

TRANSPLANTACE KOSTNÍ DŘENĚ V KLINICKÉ PRAXI

(Referát z literatury a první vlastní zkušenosti s přípravou transplantačního programu)

Podplukovník MUDr. Milan BLÁHA, MUDr. Karel NOUZA, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové
(náčelník plk. doc. MUDr. Jar. Vaňásek, CSc.)

Československá akademie věd, Ústav experimentální biologie a genetiky
(přednosta prof. MUDr. Prokop Málek, DrSc.)

Problém náhrady poškozených lidských orgánů jinými — zdravými — je velmi starý. O otázku se zajímala od začátku i vojenská medicína: transplantace by umožnila nahradit zničené jednotlivé orgány u jinak zdravých lidí i tkáně a orgány při hromadných ztrátách. Co se týče transplantace kostní dřeně (dále TKD), nabyl tento problém zvláštního významu v období, kdy lidstvo začalo být ohrožováno možnostmi použití atomových zbraní.

První klinické zkušenosti s TKD

O prvních klinických úspěších při TKD můžeme mluvit až v průběhu tohoto století a bude jim zřejmě patřit především jeho poslední období. První pokusy o terapeutické použití kostní dřeně byly však učiněny již Brownem-Séguardem a d'Arsonnavalem 1891, kteří použili xenogenní kostní dřeň perorálně u případů s chorobami krvetvorby. Následovaly pokusy

s perorálním podáním extraktu červených krvinek u perniciózní anémie. Vzhledem k tomu, že tyto choroby byly pokládány za stavy karentní, nepřipadli tehdejší autoři na myšlenku převádět živé buňky. Řada autorů proto právem všechny tyto pokusy kritizovala. R. 1929 označila Americká lékařská společnost dosud provedené pokusy za neúčinné a extraktu kostní dřeně byla přiznána účinnost jen pro obsah železa. Přesto referují Bowmann 1938 a Cooke 1938 o několika případech leukémií, léčených parenterálními injekcemi kostní dřeně, kdy došlo k částečné remisi. Schretzenmayer první použil suspenze živých buněk kostní dřeně. Následovala řada dalších pokusů. Nová etapa začala na počátku padesátých let, kdy clonění krvetvorby a TKD byly zavedeny do léčby nemoci ze záření (Jacobson 1949). Rickers předložil teorii o znovuosídlení ozářené kostní dřeně živými a funkce schopnými dřeňovými buňkami dárce. Jacobson předpokládal humorální účinek

dřeňové suspenze. Díky intenzivnímu výzkumu v následujících 20 letech přestává být TKD v poslední době pouze empirickou a ve svých výsledcích zcela nejistou léčebnou metodou a dostává se na skutečně vědeckou bázi (Pegg 1966).

První úspěchy při použití kostní dřeně v klinice byly hlášeny z celého světa. Je potěšitelné, že českoslovenští autoři nezůstali pozadu. V r. 1961 publikovali pracovníci Ústřední vojenské nemocnice (Arient, Potměšil, Skala, Dufek) léčebné použití kostní dřeně u nemocného akutní leukémií, dříve neúspěšně léčeného 6-merkaptopurinem a Prednisonem. Pacient byl celotělově ozářen 400 R a následovala TKD. Léčebné schéma bylo moderní a perfektně dokumentováno. Klinické pokusy byly na počátku 60 let provedeny také na dalších pracovištích: v Bratislavě (Hrubisko 1962), v ÚHKT v Praze (Nouza 1963).

To však již docházelo vzhledem k neuspokojivým výsledkům k poklesu zájmu o TKD. Roku 1959–62 bylo ve světové literatuře zveřejněno pouze 154 TKD u lidí (Bortin 1970).

Oživení zájmu o TKD nastalo v posledních třech letech. Bylo dosaženo výrazných pokroků při odběru a konzervaci buněk kostní dřeně, zlepšily se možnosti výběru vhodného dárce, metody imunosuprese dárce i příjemce, bylo dosaženo pokroku při úpravě kostní dřeně před transplantací. Klinické léčebné pokusy jsou zachycovány a analyzovány v ACS/NIH Organ Transplant Registry se sídlem v Chicagu. Zde se soustřeďují záznamy o provedených TKD z celého světa podle jednotného, nově upraveného formuláře.

Indikace ke klinickému použití TKD u lidí

1. Náhodné ozáření letální a lehce supraletální dávkou tvrdého záření

Cílem TKD v této indikaci je repopulace veškeré hemopoetické tkáně velkým štěpem. Tato indikace, kde TKD je jedinou nadějí na záchranu života, je řazena většinou autorů shodně na prvé místo. Není třeba zdůrazňovat mimořádný význam pro vojenskou medicínu.

V r. 1958 došlo k ozáření 6 fyziků gama-paprsky a neutrony při nešťastné události v jugoslávské Vincě. Jeden z nich, který byl ozářen největší dávkou, zemřel; další čtyři, jejichž ozáření se odhadovalo na 600 až 1000 rem, byli léčeni velmi úspěšně transplantací alogenní dřeně (Mathé a spol., 1959). Jeden pacient, jehož expozice se odhadovala na 300–500 rem, kostní dřeň nedostal a zotavil se spontánně. Úspěšné použití TKD po celotělovém ozáření vysokými dávkami bylo později opakovaně potvrzeno.

2. Některé poruchy činnosti kostní dřeně (primární i sekundární aplazie a hypoplazie kostní dřeně — např. vzniklé při léčení leukémie cytostatiky, po použití některých

léků a toxických látek, působících útlum kostní dřeně apod.)

Cílem léčby je opět repopulace veškeré hemopoetické tkáně velkým štěpem. Některí autoři však neřadí tyto poruchy krvetvorby hned na druhé místo v indikacích pro TKD. Problém použití kostní dřeně je zde ještě do jisté míry diskutabilní vzhledem k dosud málo uspokojivým terapeutickým výsledkům. V této souvislosti je zajímavý výzkumný směr, zdůvodňující malou úspěšnost TKD u primární aplazie kostní dřeně prvotní poruchou mikrocirkulace v kostní dřeni, zvláště při eventuálním autoimunním poškození cév kostní dřeně (Knospe a Crosby 1971).

Jinou indikací pro TKD jsou kongenitální hemoglobinopatie — thalassémie, sickle-cells anémie. V posledních letech bylo provedeno několik pokusů o léčbu těchto chorob pomocí TKD, některé případy byly úspěšné.

