ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 28

Přihlášeno: 05. 03. 76 (PO 21-76)

Právo přednosti od 11. 07. 75

Zveřejněno: II. mezinárodní kongres patologické fyziologie, Praha, 8.—11. července 1975

Uděleno: 02. 12. 82

Vydáno: 15. 06. 83

MDT 576.36

Autoři objevu: NEČAS EMANUEL, MUDr., CSc., PRAHA,
NEUWIRT JAN, doc., MUDr., CSc., PRAHA

Název objevu: **Rozdílný vliv poškození buněk ve fázi S a fázi M na proliferaci krvetvorných kmenových buněk**

Předmět objevu: Jev spočívající v tom, že poškození pluripotentních kmenových buněk myší ve fázi S (syntéza DNA) nebo fázi M (mitóza) buněčného cyklu ovlivňuje proliferační aktivitu této buněčné populace tak, že poškození buněk ve fázi S proliferační aktivitu vzhledem k rozsahu poškození celé populace nepřiměřeně zvyšuje, zatímco poškození buněk ve fázi M má na proliferační aktivitu mnohem menší vliv.

Objev se dotýká problému podstaty regulačního mechanismu, který řídí proliferaci, tj. intenzitu buněčného dělení, v populaci krvetvorných kmenových buněk myší. Současné znalosti o této buněčné populaci, která je prototypem kmenových buněčných populací, vedou k závěru, že intenzita buněčné proliferace je v této populaci buněk řízena. Část buněk totiž stále populaci opouští procesem buněčné diferenciace a přesto se v ní udržuje po celou délku života jedince stálý počet buněk. Také po zevním poškození se po určité době počet buněk v této buněčné populaci vrací na normální hodnotu (Porteous, D. D. a Lajtha, L. G.: Brit. J. Haemat. 12: 177, 1966). Biologický mechanismus, který řídí proliferaci těchto buněk, se dosud nepodařilo objasnit. Předpokládá se, že krvetvorná tkáň, ve které se tyto kmenové buňky nacházejí, je schopna jejich množství (nebo množství těchto buněk nacházejících se v tzv. G_0 stavu) zjistit a podle jejich počtu pak zvýšit nebo snížit intenzitu jejich proliferace (Lajtha, G. L. et al.: Brit. J. Haemat. 8: 442, 1962; Lajtha, L. G.: Brit. J. Haemat. 29: 529, 1975). Připouští se též možnost, že množství buněk v jiných, buněčnou diferenciací odvozených buněčných populacích, by mohlo řídit intenzitu proliferace kmenových buněk, jichž se týká dále popsaný jev (Vassort, F. et al.: Blood 41: 789, 1973). V našich pokusech, ve kterých byla sledována intenzita proliferace krvetvorných kmenových buněk po poškození krvetvorné tkáně různými patogenními noxami, byla zjištěna rozdílnost v proliferační odpovědi těchto buněk, přestože jejich množství bylo srovnatelné a též ostatní buněčné populace byly srovnatelně poškozeny (Nečas, E. a Neuwirt, J.: Brit. J. Haemat. 33: 395, 1976; Nečas, E. a Neuwirt, J.: Cell Tissue Kinet. 9: 479, 1976). Tento nález je v rozporu s výše uvedenými představami o způsobu řízení proliferace v populaci krvetvorných kmenových buněk myší a nemůže být jimi vysvětlen.

Podstatou objevu je jev spočívající v tom, že poškození pluripotentních kmenových buněk myší ve fázi S (syntéza DNA) nebo fázi M (mitóza) buněčného cyklu ovlivňuje proliferační aktivitu této buněčné populace tak, že poškození buněk ve fázi S proliferační aktivitu vzhledem k rozsahu poškození celé populace nepřiměřeně zvyšuje, zatímco poškození buněk ve fázi M má na proliferační aktivitu mnohem menší vliv.

