



Akademie věd České republiky

Teze disertace

k získání vědeckého titulu "doktor věd"

ve skupině věd: MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ A LÉKAŘSKÉ VĚDY

**PŘÍSPĚVEK KMENOVÝCH BUNĚK PŘI LÉČBĚ
NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

**The contribution of stem cells to the therapy
of oncologic diseases**

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru: BIOMEDICÍNA

Jméno uchazeče: prof. MUDr. Stanislav FILIP, Ph.D.

Pracoviště uchazeče: Klinika onkologie a radioterapie LFUK a FN v Hradci Králové

Místo a datum: Hradec Králové 30. března 2009

Souhrn

Vědeckou práci věnovanou otázkám využití kmenových buněk v diagnostice a následně jejich využití v léčbě jsem zahájil v roce 1990 jako vědecký pracovník na katedře Vojenské radiobiologie VLA JEP v Hradci Králové. V tomto období jsem již začal připravovat koncepci propojení experimentálního a klinického využití výsledku naší práce. Začal jsem budovat laboratoř, která cíleně využívala výsledky experimentální práce v klinické praxi. Prvním experimentálním modelem byly hematopoetické kmenové buňky (HSCs) - možnosti jejich získávání z kostní dřeně a periferní krve, dále možnosti jejich *ex vivo* expanze. Takto zaměřená laboratoř byla jednou z prvních v naší republice, kde bylo možné připravit hematopoetické kmenové buňky pro klinické využití. V roce 1993 ve spolupráci s klinickými pracovišti byla použita metoda přístrojové separace periferních hematopoetických kmenových buněk (PBPC) a jejich aplikace u nemocných se solidními nádory. Metoda využívala autologních PBPC u nemocných, kterým byla aplikována vysokodávkovaná chemoterapie a autologní transplantace PBPC měla za úkol snižovat riziko hematologické toxicity navozené právě touto léčbou. Zvládnutím metodiky se naše pracoviště dostalo do popředí i v mezinárodním měřítku a výsledky byly prezentovány v rámci registru EBMT (European Bone Marrow Transplantation) na evropské úrovni. V roce 1998 provedla naše skupina jako první v naší republice aplikaci plné krve obohacené o PBPC u nemocných žen s vysoce rizikovým karcinomem prsu v ambulantních podmínkách léčby.

Vzhledem k tomu, že nastala potřeba vytvořit bližší propojení experimentální a klinické práce, moje další působení pokračovalo na klinické úrovni, a to jak na problematice diagnostického využití kmenových buněk v onkologii, tak i následně na úrovni plasticity kmenových buněk. V tomto ohledu byla významná spolupráce s Methodist Research Institute (Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis, USA) a poté s Centre of Excellence for Aging of Brain Repair (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA). Výsledkem byly prezentované práce, ve kterých byla řešena problematika plasticity neurálních kmenových buněk (NSCs). V tomto směru naší laboratoři patřila opět priorita, a to nejen v republikovém měřítku. Výsledky byly prezentovány na mezinárodních konferencích a publikovány v mezinárodních časopisech. V tomto období jsem začal připravovat a formovat myšlenku vztahu plasticity kmenových buněk a procesu karcinogeneze. Další práce naší laboratoře je spojena s hledáním humorálních vztahů

mezi kmenovými buňkami a jejich prostředím v patologických procesech, procesech regenerace obecně, a také ve vztahu k procesům karcinogeneze. Pokračuje spolupráce s odborníky, především s prof. Denisem Englishem (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA).

Pro naši skupinu to byla výzva, která znamenala kvalitativní skok v naší experimentální práci. Vznikla celá řada velice zajímavých prací, týkajících se jak plasticity kmenových (NSCs a HSCs) buněk, tak vztahu k neurogenезi, vaskulogenезi (nestin) atd. (viz literární přehled prací autora). Ze získaných výsledků a zkušeností se dále logicky vygenerovaly teoretické úvahy o vztahu některých procesů, jako je plasticita a diverzita buněk - myšleno především kmenových buněk. Vzhledem k mému zaměření - klinický onkolog a hematolog, byl jenom krok k tomu, spojit tyto úvahy s nádorovými kmenovými buňkami. Pro tyto účely jsme v roce 2002 založili nádorovou tkáňovou banku, kde jsou kryokonzerovány nádorové tkáně. Vzhledem k tomu jsme významně rozšířili metodické možnosti naší laboratoře jak v oblasti *in vitro* metodik, tak v oblasti *in vivo* modelů. V rámci rozvojových projektů a grantů a v rámci výuky PGS studentů jsme vytvořili novou skupinu se zaměřením na výzkum a klinickou aplikaci kmenových buněk, a to především v oblasti využití v léčbě nádorových onemocnění.

V současné době naše skupina řeší dvě významné otázky: problematiku vztahu regenerace tkání a vztahu mikroprostředí a přípravu klinického využití kmenových buněk v tzv. „homing transplantaci“ – transplantaci dospělých kmenových buněk „v čase na míru“.

Summary

I started my research work with stem cells in diagnostics and, later on, in the therapy in the year 1990 as a research worker at the Department of Military Radiology of Military Medical Academy, Hradec Králové. At that time I was already preparing a conception connecting experimental results with the clinical use. I started to build a laboratory with the aim the results in my clinical practice. Hematopoietic stem cells (HSCs) served as the first model because of their easy collection from the bone marrow and peripheral blood and easy ex vivo expansion. Our laboratory with such specialization was the first in our country where hematopoietic cells could be prepared for clinical use. In 1993 in cooperation with other departments a method was introduced for instrumental separation of hematopoietic stem cells that could be used for application to patients with solid tumors. This method utilized autologous peripheral blood progenitor cells (PBPCs) in patients receiving high-dose intensive cyclic chemotherapy to reduce the risk of hematologic toxicity. Application of this method brought us again to the fore also by international standard and the results were presented in the EBMT registry at the European level. In 1998 our team performed, as first in our republic, transfusion of whole blood enriched with PBPCs in order to reduce the risk of hematologic toxicity in female patients with high-risk breast carcinoma treated with intensive cyclic chemotherapy on an out-patient basis.

Regarding the necessity to create closer connection of experimental and clinical work, I left the Army for the Department of Oncology, Teaching Hospital, Hradec Králové where I could go on with experiments and, at the same time, use the results in clinical work aimed at the problems concerning both the diagnostic use of stem cells in oncology and stem cells plasticity. In this respect, there was an important cooperation with the Methodist Research Institute (Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis, USA) and later with the Center of Excellence for Aging of Brain Repair (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA). This resulted in presentations of our studies on neural stem cells plasticity (NSCs). Again, our laboratory acquired the priority and not only in this country. Our studies were presented on international conferences and published in international journals. During this period of time I started to formulate a hypothesis about the possible relation between the stem cell plasticity and the process of carcinogenesis. Presently, our laboratory is engaged in the search of humoral relations between

stem cells and their microenvironment in both pathologic processes and regenerative processes in general and, respectively, with the relation in carcinogenesis process. Here cooperation goes on with other researches and, in the first place with Prof. Denis English (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA).

This was a challenge for our team, and it made a qualitative jump in our experimental work. A number of very interesting studies have been reported concerning stem cell plasticity NSCs and HSCs) in relation to neurogenesis, vasculogenesis (nestin) and others (see the author's survey of literature). Acquired results and experience generated theories about relations of certain processes, such as plasticity and diversity of cells – stem cells at the first place. Considering my specialization – clinical oncologist and hematologist – it was a short step to link up these thoughts with tumor stem cells. For this purpose a stem cell tissue bank was founded in 2002, where tumor tissues are cryopreserved. This resulted in a wide enlargement of methodical possibilities of our laboratory both in vitro and in vivo models.

Presently, our team works on two problems – relations between tissue regeneration and microenvironment and preparation of stem cells for clinical use in the so called „homing transplantation“ – i.e. transplantation of adult stem cells „tailored to time and measure“.

Komentář k souboru prací k tématu hematopoetické periferní kmenové buňky, jejich mobilizace a ex vivo expanze.

Klinické využití hematopoetických růstových faktorů je datováno od počátku devadesátých let minulého století. V dalším textu se pokusím přiblížit naše výsledky a podíl ve výzkumu a klinickém využití především G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), EPO (*erythropoetin*), GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*), IL-3 (*interleukin 3*) a IL-11 (*interleukin 11*). Z řady výsledků vyplynulo, že použití G-CSF a GM-CSF může mít svoje místo v klinickém využití pro reparaci krvetvorby po chemoterapii, po ozáření a také pro mobilizaci hematopoetických kmenových buněk a jejich transplantaci. Použití G-CSF a GM-CSF vede k mobilizaci progenitorových buněk, a to nejen granulocytární a granulocyto-makrofágové linie [21,38,39]. Růstové faktory byly využity při léčbě febrilní neutropenie, která představuje významné riziko infekce, zejména po chemoterapii nebo ozáření. Cílem je zkrácení doby neutropenie, čímž se snižuje riziko infekce a navíc lze úměrně zvyšovat dávku a intenzitu chemoterapie.

V tomto období se jako důležitá ukázala metoda monitorování cirkulace hematopoetických kmenových buněk v periferní krvi pomocí klonální kultivace. Touto metodou bylo možné stanovit množství transplantovaných buněk a jejich viabilitu [32]. Hlavním nedostatkem metody bylo, že kolonie CFU-GM, BFU-E a CFU-GEMM bylo možné odečítat až za 7 - 14 dní po jejich vysazení do kultivačního média. Zásadní obrat v tomto směru mělo využití CD34 antigenu exprimovaného na krvetvorných buňkách. Přes tuto nevýhodu nadále zůstala metoda klonální kultivace důležitou součástí pro hodnocení viability transplantovaného štěpu hematopoetických buněk získaných z kostní dřeně nebo periferní krve.

