

Současný pohled na krvetvornou tkáň

Current understanding of the haematopoietic tissue

Nečas E.^{1,2}, Faltusová K.¹

¹Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie, Praha

²Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, BIOCEV, Vestec 252 50

SOUHRN

Krvetvorná tkáň je celoživotním zdrojem krevních a některých tkáňových buněk. V práci je pojednáno o kvantitativním a kvalitativním aspektu této její funkce. Krvetvorná tkáň je nejznámější tkání z hlediska přítomnosti a funkce kmenových a progenitorových buněk. Rozvinuté experimentální metody, především transplantace buněk a analýza průtokovou cytometrií, umožňují vzhled do činnosti krvetvorné tkáně v rozsahu, který u jiných tkání možný není. V článku je pojednáno především o současných názorech na krvetvornou kmenovou buňku, vývojovou hierarchii krevních buněk a podpůrnou a řídící úlohu stromatu krvetvorné tkáně. Přehledně je také pojednáno o embryonálním a fetálním vývoji krvetvorby.

Klíčová slova: hematopoëza, kmenová buňka, niche, embryogeneze, C57Bl/J myš

SUMMARY

Haematopoietic tissue carries out the lifelong production of blood cells. The quantitative and qualitative aspects of blood cell production are summarised in this short review. The haematopoietic tissue is the best researched tissues regarding the role of stem and progenitor cells in tissue homeostasis and function. Advanced experimental methods, especially cell transplantation and flow cytometry, enable research into the functional organisation of haematopoietic tissue beyond the limits present in other tissues. The review focuses upon the haematopoietic stem cell, the developmental hierarchy in blood cell formation and the role of stroma in the support and control of blood cell production. A brief overview of embryonic and foetal haematopoiesis is also provided.

Key words: haematopoiesis, stem cell, niche, embryogenesis, C57Bl/J mouse

ÚVOD

Funkcí krvetvorné tkáně je stálá produkce buněk. Jsou to strukturně i funkčně velmi různorodé buňky krevní a makrofágy, žírné buňky (mastocyty, heparinocyty) a lymfocyty, které jsou přítomny ve většině tkání. Krevní buňky mají jen omezenou délku života. Ta je podstatně kratší, než je délka života celého organismu. Zanikající krevní buňky musí být proto neustále doplňovány buňkami nově vytvářenými. Produkce různých funkčně i strukturně specializovaných buněk v potřebném množství je jedinou funkcí krvetvorné tkáně.

PRODUKCE KREVNÍCH BUNĚK U ČLOVĚKA A U MYŠI

V postnatálním období života je hlavní krvetvornou tkání kostní dřen. Kvantitativně je nejvíce produkováno krevních destiček a erytrocytů, funkčně vysoko specializovaných bezjaderných krevních elementů. Produkci myeloidních buněk (erytrocytů, granulocytů, monocytů a megakaryocytů/trombocytů) lze přibližně odhadnout z jejich celkového množství v krvi a doby, po kterou setrvají v cirkulaci. U dospělého člověka kostní dřeň produkuje každý den asi:

3×10^{11} trombocytů

2×10^{11} erytrocytů

5×10^{10} granulocytů a monocytů¹

Podklady pro odhad produkce krevních buněk u člověka uvádí tabulka 1. Lze také odvodit, že krvetvorná tkáň vyprodukuje u člověka během 70 let života více než 1000 kg buněk. Produkci lymfocytů v kostní dřeni, slezině, lymfatických uzlinách a tkáních a v týmu tyto odhady nezahrnují.

Krvetvorná tkáň, krev a jejich poruchy jsou předmětem lékařských oborů hematologie a onkohematologie. Mnoho poznatků o funkci krvetvorné tkáně však poskytl výzkum v rámci experimentální hematologie, a to především výzkum zaměřený na poznání krvetvorby u myší a částečně též ryb (zebříček, *Danio rerio*).

Také u myší lze odhadnout množství buněk produkovaných krvetvornými tkáněmi (Novak a Nečas, 1994; Nečas et al., 1995). U myší asi 90 % vytvářených buněk představují erytrocyty (Nečas et al., 1995). Erytrocyty u myší setrvávají v cirkulaci kratší dobu než erytrocyty lidské, jen asi 40–50 dnů (Vácha, 1983). Podrobněji je výpočet tvorby krevních buněk u myší rozveden v tabulce 2. V porovnání s lidskou krvetvorbou je produkce krevních buněk vztažena na kilogram tělesné hmotnosti asi 3krát větší.