3. Zhoubná onemocnění krvetvorby

Při této indikaci TKD bylo provedeno nejvíce pokusů. Celkové výsledky však nejsou dosud uspokojivé. Hlavním důvodem je, že dosud neexistuje metoda umožňující zcela zlikvidovat zhoubné onemocnění a dále to, že štěp je zřejmě, stejně jako původní dřeň, vnímavý k účinkům leukemogenního činitele. V posledních letech proto došlo k přesunu zájmu pracovníků s TKD na jiné poruchy krvetvorby. Chemoterapie má dnes lepší a často i trvalé výsledky. Blastická krize u chronické leukémie, nezvládnutelná konvenčním postupem, je však stále indikací vhodnou pro transplantaci léčbu.

Tab. 1

Transplantační nomenklatura		Sérologická nomenklatura	Štěp
stará	nová		
autologní isologní	syngenní	autoantigen auto- protilátka	od téhož jedince od jedince inbrední populace
homologní	alogenní	isoantigen iso- protilátka	od jedince tétohož druhu
heterologní	xenogenní	hetero- antigen hetero- protilátka	od jedince jiného druhu
aloplastický homostabilní			z cizího materiálu

4. Stavy imunologické nedostatečnosti

Tato indikace se dostala do centra zájmu v posledních 3–4 letech, kdy se ukázalo, že v kostní dřeni jsou přítomny kmenové buňky

lymfoidní řady. Protože krvetvorba u stavů imunologické nedostatečnosti může být zcela normální, stačí pro úpravu lymfatické řady tzv. malý štěp (van Bekkum 1971). Jsou autoři, kteří připisují TKD u vhodných typů imunologické nedostatečnosti prvořadý význam (Meuwissen 1969, van Rood 1969). Od r. 1968, kdy Gatti a spol. provedli v této indikaci první úspěšnou TKD, bylo popsáno 16 dalších pacientů. Tři z nich žijí déle než 3 roky v dobrém klinickém stavu. Bez TKD byla jejich smrt neodvratná.

Buněčný a humorální efekt transplantované kostní dřeně

Již jsme se zmínili, že existují dvě teorie o mechanismu působení TKD: humorální a buněčná. Většina autorů zastává dnes buněčnou teorii, která říká, že buňky štěpu osídli hostitelovy krvetvorné, resp. i lymfoidní tkáně. Jako doklad se uvádí objevení a vzestup počtu dárčových buněk, popřípadě úplná náhrada příjemcových krevních a dřevných buněk dárčovými, i řada jiných nálezů. Uplatňuje se však pravděpodobně i humorální úloha štěpu: určitý podněcující vliv na krvetvorbu má i bezbuněčný extrakt z krvetvorné tkáně. V jaderné frakci homogenátu kostní dřeně je nedialyzovatelný faktor „radiálního zotavení“, který má pravděpodobně povahu desoxyribonukleoproteinu.

Některé problémy spojené s transplantací kostní dřeně

K transplantaci je nejlepší používat kostní dřeň **syngenní** (dárce a příjemce jsou jedinci inbrední linie pokusných zvířat, nebo jednovaječná dvojčata u lidí, popřípadě je retransplantována dřeň vlastní — autologní). Po transplantaci syngenní kostní dřeně nedochází k imunitní reakci příjemce proti štěpu ani štěpu proti příjemci. Transplantace prováděné mezi jedinci stejného druhu se nazývají **alogenní**; pak zpravidla vzniká imunitní vypuzovací reakce příjemce proti štěpu, popřípadě i reakce štěpu proti příjemci — tzv. druhotné, sekundární onemocnění. Využití **xenogenní** kostní dřeně (dárce a příjemce pocházejí z různých druhů) je méně časté, ale i zde jsou někteří autoři optimističtí a soudí, že i tato metoda má klinické vyhlídky do budoucna (van Bekkum 1970).

Jestliže byla úspěšně provedena transplantace hemopoetického štěpu, vzniká **chimera**, cíl našeho snažení. Úplný chimerismus znamená náhradu všech typů hemopoetických buněk i buněk lymfatických, chimerismus parciální znamená kompletní náhradu jedné nebo dvou řad hemopoetických buněk (například jsou přítomny ve 100 % pouze erytrocyty dárčova typu); při smíšeném chimerismu jsou přítomny dárčovy a příjemcovy buňky v příjemci zároveň.

Rozhodující k úspěšné transplantaci je také množství jaderných elementů kostní dřeně. Všeobecně se uvádí, že dostačující je množství 4×10^8 buněk/kg váhy, tj. asi 28×10^9 buněk alogenní kostní dřeně pro dospělého člověka. Množství buněk nutných pro transplantaci syngenní dřeně je zhruba 10krát menší, při transplantaci xenogenní kostní dřeně 10krát větší (poměr 1:10:100). Někteří autoři používají mnohem vyšších počtů buněk kostní dřeně (skupina v Seattle 10krát vyšších). Je ovšem obtížné shromáždit tak velké množství kostní dřeně.

Jakým způsobem kostní dřeň podat? Absolutní většina autorů používá nitrožilní infúzi buněk kostní dřeně. Zastánci intramedulárního podání kostní dřeně tvrdí, že intramedulárně aplikovaná kostní dřeň má přece jen o něco vyšší účinnost; dále je snad při tomto způsobu podání menší nebezpečí tukové embolizace. Po nitrožilním podání lze zjistit pomocí izotopy značených krevních elementů zdržení jaderných elementů asi do 24 hodin v plicích, pak nastane osídlení dřeně. Další způsoby podání (intraperitoneální, intramuskulární aj.) byly opuštěny, protože byly méně úspěšné nebo neúspěšné.

Syngenní dřevná transplantace u lidí

Transplantace syngenní dřeně u lidí je možná mezi jednovaječnými dvojčaty. Výhodné je, že postačuje jen poměrně malé množství kostní dřeně a nedochází ke vzájemným imunologickým komplikacím. V literatuře nacházíme údaje o příznivých léčebných výsledcích u několika nemocných s dřevnou aplazií. Pokusy o léčbu leukémie byly málo úspěšné — v dostupné literatuře jsme našli údaje o léčbě celkem pouze asi u 20 nemocných.