Populace pluripotentních kmenových buněk byla studována in vivo, technikou slezinných kolonií (u myší) (Till, J. E. a McCulloch, E. A.: Radiat. Res. 14: 213, 1961). Kmenové buňky byly sledovány v kostní dřeni z femuru a ve slezině. K poškození krvetvorné tkáně byla použita některá cytostatika, vykazující specifický účinek proti buňkám nacházejícím se v určité části buněčného cyklu. Hydroxyurea, arabinosid cytosin a methotrexát poškozují buňky syntetizující DNA ve fázi S buněčného cyklu, kolchicin poškozuje buňky v mitóze (Sinclair, W. K.: Cancer Res. 27: 297, 1967; Bhuyan, B. K. et al.: Cancer Res. 33: 888, 1973; Dustin, P. Jr.: V: The Kinetics of Cellular Proliferation, Grune & Stratton, New York, 1959).

Proliferační aktivita byla v populaci pluripotentních krvetvorných kmenových buněk vyšetřována dvěma metodami. Při jedné této metodě se stanovuje velikost frakce buněk ve fázi S buněčného cyklu (Becker, A. J. et al.: Blood 26: 296, 1965; Lajtha, L. G. et al.: Cell Tissue Kinet. 2: 39, 1969), při druhé metodě se sleduje velikost celé buněčné populace během jejího neustálého ničení látkou s fázově specifickým účinkem (Bruce, W. R. et al.: J. natl. Cancer Inst. 37: 233, 1966; Blackett, N. M.: J. natl. Cancer Inst. 41: 909, 1968).

Pokusy byly provedeny na samicích myšího kmene NMRI. K poškození buněk ve fázi S buněčného cyklu bylo použito následujících látek v udaných dávkách: hydroxyurea (Litalir, Squibb v dávce 900 mg/kg tělesné hmotnosti), arabinosid cytosin (Ara C) (Alexan, Mack v dávkách 25 a 50 mg/kg tělesné hmotnosti) a methotrexát (MTX) (Methotrexate, Lederle v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti). K poškození buněk ve fázi M buněčného cyklu byl použit kolchicin (Koch-Light Lab. v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti). Všechny tyto látky byly aplikovány pokusným zvířatům intraperitoneálně. Množství krvetvorných kmenových buněk bylo stanoveno metodou podle Tilla a McCullocha (Till, J. E. a McCulloch, E. A.: Radiat. Res. 14: 213, 1961). Velikost frakce těchto buněk ve fázi S buněčného cyklu byla stanovena podle stupně poškození populace studovaných kmenových buněk po jedné dávce hydroxyurey (900 mg/kg tělesné hmotnosti) podané 2 hodiny před odběrem kostní dřeně. Kontrolní skupina zvířat, vůči které bylo množství kmenových buněk přeživších podání hydroxyurey vztaženo, byla tvořena skupinou 4—5 myší, kterým byl místo hydroxyurey aplikován fyziologický roztok. Krvetvorná tkáň použitá pro jednotlivá vyšetření byla směsí kostní dřeně sestávající z kostní dřeně získané z 8—10 stehenních kostí od 4—5 myší, které byly podrobeny stejnému experimentálnímu zásahu. V některých pokusech byla použita suspenze slezinných buněk získaná smícháním buněk z 5 slezin po jejich jemné homogenizaci do podoby jednobuněčné suspenze. Buněčnost kostní dřeně femuru byla zjišťována stanovením počtu buněk v jednobuněčné suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky.

V pokusech bylo zjištěno, že poškození buněk ve fázi S má za následek značné zvýšení proliferace mezi zbylými buňkami, jak pro to svědčí zvětšení frakce buněk ve fázi S (obr. 1; obr. 2). Také značné zvýšení strmosti křivky, která ukazuje pokles velikosti celé populace při opakujícím zničení buněk, které vstoupily do fáze S, hydroxyureou (obr. 3), svědčí pro zvýšení proliferace. Sil-

ný stimulační vliv hydroxyurey na proliferační aktivitu pluripotentních kmenových buněk popsali již i jiní autoři (Vassort et al.: Blood 41: 789, 1973).

