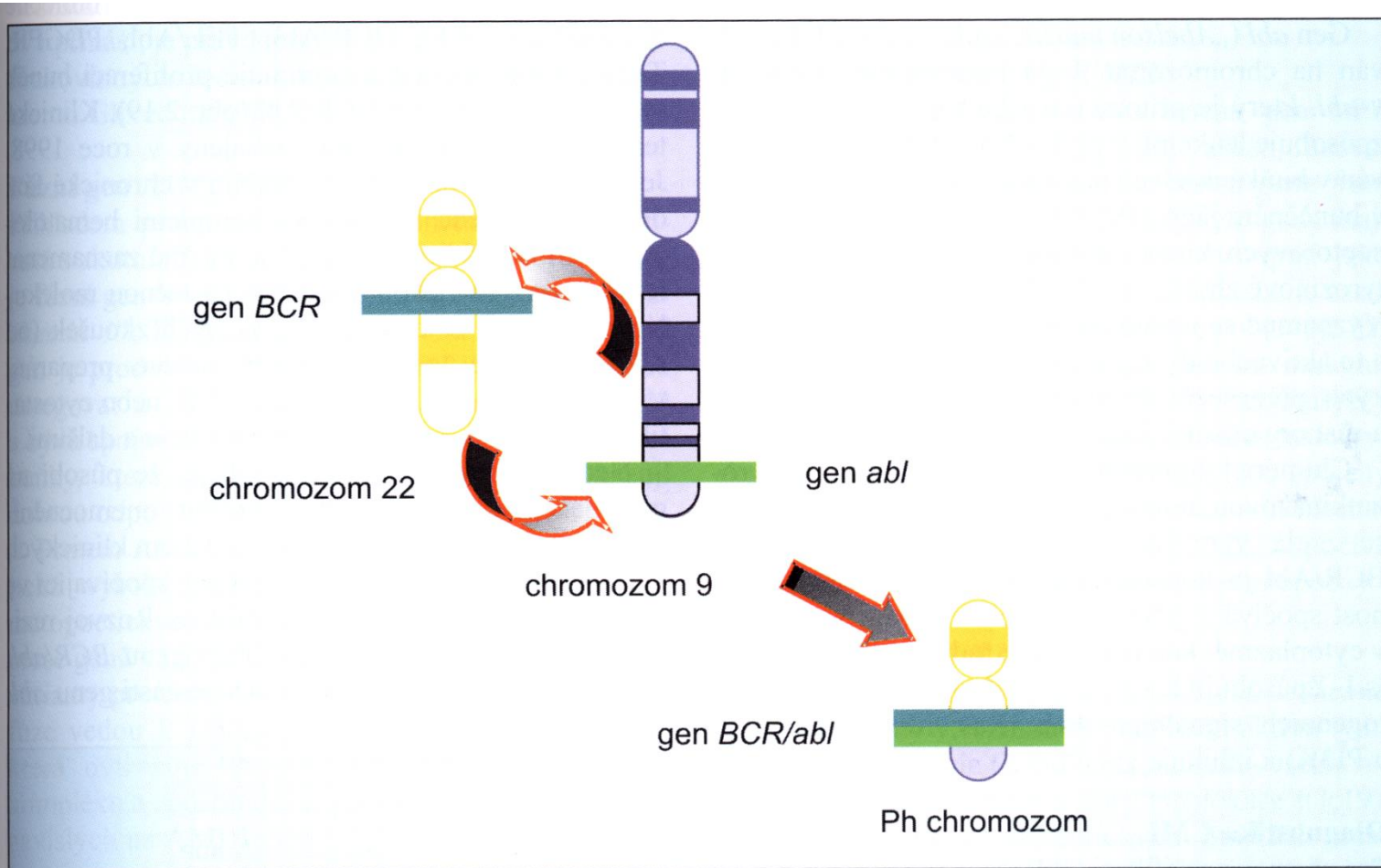
Typické genetické změny ovlivňující jak proliferaci (aktivované kinázy) tak apoptózu (Bcl-2)

Table 2

Some gene rearrangements in leukemias and lymphomas

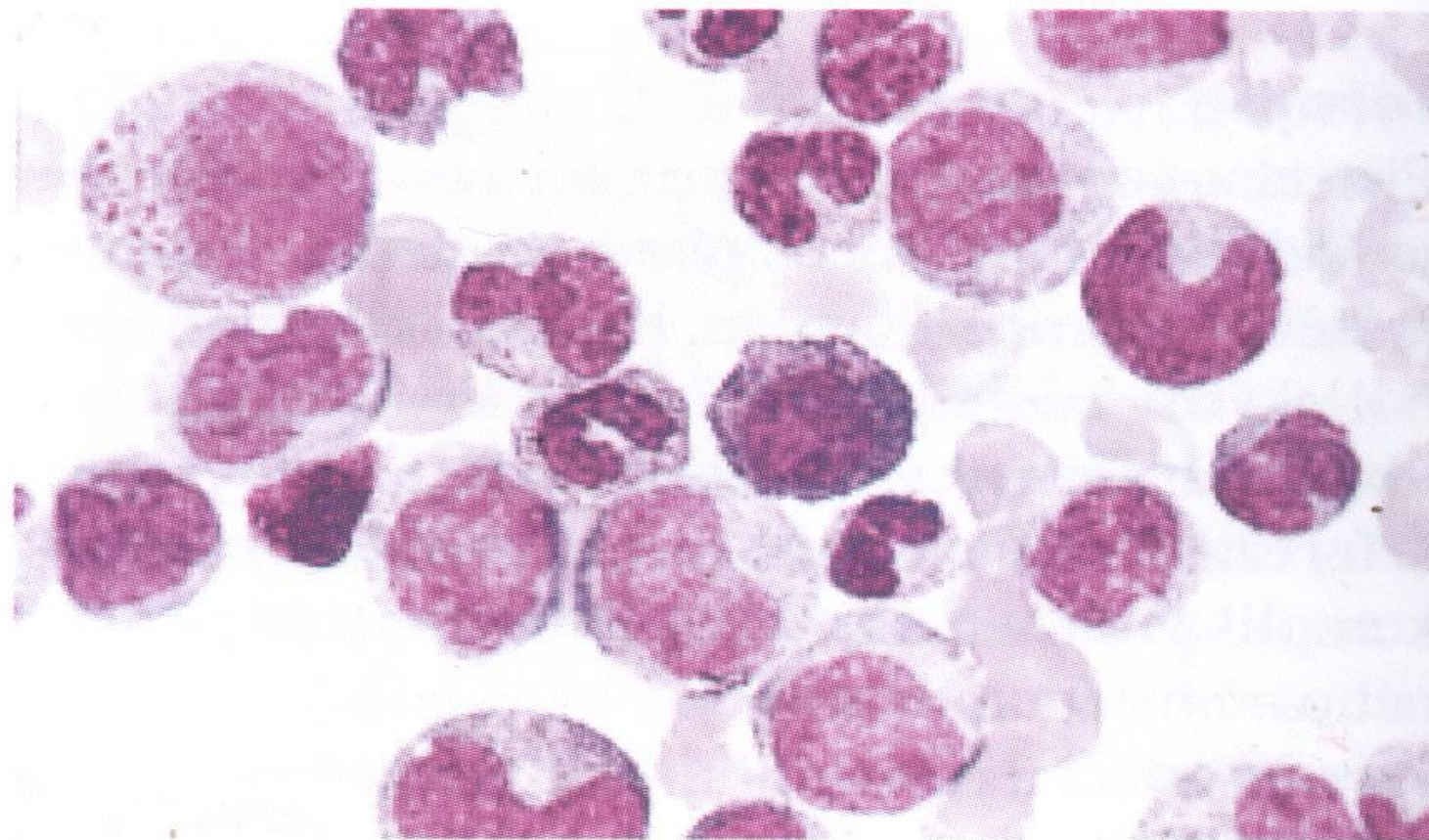
Leukemia/lymphoma	Gene rearrangement		Gene activated
CML	t9:22	bcr/abl	Tyrosine phosphorylase
AML	t8:21	IL-3R	Tyrosine kinase
APL	t15:17	PML/RAR α	Retinoic acid receptor, blocks diff.
ALL	t12:22	TEL/MN1	Transcription factors
	t9:12	TEL/abl	Tyrosine phosphorylase
Burkitt's (B-cell)	t8:14	IgG/myc	c-myc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



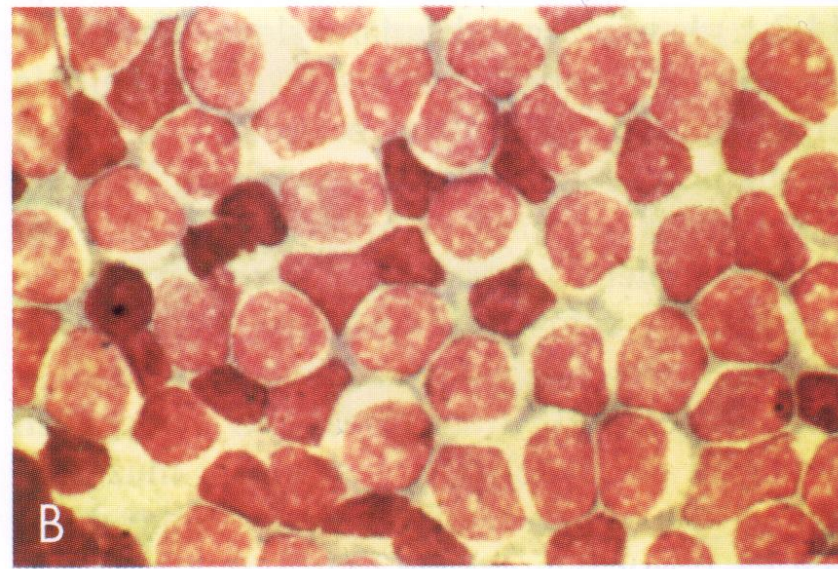
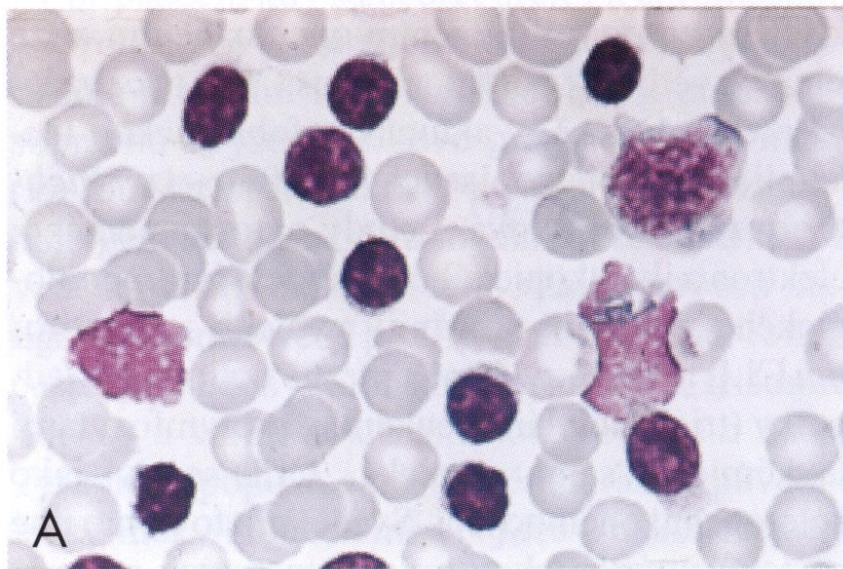
Obr. 2.17 Ph chromozom je produktem translokace $t(9;22)(q34;q11)$. Na Ph chromozomu vzniká fúzní gen *BCR/abl*, který se významně podílí na maligní transformaci hematopoetických prekurzorů.

Chronická myeloidní leukemie



Obr. 47.6. Kostní dřeň nemocného s CML

Chronická lymfatická leukemie (CLL)



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

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.