Pro mobilizaci periferních kmenových buněk byly používány dva postupy, a to: použití buď samotných růstových faktorů (eventuálně jejich kombinace), nebo kombinace chemoterapie s růstovými faktory. Z cytostatik byl pro mobilizační účely jako první použit cyklofosfamid v standardních nebo vysokých dávkách (4 - 7 g/m²), především z důvodů již známé farmakokinetiky, a také pozitivního efektu tohoto léku na nádorovou krvetvorbu. Následovala řada dalších prací zaměřených na sledování kinetiky hematopoetických kmenových buněk a na výběr vhodného mobilizačního režimu u nemocných s maligními nádory.

Zde připomeneme některé publikace, ze kterých jsme vycházeli také v našich experimentech a klinických pracích. Richman a spol. sledovali 24 nemocných s nádory: karcinomem prsu, karcinomem ovárií, teratokarcinomem a Ewingovým sarkomem. Hlavní skupinu tvořilo 14 nemocných s karcinomem ovárií. Šlo o program autologní transplantace (podání kryokonzervovaných periferních krvetvorných buněk) po chemoterapii pěti cykly adriamycinu 45 mg/m^2 a cyklofosfamidu 500 mg/m^2 , vše aplikováno 1. den. Autoři sledovali množství zadaných kmenových buněk pomocí kultivace kolonií CFU-C (*colony forming unit cells*). U kontrolní skupiny 14 zdravých dárců byla průměrná koncentrace buněk tvořících kolonie CFU-C v periferní krvi $9,5$ (range $2 - 28$) na 2×10^5 mononukleárních buněk (MNC). Průměrná koncentrace CFU-C u nemocných v periferní krvi po chemoterapii byla $6,0$ (range $0 - 27$) na 2×10^5 MNC. Zajímavé byly i výsledky dynamických studií: 7. den nebyly u nemocných v periferní krvi detekované CFU-C, ale 15. den došlo k 5násobnému vzestupu CFU-C oproti základní hodnotě. Maximální vzestup CFU-C v periferní krvi byl 21. den od chemoterapie. Tento vzestup byl 20násobný oproti základní hodnotě. Podle výsledků uzavírají autoři, že uvedená metodika vede k zisku kmenových buněk z periferní krve v adekvátním množství jako ze dřeně, a to umožňuje získaný materiál použít ke studiu příznivého ovlivnění myelo-suprese po intenzivní chemoterapii [37]. Sheridan a spol. použili pro mobilizaci G-CSF v dávce $12 \text{ } \mu\text{g/kg/den}$ v kontinuální s.c. infúzi. Medián zvýšení počtu cirkulujících CFU-GM byl 58krát a BFU-E 24krát [39]. Pettengellová a spol. v roce 1992 prezentovali předběžné výsledky u malé skupiny nemocných s maligním lymfomem, kterým byl nebo nebyl podáván G-CSF v průběhu fáze obnovy krvetvorby po chemoterapii (VAPEC-B). U této skupiny nemocných bylo popsáno zvýšení počtu cirkulujících CFU-C, a to zvláště u pacientů, kterým byla podávána chemoterapie v kombinaci s G-CSF [33]. Siena a spol. sledovali cirkulaci progenitorových buněk s expresí antigenu CD34 (CD34⁺ buněk) u 5 nemocných (1 pacient s Hodgkinovým lymfomem, 2 pacienti s non-Hodgkinovým lymfomem a 2 pacientek s karcinomem prsu). Byl použit protokol vysokodávkované chemoterapie – cyklofosfamid 7 g/m^2 s podáváním nebo bez podáváním GM-CSF v dávce $5,5 \text{ } \mu\text{g/kg/den}$ v i.v. infúzi. V období „peaku“ CD34⁺ v periferní krvi (3. týden po chemoterapii) provedli 3 – 4 leukaferézy na kontinuálním separátoru a podařilo se jim odebrat dostatek PBPC pro autologní transplantaci. Výtěžek byl podáním GM-CSF zvyšován 5x a byl větší, než při odběru kostní dřeně v celkové narkóze. Kultivačními metodami i vyšetřením membránových antigenů prokázali, že kvalita PBPC je stejná jako kvalita

dřeňových progenitorů. Proto uzavírali, že PBPC jsou vhodné pro transplantace i pro genové manipulace stejně, jako dřeňové krvetvorné buňky [40]. V další studii Teshima a spol. sledovali 68 nemocných (99 sérií leukaferéz) s hematologickými a solidními nádory. Sledování mobilizace PBPC bylo prováděno po samotné cytostatické léčbě, nebo v kombinaci cytostatické léčby s G-CSF. Většina nemocných byla léčena standardním chemoterapeutickým režimem. Podávání G-CSF bylo zahájeno při prvním zvýšení počtu leukocytů, průměrně 13. den (range 5 - 23) po chemoterapii. G-CSF byl podáván v dávce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ i.v. v 6 hodinové infúzi nebo byl podáván s.c. v dávce 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$. Maximální vzestup počtu cirkulujících CFU-GM v periferní krvi byl u nemocných s chemoterapií 27,7 dne a u nemocných s kombinací chemoterapie a G-CSF 24,2 dne. Při hodnocení průměrného výtěžku CFU-GM v periferní krvi byl zjištěn signifikantně vyšší výtěžek CFU-GM u nemocných s kombinovaným mobilizačním režimem (chemoterapie a G-CSF): při chemoterapii byl průměrný výtěžek CFU-GM $8,4 \times 10^4/\text{kg}$ a při kombinaci chemoterapie s G-CSF $18,6 \times 10^4/\text{kg}$ [41]. Vose a spol. popsali v roce 1992 u nemocných s Hodgkinovým lymfomem 12násobné zvýšení CFU-GM v periferní krvi po 11 dnech podávání IL-3 v dávce 125 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ i.v. [46]. Vredenburgh a spol. v roce 1998 publikovali výsledky randomizované studie s použitím lidského rekombinantního interleukinu-11 (IL-11) v průběhu autologní transplantace kostní dřeně s PBPC u nemocných s karcinomem prsu. Tato studie sledovala možnosti ovlivnění obnovy krevních destiček. U 80 nemocných byla použita vysokodávkovaná chemoterapie v kombinaci cyklofosamid, cisplatina a karmustin. Nemocné byly randomizovány do 3 skupin: placebo – 26 nemocných, podávání IL-11 v dávce 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ – 28 nemocných a podávání IL-11 v dávce 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ – 26 nemocných. Podle výsledku nebylo prokázáno, že léčba IL-11 významně sníží počet nutných transfuzí krevních destiček [47].

Růstový faktor G-CSF je v hematonekologii a onkologii používán při léčbě febrilní neutropenie u nemocných např. po intenzivní a vysokodávkované chemoterapii, EPO při léčbě chronické anemie u onkologických nemocných. Využití kombinace těchto růstových faktorů jsem prezentoval v práci, která řeší otázku možnosti mobilizace PBPC u nemocných žen po intenzivní chemoterapii. Tato práce vznikla v roce 1996 a byla publikována v roce 1997 v časopise Neoplasma:

Circulation of progenitor cells after intensive chemotherapy followed by combination G-CSF and EPO in breast carcinoma.

S. Filip, J. Vaňásek, M. Bláha, J. Vávrová

Neoplasma, 1997, 44 (4): 212-218.

Podle našich zkušeností lze u nemocných s karcinomem prsu použitím intenzivní chemoterapie a kombinace G-CSF (filgrastin) a EPO (erythropoetin) dosáhnout velmi dobrého mobilizačního efektu. Sledovali jsme 11 nemocných žen s karcinomem prsu, kterým byla podávána intenzivní cyklická chemoterapie EC (epirubicin 150 mg/m² a cyklofosfamid 1300 mg/m²). Při léto léčbě často dochází k leukopenii a anemii s nutností transfúzí, nebo dokonce ke snížení intenzity terapie. Proto jsme při poklesu hemoglobinu pod 85 g/l podávali nemocným kombinaci G-CSF 5 µg/kg/den s.c. a EPO v dávce 250 IU/kg/den, také s.c. Zjistili jsme statisticky významný vzestup cirkulujících progenitorových buněk v periferní krvi oproti výchozím hodnotám: CD34⁺ 7,8krát, CFU-GM 23,4krát a BFU-E 28,7krát. Kombinace G-CSF a EPO se tedy jevila po této stránce klinicky účinná a také vhodná pro mobilizaci progenitorových buněk. V letech 1995-1997 tato práce představovala v naší republice první soubor nemocných s karcinomem prsu, u kterých byla v léčbě použita kombinace růstových faktorů. Byla monitorována jak klinická odpověď na podání růstových faktorů, tak cirkulace progenitorových buněk v periferní krvi po aplikaci intenzivní cyklické chemoterapie u nemocných žen s karcinomem prsu. Práce ukázala cestu pro další možnosti využití kombinace růstových faktorů, a to především za účelem mobilizace PBPC. Svou prací jsme také vytvořili základ pro klinické využití těchto růstových faktorů v přípravě nemocných k autologní transplantaci periferních kmenových buněk s karcinomem prsu.

Používání hemopoetických růstových faktorů vedlo u nemocných po cytostatické léčbě k významně rychlejší reparaci kostní dřeně, doplňování marginálního a cirkulačního poolu kmenových buněk. Při monitorování nemocných s karcinomem prsu sledovaným v období po cytostatické léčbě jsme prokázali velmi dobrý efekt růstových faktorů jak na krvetvorbu, tak také na snížení četnosti sekundárních infekčních komplikací. Obdobný poznatek byl učiněn také u onkologicky nemocných trpících chronickou anémií. Použití erythropoetinu u onkologických pacientů vycházelo ze zkušeností, které získali nefrologové při léčbě renální insuficience. V naší další klinické studii jsme spolu s autologní transplantací PBPC použili k léčbě kombinaci G-CSF a EPO. Výsledky této studie byly prezentovány v roce 1999 a publikovány v časopise Neoplasma:

The increase of the rate of hemopoietic recovery and clinical benefit of the erythropoietin (EPO) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with peripheral blood progenitor cells (PBPC) after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer patients.