Rozsahem podobné poškození způsobené poškozením buněk vstupujících do fáze M (mitózy) kolchicinem, mělo na proliferační aktivitu zbylých kmenových buněk značně menší stimulační vliv. Velikost frakce buněk ve fázi S se zvětšuje jen nepatrně (obr. 1) a sklon křivky ukazující velikost celé populace při neustálém ničení buněk vstupujících do mitózy se zvyšuje značně pomaleji než po poškození S-buněk hydroxyureou (obr. 3).

Rozsah poškození populace pluripotentních kmenových buněk byl v obou případech (látek poškozujících buňky ve fázi S a fázi M) přibližně stejný (Nečas, E. a Neuwirt, J.: Cell Tissue Kinet. 9: 479, 1976). Po jedné injekci hydroxyurey se populace kmenových buněk zmenšila nanejvýše o 10 %. Dávka kolchicinu (1 mg/kg tělesné hmotnosti) byla volena na základě předběžných pokusů zjišťujících účinek kolchicinu na krvetvornou tkáň. Zvolená dávka kolchicinu, aplikovaná jednorázově, zmenšila populaci kmenových buněk přibližně o 10—20 % (tabulka 1). Jiné buněčné populace, intenzívněji proliferující, byly poškozeny více, jak ukazuje pokles buněčnosti kostní dřeně, avšak rozsah poškození byl opět přibližně stejný pro oba druhy zásahů. Toto je demonstrováno na změně buněčnosti kostní dřeně po jedné injekci hydroxyurey nebo kolchicinu (tabulka 1; obr. 4). Výsledky

TABULKA 1

	Počet buněk v kostní dřeni femuru	%	Počet kmenových buněk v kostní dřeni femuru	%
Kontroly	$9{,}7 \cdot 10^6$	100	1484 ± 158	100
HU (9*)	$5{,}2 \cdot 10^6$	54	1359 ± 139	92
HU (14)	$4{,}2 \cdot 10^6$	43	1189 ± 151	80
HU (19)	$4{,}6 \cdot 10^6$	47	1314 ± 170	88
HU (24)	$5{,}9 \cdot 10^6$	60	1451 ± 149	98
HU (29)	$3{,}1 \cdot 10^6$	32	1313 ± 127	88
Průměrný pokles po aplikaci HU		47		89
Kontroly	$17{,}4 \cdot 10^6$	100	2270 ± 183	100
Kolchicin (9)	$8{,}4 \cdot 10^6$	48	1949 ± 194	86
Kolchicin (14)	$7{,}9 \cdot 10^6$	45	1859 ± 256	82
Kolchicin (19)	$9{,}0 \cdot 10^6$	52	2083 ± 264	92
Kolchicin (24)	$9{,}5 \cdot 10^6$	55	1538 ± 186	68
Kolchicin (29)	$9{,}5 \cdot 10^6$	55	1769 ± 258	78
Průměrný pokles po aplikaci kolchicinu		49		81