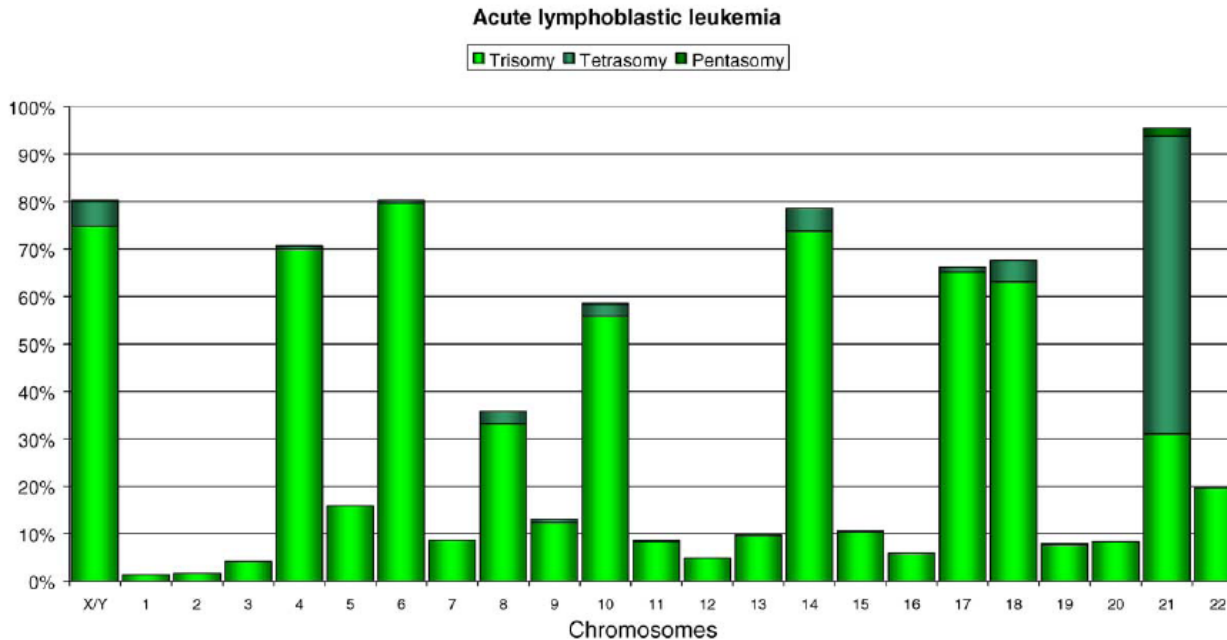


Fig. 1. Pattern of whole chromosome gains in massively hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia without concomitant structural chromosome changes. The most frequent polysomies are those of chromosomes 21 (most often tetrasomy), X, 6, 14, 4, 18, 17, and 10.

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 – genetické změny vedoucí ke konstitutivní aktivaci receptoru pro IL-3 – aktivace tyrosin kináz a proliferace.
Konstitutivní aktivace IL-3 receptoru podporuje růst všech typů myeloidní řady

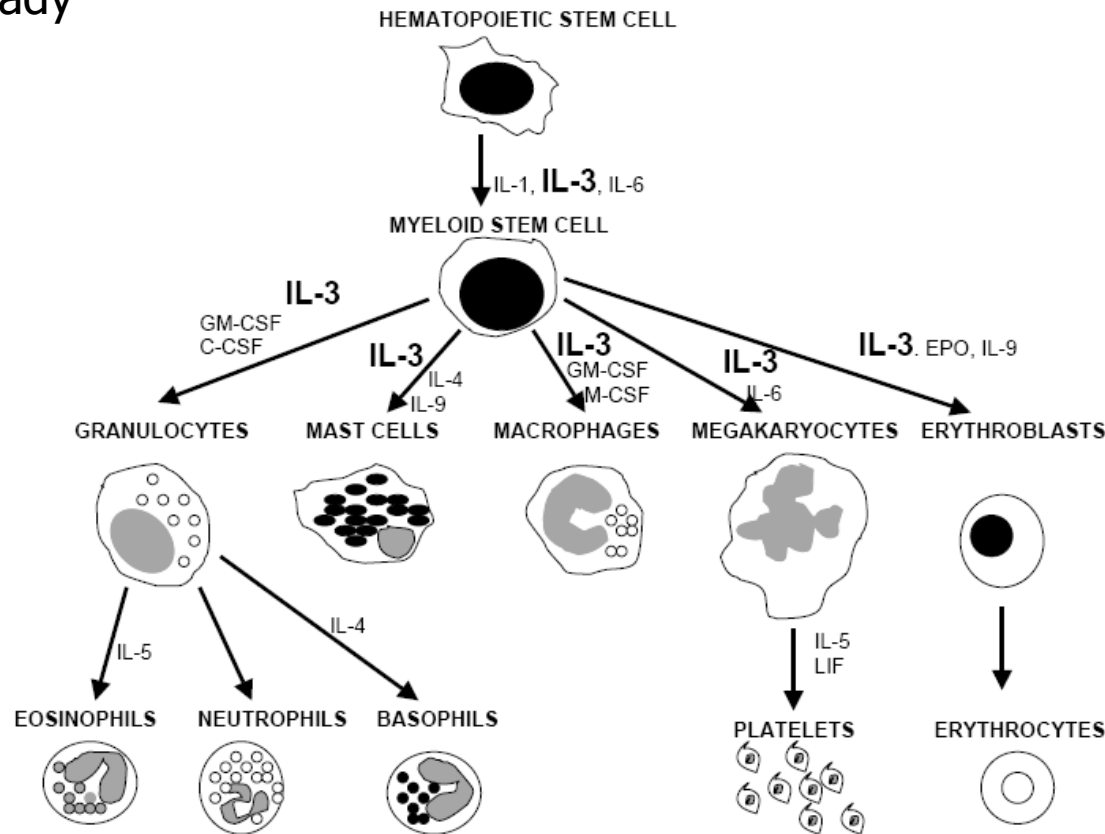


Fig. 10. Constitutive activation of the IL-3 receptor causes myelogenous leukemia. IL-3 is active in the proliferation and differentiation of all cells in the myeloid series, including polymorphonuclear leukocytes, monocytes, megakarocytes (platelets), and erythrocytes. Thus, constitutive activation 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 onkogenů

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.

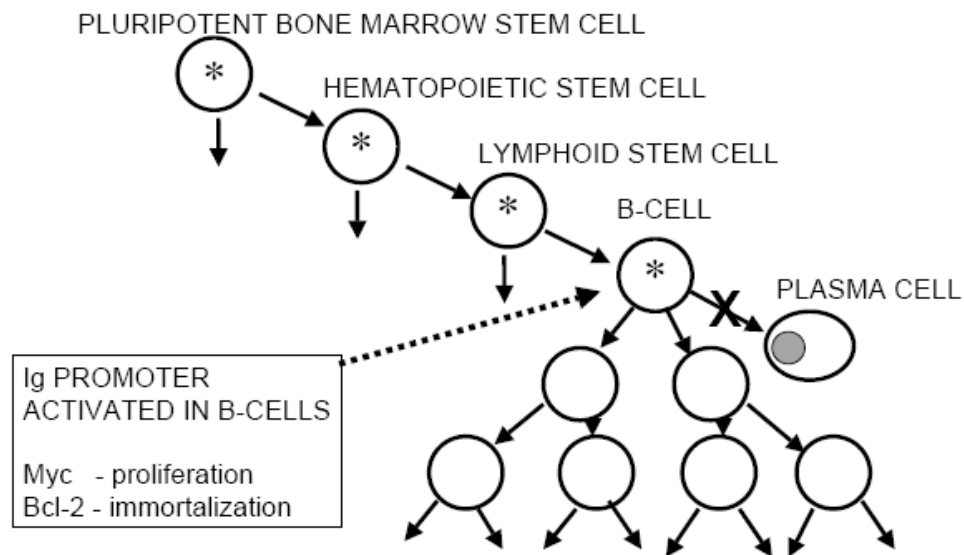
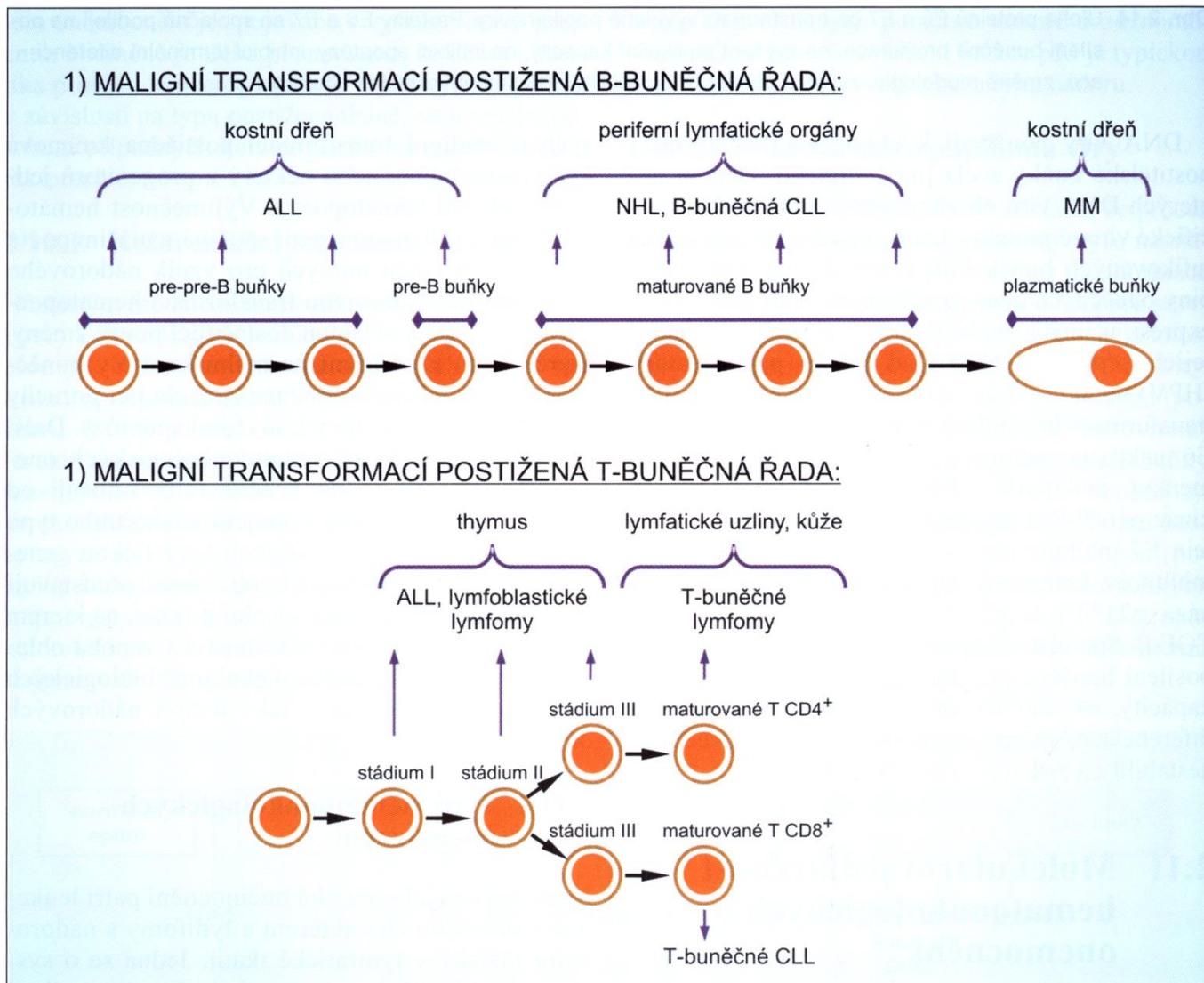
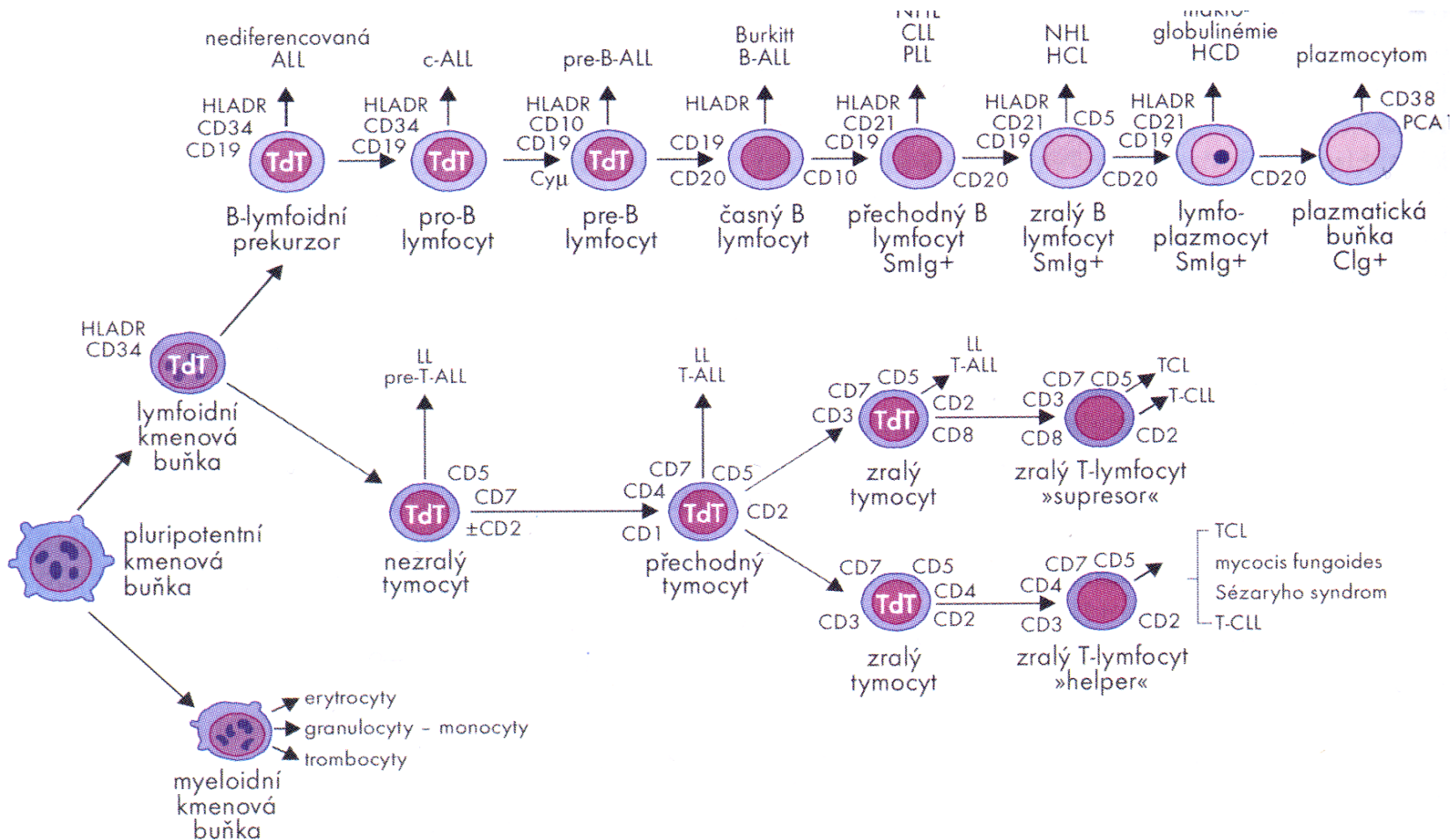