Autologní dřevná transplantace u lidí

Při podání vlastní kostní dřeně se neuplatňují imunologické bariéry, které by byly na překážku transplantace. Minimální nutné množství kostní dřeně je poměrně malé, zpravidla se používá asi 100 ml aspirované dřeně. Transplantace vlastní kostní dřeně se nejčastěji používá pro zajištění bezpečnosti intenzivní terapie zářením a masivní chemoterapie u maligních chorob. Kostní dřeň je možno po krátkou dobu uchovávat při chladničkové teplotě, pro delší uchování je nutné mrazení na nízké teploty (—79 st. C — teplota suchého ledu nebo —196 st. C — teplota tekutého dusíku). Po skončení protinádorové terapie je vrácena i. v. nemocnému.

Nejjednodušší metodu autologní TKD popsal Black 1959, který odňal kostní dřeň do heparinizované injekční stříkačky, pak podal rychle účinkující chemoterapeutikum a po odeznění účinku vrátil kostní dřeň nemocnému. Jinou možností je ochránit kostní dřeň před ozáře-

ním např. cloněním určité oblasti olovem a před vlivem chemoterapeutik zaškracením končetiny turniketem. Chráněné oblasti je popřípadě možné obohatit o kostní dřeň, získanou z jiných míst těla.

Při hodnocení výsledků autologní TKD se používá jako míry úspěchu rychlosti regenerace krvetvorby. Vzhledem k tomu, že krvetvorba se může zotavit spontánně i po poměrně značném poškození a osud vlastních retransplantovaných buněk nelze prakticky sledovat, je hodnocení úspěšnosti této léčby dosud velmi problematické.

Zajímavé jsou pokusy o odběr a uchovávání kostní dřeně během remise leukémie a její podání při relapsu po celotělovém ozáření (Mc Govern 1963). Tyto pokusy byly vesměs neúspěšné, snad i pro technické závady (Pegg 1966). Infúze autologní kostní dřeně má omezení také z jiných důvodů. Snaha o zničení nádorového ložiska velkými dávkami záření nebo chemoterapeutik často není provázána úspěchem. Někteří autoři neuvádějí vůbec případy zhoubných nádorů mezi indikacemi pro TKD. Přes uvedené nevýhody se zdá, že použití autologní kostní dřeně umožňuje pokračovat v léčbě i při zhoršení krevního obrazu a vzniku dalších projevů útlumu krvetvorby.

Alogenní dřeňová transplantace u lidí

Alogenní TKD jsou nejběžnější; jejich počet vzrostl zejména v posledních 3—4 letech a bude jim pravděpodobně věnována největší pozornost i v budoucnu. Při transplantaci alogenní kostní dřeně narazíme na rozdíl od dříve popsané transplantace syngenní kostní dřeně na základní obtíže, kterými jsou imunitní reakce, vyvolané odlišnými antigenními vlastnostmi dárce a příjemce. Tyto reakce se projevují jako vypuzení štěpu, anebo druhotná nemoc — syndrom chorobných příznaků, vyvolaných reakcí štěpu proti příjemci. Sekundární choroba se vyvíjí jedině tehdy, ujmeme-li se transplantát alespoň dočasně, protože jedině tehdy se může reakce imunokompetentních buněk proti hostiteli rozvinout. Má těžké klinické příznaky a často vede ke smrti. Je proto nutno s maximální intenzitou provádět prevenci a intenzivní léčbu této imunologické komplikace.

Vzhledem k zásadní důležitosti problematiky pojednáme o některých faktorech alogenní TKD podrobněji.

Imunosuprese příjemce

- a) v minulých letech byla nejčastěji používána imunosuprese příjemce celotělovým ozářením v subletálních a letálních dávkách. Tato léčba měla řadu prognosticky závažných vedlejších příznaků, a proto se zájem výzkumníků přesunul na imunosupresiva.
- b) Z chemoterapeutik se nejvíce osvědčil cyklofosfamid (dále CY), ale s úspěchem byla

použita i jiná imunosupresiva. Bylo vypracováno několik aplikačních schémat. V současné době se nejčastěji používá tzv. Baltimorské schéma, kdy se aplikuje CY v dávce 60 mg/kg/den po 4 dny a pátý den se transplantuje kostní dřeň. Santos (1970) doporučuje podat jednu konzervu krve dárce příjemci před TKD, což podle něho umožňuje snížit dávku CY na 45 mg/kg po 4 dny.

- c) Výhodné je i použití antilymfocytárního séra (dále ALS) nebo antilymfocytárního globulinu, o němž např. referují Mathé a Amiel 1971, Nouza 1971. Při aplazii kostní dřeně není vhodné použít k přípravě příjemce záření a CY; doporučuje se podávat 1 měsíc androgeny a pak použít ALS. ALS je rovněž vhodné v přípravě léčby kostní dřeně u hemoglobinopatií.

Sekundární nemoc

Van Bekkum a spol. (1959) považují tento syndrom za kombinovaný efekt reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host-reaction), následků samotného ozáření a nízké rezistence proti infekcím. Reakci vyvolávají ve dřeňovém štěpu obsažené imunokompetentní buňky. Tíže choroby závisí na jejich množství v transplantátu, a proto se stupňuje při zvyšování celkového objemu kostní dřeně. Je nutné přísně odlišovat sekundární chorobu od časně nebo pozdní vypuzovací reakce, v níž imunitní reakce hostitele likviduje štěp. Smrt v tomto případě je provázána aplazií kostní dřeně, zatímco při sekundární chorobě je dřeň nápadně buněčná (Butomo 1970).

Z hlediska patologicko-anatomického dělí de Vries (1970) sekundární chorobu na akutní a chronickou. Mathé (1970) soudí, že pro klinickou praxi je vhodné rozeznávat 4 kategorie: hyperakutní, akutní, subakutní a chronický sekundární syndrom. Hyperakutní se objeví ještě před tím, než dřeňový štěp restauruje dřeň. Ostatní 3 syndromy se objevují až potom, když je kostní dřeň již morfologicky zřetelně obnovena. Akutní sekundární syndrom kolem 30. dne, subakutní začátkem 3. měsíce a chronický později.

R. 1970 shrnul Mathé kritéria pro diagnózu sekundární choroby:

1. Žaživací poruchy: anorexie, průjem, zvracení, poruchy trávení a vstřebávání.
2. Hepatitida se žloutenkou a zvýšením hladiny jaterních enzymů.
3. Různé kožní projevy: eflorescence různého typu — někdy splývající, exfoliativní dermatitis, edém kůže apod.
4. Všeobecné příznaky: horečka, nereagující na obvyklá antipyretika, různé infekce bakteriální, kvasinkové, virové (např. i cytomegalovirové).