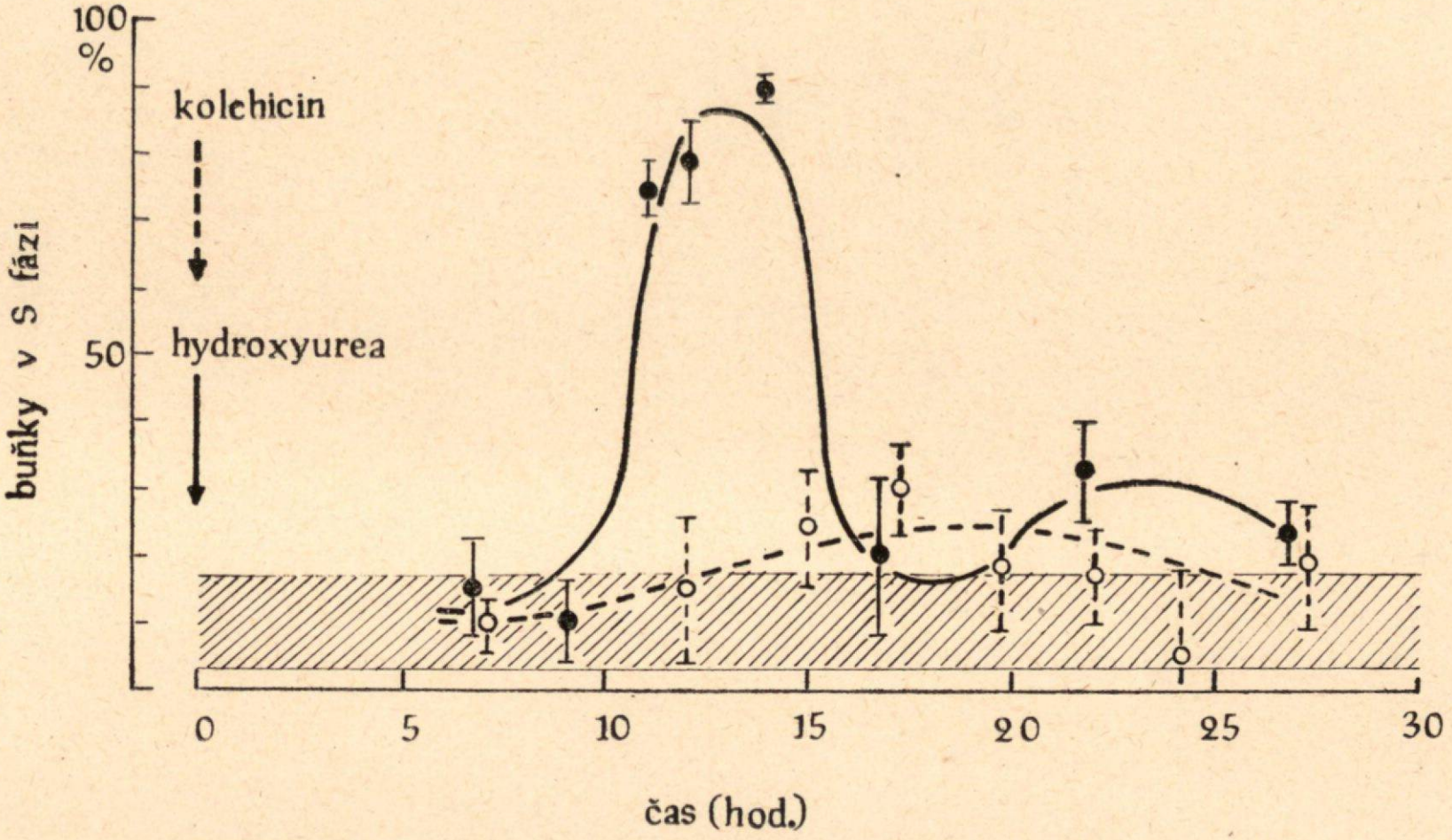
HU = hydroxyurea; * údaj doby v hodinách, za kterou byla vyšetření provedena po podání hydroxyurey nebo kolchicinu.

uvedené na obrázku č. 4 ukazují také to, že eliminace buněk poškozených hydroxyureou nebo kolchicinem přibližně stejně rychle, a dále pak to, že kolchicin nenarušuje schopnost buněk proliferovat, jak o tom svědčí rychlá regenerace buněčnosti kostní dřeně.