Fig. 11. Activation of immunoglobulin promoter linked to oncogene (*c-Myc*) and/or apoptosis blocking gene (*Bcl-2*) produces B-cell cancer in transgenic mouse model of Burkitt's lymphoma. B-cell lymphomas occur when the immunoglobulin gene promoter is linked to an oncogene (*c-Myc*) and/or a gene that 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.

Sell S, Crit Rev Oncol Hematol 51, 2004:1-28



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



Obr. 47.4. Schéma lymfoidní diferenciacie s vyjádřením vztahu k různým lymfoproliferačním onemocněním. Tato onemocnění mohou vznikat maligní transformací lymfocytu v kterémkoliv stadiu jeho postupného vy-
 zrávání. 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 – nehodgkinský lymfom; HCD – choroba z těžkých řetězců; LL – lymfocytární lymfom; SmIg – povrchový imunoglobulin; TdT – terminální deoxynukleotidyltransferáza; Clg – cytoplazmatický imunoglobulin; cALLA – společný leukemický antigen



Diagnostika, léčba, terapeutické využití cytokinů

Diagnostika

Nejdůležitější vyšetření, tzv. **imunofenotypizace**

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

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

Mikroskopické stanovení – morfologie

Molekulárně biologické metody – FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace)

Rostoucí frakce, morfologie a klinický průběh tří typů leukémií (akutní myeloidní leukémie, chronická myeloidní leukémie, chronická lymfocytární leukémie)

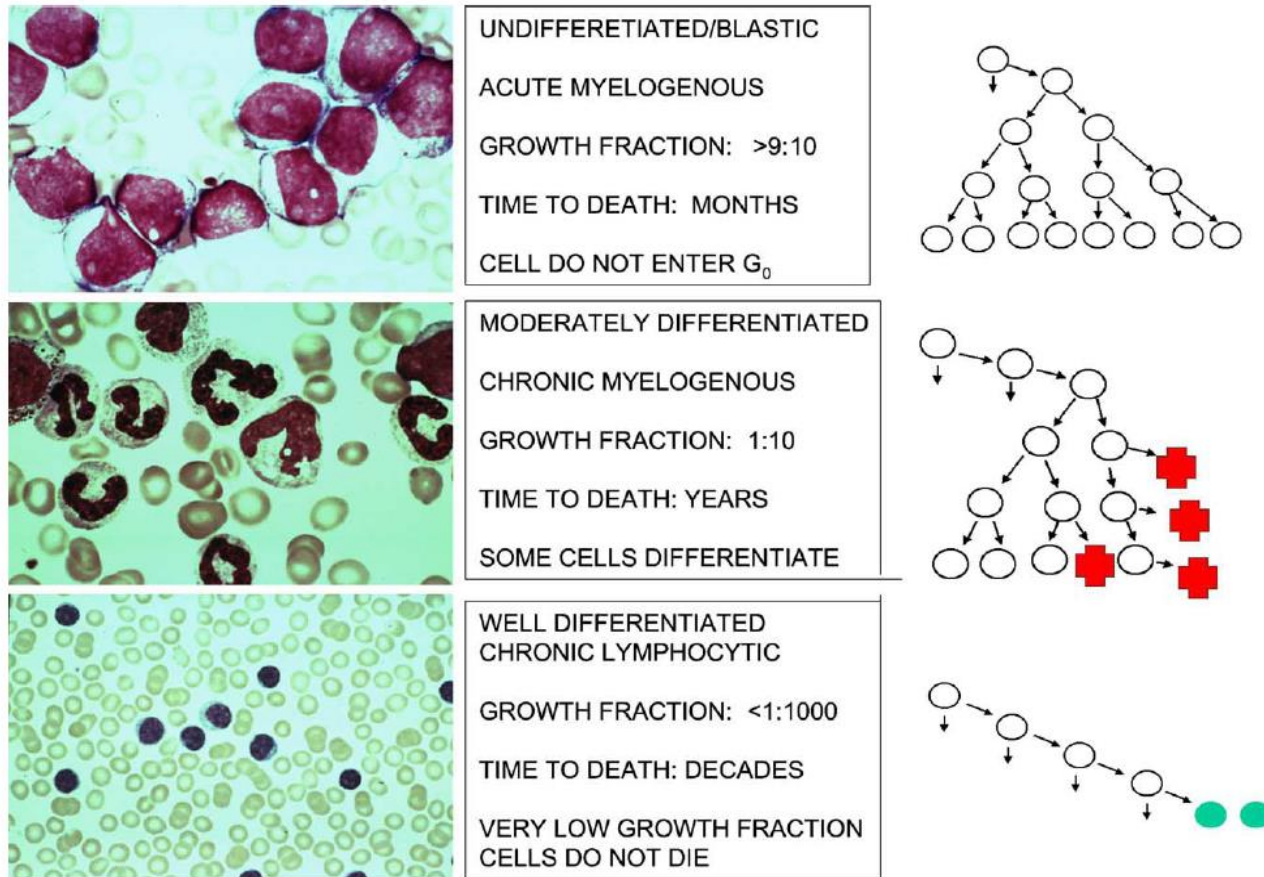
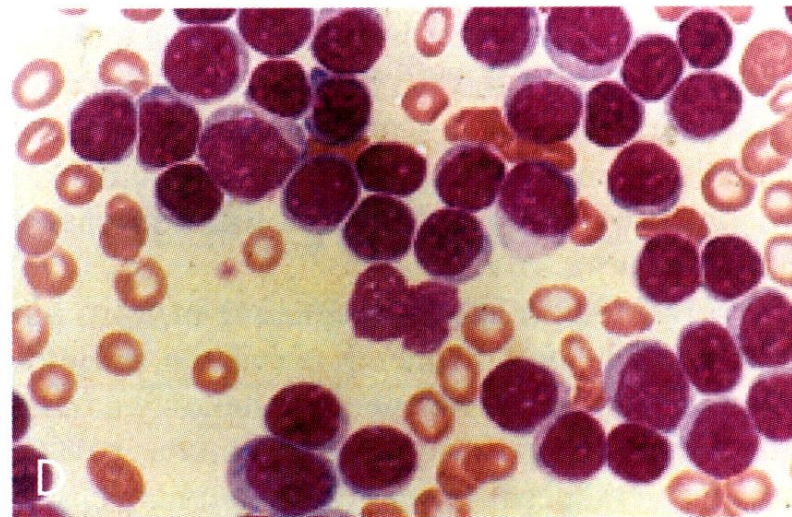
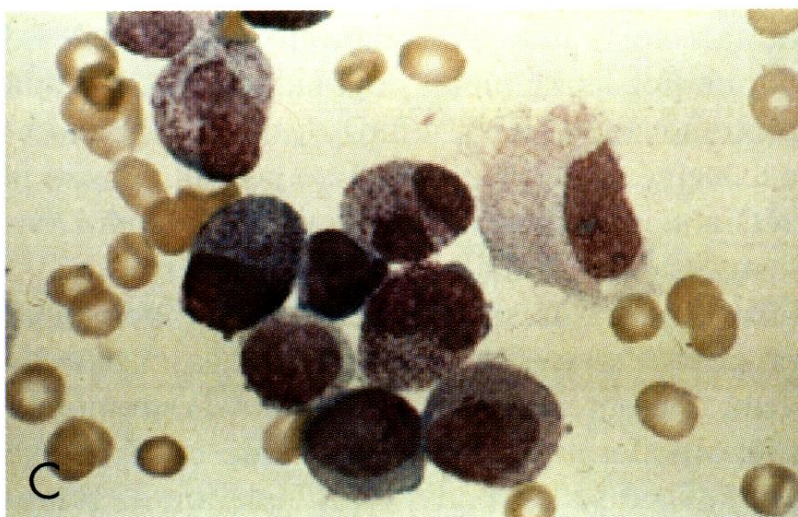
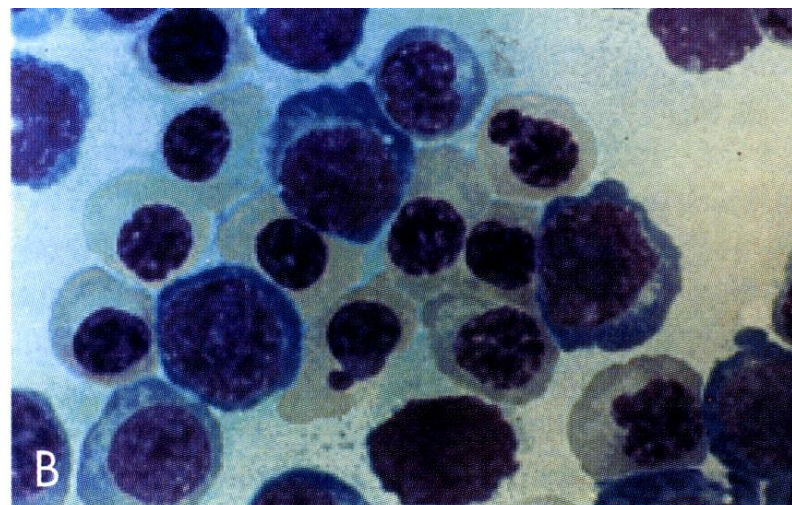
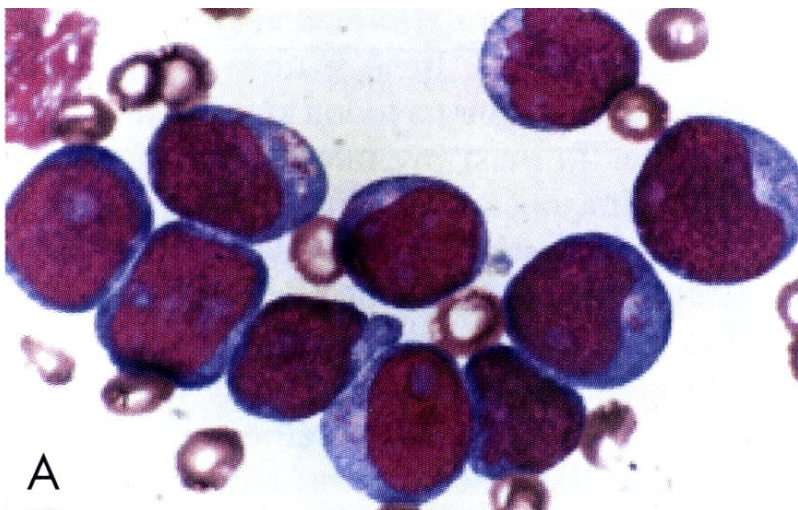
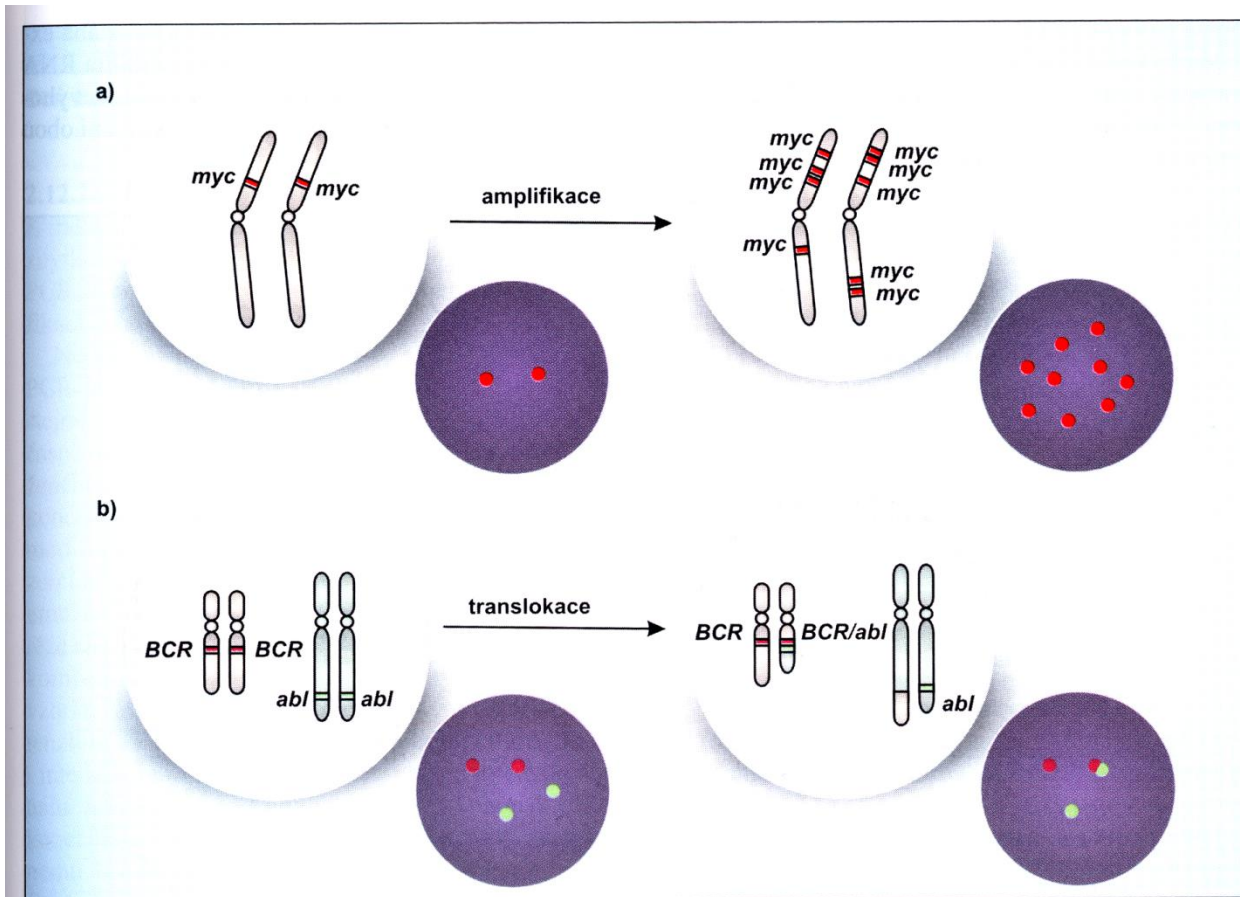