V patogeneze sekundární choroby hraje důležitou úlohu poškození lymfatické tkáně. Imu-

nokompetentní buňky dárce se setkávají v organismu hostitele, zvláště v lymfatickém systému, s antigenně cizími buňkami, senzibilizují se a reagují proti nim. Po přechodné hyperplazii vzniká atrofie lymfatické tkáně příjemce, provázená poruchou obranyschopnosti organismu a rozvojem infekčních komplikací. Barnes (1962) zdůrazňuje vedle poklesu obranyschopnosti i narušení dalších funkcí lymfocytů (trofické úlohy při syntéze DNK bílkovin, při mitózách a dalších významných dějích).

Z patogenezy sekundární choroby vyplývá i způsob její prevence a léčení. Mezi nejvýznamnější opatření patří:

1. Výběr vhodného dárce

Ukázalo se, že mezi geneticky velmi blízkými jedinci, shodnými v hlavním lidském transplantacním (histokompatibilním) systému HL-A, probíhají vzájemné imunitní reakce poměrně mírně a lze je snáze překonat. Výběr vhodných dárců je dnes zajištěn velmi rozpracovanými metodami sérologické typizace, testem smíšených lymfocytárních kultur in vitro a dalšími metodami (Ivašková et al. 1969, Nouza a Böhm 1971).

2. Ovlivnění dárce

Bylo vyzkoušeno promývání cév zvířat fyziologickým roztokem ke snížení počtu dřeňových lymfoidních buněk (Thomas 1962). Dále byly číněny pokusy o snížení počtu lymfoidních buněk ozářením dárce; tento postup ovšem snižuje vedle počtu imunokompetentních buněk také počet hemopoetických elementů. Ani použití radioprotektiv nezlepšilo výsledky. Příprava dárce kortikoidy a imunosupresivními látkami s cílem vyvolat involuci lymfoidní tkáně dává pochybné výsledky. Nepoužitelná pro praxi je neonatální thymektomie, vhodná u zvířat (Dalmasso 1962), a podání příjemcových antigenů v postnatálním období. ALS dává lepší výsledky u myši než u primátů.

3. Manipulace se štěpem in vitro

Opatření, která můžeme zahrnout pod pojem „manipulace se štěpem in vitro“, nabývají praktické důležitosti v poslední době:

a) Biologické působky

R. 1963 zjistili Amiel a Mathé, že inkubace kostní dřeně při teplotě 37 st. C po 2 hodiny snižuje významně počet imunokompetentních buněk, ale nesnižuje léčebný účinek kostní dřeně. Inkubace při 37 st. C (ev. při 4 st. C) in vitro totiž ničí imunologicky aktivní buňky hlodavců 10krát více než buňky krvetvorby (van Bekkum 1964).

Později bylo zjištěno, že u myši ALS postihuje lymfoidní buňky více než krvetvorné, u primátů je tento fenomen méně vyjádřen.

Nadějně je antiglobulinové sérum (které postihuje pouze buňky nesoucí globulinové receptory, tj. pouze buňky lymfoidní), popřípadě séra proti antigenům, specifickým pro lymfoidní buňky.

b) Fyzikální metody

Veliké naděje jsou vkládány v posledních letech do metod separace kmenových buněk sedimentací a centrifugací. Turner 1967 získal centrifugací buněčné suspenze myši kostní dřeně v gradientu hovězího serumalbuminu frakci, která obsahovala 30krát více buněk tvořících kolonie než výchozí suspenze. Jeho pokusy s úspěchem opakovali další autoři (Demko 1968, Simonsen a spol. 1968 aj.). Separace léčebně účinné a nebezpečné frakce buněk kostní dřeně v gradientu hovězího serumalbuminu byla zkoušena také u jiných zvířat a s lidskou dření (Dicke a spol. 1968 — 1971). Výsledky některých prací jsou povzbudivé. U pokusných zvířat byly již získány frakce obsahující 20—40 % kmenových buněk.

Kultivaci buněčných klonů in vitro bylo dosaženo takového pokroku, že se začínají objevovat práce o neomezené propagaci lymfoidních buněk. Takový vývoj oživil starý sen pracovníků s TKD — pěstování neohrančených počtů buněk, a to kteréhokoli žádaného typu a antigenní skupiny v laboratoři a tím zabezpečení každého pacienta štěpem podle jeho vlastní potřeby (van Bekkum 1970).

4. Ovlivnění příjemce

V léčbě příjemce po TKD byla s úspěchem vyzkoušena řada postupů: nejčastěji je používán ametopterin (Metotrexate), CY, kortikoidy, antilymfocytární sérum a globulin. K úpravě lymfatické aplazie směřuje podání lymfostimulačních látek, např. extraktu z thymu a štěpů z thymu (Mathé et al. 1968).

Je ovšem nutné si uvědomit, že reakce GVH nemusí být vždy nežádoucí: její první fáze může být využita při léčbě leukémií a k ničení tumorózních buněk. Je však nutno zajistit dobře kontrolu dalšího průběhu druhotné nemoci.

Testy vitality a funkčních vlastností kostní dřeně

V souvislosti s TKD vyvstává důležitost zjišťování životnosti a funkceschopnosti hemopoetických buněk. K tomu slouží řada metod. Určuje se schopnost buněk růst v tkáňových kulturách, pohyblivost buněk, počet mitóz, úroveň syntézy DNK, Hb, intenzita dýchání apod. Nejrozšířenější jsou ukazatelé charakterizující tinkční vlastnosti jádra a protoplazmy buněk — pro svou jednoduchost a časovou nenáročnost. Metody spočívají na předpokladu, že barvitelnost koloidů jednotlivých buněk závisí na jejich funkčním stavu. Některá barviva (např. eosin, erythrosin) barví difúzně mrtvé nebo poškozené buňky, nepoškozené se nebarví. Někte-

rá barviva dovolují rozlišovat ještě skupinu buněk v tzv. stavu reverzibilního poškození — paranekrózy. Bylo vyzkoušeno barvení brilant-kresylovou modří, trypanovou modří, fluoreskujícími barvivy — zvláště akridinovou oranží. Tyto testy obvykle nekorelují zcela přesně se skutečnou funkceschopností kostní dřeně, obvykle nadhodnocují skutečnost (Costachel, Corneci 1968), ale jsou srovnatelné a pro jednoduchost je používá řada autorů. Nejlepším ukazatelem skutečné funkceschopnosti buněk kostní dřeně je jejich praktická schopnost obnovit krvetvorbu, což se dá zjišťovat na modelu ozářených zvířat. Velmi cenné je zjišťování růstu buněčných kolonií ve slezině, metodika je však zatím použitelná pro myši a teprve se hledají vhodné klinické systémy. Nadějně je vyšetřování růstu buněčných kolonií kmenových buněk v polotekutém agaru. Úroveň syntézy DNK v buňkách se dá zjistit podle začleňování thymidinu, značeného C 14, nebo tritiem. Tato metoda je však nejen technicky náročná a drahá, ale má i technická omezení (ředění izotopu při dělení buněk; kmenové buňky prodělávají někdy dlouhou, tzv. spící fázi, kdy se nedělí a izotop tedy nezabudovávají). Řada metod s barvivy, izotopových a jiných, má také své omezení v tom, že zkoumá buňky kostní dřeně vcelku a nejen buňky kmenové, kterých je méně než 1 %.