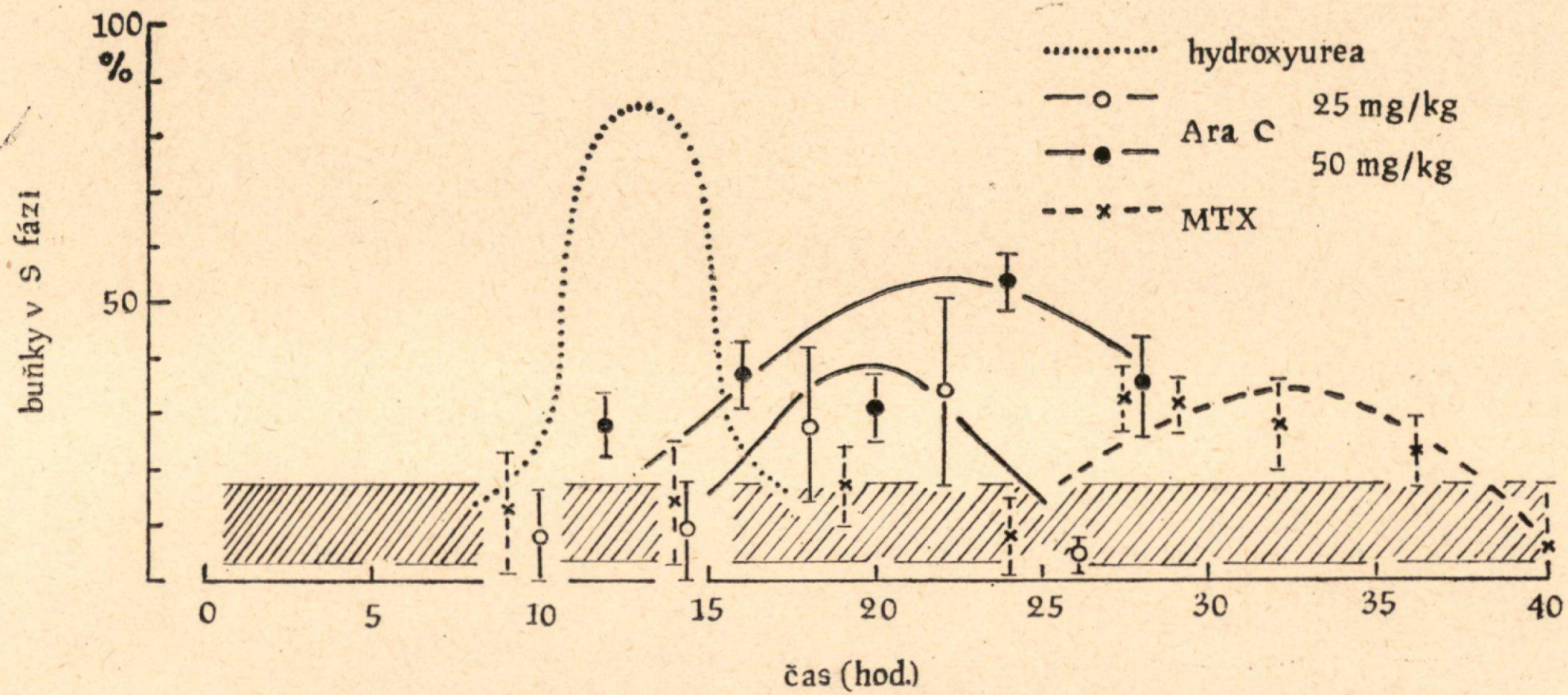
Význam objevu lze vidět především v tom, že se jedná o základní nový poznatek týkající se řízení proliferace v populaci kmenových buněk. Další výzkum odlišného působení buněk v různých fázích buněčného cyklu na proliferační aktivitu by měl přinést pokrok v poznání zákonitostí, kterými je řízena proliferace normálních a nádorově změněných kmenových buněk. Základní význam objevu je v tom, že umožňuje správně orientovat další výzkumnou práci v oblasti studia řízení proliferace normálních a nádorových buněk.

Cytostatika, použitá k poškození krvetvorné tkáně, jsou používána k léčbě lidí postižených nádorovým onemocněním. Popsaný jev upozorňuje na možnost toho, že některá cytostatika mohou při nevhodném schématu aplikace vyvolat zvýšení buněčné proliferace a tím stimulovat růst nádoru.