Fig. 12. Growth fractions, morphology, and clinical course of three selected leukemias. In acute myelogenous leukemia, the tumor cells are arrested in an active growth phase: cells that divide and do not enter G_0 , but pass directly into the next cell cycle. Few, if any, differentiated cells are seen; 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

In situ fluorescenční hybridizace (FISH)



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

- 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.
- 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 smíšený signál v důsledku emise fluorescence ze sond lokalizovaných v těsném sousedství.



Průtoková cytometrie (flow cytometry)

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

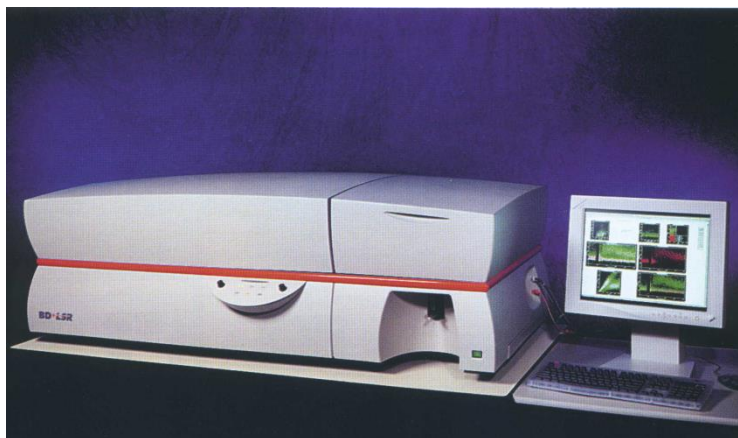


The **FACSCalibur** is the first a 4-colour, dual laser, benchtop system capable of both cell analysis and sorting fully integrated multiparameter system, wide range of research and clinical applications



FACSDiVa (Vantage)

High performance, high speed cell sorter
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

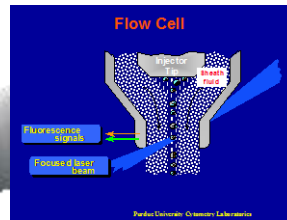
**Laboratory
of
cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**

Basics of flow cytometry

represents:

Fluids



Optics



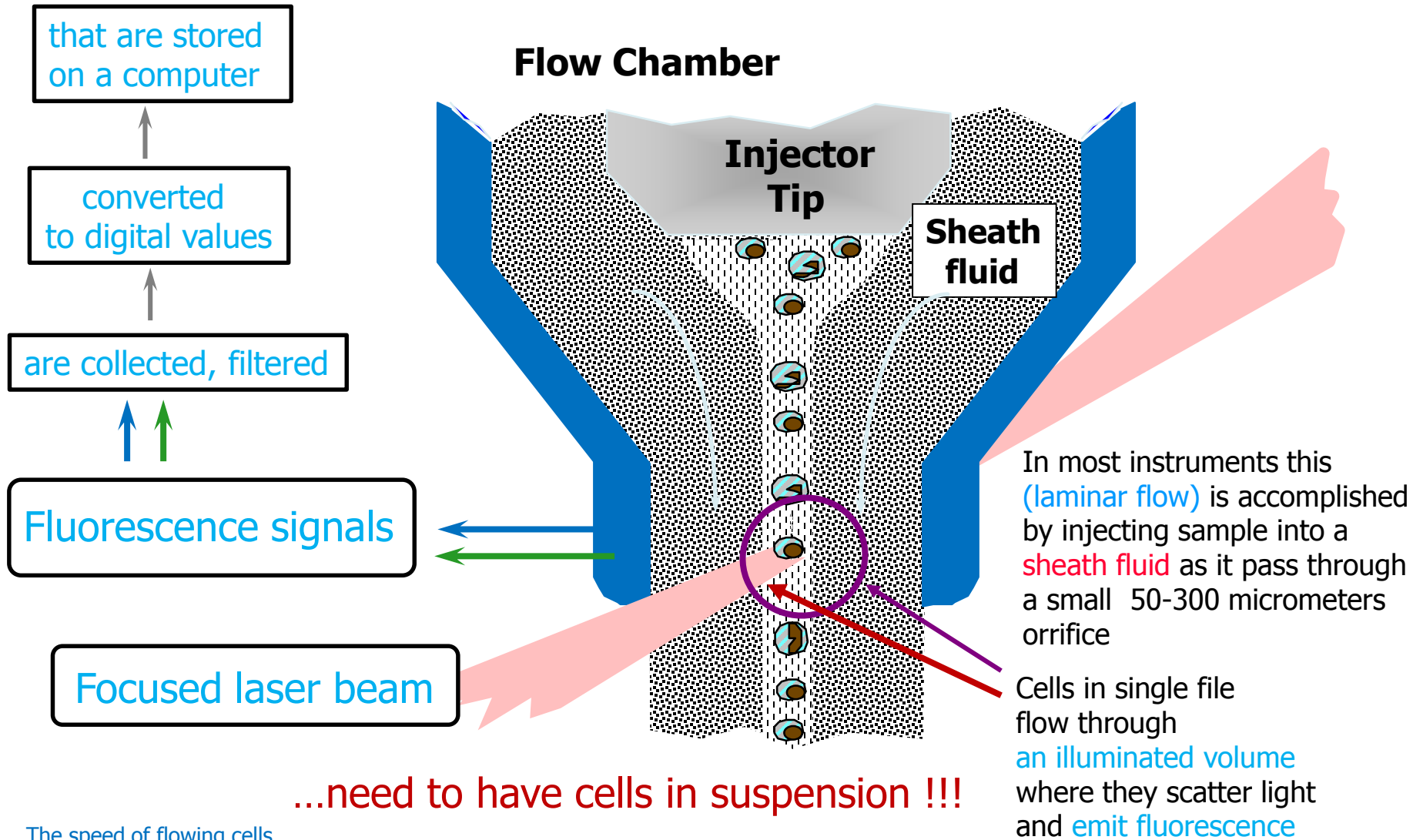
Electronics



Laboratory
of **cyt**okinetics

Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic

Flow Cell - Mechanism



...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

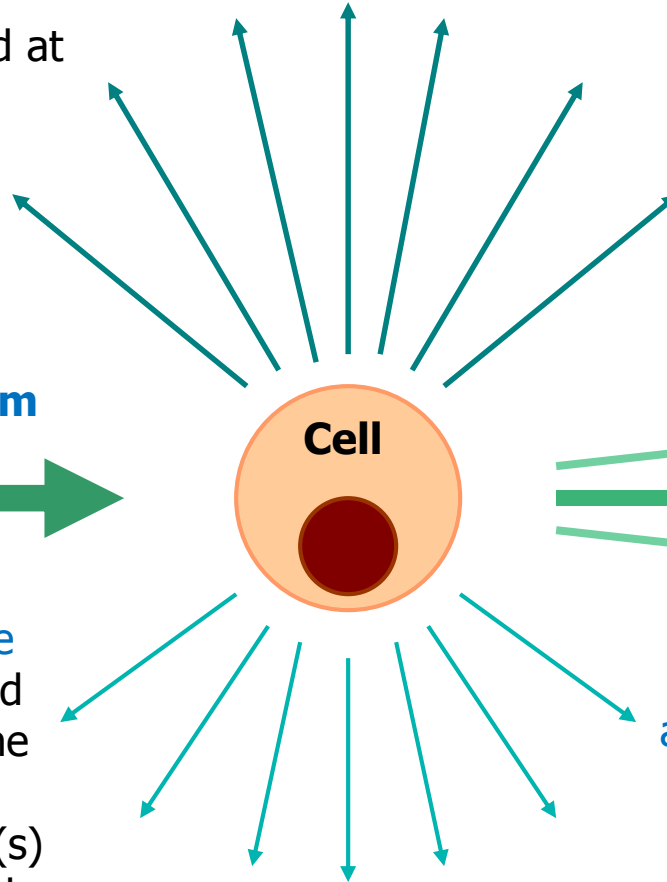
Fluorescence is emitted, and light scattered, in all directions.