Sami používáme prozatím metody s trypanovou modří, která je velmi jednoduchá a nenáročná. Současně přistupujeme k metodě zjišťování úrovně metabolismu DNK a v budoucnu hodláme využít některé z přesnějších metod, jmenovitě metody zjišťování růstu buněčných kolonií in vitro.

Významné jsou rovněž testy zjišťující imunologickou aktivitu štetu — u zvířat lze použít metody in vivo, u člověka jsou nejperspektivnější metody in vitro — například stimulace lymfoidních buněk k blastické transformaci phytohemaglutininem.

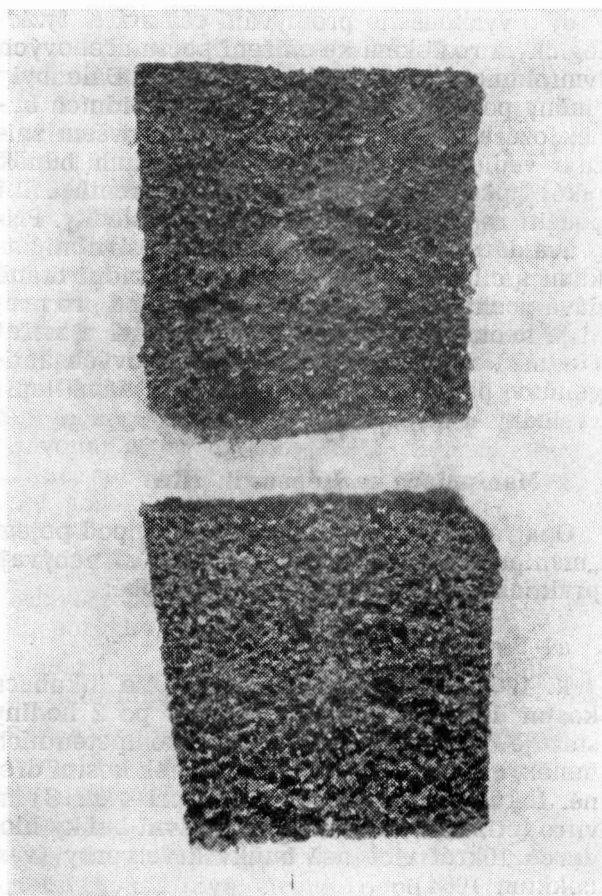
Některé technické aspekty odběru, uchovávání a podání kostní dřeně

Získávání dřeňových buněk

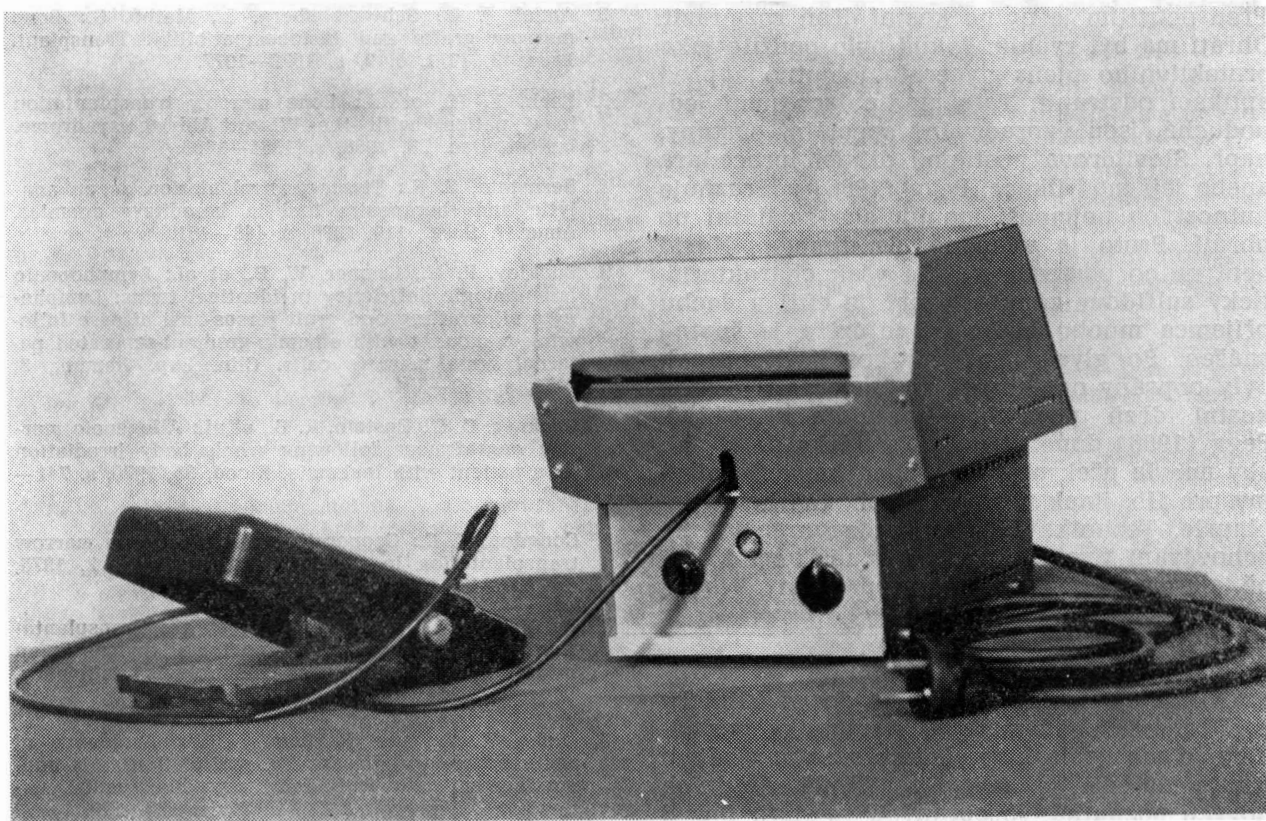
U normálního dospělého člověka je obsažena hemopoetická kostní dřeň v kostech lebky, hrudního koše, pánve a páteře. Odběr kostní dřeně od živých dárců je obvykle prováděn mnohonásobnými punkcemi s aspirací. Dameshek (1956) původně používal lokální anestézie a sedativ, ale obvykle se dává přednost celkové anestézii, kdy lze také získat větší množství kostní dřeně. Pacient leží na břiše, punktuje se zadní ilické hřebeny a trny, potom je pacient otočen a provedena aspirace ze sternu, předních ilických hřebenů a spina ilica anterior. V pánevní oblasti je obvykle dostatečně pohyblivá kůže, což umožňuje udělat několik punkcí z jednoho kožního vpichu. Používá se různých jehel, např. Wim-Silvermanovy,