S. Filip, J. Vaňásek, M. Bláha, P. Měřička, J. Vávrová, K. Podzimek

Neoplasma, 1999, 46 (3): 166-172.

U 11 nemocných žen s vysoce rizikovým karcinomem prsu jsme v období pancytopenie po autologní transplantaci PBPC podávali kombinaci hemopoetických růstových faktorů G-CSF a EPO. Podávání G-CSF jsme zahajovali vždy při poklesu leukocytů pod $1 \times 10^9/l$ v dávce 5 $\mu g/kg/den$ s.c. až do doby, kdy došlo k vzestupu leukocytů v periferní krvi nad $5 \times 10^9/l$. Podávání EPO bylo zahájeno vždy při poklesu Hb pod 100 g/l a zároveň při vyloučení jiné příčiny anemie v dávce 250 UI/kg/den s.c. až do doby vzestupu Hb nad 130 g/l. Vzestup leukocytů byl pozorován v období od 5. do 10. dne aplikace kombinace růstových faktorů. Zvýšený počet buněk CD34⁺ v periferní krvi nepředcházel zvýšenému počtu leukocytů, byl současný a trval až do 10. dne. Obdobný výsledek jsme pozorovali také při hodnocení kultivací progenitorových buněk CFU-GM z periferní krve. Při sledování hodnot trombocytů jsme u žen s karcinomem prsu zaznamenali normalizaci jejich počtu kolem 20. dne. U všech nemocných jsme při sledování hodnot hemoglobinu a erytrocytů, pozorovali vzestup již 10. den a postupnou normalizaci hodnot hemoglobinu a erytrocytů 15. až 30. den. Výsledky sledování hladiny EPO v séru plně korelují s jeho aplikací u všech nemocných. Po vysazení EPO došlo k normalizaci hladiny erythropoetinu v séru 30. den od zahájení léčby. Žádný z pacientů před podáním EPO neměl zvýšenou, nebo naopak sníženou hladinu erythropoetinu v séru. Uvedené výsledky dokumentovaly, že hlavním obdobím reparace krvetvorby je 7. až 10. den. V tomto období dochází jak ke vzestupu leukocytů, tak CD34⁺ buněk, hladina erythropoetinu v séru je také zvýšená, i když je to dané pravděpodobně intenzitou podávání EPO. Publikovaná práce byla důležitým mezníkem a ukázala na naši metodickou připravenost pro zvládnutí intenzivních léčebných postupů pro ambulantní léčbu u nemocných se solidními nádory.

Počátkem roku 1999 jsme v naší laboratoři připravili několik experimentů, které vycházely z metodiky *ex vivo* expanze hematopoetických buněk. Účelem těchto experimentů bylo najít vhodnou kombinaci cytokinů k expanzi kmenových buněk *ex vivo*. V tomto období bylo již známo, že cytokiny musí jednak stimulovat vlastní obnovu kmenových buněk, a dále stimulovat proliferaci těchto buněk žádaným směrem. Některé výsledky ukazovaly, že některé cytokiny jsou nepostradatelné při expanzi kmenových

buněk, takovými cytokiny byly IL-3 a SCF [8]. Použití samotného SCF mělo jen velmi malou stimulační aktivitu. Tento růstový faktor je však významný pro svůj synergický efekt při použití s dalšími cytokiny, především s IL-3. Právě výběr vhodné kombinace cytokinů je důležitý k tomu, zda dojde k expanzi primitivních buněk či k proliferaci buněk již zadaných určitým směrem. Brugger a spol. popsali, že kombinace SCF, IL-1, IL-3, IL-6 a EPO je optimální jak pro expanzi celkového množství jaderných buněk, tak pro expanzi klonogenních progenitorů [9]. Lemoli a spol. prokázali, že IL-11 iniciuje proliferaci velmi primitivních hematopoetických progenitorů a potencuje aktivitu SCF a IL-3 [26]. Gross a spol. použili k expanzi CD34⁺ buněk kombinaci SCF+IL-3+GM-CSF+Epo. Po šestidenní expanzi identifikovali populaci buněk CD34⁺/CD71^{low}/CD38⁻ s dlouhodobým repopulačním potenciálem a dále vzestup buněk zadaných erytroidním směrem (CD71^{high}) a buněk zadaných do myeloidní diferenciac (CD33⁺) [20]. Traycoff a spol. prokázali, že pokles v hematopoetickém potenciálu, v případě kultivace CD34 buněk *in vitro*, je spojený s jejich proliferační historií. CD34, které se v kultuře dělily 4krát, měly podstatně menší schopnost obnovit krvetvorbu ozářených NON/SCID myši než CD34 buňky v G₀ fázi, které ještě nebyly expandovány. V případě, že kmenová buňka projde pouze jedním dělením, její potenciál dlouhodobě obnovit krvetvorbu se neliší, případně je lepší než u CD34 v G₀ fázi. Prokázali dále, že po čtyřech děleních se zvyšuje procento buněk podléhajících apoptóze [42]. Hlavním cílem *ex vivo* expanze při léčbě poškozené krvetvorby je produkovat *ex vivo* primitivní hematopoetické prekurzory se stejnou schopností, jako mají čerstvě izolované buňky a také buňky diferencující se na neutrofilní granulocyty. Zdá se však, že buňky proliferující v kultuře pod vlivem cytokinů se často spíše diferencují a mají deficit ve své primitivní hematopoetické funkci. Ukazuje se, že existuje kritický počet dělení primitivní kmenové buňky. Je třeba si uvědomit, že proliferační potenciál primitivních buněk je konečný a je limitujícím faktorem při naší snaze manipulovat s těmito buňkami *in vitro* [44].

V našich experimentech jsme k expanzi AC133 buněk použili cytokiny SCF, IL-3, IL-11 a jejich kombinace SCF+IL-3, SCF+IL-11, SCF+IL-3+IL-11. Presentované výsledky byly základem pro vypracování metodiky *ex vivo* expanze hematologických buněk pro klinické využití u nemocných léčených chemoterapií. Tato práce byla publikována v roce 2000 v časopise Neoplasma:

Myeloid differentiation and maturation of SCF+IL-3+IL-11 expanded C133⁺/CD34⁺ cells selected from high-risk breast cancer patients.

S. Filip, J. Vávrová, D. Vokurková, M. Bláha, J. Vaňásek

Neoplasma, 2000, 47 (2): 73-80.

AC133⁺ buňky byly expandovány *ex vivo*. Jako kontrola bylo použito kultivační médium, které jsme standardně používali v rámci rutinního vyšetření CFU-GM a BFU-E. Pro *ex vivo* expanzi byl použit panel cytokinů a jejich kombinace (SCF, SCF+IL-3, SCF+IL-11 a SCF+IL-3+IL-11). Po 14denní kultivaci byl spočítán počet kolonií CFU-GM a BFU-E. V kultivačním médiu (kontrola) byl počet CFU-GM/10⁴ MNC 480,1 (175-710) a BFU-E/10⁴ MNC 274,2 (10-998). Po sedmidenní expanzi s kombinací SCF+IL-3 stoupl počet CFU-GM/10⁴ MNC 614,2 (257-1040), ale poklesl počet BFU-E/10⁴ MNC 74,9 (60-218). Podobně při kombinaci SCF+IL-11 stoupl počet CFU-GM/10⁴ MNC 1393 (310-2640) a poklesl počet BFU-E/10⁴ MNC 123,3 (570-6042) a také při kombinaci SCF+IL-3+IL11 byl zaznamenán vzestup CFU-GM/10⁴ MNC 1120 (670-1570) a pokles BFU-E/10⁴ MNC 73,9 (40-175) ve srovnání s kontrolou. Při hodnocení počtu AC 133⁺ buněk bylo zjištěno, že dosažená *ex vivo* expanze u kombinace SCF+IL-3+IL-11 byla až 19,4 násobná. Z výsledků je zřejmé, že námi použité kombinace stimulovaly především diferenciaci kmenových buněk směrem do granulocytární řady. Vypracováním metodiky *ex vivo* expanze jsme vytvořili jako první v naší republice metodiku pro klinické využití takto upravených koncentrátů hematopoetických buněk, získaných z periferní krve u onkologicky nemocných léčených myeloablativní chemoterapií. Tato metoda umožňovala připravit koncentráty buněk pro autologní transplantaci „na míru“, např. autologní transplantaci buněk s potenciálem diferenciaci do granulocytární nebo trombocytární řady. I přes tyto úspěchy jsme tuto metodu již dále nerozvíjeli a pro klinickou aplikaci jsme vypracovali další metodu aplikace autologní plné krve obohacené o PBPC, která byla uplatněna v ambulantním systému léčby onkologických pacientů.

Komentář k souboru prací k tématu autologní transplantace PBPC a plné krve obohacené o PBPC

Autologní transplantace periferních kmenových buněk (*peripheral blood stem cells* – PBSC), nebo přesněji periferních progenitorových buněk (*peripheral blood progenitor cells* – PBPC), byly v období od poloviny devadesátých let minulého století stále častěji používány v léčbě hematologických a nehematologických malignit, i autoimunních nemocí. Souhrn aktivit alogenní a autologní transplantace v Evropě od roku 1996 až 1998 shrnul ve svém článku Grathwol a spol. v roce 1998. V publikované sestavě hodnocených pracovišť bylo také zařazeno naše pracoviště s počtem 37 autologních transplantací u nemocných se solidními nádory [19].