The amount of light scattered at large angles ($15 - 150^\circ$) increases with cells' internal granularity and surface roughness

Incident light beam



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 but is affected by other factors, such as refractive index

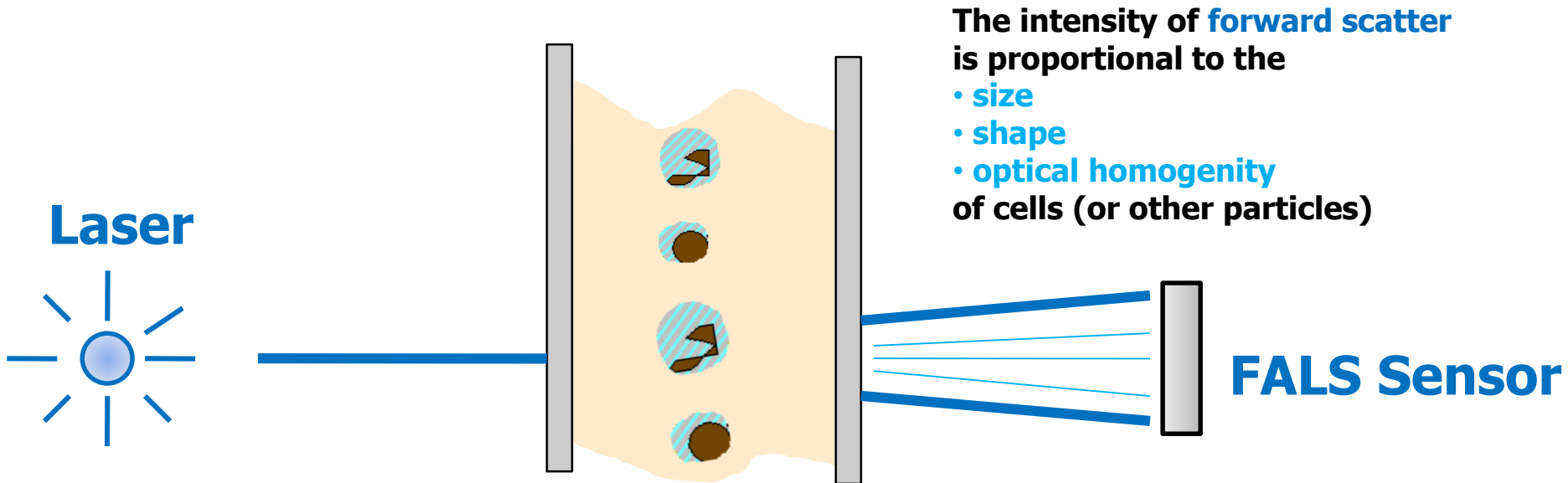


Extinction, i. E., the light loss from the incident beam, represents the sum of light absorbed and light scattered by the cell

The amount of light scattered at small angles ($0.5 - 5^\circ$) gives a rough measure of cell size

*Purdue University Cytometry Laboratories,
www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate.htm*

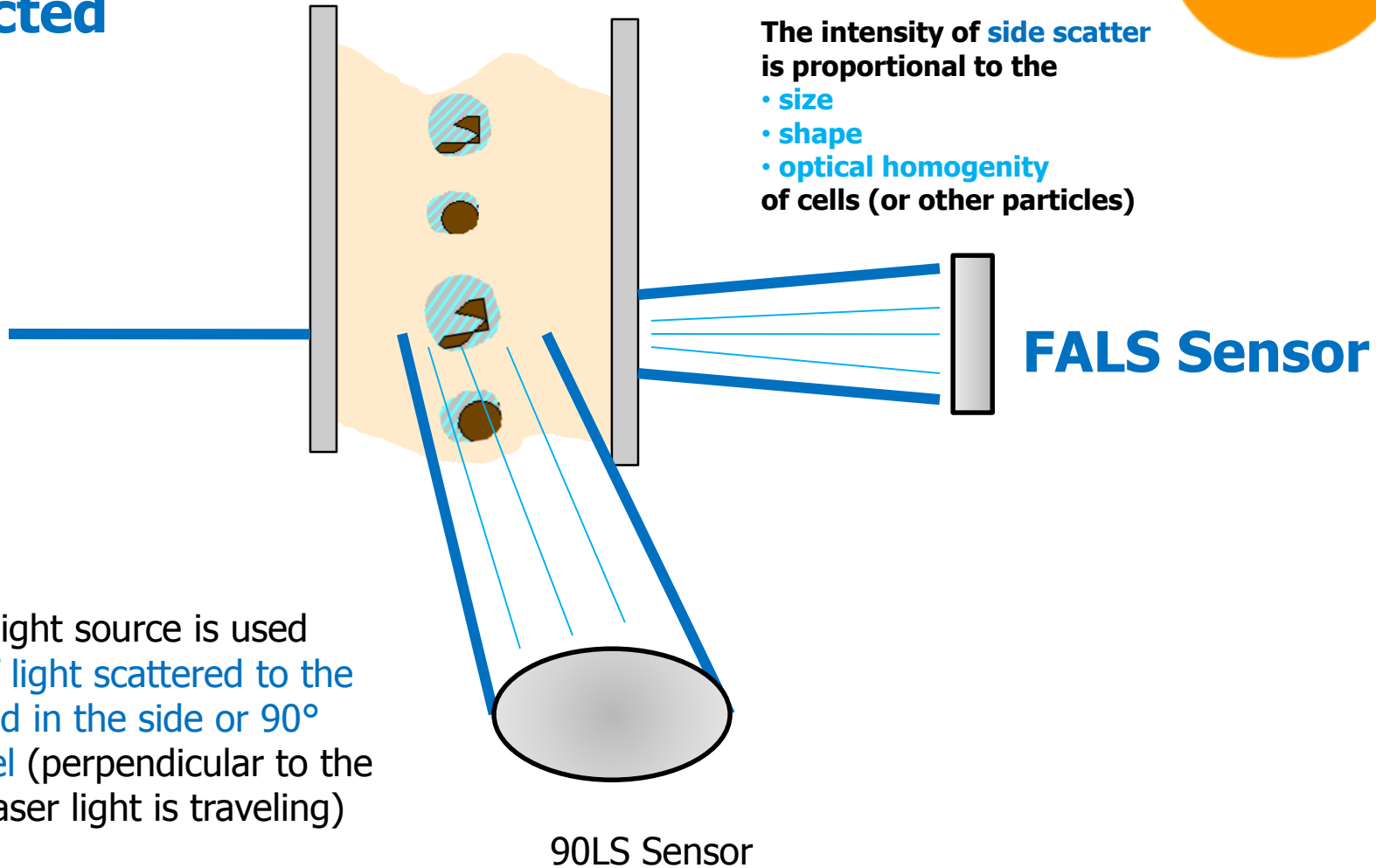
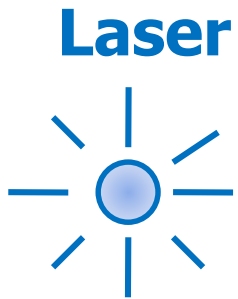
How Forward Angle Light Scatter is collected



When a laser light source is used the amount of light scattered in the **Forward direction** is detected in the forward scatter channel (along the same axis that the laser light is traveling)

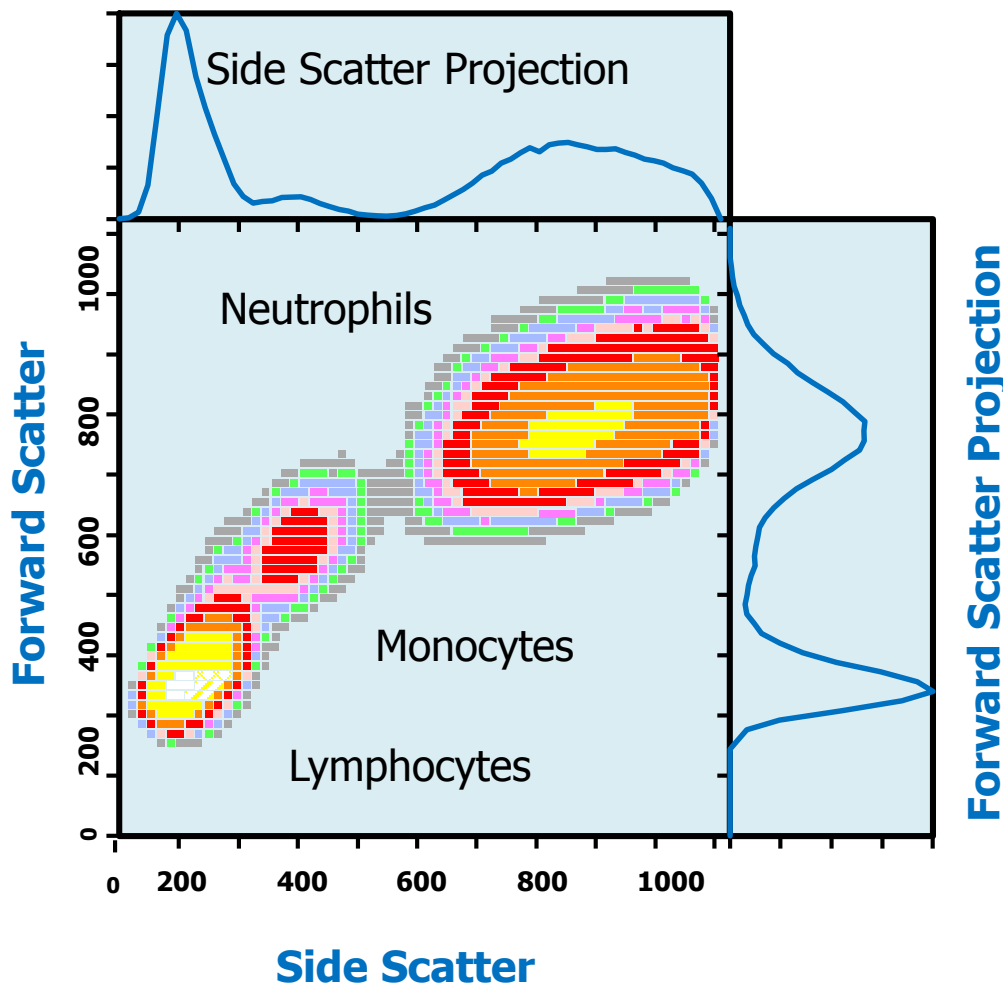
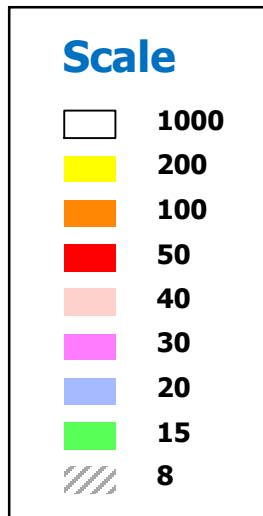
*Purdue University Cytometry Laboratories,
www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate.htm*

How 90 Degree (side) Light Scatter is collected

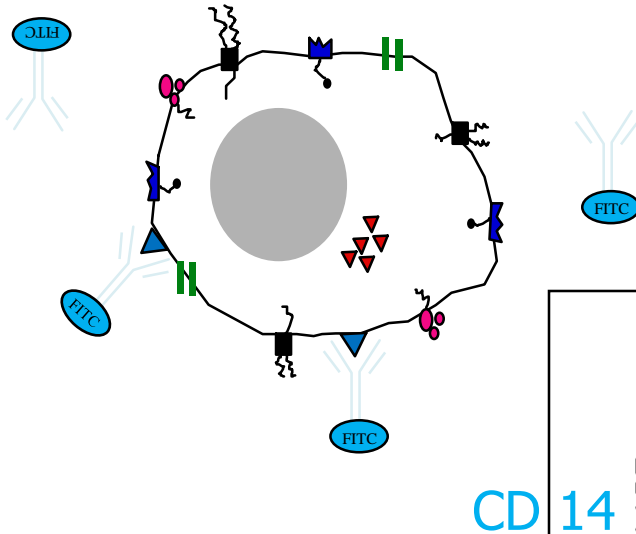


When a laser light source is used the amount of light scattered to the side is detected in the side or 90° scatter channel (perpendicular to the axis that the laser light is traveling)