Milerovy, Waterfieldovy, Peggovy. Lze použít aspirace do stříkačky přes trojcestný kohout, kterým se dá přisávat konzervační roztok s heparinem, v třetí poloze kohoutu se provádí vypuštění do kontejneru. Sami hodláme použít k aspiraci vývěvy o podtlaku asi $\frac{3}{4}$ atm. (metodika pracovníků tkáňové banky v Lipsku). Při jednom nasátí se doporučuje odebrat 2–5 ml kostní dřeně, při větším odběru je velká příměs periferní krve. Provádí se asi 30–50 vpichů, z jednoho vpichu asi 3 punkce, celkem je možno získat asi 400 ml kostní dřeně o celkové buněčnosti $5\text{--}15 \times 10^9$ jaderných buněk. Pegg (1966) doporučuje před provedením odběru kostní dřeně provést diagnostické punkce kostní dřeně, aby bylo možno upřesnit uložení červené kostní dřeně u konkrétního dárce, event. vyloučit výskyt maligních buněk.

Pro odběr kadaverózní dřeně bylo popsáno několik metodik. Nejjednodušší popsala Spižarskaja a Mamyševa (1961); tato aspirační metodika však má malou výtěžnost. Ferrebee a spol. (1959) provádějí sterilní pitvu a snesení předních obratlových těl k odběru kostní dřeně. Je to metoda náročná technicky i na zachování sterility. Ray a spol. (1959) doporučili lisování obratlových těl v sáčcích. Podobné metodiky použil i Pegg (1966). Naše skupina pracuje metodikou vypracovanou Vaňáskem



Obr. 1. Kostka kostní dřeně, získaná po opracování zevních ploch obratlových těl



Obr. 2. Svářečka na sáčky pro kostní dřev podle doc. Vaňásk

a Klenem (1968); obratlová těla získaná normální pítvou se zvenčí sterilizují pomocí roztoku formalinu, pak se opláchnou sterilní vodou, načež se opracují zevní plochy obratlových těl a takto získané kostičky kostní dřev jsou lisovány ve speciálním lisu. Získaná dřev se homogenizuje ve speciálním homogenizátoru za použití sít s oky různé velikosti, pak je kostní dřev vypuštěna do kontejneru a odcentrifugován tuk. Dosud provedená opakovaná vyšetření sterility jsou uspokojující, celý proces je však dosti náročný a hodláme ho ještě modifikovat. Výtěžnost jaderných buněk z páteře jednoho dospělého člověka je obvykle dostatečná k provedení alogenní TKD. Podle našich dosavadních výsledků je to 5×10^8 — 1×10^{11} jaderných buněk.

K získání kostní dřev se dá použít i chirurgicky získaných kostí (zvl. žeber) nebo fetálních jater. Tyto metody jsou však u lidí těžce použitelné a dávají malý výtěžek.

Konzervace kostní dřev

V posledních letech se používají dva způsoby konzervace kostní dřev. První — chlazení při nízkých teplotách (používá se tuhý CO_2 , teplota -79 st. C, nebo tekutý dusík, teplota -196 st. C). Druhý — režim obyčejných chladničkových teplot za přidání stabilizujících a konzervujících roztoků. Dlouhodobější uchování umožňuje jen první způsob. Je však třeba

použít speciální a někdy složité přístroje se zvláštním režimem mrazení. Je nutno zvláště dbát na skupenské teplo, které může v určitém bodě působit výchylku („spike“) ve stanoveném režimu mrazení. Nebezpečí spojené s velkým zvýšením osmotického tlaku v tekuté fázi při mrznutí vody se snižuje přidávkou některých látek: glycerinu, dimethylsulfoxidu, polyvinylpyrolidonu a dalších. V podstatě každý neutrální roztok, který není toxický, má větší nebo menší příznivý vliv (Pegg 1966). Byl vyzkoušen a používá se roztok Hanksův, Tyrodův, TC 199, přídavek 5% lidského séra, v SSSR používají roztok COLIPK. Při použití chladničkových teplot ($+2$ — $+5$ st. C) zůstává dřev léčebně účinná asi týden, pak klesá její účinnost pod 20 % (Costachel 1968).

V konzervaci kostní dřev bylo dosaženo pozoruhodně dobrých výsledků. Byly popsány úspěšné TKD po několika letech konzervace (Cabins a spol. 1962, Fedotěnko a Lavryk 1966 a další).

Uchovávání a aplikace kostní dřev

Kostní dřev je nutno uchovávat ve zvláštních kontejnerech, kde hrají úlohu různé technické detaily: významné je např. složení stěny nádoby, přesné požadavky jsou kladeny na difuzibilitu pro CO_2 a dusík při uchovávání v tomto prostředí, tepelnou vodivost apod. Sami zkoušíme zatavené sáčky ze speciální fólie.

Před použitím je nutno kostní dřeň rozmrazit. Ohřátí má být rychlé. Pokud bylo použito jako protektivního agens glycerolu, je nutno jej před aplikací odstranit. Tato manipulace není jednoduchá, jsou vypracovány speciální postupy, např. Sloviterova postupná diluční procedura anebo její modifikace. Pegg (1966) zdůrazňuje nutnost co nejmenší manipulace se dřením po ohřátí. Proto je výhodné, že dimetylsulfoxid není nutno odstraňovat. Má však charakteristický sulfidový zápach, který je cítit v dechu příjemce mnoho hodin po infúzi a je špatně snášen. Po glycerolizované kostní dřením pak byly popsány opakovaně spazmy vén. Ohřátou kostní dřeň podáváme zpravidla nitrožilně, Pegg (1966) doporučuje malé dávky do 80 ml, aby nebyla překročena vazebná kapacita plazmy pro Hb, jinak nastává přechodná hemoglobinurie. Technika konzervace zabezpečí totiž uchovávání životaschopných buněk kostní dřeně, ale erytrocyty jsou většinou ničeny.