Pro metodiku autologní transplantace PBPC bylo potřeba vyřešit několik problémů. Prvním problémem bylo stanovení minimálního počtu kmenových buněk, které musí být nutně převedeny, aby byla zaručena kvalitní a rychlá obnova krvetvorby. Většina pracovišť se snažila, aby počet transplantovaných CD34⁺ buněk nebyl nižší než 1x10⁶/kg hmotnosti nemocného, optimální počet je 5x10⁶/kg [27]. Dalším problémem byl odhad vhodného údobí „timing“ pro odběr PBPC.

Zde připomenu některé důležité práce, které byly také základem pro naše klinické aplikace. Arena a spol. v roce 1998 publikovali výsledky celkem 223 leukaferéz, kdy vyšetřovali počet MNC, CD34⁺ buněk a počet CFU-GM těsně před sběrem a den před sběrem. Lineární regresní analýzou dokázali, že právě CD34⁺ stanovené v periferní krvi těsně před první aferézou jsou relevantní množství CD34⁺ v sebraném transplantátu [4]. Hlavní podíl na expresi CD34 mají heterogenní populace buněk zadaných pro granulocytární a monocytární řadu [15]. Dercksen a spol. v roce 1995 popsali vhodnější ukazatel založený na panelu exprese CD34⁺/CD41⁺ [13]. Feng a spol. roku 1998 prokázali významnou korelaci mezi počtem CD34⁺/CD41a⁺ v separovaných a zamražených PBPC a „recovery“ jak granulocytů, tak trombocytů po transplantaci. Stanovili také korelaci mezi počtem CFU-Meg, CD34⁺/CD41a⁺ v infundovaných PBPC a rychlostí obnovy trombocytů. Ukázalo se, že pro rychlou obnovu trombocytů je třeba 1x10⁵/kg CD34⁺/CD41a⁺ [15]. Millar a spol. v roce 1998 podali důkaz, že dlouhodobá obnova trombocytů je více závislá na počtu CD34⁺/CD33⁻, než na celkovém počtu CD34⁺ buněk. 1,4x10⁶ (CD34⁺/CD33)/kg bylo nutné pro rychlou obnovu trombocytů po transplantaci [28].

Hledání nových možností korelace získaných a transplantovaných kmenových buněk a rychlosti přijetí štěpu vede ke snížení rizika komplikací, ke zvýšení efektivity léčby a k benefitu nemocných léčených HDC (vysokodávkovaná chemoterapie) s podporou PBPC. Strádání nemocných i náklady na léčbu se snaží autoři snížit zvyšováním podílu ambulantní léčby. Při ambulantním podání chemoterapie s růstovými faktory k mobilizaci PBPC bylo 12 - 30 % pacientů hospitalizováno v průměru 5 dní [49]. Výsledky další studie ukázaly, že u pacientů, kteří dostávali cyklofosfamid, docetaxel a G-CSF k mobilizaci PBPC, vyžadovalo jen 9 % hospitalizaci [50]. Výsledky těchto studií i naše výsledky ukázaly, že podání G-CSF nebo GM-CSF k mobilizaci PBPC nevyžaduje hospitalizaci a je obvykle metodou volby [6]. Toto zjištění významně ovlivnilo naši další práci. Jako první v republice jsme vypracovali protokol léčby intenzivní cyklické chemoterapie s aplikací plné krve obohacené o PBPC, který bylo možno použít ambulantně. V tomto období byly vypracovány postupy, které umožnily docílovat stoupajících výtěžků PBPC v periferní krvi nemocných. Použití efektivních mobilizačních režimů – kombinace chemoterapie a růstových faktorů a cytokinů umožňovalo zvýšit počet cirkulujících progenitorových buněk až 100násobně [27]. Dalším důležitým aspektem je snaha o redukci transfundovaného objemu a tím také snížení množství podaného kryoprotektiva - DMSO (dimethylsulfoxid) i hemolyzovaných erytrocytů. Tyto snahy vedly k myšlence použít v rámci podpůrné léčby pouhou plnou krev obohacenou o PBPC.

První zkušenosti s použitím plné krve popsal Molineux a spol. v roce 1990, když letálně ozářeným myším aplikovali 3 ml krve (1,5násobek normálního krevního objemu). Před odběrem byly myši léčeny G-CSF v malé dávce – což vedlo k mobilizaci PBPC [29]. Ossenkoppele a spol. ověřovali u 6 nemocných s mnohočetným myelomem hypotézu, zdali je možno nahradit PBPC (které byly separované a kryokonzervované) plnou krví (odebranou venesekcí) po léčbě vysokodávkovaným melphalanem (140 mg/m²). Při porovnávání studované skupiny a kontrolní skupiny (20 nemocných), kterým nebyly podány PBPC, byly zjištěny statisticky významné rozdíly v obnově krvetvorby. Podle autorů se uvedená technika jeví jako snadná, efektivní pro obnovu krvetvorby po vysokodávkované chemoterapii [30]. Pettengellová a spol. roku 1995 popsali použití separovaných PBPC a plné krve jako podpůrné léčby u 25 nemocných s malobuněčným karcinomem plic v rámci intenzivní cyklické chemoterapie. Nemocní byli léčeni kombinací ICE (ifosfamid, karboplatina, etoposid) a G-CSF (300 µg/kg/den s.c. ve 4. – 15. den). Podle hodnocení autorů se chemoterapie ICE jeví jako do mobilizace PBPC jako efektivní

(až 120násobný vzestup GM-CSF). Při hodnocení obnovy krvetvorby bylo prokázáno, že je pro podpůrnou léčbu možno použít jak separované PBPC, tak plnou krev obohacenou o PBPC [32,33]. Dräger a spol. roku 1998 popsali svoje zkušenosti s možností aplikace plné krve, obohacené o PBPC u 30 nemocných s mnohočetným myelomem a u 25 nemocných s lymfomem. Dosažené výsledky byly srovnávány s historickou kontrolní skupinou. Bylo prokázáno významné snížení doby neutropenie, trombocytopenie a doby hospitalizace [14]. Podle Pettengellové a spol. byla prokázána stejná efektivita postupu s použitím kryokonzervovaných PBPC versus plná krev obohacená o PBPC [1,14]. Oproti tomu popisuje De Wit a spol. v roce 1998, že při srovnání podpory krvetvorby pomocí plné krve nebo G-CSF nebyl nalezen významný rozdíl [12].

Naše první zkušenosti s použitím intenzivní cyklické chemoterapie s podporou separovanými PBPC a plnou krví obohacenou o PBPC se datují od roku 1994. V období let 1994 až 2000 jsme jako první v republice zavedli tuto metodu v léčbě nemocných s vysoce rizikovým karcinomem prsu, obdobně jsme léčili nemocné s dalšími nádorovými onemocněními, jako malobuněčným karcinomem plic, karcinomem varlat a karcinomem ledviny. Největším souborem byly nemocné ženy s pokročilým karcinomem prsu, kde jsme jako první v republice také vytvořili léčebný protokol s využitím aplikace plné krve obohacené o PBPC, která byla transfundována nemocným po cyklické intenzivní chemoterapii. Výsledky naší práce byly publikovány v časopise *Journal of Hematotherapy and Stem Cells Research* v roce 2000:

Application of whole blood and peripheral blood progenitor cells (PBPC) and new strategies for rescue after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer

S. Filip, M. Bláha, K. Odrážka, P. Měřička, J. Vávrová

J. Hematotherapy & Stem Cell Research, 2000, 9 (1): 31-38.

Léčba pacientek s vysoce rizikovým karcinomem prsu s využitím plné krve obohacené o PBPC byla prováděna podle protokolu EC (epirubicin 150 mg/m² a cyklofosfamid 1250 mg/m², obojí 1. den, ve 14-denních intervalech). První cyklus intenzivní cyklické chemoterapie byl mobilizační, s použitím G-CSF v dávce 5 µg/kg/den, podávání bylo zahájeno vždy 7. den po aplikaci chemoterapie bez vztahu ke krevnímu obrazu. Odběr PBPC leukaferézou byl prováděn 11. až 13. den. Plná krev byla odebrána 14. den po chemoterapii. Jako podpůrná léčba byla použita kombinace plné krve

obohacené o PBPC a kryokonzervované PBPC (back-up). Plná krev byla podávána po 2. - 5. cyklu, po 6. cyklu byly podávány kryokonzervované PBPC. V našich klinických postupech jsme zjistili, že uvedená metoda má některé problémy, a to především v tom, že plná krev má menší výtěžky CFU-GM a CD34⁺ buněk. Dalším problémem byla větší možnost kontaminace nádorovými buňkami a s tím spojená otázka čištění „purgingu“. V prvním případě jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v reparaci krvetvorby při porovnání PBPC a plné krve obohacené o PBPC. V druhém případě se nám nepodařilo prokázat vztah mezi existencí nádorových buněk v transplantátu a relapsu onemocnění. Významnými však zůstávaly námi zjištěné a ověřené nesporné výhody, především dostupnost této metody i v ambulantních podmínkách, významně menší zátěž nemocného ve srovnání s odběrem PBPC pomocí leukaferézy. Nemocný není zatěžován kryoprotektivními látkami, které jsou ve vyšších koncentracích toxické a ani hemolyzovanými erytrocyty, jak tomu bylo v případě podání kryokoncentrátů. Tento soubor byl součástí pravidelných prezentací skupiny EBMT [19] na evropské úrovni v rámci přednášek a posléze publikací v odborných zahraničních časopisech. Naše pracovní skupina se významně podílela na spolupráci v rámci EBMT „solid tumor group“. Touto metodou jsme léčili celkem 97 pacientek, z toho 56 pacientek s lokálně pokročilým nebo metastázujícím karcinomem prsu. Soubor byl největší skupinou nemocných léčených výše uvedenou metodou v naší republice, který byl prezentován. Výsledky 10-ti letého přežití byly prezentovány a publikovány nejen u nás, ale i v zahraničí [10].