Light Scatter Gating



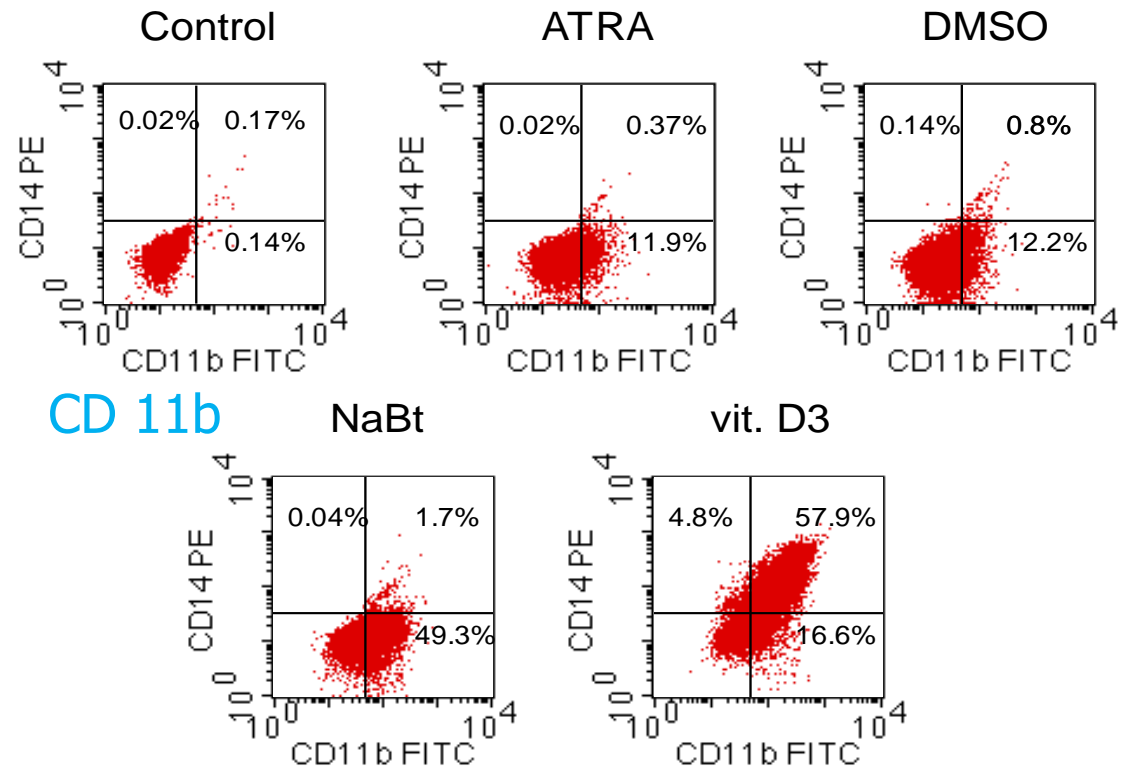
Purdue University Cytometry Laboratories,
www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate.htm



Two-parametric analysis of cell surface antigens

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

CD11b (granulocyte/ monocyte marker)
CD14 (monocytic marker)



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)

Pluripotentní hemopoetické kmenové buňky

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.

Úloha stromatu v kostní dřeni

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

Byly vytvořeny dlouhodobé kultury pro myeloerytroidní a lymfoidní vývoj.

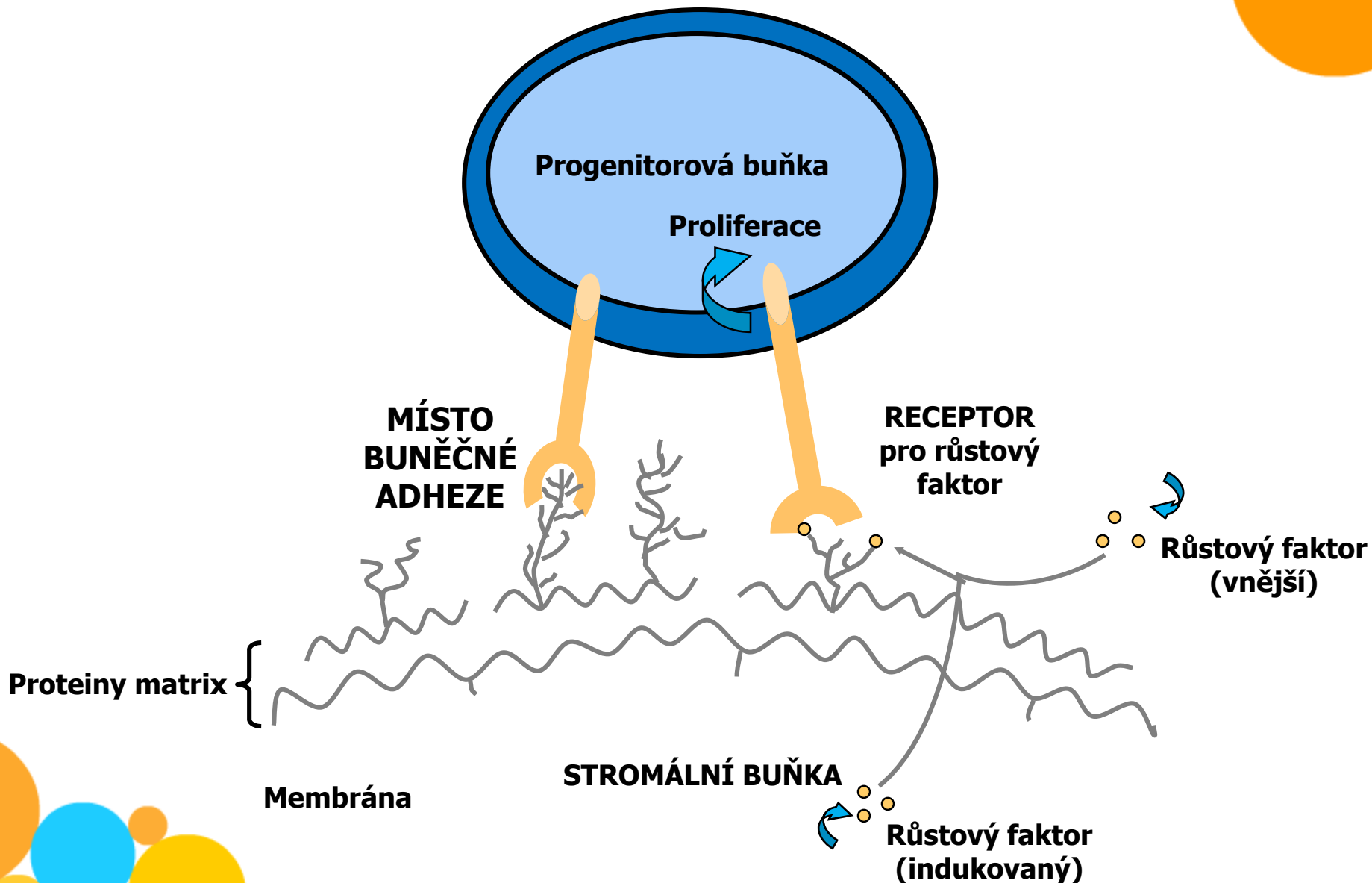
Řada údajů předpokládá, že **vzájemné kontakty buněk a specifické účinky extracelulární matrix pomáhají regulovat vývoj kmenové buňky.**

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. **Negativní regulátory kmenových i líniově specifických buněk**, např. TGF beta produkovaný stromálními buňkami.

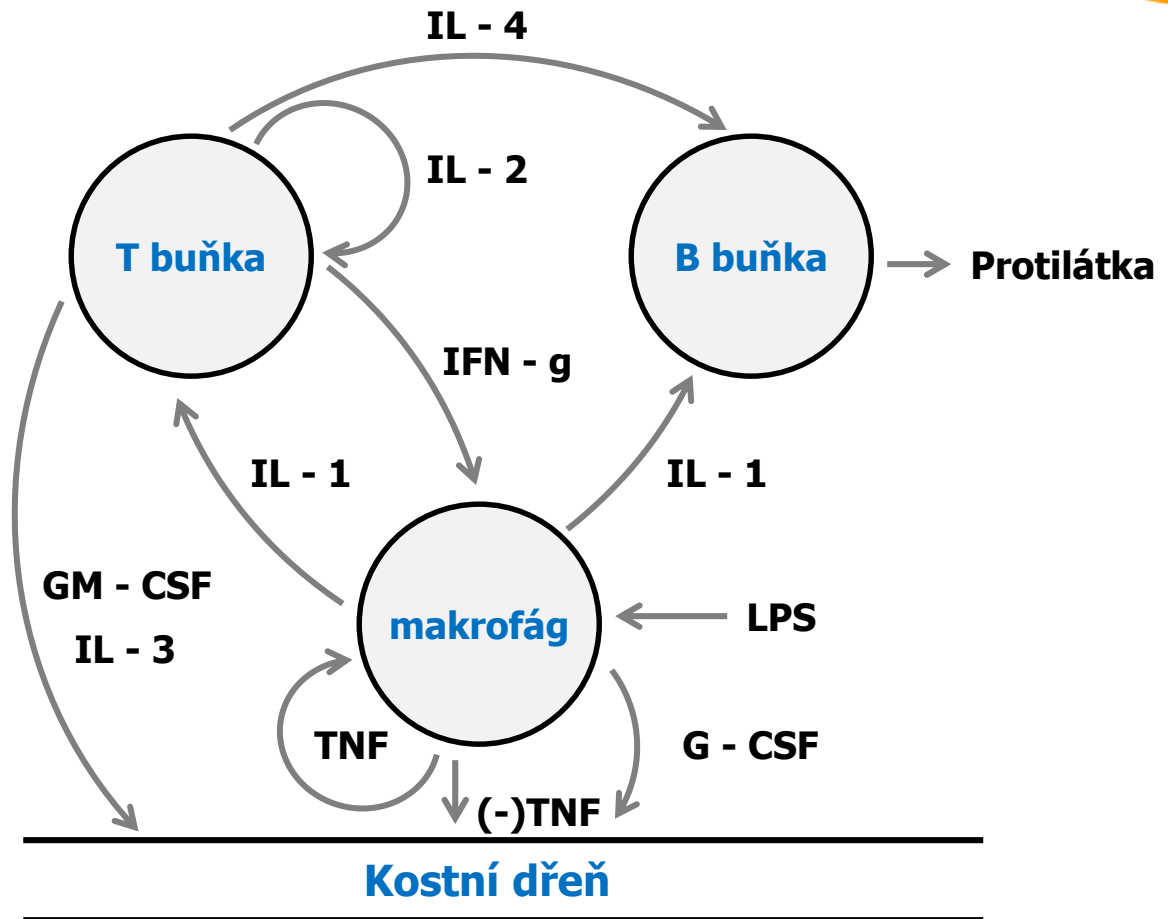
Pozornost věnována tomu jak kmenové buňky a různé leukemie unikají této negativní kontrole.


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



Sít' interakce cytokinů, pozitivní a negativní zpětná vazba

- **IFN-g** - interferon gamma
- **LPS** - lipopolysacharide
- **TNF** - tumor necrosis factor





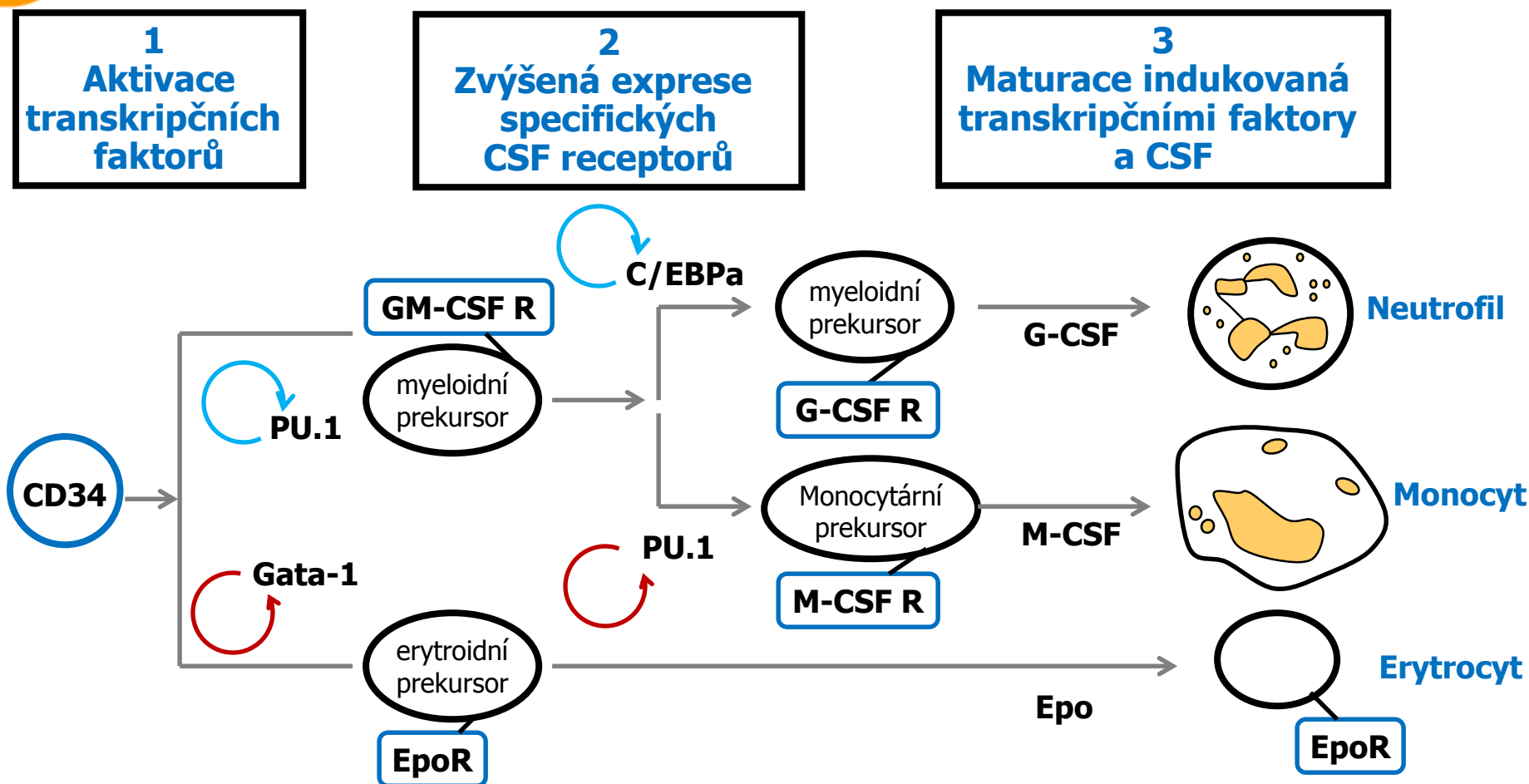
Línie výzkumů mechanismů působení **retroviru indukujícího erytroleukémii** vedlo k odhalení, že **virové proteiny** mohou stimulovat růst hostitelských buněk tím, že působí jako pseudoligandy pro receptory růst. faktorů.