Závěr

TKD je perspektivní, ale ne dosud klinicky rozšířená léčebná metoda. V několika posledních letech došlo k prudkému vzestupu zájmu o tuto metodu, což lze připsat řadě zásadních nových poznatků, rozebraných ve statí. Dosud neúspěšnější u lidí bylo použití TKD po ozáření a u některých stavů imunologické nedostatečnosti. Důležitým důvodem, který vede k váhání při léčebném použití kostní dřeně, je nebezpečí sekundární choroby. Pokroku v prevenci a léčbě sekundární choroby bylo v poslední době dosaženo hlavně zlepšením imunosupresivních postupů, zavedením výběru antigeně podobných dárců a příjemců a vypracováním metod umožňujících odstranění imunokompetentních buněk a koncentrací kmenových buněk štěpu. Vedle dřeně od živých dárců — nejčastěji příbuzných, je možno použít i kadaverózní kostní dřeň, kde však je mnohem obtížnější vyhledávat kompatibilní materiál. Zde mohou pomoci mezinárodní banky kostní dřeně.

Problémy spojené s TKD jsou složité a náročné. Odpovědně řešit je mohou pouze velké kolektivy pracovníků, pokud možno mezinárodně sdružené. Tak například již několik let úspěšně pracuje „Cooperative Group on Bone Marrow Transplantation in Man“, sdružující přední světové pracovníky tohoto oboru. Jsou podnikány kroky k zahájení součinnosti i v zemích socialistického tábora.

TKD prochází nyní fází klinických pokusů a intenzivního experimentálního studia. Nabízí se stále více a lepších možností k zvýšení aplikovatelnosti TKD v klinice.

Literatura

1. Albert, E. D., Mickey, M. R., et al.: Seven new HL-A specificities and their distribution in three races. *Histocompatibility testing*, 221—230. Copenhagen, Munksgaard 1970.
2. Amiel, J. L., Schwarzenberg, L., Mathé, G.: Bone marrow grafts and histocompatibility. *Transplant. Proc.*, 3, 1971, č. 2, s. 1072—1077.
3. Bach, F. H., et al.: Bone marrow transplantation in a patient with the Wiscott-Aldrich syndrome. *Lancet*, Dec. 28, 1968, s. 1364—1366.
4. Bernstein, S. E.: Tissue transplantation as an analytic and therapeutic tool in hereditary anemias. *Amer. J. Surg.*, 119, 1970, s. 448—451.
5. Buckley, R. H., Kremer, W. B., et al.: Lymphopenic immunologic deficiency in identical twins: Lymphocyte allografting and graft-versus-host disease following treatment with albumin-gradient-separated paternal bone marrow cells. *Clin. Exp. Immun.*, 9, 1971, s. 289—304.
6. Buckner, C. D., Epstein, R. B., et al.: Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood*, 35, 1970, s. 741—750.
7. Congdon, C. C.: Cooperative group on bone marrow transplantation in man. *Transplant. Proc.*, 2, 1970, č. 3, s. 342—360.
8. De Konning, J., Dooren, L. J., et al.: Transplantation of bone marrow cells and foetal thymus in an infant with lymphopenic immunologic deficiency. *Lancet*, 1, 1969, s. 1223.
9. Dicke, K. A.: van Bekkum, D. W.: Avoidance of acute secondary disease by purification of hemopoietic stem cells with density gradient centrifugation. *Exp. Hematol.*, 1970, č. 20, s. 126—130.
10. Dooren, L. J., de Konning, J., et al.: Successful treatment of Swiss type agamaglobulinemia with a bone marrow stem cell fraction. *Exp. Hematol.*, 1970, č. 20, s. 41—42.
11. Douglas, S. D. and Friedenberg, H. H.: Graft versus host reaction in Wiskott-Aldrich syndrome: Antemortem diagnosis of human GVH in an immunologic deficiency disease. *Vox Sang.*, 16, 1969, s. 172—178.
12. Fedotenkov, A. G., et al.: Ottaľvanije zamoroženogo kostnogo mozga i otmývanije jeho ot glycerina pered transplantacijej. *Probl. Gemat.*, 1969, č. 3, s. 48—51.
13. Fiala, J.: Otázky léčebného použití slezinných buněk. *Vnitř. Lék.*, 17, 1971, č. 12, s. 1191—1193.
14. Fialkow, P. J., Thomas, E. D., et al.: Leukemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet*, 1, 1971, s. 251—255.
15. Fölsch, E.: Knochenmark-transfusion. *Deutsch. Med. Wschr.*, 97, 1972, č. 37, s. 1—5.
16. Gabelov, A. A., Kojro, M. A.: Autotransplantacija kostnogo mozga pri lučevoj terapii. *Med. Radiol. (Moskva)*, 13, 1968, č. 12, s. 9—14.
17. Graw, R. G., Brown, J. A., et al.: Transplantation of HL-A identical bone marrow to patients with acute lymphocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 1970, č. 20, s. 35—41.
18. Graw, R. G., Brown, J. A., et al.: Transplantation of HL-A identical allogeneic bone marrow to a patient with acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 36, 1970, č. 6 s. 736—747.
19. Grey, R. G., Leventhal, B. G., et al.: In: Abstracts of the third international congress of the Transplantation society. The Hague, 1970, 211.
20. Gutierrez-Romero, M., and Mathé, G.: The conditioning of the recipient as a factor enhancing immune insufficiency induced by the graft-versus-host reaction. *Transplantation*, 13, 1972, č. 1, s. 1—4.