Komentář k souboru prací na téma plasticita kmenových buněk

Východiskem pro naše experimentální práce ve směru studia plasticity hematopoetických a neurálních kmenových buněk byla práce Björnsona a spol., kteří oznámili, že kultivované myší neurální kmenové buňky jsou schopny po transplantaci ozářeným myším produkovat různé typy krevních buněk [7]. Provedli experiment, jehož cílem bylo stanovit, zda se kmenové buňky omezují na tvorbu specifických typů buněk podle tkání, v nichž sídlí. Zjistili, že po transplantaci ozářeným hostitelům geneticky označené neurální kmenové buňky produkovaly různé typy krevních buněk, včetně myeloidních a lymfoidních, právě tak jako nezralé hematopoetické buňky. To znamenalo, že neurální kmenové buňky mají širší diferenciační potenciál, než se původně očekávalo. Experimentální práci na poli plasticity kmenových buněk jsme zahájili koncem roku 2001. Využili jsme naše bohaté zkušenosti jak s hematopoetickými kmenovými buňkami, tak nově s neurálními kmenovými buňkami. Naše první práce v tomto směru vznikla také na základě spolupráce s Methodist Research Institute (Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis, USA). Experimenty naší skupiny byly prvními tohoto druhu v naší republice a metodicky znamenaly nový pohled na objasňování procesů, týkajících se plasticity kmenových buněk. Výsledky naší práce byly prezentovány v roce 2004 v časopise *Stem Cells and Development* v roce 2004:

Local environmental factors determine hematopoietic differentiation of neural stem cells.
S. Filip, J. Mokrý, J. Karbanová, J. Vávrová, D. English
Stem Cells and Development, 2004, 13 (1): 113-120.

Cílem našeho experimentu bylo sledovat, jaký podíl na reparaci krvetvorby mohou mít transplantované NSCs a jaká je distribuce transplantovaných buněk u nesplenektomovaných a splenektomovaných subletálně celotělově ozářených myší. Transplantace buněk kostní dřeně podle očekávání příznivě ovlivnila hematopoézu a urychlila reparaci kostní dřeně. Již 12. den a 30. den po transplantaci buněk kostní dřeně došlo k normalizaci hematopoézy u subletálně celotělově ozářených myší. Transplantace neurálních kmenových buněk neměla významný vliv na reparaci kostní dřeně 12. ani 30. den po subletálním ozáření, což také potvrdilo to, že v kostní dřeni nebyly nalezeny X-Gal pozitivní kolonie CFU-GM. Při srovnání kontrolní skupiny myší, které byly ozářeny

subletální dávkou oproti kontrolní skupině, u které byla provedená splenektomie, a také jim nebyly transplantovány buňky, jsme zjistili, že splenektomie nevedla k významnému zvýšení počtu CFU-GM v kostní dřeni, a že tento rozdíl nebyl statisticky významný. Důležitým zjištěním ale je, že NSCs po transplantaci kolonizují především slezinu, kde se uplatňují na extramedulární hematopoéze. Při splenektomii dochází k významnému snížení podílu extramedulární hematopoézy na reparaci kostní dřeni. Následně dochází ke kolonizaci kostní dřeni NSCs. Tyto buňky byly také prokázány v koloniích CFU-GM z kostní dřeni, kde X-GAL⁺ buňky byly nalezeny ve více než 50%. Zjistili jsme, že transplantace NSCs má vliv především na extramedulární hematopoézu. Dále jsme zjistili, že po splenektomii dochází ke kolonizaci kostní dřeni NSCs. Plasticita NSCs je přímo závislá na extramedulárním mikroprostředí. Z toho plyne, že kostní dřeň nemusí být cílovým orgánem pro diferenciaci NSCs v hemopoetické buňky. Extramedulární hemopoetický systém představuje pro NSCs vhodné prostředí pro rozvinutí jejich plasticity.

Náš experiment však nespĺňoval velice přísné požadavky určené Andersonem, Gagem a Weissmanem. Navíc k další opatrnosti v experimentech nás vedly některé dřívější práce publikované van der Kooyem, který opakoval experimenty s použitím populace neurálních kmenových buněk odvozených z jediné kmenové buňky, ale nepodařilo se mu generovat žádné krevní buňky [11,43]. Jiní autoři, např. studie Clarkové, Friséna a jejich kolegů, podporovali myšlenku, že neurální kmenové buňky mají široký potenciál. Ale i toto se setkala se skepsí. Tým vědců purifikoval neurální kmenové buňky v kultuře, umožnil jim vyrůst do mnohobuněčných shluků, tzv. neurosfér, a vložil je do blastocysty vyvíjejícího se myšího embrya. Tyto buňky přispěly k vývoji všech tří zárodečných vrstev zvířete. [17]. Ačkoliv Friséna připouštěl, že některé ze zřejmě reprogramovaných buněk mohly fúzovat, věří, že k fúzi dochází vzácně. Proto tento mechanismus nemůže být zodpovědný za tak širokou distribuci *lacZ*⁺ buněk pozorovanou ve většině chimérických embryí [48]. Podle názoru mnoha vědců, publikovaného studií, která nejlépe ukazuje skutečnou plasticitu, je studie skupiny vedené Lagassem. Vědci purifikovali hematopoetické kmenové buňky myších samců podle 13 buněčných povrchových markerů. Po injekci buněk do cirkulace ozářených myších samic s genetickou poruchou jater vedl transplantát nejen k reparaci krevního systému u 4 z 9 myší, ale rovněž léčebně upravil jejich defekt jater. Když vědci tyto myši utratili o 7 měsíců později, třetina až polovina jejich jaterní tkáně byla odvozena z dárcovských buněk [22]. Zde je důležité připomenout skutečnost, že plasticita kmenových buněk

se projevuje i v některých formách mikrochimérismu. K mikrochimérismu dochází fyziologicky během těhotenství při přestupu fetálních buněk do matčiny cirkulace. Kmenové buňky fétu, které obejdou placentární bariéru, mohou kolonizovat tkáň matky postižené chorobným procesem, např. při infekčním nebo endokrinním onemocnění. Tyto nezralé buňky jsou schopny perzistovat v mateřských tkáních léta i desetiletí [23]. Příklad, kdy mikrochimérismus přispěl k regeneraci tkání, popisuje i Alison a spol. U žen s chronickým poškozením jater, které obdržely krevní transfúzi od mužského dárce, bylo možné v jaterním parenchymu identifikovat buňky, které svou morfologií byly identické se zralými hepatocyty, vyjadřovaly jaterní specifický marker cytokeratin 8 a jejich jádro obsahovalo Y chromosom [2]. Otázkou nadále zůstává průkaz, zda např. mohou transplantované buňky plně fungovat v nových rolích, které přijaly, a tím zachránit poškozenou tkáň nebo organismus. I přes tyto úspěchy ale nemůžeme jistě dokázat plasticitu kmenových buněk. Stále nevíme, jak vypadá multipotentní – zakládající buňka. Zde musíme připustit až filozofickou otázku: lze za současného stavu poznání postihnout tuto buňku? Je způsob, kterým se o to snažíme, skutečně správný? Je vůbec otázka kmenové buňky správně definovaná? Připouštíme, že diskuse na toto téma by nás zavedla nad rámec tohoto sdělení. Ale tyto a další úvahy nás vedly k rozšíření našich experimentů o sledování kinetiky transplantovaných NSCs v organismu příjemce. Další naše práce vznikla také ve spolupráci s Methodist Research Institute (Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis, USA). Následně odchodem našeho spolupracovníka prof. Denise Englishe do Center of Excellence for Aging and Brain Repair (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA), byla spolupráce rozšířena, a to především v *in vivo* experimentech. Experimenty naší skupiny související se sledováním kinetiky transplantovaných buněk byly logickým pokračováním a snahou prokázat plasticitu transplantovaných buněk a určit některé prediktivní faktory pro plasticitu transplantovaných buněk. Výsledky naší práce byly prezentovány v roce 2005 v časopise *Transfusion and Apheresis Science*:

The transplantation of neural stem cells and predictive factors in hematopoietic recovery in irradiated mice.

S. Filip, J. Mokrý, J. Karbanová, J. Vávrová, D. Vokurková, M. Bláha, D. English
Transfusion and Apheresis Science, 2005, 32 (2):157-166.