U lidských i živočišných leukémií byly identifikovány **geny homologní se známými transkripčními aktivátory**.

Některé hrají roli v diferenciaci hemopoetických buněk, protože jsou homologní nebo identické s geny dříve identifikovanými v jiných experimentálních 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 mechanizmy**, 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.

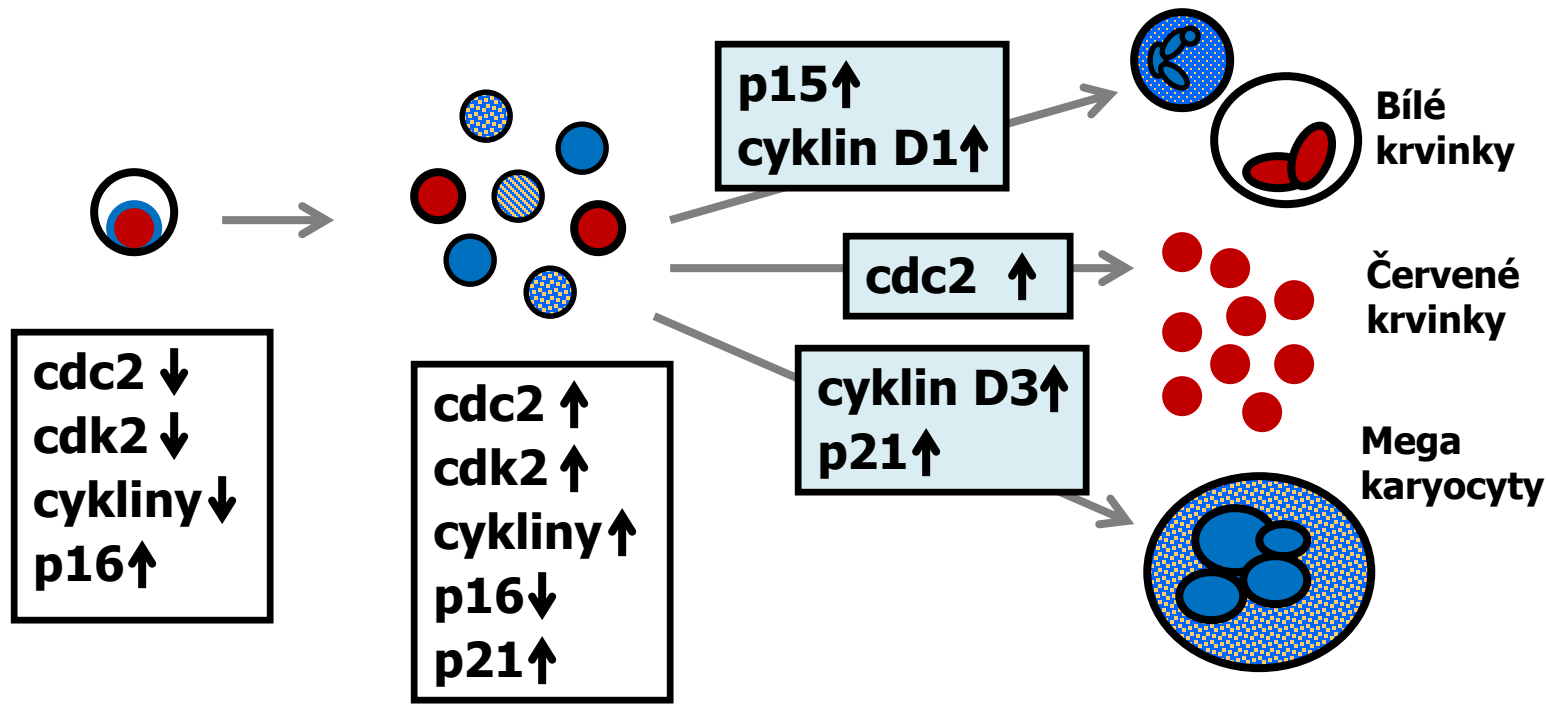
Tak působí např. poškození chromozomální DNA. V tomto procesu se účastní také **specifické geny např. p53 nebo bcl-2**. Mutace těchto genů pak způsobují poruchy apoptózy.

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

Geny kontroly buněčného cyklu v hemopoéze

Diferenciace

Typ buněk: Kmenové buňky Komitované progenitory Morfologicky zralé buňky
Funkce: Sebeobnova Zásobárna pto tvorbu krve Terminální diferenciace

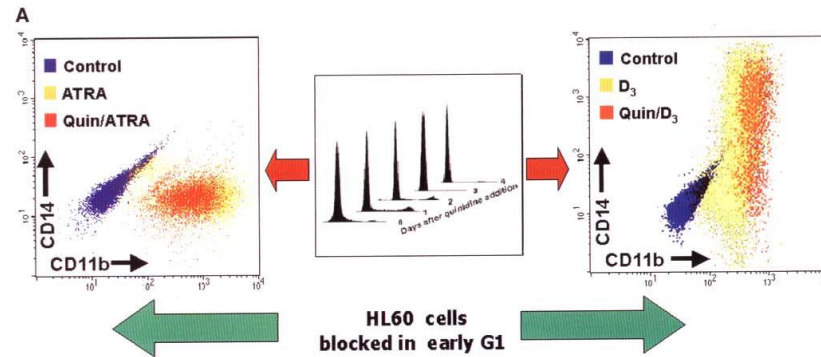


Stav buněčného cyklu:

Zástava G0/G1 (pomalé cyklování) **Vstup do S-fáze (aktivní cyklování)** **Zástava G0/G1 (diferenciace)**

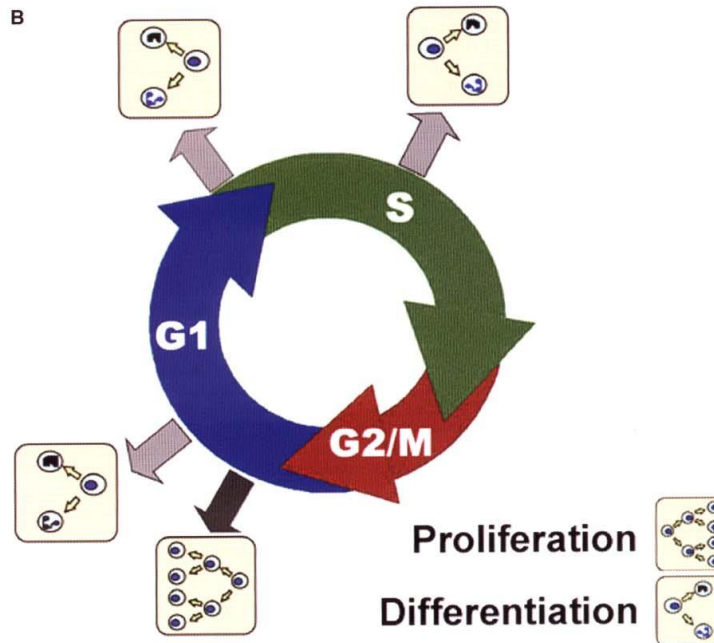
Exprese genů kontrolujících buněčný cyklus v jednotlivých stádiích hematopoetické diferenciace a její vztah k funkčnímu stavu.

Vztah mezi buněčným cyklem a diferenciací



Differentiation to neutrophils following treatment with ATRA

Differentiation to monocytes following treatment with vitamin D₃



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.

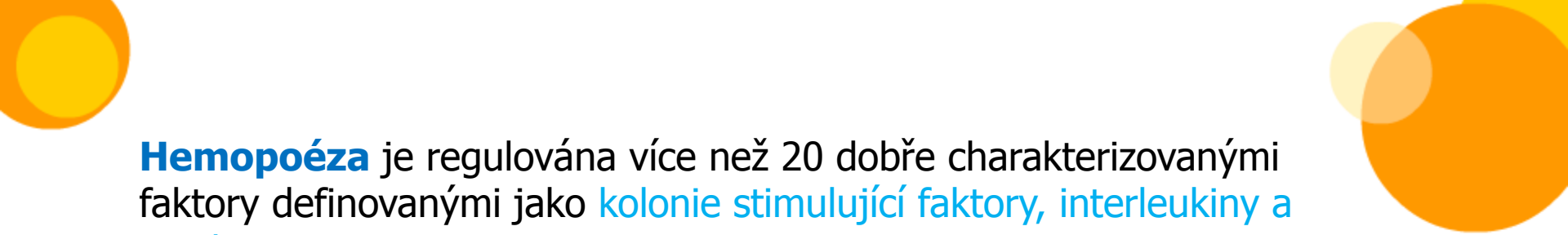
Biologická terapie s využitím cytokinů a růstových faktorů

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.



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.**

Působí v síti.



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 llogenní 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 diferenciacích látek k podpoře zrání blokováných 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 bílých krvinek a destiček.

Diferenciace myeloidních leukemických buněk do nemaligních zralých makrofágů nebo granulocytů interleukinem-6