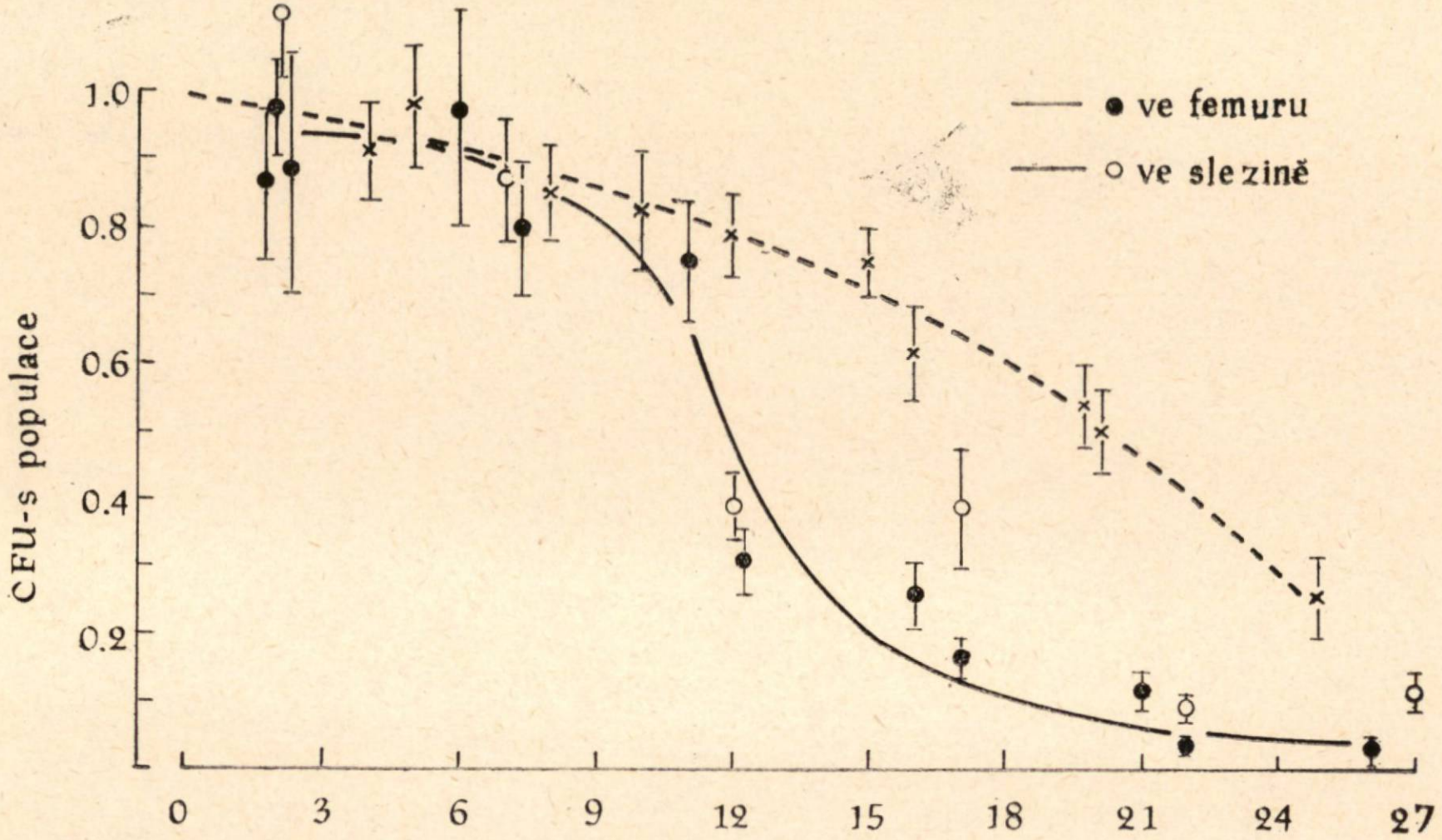
Severografia, n. p., závod 7, Most


100
%
50
kolchicin
hydroxyurea
buňky v S fázi
0
5
10
15
20
25
30
čas (hod.)