Cílem dalšího experimentu, který významně ovlivnil naši práci na téma plasticity kmenových buněk, bylo sledovat kinetiku transplantovaných NSCs u subletálně

celotělově ozářených myší. V prezentovaných experimentech jsme se snažili zopakovat výsledky pokusu prokazujícího příspěvek NSCs v obnově krve tvorby. Pokusili jsme se splnit další z podmínek pro důkaz plasticity NSCs v hematopoetických i nehematopoetických tkáních. Histochemická analýza transplantovaných *lacZ*⁺ buněk byla prováděna 12. a 30. den po transplantaci v nehematopoetických tkáních (plíce, játra, slezina, thymus a kosterní sval). Statisticky významný vzestup počtu transplantovaných buněk byl zaznamenán ve slezině a thymu. Tento výsledek podporoval naši původní úvahu o tom, že NSCs mají úzký vztah k lymfopoéze. Při analýze povrchového znaku Sca-1 na buňkách kostní dřeně a NSCs po transplantaci bylo zjištěno, že NSCs mají hematopoetickou identitu a mohou se uplatňovat při obnově krve tvorby, i když nemají typické povrchové znaky HSCs. Tento rozdíl ale vyvolal další otázky, které souvisejí s hematopoetickou identitou transplantovaných buněk. Pro průkaz plasticity NSCs by nález znaků typických pro HSCs byl důležitý a měl by prediktivní hodnotu. Tyto a další naše experimenty jenom potvrzují opatrnost v prezentaci výsledků práce s kmenovými buňkami. Vzhledem k výše uvedeným výsledkům bylo nutné opakovat a znovu se zaměřit v první řadě na kinetiku a "homing" transplantovaných buněk v tkáních příjemců a jejich identifikaci a funkční analýzu. Pro další práci jsme místo NSCs použili HSCs, a to především proto, že s tímto modelem byly naše zkušenosti větší. Zaměřili jsme se na popis reparace krve tvorby a *in vivo* homing transplantovaných *lin*⁻*CD117*⁺ (obsahující *lacZ* gen) buněk z kostní dřeně po celotělovém letálním ozáření myší dávkou LD 9Gy v hematopoetických a nehematopoetických tkáních. Interval analýzy byl volen tak, aby postihl období monitorující reparaci, kterou pozorujeme u hematopoetického systému (8., 12. a 30. den po transplantaci). Analýza *CD117*⁺ buněk byla provedena v kostní dřeni, slezině, thymu a periferní krvi. Transplantované buňky, obsahující *lacZ* gen, byly analyzovány histochemicky ve slezině, thymu, játrech, žaludku, střevě a stehenní kosti. V našich experimentech bylo prokázáno, že transplantací separovaných buněk dosáhneme reparaci hematopoézy. Rozdíly v počtu CFU-GM v kostní dřeni ($p < 0,001$) a slezině ($p = 0,0031$) byly statisticky významné, ale neměly vliv na přežití letálně celotělově ozářených myší. Dále se ukázalo, že v procesu *in vivo* homingu nejsou aktivovány výlučně jenom hematopoetické tkáně, zde také s velkou pravděpodobností nastupují jiné mechanismy reparace, jako např. extramedulární hematopoéza a kolonizace nehematopoetických tkání, např. LPM tenkého střeva [16].

Komentář k souboru prací na téma nádorové kmenové buňky

Naše další teoretická a experimentální práce v oblasti nádorových kmenových buněk vycházela z diskuze, která se týká "rozporu" ve schopnosti zralých kmenových buněk generovat pouze jeden typ diferencovaných buněčných fenotypů, a také schopnosti některých jiných populací kmenových buněk mít širší fenotypový potenciál, než mají typy buněk v jejich rezidenční tkáni [24,34,45]. Z toho dále plyne jedna z hlavních otázek souvisejících s pochopením homeostázy tkání a organismu jako celku - je to vztah plasticity a diverzity kmenových buněk. Můžeme tyto dva fenomény oddělit? Je diverzita kmenových buněk jenom funkčním vyjádřením jejich plasticity? K tomu, abychom se přiblížili k možné odpovědi na uvedené otázky, připomeneme, že tradiční model fenotypové diverzifikace buněk je založen na přísné hierarchii podskupin kmenových buněk s individuálními buněčnými liniemi vznikajícími cestami progresivní a jednosměrné diferenciací [3,25]. Podle tohoto názoru kmenové buňky podstupují sérii na sebe navazujících kroků, které se nezvratně generují v sekvenci pluripo-tentní, multipotentní, bipotentní, unipotentní a v diferencované potomstvo. Toto předpokládané třídění kmenových buněk se zakládá na víře, že kmenové buňky v dospělých tkáních jsou ve své kapacitě omezeny tak, aby produkovaly pouze fenotypy diferencovaných buněk rezidenční tkáně. Důkaz naznačující, že tkáňově odvozené kmenové buňky mohou mít širší potenciál, než jak se předpokládalo, zpochybňuje tuto základní premisu [35]. Akceptování plasticity kmenových buněk vede ke změně standardního názoru na diverzifikaci buněčných fenotypů, a proto nepřekvapilo, že nové poznatky se setkaly se zdravou dávkou skepticismu [18,36].

Podle našich představ může komplementární vztah plasticity a diverzity úzce souviset s možností vzniků nádorů. Proto zde velice stručně představíme současný pohled na jednu z možností vzniku nádorů, kde tyto dva fenomény sehrávají významnou úlohu. Podstatou celého problému je proces reparace tkání. Při poškození tkáně dochází k poklesu počtu diferencovaných buněk. To v důsledku působení signálních cest vede k aktivaci kmenových buněk a niché. Posléze může dojít k reparaci poškozené tkáně. Jiná situace ale vznikne tehdy, když dochází k chronickému poškozování tkáně a tedy k opakované aktivaci kmenových buněk. Zde může dojít za určitých podmínek ke vzniku nádoru [5]. Musíme připomenout, že důležitým jevem, který se tady uplatňuje, je plasticita

kmenových buněk. Naše základní představa vychází z předpokladu, že plasticita je vlastnost nejenom kmenových, ale také nádorových kmenových buněk. Obecně platí, že míra plasticity klesá se stupněm diferenciací buněk. Jak ale ukazují současné experimenty, asi nebude úplně nulová a nebude tedy platit, že vysoce diferencované buňky nebudou mít schopnost plasticity. Jejich plasticita bude malá, ale tento fenomén úplně nevymizí. Obecně řečeno, při poklesu počtu kmenových buněk se snižuje schopnost jejich plasticity, tj. populace je málo "plastická", ale vzhledem k tomu, že plasticita je obecně platný fenomén jak pro normální, tak nádorové kmenové buňky, dochází k nárůstu populace nádorových kmenových buněk, a tehdy se tato jejich plasticita zvyšuje. Myslíme si, že by to znamenalo, že za určitých okolností se mohou nádorové kmenové buňky účastnit regenerace, a to bez toho, že by daly vznik nádoru. Nabízí se nám předpoklad, že nádorové kmenové a progenitorové buňky pravděpodobně v určitém období můžeme reprogramovat a tímto dát podnět pro vznik normální tkáně.

Výše uvedené teoretické úvahy vedly k vypracování modelu karcinogeneze, založeného na vztahu kmenových buněk, jejich plasticity a diverzity. Předložená práce vznikla v rámci spolupráce s odborníky z University of South Florida College of Medicine (Tampa, FL, USA) a byla publikována v časopise *Stem Cells and Development* v roce 2008:

Stem cells and the phenomena of plasticity and diversity; a limiting property of carcinogenesis

S. Filip, J. Mokrý, J. Horáček, D. English

Stem Cells and Development, 2008, 17 (6): 1031-1038.

Naše práce se pokouší podat přehled některých důležitých otázek a názorů týkajících se jak plasticity, tak diverzity kmenových buněk. Základní myšlenkou je popis komplementárního vztahu mezi plasticitou a diverzitou kmenových buněk a nádorových kmenových buněk. Pro popis tohoto problému jsme si vybrali teoretický model procesů spojených s regenerací tkání. Na tomto modelu se snažíme dokladovat vztah mezi plasticitou a diverzitou kmenových buněk, poukázat na některé teoretické možnosti vzniku nádorů a možnosti reprogramování nádorových buněk. Vzhledem k tomu, že v našich úvahách předpokládáme komplementární vztah mezi plasticitou a diverzitou kmenových buněk, může vysoce plastická populace buněk navodit určitý stupeň diverzity všech buněk, včetně nádorových, a může vzniknout populace buněk s malou diverzitou

(*low diversity cells*). Případně nastane, že stupeň diverzity všech buněk se začne zvětšovat, tímto dojde ke strmému nárůstu plasticity nádorových kmenových buněk, k poklesu plasticity dospělých kmenových buněk a vznikne situace, kdy může dojít ke vzniku nádoru. Tímto stavem se navodí nový stupeň diverzity všech buněk a vzniká populace buněk s velkou diverzitou (*high diversity cells*). Na základě této úvahy si myslíme, že za určitých okolností se mohou nádorové kmenové buňky účastnit regenerace, a to i bez toho, že by daly vznik nádoru - *low diversity cells*, nebo může dojít ke vzniku nádoru – *high diversity cells*. Zde se také nabízí předpoklad, že nádorové kmenové a progenitorové buňky pravděpodobně v určitém období přechodu ze stavu diverzity, např. low – high – low se mohou neprogramovat, a tímto dát podnět pro vznik normální tkáně. Plasticita a diverzita kmenových buněk zde hraje významnou roli a stav high – low – high ukazuje na jejich komplementární vztah. Tyto dva fenomény nelze v čase od sebe oddělit. Proto se pokusme na tuto situaci dívat z pohledu biologického principu neurčitosti – vybrat si cestu plasticity nebo diverzity, obojí ve stejném čase není možné.

Závěr disertační práce

Předložená disertační práce se snaží přiblížit postupný vývoj výzkumu a posléze klinického využití kmenových buněk - HSCs v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění. Dále přináší současný pohled na kmenové buňky, vznáší některé otázky k této problematice a následně nabízí na část z nich odpovědi. Připomeňme si ty nejdůležitější: je možné přimět buňky jednoho typu tkáně, aby vypadaly a chovaly se jako buňky jiné tkáně? Dochází k těmto změnám přirozeně? A mohly by se takové transdiferenciace použít v léčbě některých nemocí?