21. Hathaway, W. E., Fulginiti, V. A., et al.: Graft-vs-host reaction following a single blood transfusion. *J. Amer. Med. Ass.*, 201, 1967, č. 13, s. 1015–1020.
22. Hong, R., Bach, F. H.: Bone marrow transplantation. Aggravating factors in graft versus host disease. *Transplantation*, 10, č. 3, s. 192–194.
23. Ivašková, E., Dausset, J., et al.: Identifikace leukocytárních antigenů a jejich význam pro klinickou transplantaci a hematologii. *Vnitř. lékař.*, 15, 1969, č. 4, s. 379–387.
24. Kašpar, M., Fiala, O.: Cytostatická terapie generalizovaných forem zhoubných nádorů s transplantací kostní dřeně. *Brat. Léč. listy*, 54, 1970, č. 4, s. 435–442.
25. Knospe, W. H., Crosby, W. H.: Aplastic anaemia: a disorder of the bone-marrow sinusoidal microcirculation rather than stem-cells failure? *Lancet*, January, 2, 1971 s. 20–22.
26. Kovalenko, P., Rachmatulaev, A. R.: Autotransplantace zamороženného kostního mozga při chirurgickém i lúčevom lečení rakiny legkich. *Vest. Chir.*, 101, 1968, č. 10, s. 52–55.
27. Kurnick, J. E., Ward, H. P., et al.: Allogeneic marrow infusions in aplastic anemia. *Exp. Hematol.*, 1970, č. 20, s. 29–33.
28. Hakinodan, T., Santos, G. W., et al.: Immunosuppressive drugs. *Pharm. Rev.*, 22, 1970, s. 189–247.
29. Mathé, G., Amiel, L. J., et al.: Bone marrow transplantation. In: Rapaport, F., and Dausset, J., eds.: *Human marrow transplantation*. Grune and Stratton 1968, s. 284–303.
30. Mathé, G., Amiel, J. L. et al.: Bone marrow transplantation and leukocyte transfusions. Springfield, C. C. Thomas 1971.
31. Meuwissen, H. J., Gatti, R. A., et al.: Treatment of lymphopenic hypogammaglobulinemia and bone marrow aplasia by transplantation of allogeneic marrow. *New. Eng. J. Med.*, 281, 1969, s. 691–697.
32. Meuwissen, H. J., Rodey, G., et al.: Bone marrow transplantation therapeutic usefulness and complications. *Amer. J. Med.*, in press.
33. Miller, M. E.: Graft-vs-host reactions in man with special reference to thymic dysplasia. *Birth Defects Vol. IV. In: Immunologic deficiency diseases in man* (ed. by D. Bergsma and R. A. Good), Birth Defects—original article series, Vol. IV. The National foundation press, New York, 1968, p. p. 257–269.
34. Nouza, K., Böhm, F.: Transplantace kostní dřeně v klinice, hodnocení a vyhlídky. *Vnitř. lékař.*, 14, 1971, č. 10, s. 999–1008.
35. Petrov, R. V.: Effect of interaction of immunologically incompatible cells from hemopoietic tissue. *Exp. Hematol.*, 1970, č. 20, s. 86–96.
36. Petýrek, P., Mráz, J.: Therapeutic effect in lethally irradiated mice of cell fractions obtained by gradient centrifugation of spleen homogenate in bovine serum albumin. *Fol. Biol. (Praha)*, 18, 1972, s. 34–41.
37. Philips, R. A.: Review of bone marrow transplants at the Ontario cancer institute. *Transplant. Proc.*, in press.
38. Philips, R. A.: and Cowan, D. H.: Human bone marrow transplantation. *Med. Clin. N. Amer.*, 56, 1972, č. 2, s. 433–451.
39. Pillow, R. P., Epstein, R. B., et al.: Treatment of bone marrow failure by isogeneic marrow infusion. *New. Eng. J. Med.*, 275, 1966, s. 94–97.
40. Rogentine, G. N., Rosenberg, S., et al.: Successful allogeneic bone marrow transplantation in aplastic anemia. *Blood*, 36, 1970, s. 829.
41. Rozhold, Z., Rozhold, J., et al.: Význam autotransplantace kostnej drene pri nárazovej chemoterapii maligných nádorov. *Rozhl. chir.*, 48, 1969, s. 556–560.
42. Ryškov, S. V., Cholodnyj, A. J., et al.: K metodike polučeniya postmertnogo kostnogo mozga. *Probl. Gemat.*, 130, 1968, č. 2, s. 49–50.
43. Santos, G. W., Burke, P. J., et al.: Marrow transplantation and graft-versus-host disease in acute monocytic leukemia. *Exp. Hematol.*, 18, 1969, s. 20.
44. Santos, G. W., Burke, P. J., et al.: Rationale for the use of cyclophosphamide as an immunosuppressant for marrow transplants in man. In: *Pharmacological treatment in organ and tissue transplantation*, Proceedings of an international symposium, International congress series No. 197. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1970, 24–31.
45. Santos, G. W., Sensenbrenner, L. L. et al.: Marrow transplantation in man following cyclophosphamide. *Transpl. Proc.*, in press.
46. Sensenbrenner, L. L., Santos, G. W.: Effect of syngeneic and allogeneic lymphnode cells on spleen colony forming units. *Fed. Proc.*, 29, 1970, s. 785.
47. Schwarzenberg, L., and Mathé, G.: New data on the treatment of leukemias and other tumors by the graft-versus-host reaction. In: *Advances in transplantation*. Baltimore, Williams and Wilkins 1968, s. 549–555.
48. Storb, R., Buckner, C. D., et al.: Cyclophosphamide regimens in Rhesus monkeys with and without marrow infusion. *Cancer Res.*, 30, 1970, s. 2195–2203.
49. Šteruská, M., Hrubíško, M.: Unsere Erfahrungen mit Knochenmark-transfusionen bei Aplasie der Hemo-pese. *Folia Hemat.*, 92, 1969, č. 3, s. 332–340.
50. Thomas, E. D., Bryant, J. J., et al.: Allogeneic marrow grafting using HL-A matched donor — recipient sibling pairs. *Tr. Assoc. Am. Phys.*, in press.
51. Thomas, E. D., Buckner, C. D., et al.: Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood*, 38, 1971, č. 3, s. 267–287.
52. Thomas, E. D., Rudolph, R. H., et al.: Isogeneic marrow grafting in man. *Exp. Hematol.*, in press.
53. Tmomas, E. D., Storb, R.: Technique for human marrow grafting. *Blood*, 36, 1970, č. 4, s. 507–515.
54. Van Bekkum, D. W.: Bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.*, 3, 1971, č. 1, s. 53–57.
55. Van Bekkum, D. W.: Mitigation of acute secondary disease by treatment of the recipient with anti-lymphocytic serum prior to grafting of allogeneic hemopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 20, 1970, s. 3–5.
56. Van Bekkum, D. W.: Radiation Chimeras. *Transplant. Proc.*, 2, 1970, č. 4, s. 479–482.
57. Yamamura, M., Newton, R. C. F., et al.: Uncomplicated HL-A matched sibling bone marrow graft for combined immune deficiency. *Brit. Med. J.*, 2, 1972, s. 285–289.