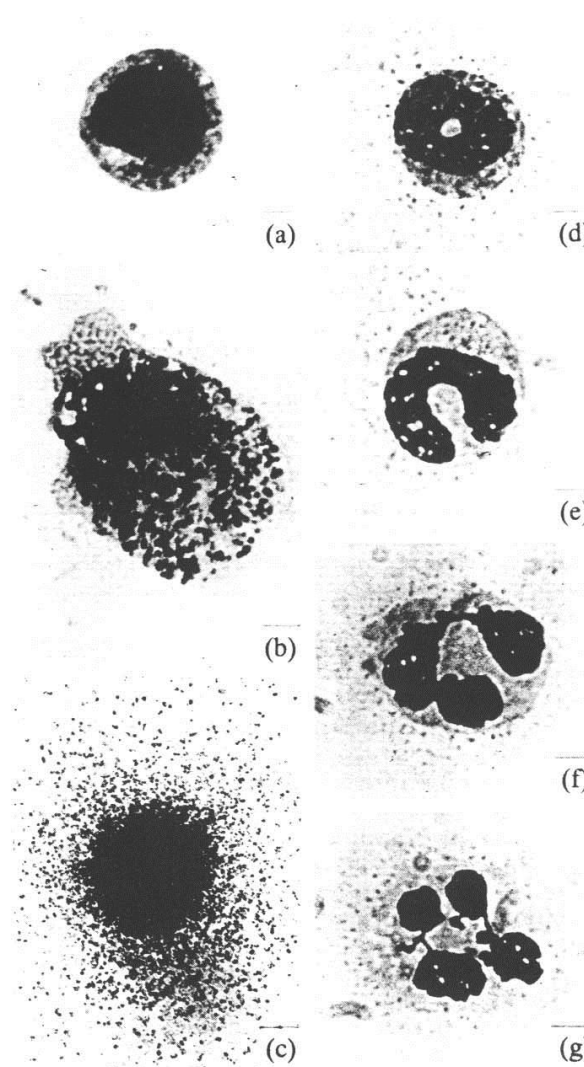
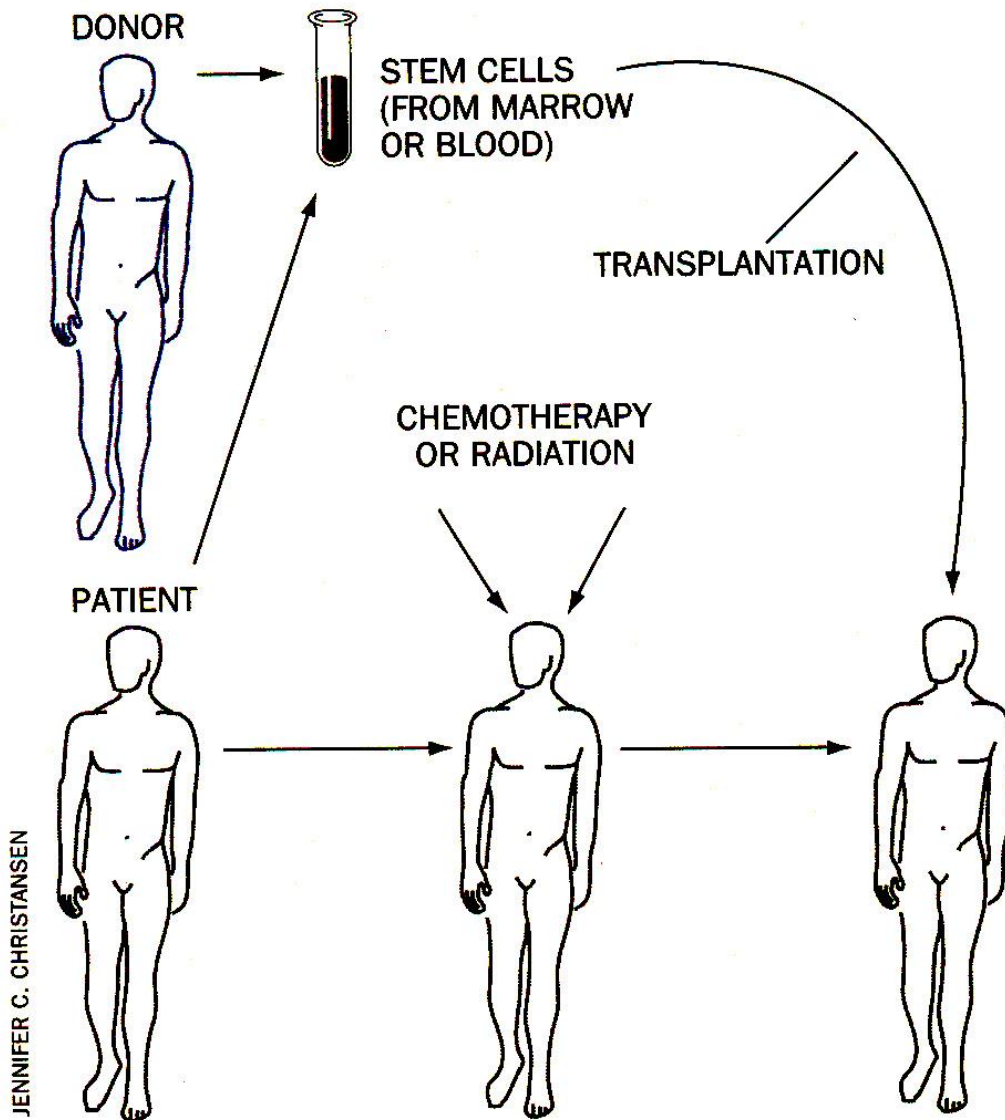


Figure 5. Differentiation of myeloid leukaemic cells to non-malignant mature macrophages or granulocytes by normal myeloid differentiation-inducing protein IL-6. (a) Leukaemic cell; (b) macrophage; (c) colony of cells with macrophages; (d–g) stages in differentiation to granulocytes [74].

Transplantace

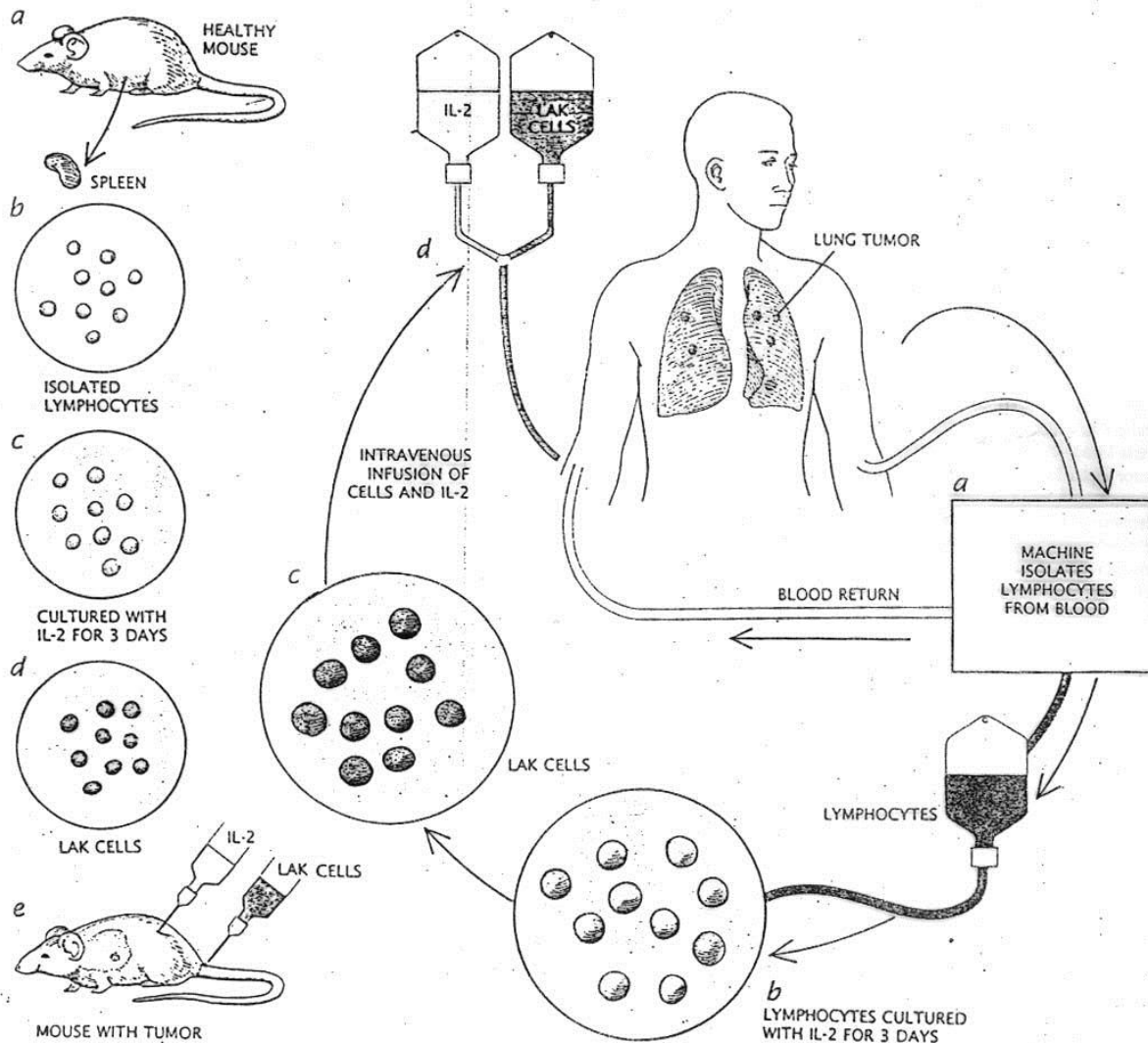


Autotransplantace

Před plánovanou radio- či chemoterapií nádorů (nehemopoetických). Odběr zdravé kostní dřeně nebo krve – izolace kmenových buněk či progenitorů (někdy s podporou příslušných růst. faktorů). Po léčbě zpětná transplantace pro obnovu krvetvorby.

Transplantace od vhodného dárce – u hemopoetických malignit.

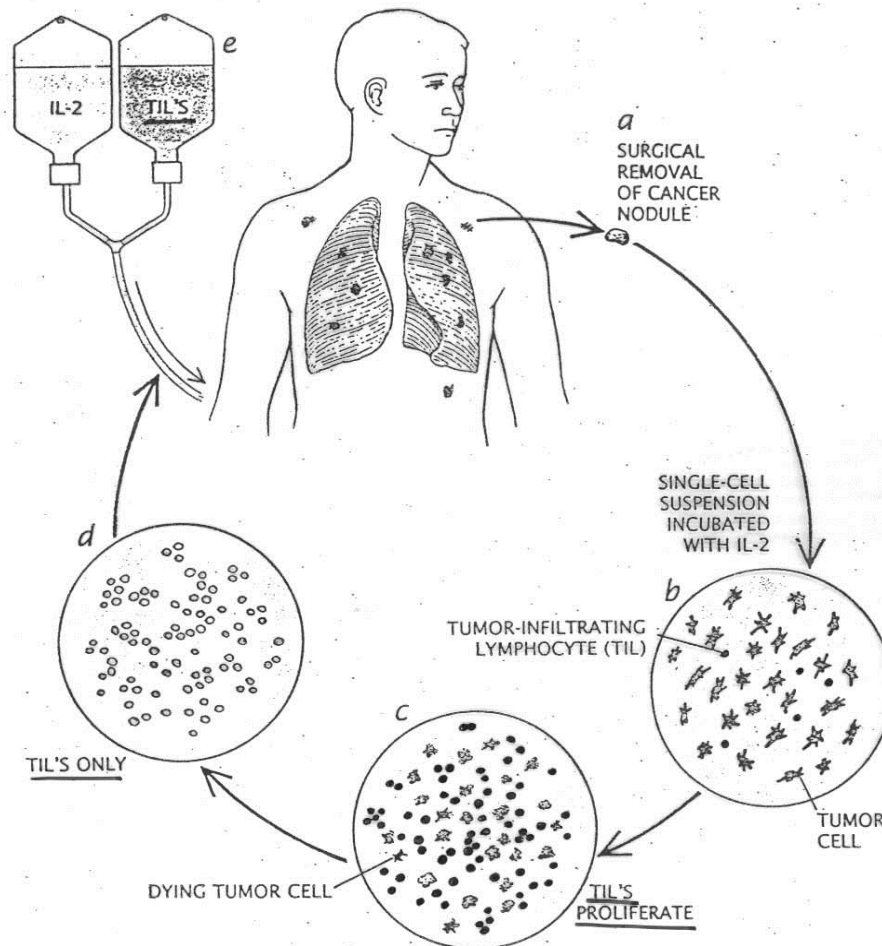
Využití LAK (lymphokine-activated killer) buněk v protinádorové terapii



LAK CELLS (lymphokine-activated killer cells), which were first described in 1980, are another experimental anticancer weapon. For study in mice (left), production begins with the removal of the spleen from healthy animals (a). The lymphocytes in the spleen are isolated (b) and cultured for three days with interleukin-2 (IL-2) (c), a hormonelike product of T cells. During that time the interleukin-2 causes certain lymphocytes known as

null cells to become LAK cells (d), which can recognize and attack a variety of cancers. In studies (e) the LAK cells, together with interleukin-2, are injected into tumor-bearing mice. For study in humans (right), lymphocytes are isolated from the bloodstream (a) and cultured with interleukin-2 (b) to generate LAK cells (c). When patients are treated (d), about 50 billion LAK cells are infused intravenously along with interleukin-2.

TIL'S (tumor-infiltrating lymphocytes) vyžadují víc než měsíc přípravy před aplikací pacientům



TIL'S, which seem to be more potent than LAK cells, take a month or more to generate for administration to patients. After a nodule of cancerous tissue is removed from a patient (a), cells in the nodule are separated from one another by enzymes and then cultured with interleukin-2 (b). Under the influence of the interleukin-2, lymphocytes scattered throughout the tumor—the TIL's (blue)—begin to proliferate rapidly and to attack the cancer cells (c). After a total of 30 to 45 days, the lymphocytes in the culture completely replace the tumor cells (d). Two-hundred billion of these replacement TIL's are then infused into the patient along with additional interleukin-2 (e).

Výukovou pomůcku zpracovalo Servisní středisko pro e-learning na MU

<http://is.muni.cz/stech/>

Technické řešení této výukové pomůcky je spolufinancováno Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdelávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