V úvodní části disertační práce se snažím přiblížit některé důležité historické aspekty vývoje poznání kmenových buněk a stručný pohled na biologii, fyziologii a patofyziologii některých procesů, které souvisí s kmenovými buňkami obecně, a následně především s hematopoetickými kmenovými buňkami (HSCs). V následující klinické části popisují vývoj našich úspěšných, ale také neúspěšných metodických postupů, které byly základem klinického využití HSCs. Postup autologní transplantace periferních kmenových buněk (PBPC) umožnil využít jak vysokodávkovaných, tak intenzivních chemoterapeutických režimů u nemocných se solidními nádory. V té době se věřilo, že použití těchto režimů povede k lepším výsledkům léčby a k prodloužení života nemocných. První výsledky po sledování tomu nasvědčovaly. Avšak při dalších analýzách se ukázalo, že to ve vztahu k celkovému přežití (OS) pravděpodobně nebude mít vliv a studie, které to prokazovaly, musely být revidovány (např. Bezwoda a spol. 1998). Dalším stupněm bylo začleňování nových, velice účinných léků, jako např. taxanů a růstových faktorů, při léčbě karcinomu prsu. Použité léčebné režimy měly hematolo-gickou toxicitu, ale již nebylo potřeba použít autologní transplantace PBPC ke zvládnutí komplikací léčby. Na základě těchto faktů došlo k tomu, že z velkého počtu indikací u solidních nádorů byla pro použití vysokodávkovaných režimů s PBPC postupně redukována celá řada indikací (např. malobuněčný karcinom plic, karcinom ovaria, karcinom prsu a další). Přesto i po roce 2000 některé skupiny nadále používají tuto metodu léčby. V roce 2007 jsme provedli vyhodnocení našich výsledků 10-ti letého sledování nemocných žen s pokročilým karcinomem prsu, léčených intenzivní cyklickou chemoterapií a autologní transplantací PBPC a plné krve obohacené o PBPC. Zde jenom připomenou, že podobně jako celá řada dalších autorů, ani naše skupina nepotvrdila statisticky významný rozdíl v OS. Vzhledem k zařazování nových léků, růstových faktorů a dnes také biologické léčby, naše skupina ukončila

u některých indikací použití výše uvedených postupů. V roce 2001 naše skupina připravila metodiku pro využití vysoko dávkovaných režimů s PBPC u nemocných mužů s refrakterním non-seminomem. Musím ale připomenout, že těch několik let experimentální a klinické práce nám umožnilo vypracovat velice funkční modely pro experimentální práci, a to především: separaci periferních kmenových buněk, jejich fenotypizaci, *ex vivo* expanzi, a to jak na *in vitro*, tak *in vivo* modelech a další. Tato naše dovednost nám pomohla plynule přejít na již dříve předpokládanou oblast výzkumu, týkající se plasticity kmenových buněk. Zde také byla zahájena naše spolupráce s prof. Denisem Englishem z Methodist Research Institute (Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis, USA), dále s Centre of Excellence for Aging of Brain Repair (University of South Florida College of Medicine, Tampa, USA) a nakonec s University of South Florida College of Medicine (Tampa, USA). Pro naši skupinu to byla výzva a znamenala kvalitativní skok. Vznikla celá řada velice zajímavých prací, týkajících se jak plasticity kmenových (NSCs a HSCs) buněk, tak vztahu k neurogenезi, vaskulogenезi (nestin) a další (viz literární přehled prací autora). V rámci této spolupráce se sešla svým způsobem jedinečná skupina odborníků zabývajících se uvedenou problematikou a v rámci naší republiky jsme vytvořili několik zajímavých metodik výzkumu plasticity kmenových buněk. Ze získaných výsledků a zkušeností se dále logicky vygenerovaly teoretické úvahy o vztahu některých procesů, jako je plasticita a diverzita buněk - myšleno především kmenových buněk. Vzhledem k mému zaměření - klinický onkolog a hematolog, byl jenom krok k tomu spojit tyto úvahy s nádorovými kmenovými buňkami. Pro tyto účely jsme v roce 2002 v rámci FN v Hradci Králové založili nádorovou tkáňovou banku, kde jsou kryokonzervovány nádorové tkáně. Ve spolupráci s viváriem LF UK v Hradci Králové se nám také podařilo zvládnout chov geneticky modifikovaných zvířat – myši (GMO), a tím rozšířit možnosti naší experimentální práce. Vzhledem k tomu jsme rozšířili metodické možnosti naší laboratoře, a to jak v oblasti *in vitro* metodik, tak v oblasti *in vivo* modelů. V rámci rozvojových projektů a grantů a v rámci výuky PGS studentů jsme vytvořili novou skupinu se zaměřením k výzkumu a klinické aplikaci kmenových buněk v léčbě nádorových onemocnění.

V současné době naše skupina řeší dvě významné otázky. Problematiku vztahu regenerace tkání a mikroprostředí v řadě první a následně přípravu klinického využití kmenových buněk při tzv. „homing transplantaci” – transplantaci dospělých kmenových buněk „v čase na míru”.

Poděkování

Předložená doktorská disertační práce vznikla na základě spolupráce celé řady odborníků, kteří jsou součástí naší skupiny. Především chci poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Mokrému, Ph.D., přednostovi Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové, prof. Denisu Englishovi, z University of South Florida College of Medicine (Tampa, USA), prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc., vedoucí Oddělení radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany Brno, prof. MUDr. Milanovi Bláhovi, CSc., Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky LF a FN UK v Hradci Králové a MUDr. Pavlu Měřičkovi, Ph.D., vedoucímu Tkáňové banky FN Hradec Králové.

Literární přehled k tématům disertační práce:

1. Ager, S., Mahendra, P., Jestice, H.K., et al.: The use of non-cryopreserved peripheral blood progenitor cells in autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1995, 16, s. 633-634.
2. Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., et al.: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, 406, s. 257.
3. Anderson, D., Gage, F., Weissman, I.: Can stem cells cross the lineage boundaries? *Nature Med.*, 2001, 7, s. 393-395.
4. Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., et al.: Circulating CD34⁺ absolute cell number is the best single parameter to predict the quality of leukapheretic yield. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 22, s. 215-216.
5. Beachy, P.A., Karhadkar, S.S., Berman, D.M.: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 2004, 432, s. 324-331.
6. Besinger, W.I., Longin, K., Appelbaum, F., et al.: Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br. J. Haematol.*, 1994, 87, s. 825-831.
7. Björnson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., et al.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by neural stem cells in vivo. *Science*, 1999, 283: 534-537.
8. Brandt, J., Briddell, R.A., Srour, E.F., et al.: Role of c/kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1992, 79, s. 634-641.
9. Brugger, W., Mocklin, W., Heimfeld, S., et al.: Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ cells by stem cell factor, IL-1 beta IL-6, IL-3, interferon-gamma and erythropoietin. *Blood*, 1993, 81, s. 2579-2584.
10. Cinek, P., Filip, S., Vaňásek, J., Měřička, P., et al.: Intensive cyclic chemotherapy and transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) or whole blood in high-risk breast cancer – Follow up at 10 years. *Exp. Oncol.*, 2007, 29, s. 144-151.
11. Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., et al.: Generalized potential of adult stem cells. *Science*, 2000, 288, s. 1660-1663.
12. De Wit, R., Kruit, W.H.J., Lamers, C.H.J., et al.: A phase I/II study of multicyclic dose-intensive chemotherapy supported with G-CSF, or G-CSF and hematopoietic

- progenitor cells in whole blood, in two consecutive cohorts of patients. *Br. J. Cancer*, 1998, 77, s. 2363-2366.
13. Dercksen, M.W., Weimar, I.S., Richerl, D.J.: The value of flow cytometric analysis of platelet glycoprotein expression on CD34⁺ cells measured under conditions that prevent P-selectin mediated binding of platelets. *Blood*, 1995, 86, s. 3771-3782.
 14. Dräger, A.M., Ossenkoppele, G.J., Jonkhoff, A.R., et al.: New strategies in hematopoietic stem cell transplantation: G-CSF-mobilized unprocessed whole blood. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1998, 31, s. 49-53.
 15. Feng, R., Shimazaki, C., Inaba, T., et al.: CD34⁺/CD41a⁺ cells best predict platelet recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 21, s. 1217-1222.
 16. Filip, S., Mokřý, J., Vávrová, J., et al.: Homing of lin⁻/CD117⁺ Hematopoietic stem cells. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2009, v tisku.
 17. Frisén, J.: Stem cell plasticity? *Neuron*, 2002, 35, s. 415-418.
 18. Goodell, M.A.: Stem-cell „plasticity“: befuddled by the muddle. *Curr. Opin. Hematol.*, 2003, 10, s. 208-213.
 19. Grathwohl, A. Passweg, J., Baldomero, H., et al.: Blood and marrow transplantation activity in Europe 1996. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 22, s. 227-240.
 20. Gross, S., Helm, K., Gruntmeir, J.J., et al.: Characterization and phenotypic analysis of differentiating CD34⁺ human bone marrow cells in liquid culture. *Eur. J. Haematol.*, 1997, 59, s. 318-326.
 21. Huan SD, Hester J, Spitzer, G et al. Influence of mobilized peripheral blood cells on the hematopoietic recovery by autologous marrow and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after high-dose cyclophosphamide, etoposide and cisplatin. *Blood*, 1992, 79, 3388-3393.
 22. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418, s. 41-49.
 23. Khosrotehrani, K., Bianchi, D.W.: Fetal cell microchimerism: helpful or harmful to the parous woman? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2003, 15, s. 195-199.
 24. Krause, D.S.: Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.*, 2002, 9 (11), s. 754-758.