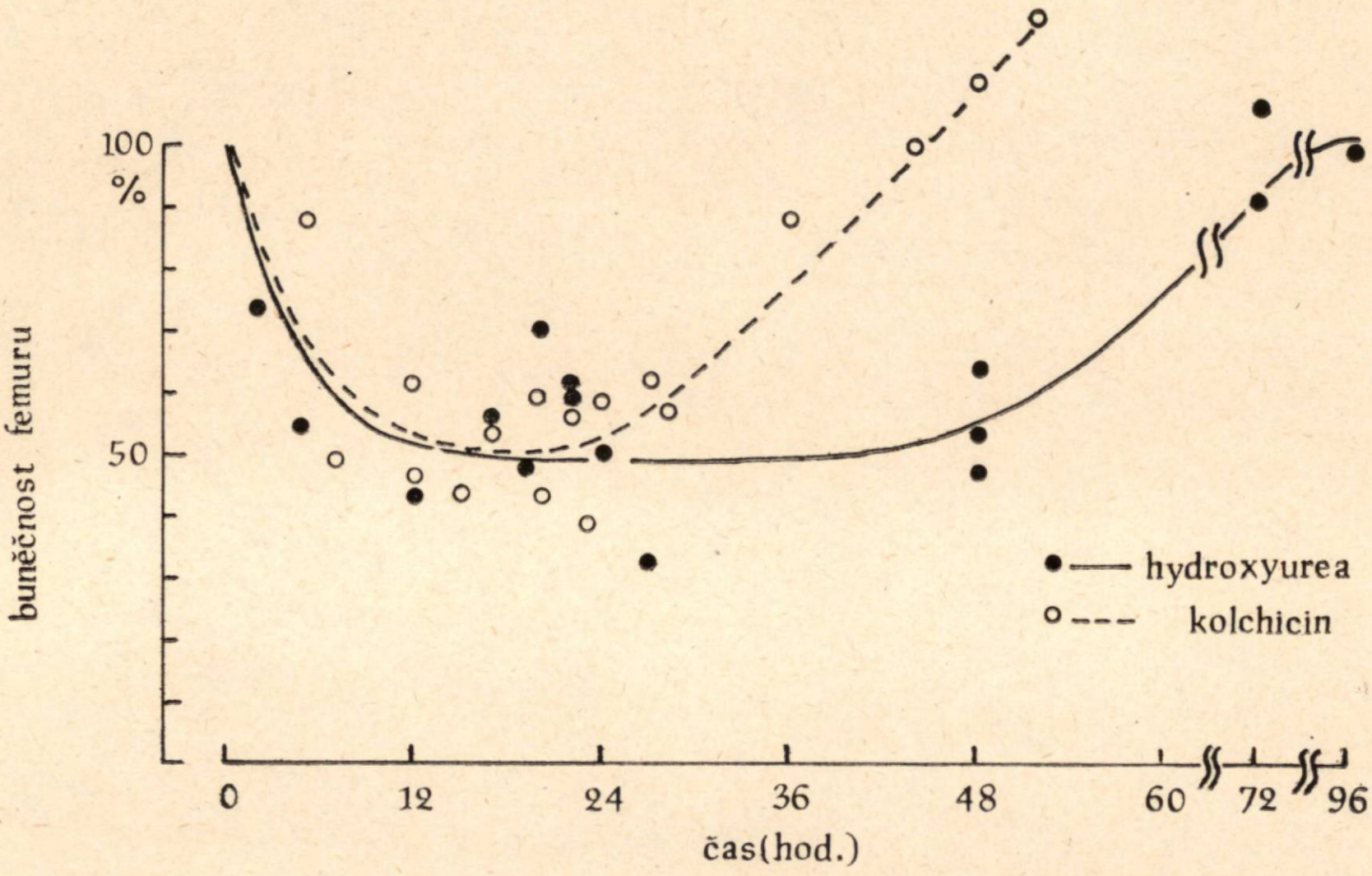
OBR. 1


100
%
50
buňky v S fázi
hydroxyurea
Ara C
25 mg/kg
50 mg/kg
MTX
0
5
10
15
20
25
30
35
40
čas (hod.)

OBR.2


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
CFU-s populace
ve femuru
ve slezině
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
Délka podávání hydroxyurey (● ○) nebo kolchicinu (×) (hod.)

OBR. 3


100
%
50
buněčnost femuru
0
12
24
36
48
60
72
96
čas(hod.)
hydroxyurea
kolchicin

OBR. 4