

Abstrakt

Východisko: Transplantace krvetvorných kmenových buněk slouží k léčbě poruch krvetvorby, autoimunitních chorob i některých nehematologických onemocnění. Ne pro všechny pacienty se však podaří nalézt vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk (HSC). Protože HSC vykazují nízkou proliferační a metabolickou aktivitu, lze u nich přepokládat odolnost vůči nedostatku kyslíku a metabolických substrátů, který nastává při ischemii, např. v kadaverózní kostní dřeni. Cílem této práce bylo pomocí experimentálního myšího modelu ověřit možnost odběru HSC z kadaverózní kostní dřene. Navíc byla testována tolerance HSC k inhibitorům metabolismu a k uchovávání *in vitro*.

Metody: V experimentech byl použit modelový organismus *Mus musculus* C57Bl/6 („wild-type“ a p53 knock-out). Kostní dřeň byla po určitou dobu (0 až 48 hod) ponechána v uzavřených femurech dárců při teplotě 37°C, 20°C nebo 4°C v podmínkách ischemie, nebo byla ihned odebrána a buňky byly vystaveny inhibitoru dýchacího řetězce kyanidu draselnému či inhibitoru glykolýzy 2-deoxy-D-glukose, příp. pouze skladovány *in vitro*. Vliv ischemie, metabolických inhibitorů a skladování *in vitro* na transplantabilitu HSC byl studován na myším kongenním modelu Ly5.1/Ly5.2 metodou kompetitivní repopulace. Poměry živých, apoptotických a mrtvých buněk v subpopulacích kostní dřene, a zastoupení LSK SLAM (Lin^{low}Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) a LSK SP (side population) buněk, reprezentujících HSC, byly měřeny pomocí průtokové cytometrie.

Výsledky: Na základě chimerismu buněk dárcovského původu sledovaného v periferní krvi příjemců po dobu 6 měsíců od transplantace bylo zjištěno, že dlouhodobá repopulační schopnost HSC vystavených ischemii zůstává při 37°C, 20°C resp. 4°C zachována po dobu minimálně 2, 6 resp. 12 hodin. S následným poklesem transplantability klesalo i zastoupení LSK SLAM a LSK SP buněk v kostní dřeni (BM). Ischemie způsobila také zvýšení počtu apoptotických a mrtvých buněk v BM, přičemž v LSK populaci (bohaté na HSC) byl pozorován menší nárůst než v populacích diferencovaných prekurzorů krevních buněk. U HSC odebraných z kadaverózní dřene p53^{-/-} myši nebyly v porovnání s „wild-type“ HSC pozorovány významné rozdíly v přežívání ani v transplantabilitě. Po inkubacích s inhibitory byla zjištěna vyšší odolnost LSK buněk k inhibici KCN; k inhibici 2-DG byly citlivé všechny buňky kostní dřene. Dvoudenní skladování buněk při 37°C ani čtyřdenní skladování při 4°C transplantabilitu HSC neovlivnilo.

Závěr: Výsledky naší studie prokázaly, že HSC přežívají v kadaverózní kostní dřeni po významnou dobu, aniž by ztrácely svou repopulační schopnost. Ukázalo se, že představují populaci kostní dřene nejodolnější k nedostatku kyslíku a metabolických substrátů. Přežívání HSC bylo významně prodlouženo při skladování *in vitro*, proto by buňky měly být vždy odebrány co nejdříve.