25. Lemischka, I.: A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp. Hematol.*, 2002, 30, s. 848-852.
26. Lemoli, R.M., Gasparetto, C., Scheinberg, D.A., et al.: Autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leukemia: in vitro treatment with myeloid-specific monoclonal antibodies and drugs combination. *Blood*, 1993, 77, s. 1829-1836.
27. Mayer, J., Vorlíček, J.: Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových krvetvorných buněk v komplexní léčbě zhoubných nádorů. Masarykova Universita v Brně, 1997, s. 70.
28. Millar, B.C., Millar, J.L., Shepherd, V., et al.: The importance CD34⁺/CD33⁻ cells in platelet engraftment after intensive therapy for cancer patients given peripheral blood stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 22, s. 469-475.
29. Molineux, G., Pojda, I.N., Hampson, B.I., et al.: Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1990, 76, s. 2153-2158.
30. Ossenkoppele, G.J., Jonkhoff, A.R., Huijgens, P.C., et al.: Peripheral blood progenitors mobilized by G-CSF (filgrastim) and reinfused as unprocessed autologous whole blood shorten the pancytopenic period following high-dose melphalan in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, 13, s. 37-41.
31. Pettengell, R., Guiney, H., Ranford, J.A., et al.: Granulocyte colony-stimulating factor to prevent dose-limiting neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized controlled trial. *Blood*, 1992, 80 (6), 1430-1436.
32. Pettengel, R., Woll, P.J., O'Connor, D.A., et al. I.: Viability of haemopoietic progenitors from whole blood, bone marrow and leukapheresis product: effects of storage media, temperature and time. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, 14, s. 703-709.
33. Pettengel, R., Woll, P.J., Teatcher, N., et al.: Multicyclic, dose-intensive chemotherapy supported by sequential reinfusion of hematopoietic progenitors in whole blood. *J. Clin. Oncol.*, 1995, 13, s. 148-156.
34. Poulosom, R., Alison, M.R., Forbes, S.J., et al.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002, 197, s. 441-456.
35. Quesenberry, P.J., Colvin, G.A., Adeb, M., et al.: The stem cell continuum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, 1044, s. 228-235.

36. Quesenberry, P.J.: The continuum model of marrow stem cell regulation. *Curr. Opin. Hematol.*, 2006, 13, s. 216-221.
37. Richman, C.M., Weiner, R.S., Yankee, R.A.: Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976, 47, 1031-1039.
38. Ruiz-Argüelles, G.J., Ruiz-Argüelles, A., Pérez-Romano, B., et al.: Filgrastim-mobilized peripheral-blood stem cells can be stored at 4 degrees and used in autografts to rescue high dose chemotherapy. *Am. J. Hematol.*, 1995, 48, s. 100-103.
39. Sheridan, W.P., Begley, C.G., Jutter, C., et al.: Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet*, 1992, 339, s. 640-644.
40. Siena, S., Bregni, M., Brando, B., et al.: Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancements by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1989, 74, s. 1905-1914.
41. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y et al. Cytotoxic drug and cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. *Bone Marrow Transplant.*, 1992, 10, s. 215-220.
42. Traycoff, C.H.M., Orazi, A., Ladd. A.C.: Proliferation-induced decline of primitive hematopoietic progenitor cell activity is coupled with an increase in apoptosis of ex vivo expanded CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.*, 1998, 26, s. 53-62.
43. Van der Kooy, D., Weiss, S.: Why stem cells? *Science*, 2000, 287, 1439-1441.
44. Vávrová, J., Filip, S., Vokurková, D., et al.: Ex vivo expansion CD34⁺/AC133⁺ - selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in high-risk breast cancer patients receiving intensive chemotherapy. *Haematology Cell Ther.*, 1999, 41, s. 105-112.
45. Verfallie, C.M., Pera, M.F., Lansdorp, P.M.: Stem cells: hype and reality. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 2002, s. 369-391.
46. Vose, J.M., Bierman, P.J., Anderson J.R., et al.: Progressive disease after high-dose therapy and autologous transplantation for lymphoid malignancy: clinical course and patient follow-up. *Blood*, 1992, 80 (8), 2142-2148.
47. Vredenburgh, J.J., Hussein, A., Fisher, D., et al.: A randomized trial of recombinant human interleukin-11 following autologous bone marrow transplantation with

- peripheral blood progenitor cell support in patients with breast cancer. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 1998, 4, s. 134-141.
48. Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., et al.: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 2003, 24, 422, s. 897-901.
 49. Weaver, C.H., Birch, R., Greco, F.A., et al.: Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized dose escalation trial of filgrastim. *Br. J. Haematol.*, 1998, 100, s. 338-347.
 50. Weaver, C.H., Schwartzberg, L., Zhen, B., et al.: Mobilization of peripheral blood stem cells with docetaxel and cyclophosphamide (CY) in patients with metastatic breast cancer: a randomized trial of 3 versus 4 g/m² of CY. *Bone Marrow Transplant.*, 1999, 23, s 421-425.

Literární přehled prací autora související s tématem disertační práce:

1. **Filip, S.**, Vaňásek, J., Vávrová, J., et al. Circulation of progenitor cells after intensive chemotherapy with used G-CSF and EPO. *Neoplasma*, 1997, 44 (4), s. 212-218.
2. Vaňásek, J., **Filip, S.**, Medková, V., et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) through a combination of chemotherapy and G-CSF in breast cancer patients and a possibility of unprocessed whole blood collection. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 21, s.123-126.
3. Vávrová, J., **Filip, S.**, Vokurková, D., et al. Ex vivo expansion CD34⁺/AC133⁺ - selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in high-risk breast cancer patients receiving intensive chemotherapy. *Hematol. Cell Ther.*, 1999, 41, s. 105-112.
4. **Filip, S.**, Vaňásek, J., Bláha, M., et al. The increase of the rate of hemopoietic recovery and clinical benefit of the erythropoietin (EPO) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with peripheral blood progenitor cells (PBPC) after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *Neoplasma*, 1999, 46 (3), s. 166-172.

5. **Filip, S.**, Vávrová, J., Vokurková, D., et al. Myeloid differentiation and maturation of SCF+IL-3+IL-11 expanded AC133⁺/CD34⁺ cells selected from high-risk breast cancer patients. *Neoplasma*, 2000, 47 (2), s. 73-80.
6. **Filip, S.**, Bláha, M., Odrážka, K., et al. Application of whole blood and peripheral progenitor cells (PBPC) and new strategies for rescue after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer. *J. Hematotherapy Stem Cell Res.*, 2000, 9 (1), s. 31-38.
7. **Filip, S.**, Petera, J., Odrážka, K., et al. The current look at high-dose chemotherapy in breast cancer. *Neoplasma*, 2000, 47 (5), s. 261-268.
8. Vaňásek, J., **Filip, S.**, Medková, V., et al. Intensive cyclic chemotherapy with unprocessed whole blood support in advanced cancer. *Neoplasma*, 2001, 48 (1), s. 34-38.
9. **Filip, S.**, Bláha, M., Petera, J., et al. Peripheral progenitor cells (PBPC) in supportive care after high-dose chemotherapy in breast cancer. *Neoplasma*, 2001, 48 (1), s.39-47.
10. Vávrová, J., Vokurková, D., Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., **Filip, S.** Antiapoptotic cytokine IL-3+SCF+FLT3l influence on proliferation of gamma-irradiated AC133⁺/CD34⁺ progenitor cells. *Folia Biologica (Praha)*, 2002, 48, s. 51-57.
11. **Filip, S.**, Mokřý, J., Hruška, I. Adult stem cells and their importance in cell therapy. *Folia Biologica (Praha)*, 2003, 49, s. 9-14.
12. **Filip, S.**, Mokřý, J., Karbanová, J., Vávrová, J., English, D. Local environmental factors determine hematopoietic differentiation of neural stem cells. *Stem cells and Development*, 2004, 13 (1), s. 113-120.
13. **Filip, S.**, English, D., Mokřý, J. Issues in stem cell plasticity. *J. Cell. Mol. Med.*, 2004, 8 (4), s. 572-577.
14. Mokřý, J., Čížková, D., **Filip, S.**, Ehrmann, J., Österreicher, J., Kolář, E., English, D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells and Development*, 2004, vol. 13, no. 6, s. 658-664.
15. **Filip, S.**, Mokřý, J., Karbanová, J., Vávrová, J., Vokurková, D., Bláha, M., English, D. The Transplantation of neural stem cells and predictive factors in hematopoietic recovery in irradiated mice. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2005, 32, s. 157-166.
16. Mokřý, J., Karbanová, J., **Filip, S.** Differentiation potential of murine neural stem cells in vitro and after transplantation. *Transplantation Proc.*, 2005, 37, s. 268-272.

17. **Filip, S.**, Mokřý, J., English, D., Vojáček, J. Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biologica (Prague)*, 2005, 51, s. 180-187.
18. **Filip, S.**, Mokřý, J., English, D. Stem cell plasticity and carcinogenesis. *Neoplasma*, 2006, 53, s. 87-91.
19. **FILIP, S.** The phenomenon of stem cell plasticity: Biological or physiological problems? *Stem Cells and Development*, 2006, 15, s.753.
20. Bláha, M., Měřička, P., Štěpánová, V., Šplíňo, M., Malý, J., Jebavý, L., Žák, P., Cermanová, M., **Filip, S.**, et al. Prevention of infection transmission during stem cell transplantation. *Folia Microbiologica*, 2006, 51, s. 609-613.
21. Cinek, P., **Filip, S.**, Vaňásek, J., et al. Intensive cyclic chemotherapy and transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) or whole blood in high-risk breast cancer – follow up at 10 years. *Experimental Oncology*, 2007, 20, 2, s. 144-151.
22. Mokřý, J., Karbanová, J., **Filip, S.**, Čížková, D., et al.: Phenotypic and morphological characterization of in vitro oligodendroglioneogenesis. *Stem Cells and Development*, 2008, 17, s. 333-342.
23. Mokřý, J., Pudil, R., Ehrmann, J., Cizkova, D., Ostterreicher, J., **Filip, S.**, Kolar, Z. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch*, 2008, 453, s. 33-41.
24. **Filip, S.**, Mokřý, J., Horáček, J., English, D. Stem Cells and the Phenomena of Plasticity and Diversity. A limiting Property of Carcinogenesis. *Stem Cells and Development*, 2008, 17, s.1031-1038.
25. **Filip, S.**, Mokřý, J., Vávrová, J., et al. Homing of lin-/CD117+ Hematopoietic stem cells. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2009, přijato v tisku.