¹ O setrvání granulocytů a monocytů v cirkulaci jsou velmi rozdílné údaje. Tento odhad vychází z tradičního a nejčastějšího údaje o poločasu setrvání v cirkulaci (5) – 8 hodin, založeného na radioizotopovém označení separovaných granulocytů *in vitro* a jejich transfuzi zpět do oběhu. Pokud by tyto buňky setrvávaly v cirkulaci podstatně déle, až 5 dnů (Pillay et al., 2010; Bekkering a Torensma, 2013), byla by jejich produkce několikanásobně menší.

Tab. 1: Produkce myeloidních krevních buněk u dospělého člověka.

	Počet v μ l ^a	Počet v krvi (5 l)	Délka života*; poločas v cirkulaci (T1/2) [#]	Denní produkce (10^8)
Erytrocyty	$4,5 \times 10^6$	$2,25 \times 10^{13}$	120,0	1875,0
Granulocyty				
– neutrofilní	$3,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^{10}$	0,3#	462,1 ^{b,c}
– eozinofilní	$1,8 \times 10^2$	$9,0 \times 10^8$	0,3#	20,8 ^b
– bazofilní	$3,0 \times 10$	$1,5 \times 10^8$	0,3#	3,5 ^b
Monocyty	$2,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^9$	0,3#	27,7 ^b
Trombocyty	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{12}$	4,5*	2800,0 ^b
– Megakaryocyty				1,4 ^b
– „Diploidní megakaryocyty“				22,4
Celkem				2411,0

^aVýchozí hematologické hodnoty jsou z Wintrobe´s Clinical Hematology, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

^bDenní obrat (TR; turnover rate) byl vypočítán z poločasu setrvání buněk v cirkulaci (T1/2) a celkového počtu buněk v krvi podle vzorce $TR = 0,693/T1/2$ v hodinách × počet buněk v cirkulaci.

^cPoločas setrvání granulocytů v cirkulaci člověka je většinou udáván ≈ 5–8 hodin, ale i 5 dnů (Simon a Kim, 2010; Bekkering a Torensma, 2013). Pokud by granulocyty cirkulovaly v krvi po několik dnů, byl by odhad jejich produkce, uvedený v tabulce, významně nižší. Produkce erytrocytů by pak představovala 90 % víc myeloidních buněk produkovaných kostní dření, podobně jako u myší (viz tab. 2).

^dProdukce trombocytů byla extrapolována na produkci „diploidních megakaryocytů“ použitím těchto předpokladů: megakaryocyt (N32) reprezentuje 16 „diploidních buněk“ a z jednoho megakaryocytu vznikne 2000 trombocytů (Wintrobe´s Clinical Hematology, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993).

Tab. 2: Produkce myeloidních krevních buněk u myši.^a

	Počet v μ l	Počet v krvi (1,3 ml)	Délka života*; poločas v cirkulaci (T $1/2$); [#]	Denní produkce (10^8)
Erytrocyty	$9,8 \times 10^6$	$1,34 \times 10^{10}$	43,0 ^{b,*}	2,290 ^e
Granulocyty				
– neutrofilní	$1,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^{6,d}$	0,1 ^e #	0,222 ^{f,g}
– eozinofilní	$1,8 \times 10^2$	$2,5 \times 10^5$	0,1#	0,017 ^f
– bazofilní	$4,2 \times 10$	$5,8 \times 10^4$	0,1 ^j #	0,004 ^f
Monocyty	$1,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	0,7 ^k #	0,001 ^f
Trombocyty	$1,0 \times 10^6$	$1,34 \times 10^9$	1,3 ⁱ *	3,350 ^f
– Megakaryocyty				0,003
– „Diploidní megakaryocyty“				0,040
Celkem				2,574

^aOdhad objemu krve a počtu krevních elementů v krvi jsou průměrné hodnoty pro myš (Mitruka et al., 1977).

^bDélka života erytrocytů u myší (Vácha, 1983).

^cOdhad produkce tvorby erytrocytů kostní dření byl snížen o 25 % z důvodu erythropoézy ve slezině myší (Vácha et al., 1982).

^dPočet neutrofilních granulocytů byl zdvojnásoben z důvodu granulocytů, které aktuálně necirkuluji.

^ePoločas setrvání neutrofilních granulocytů v krvi (podle Lee et al., 1979).

^fDenní obrat (TR, turnover rate) byl vypočítán z poločasu setrvání buněk v cirkulaci (T1/2)a celkového počtu buněk v krvi podle vzorce $TR = 0,693/T1/2$ v hodinách × počet buněk v cirkulaci.

^gLee et al., 1979, stanovili obrat neutrofilních granulocytů u myší na $0,50 \times 10^8/\text{den}$, Uchida a Yamagawa, 1992, na $0,19 \times 10^8/\text{den}$.

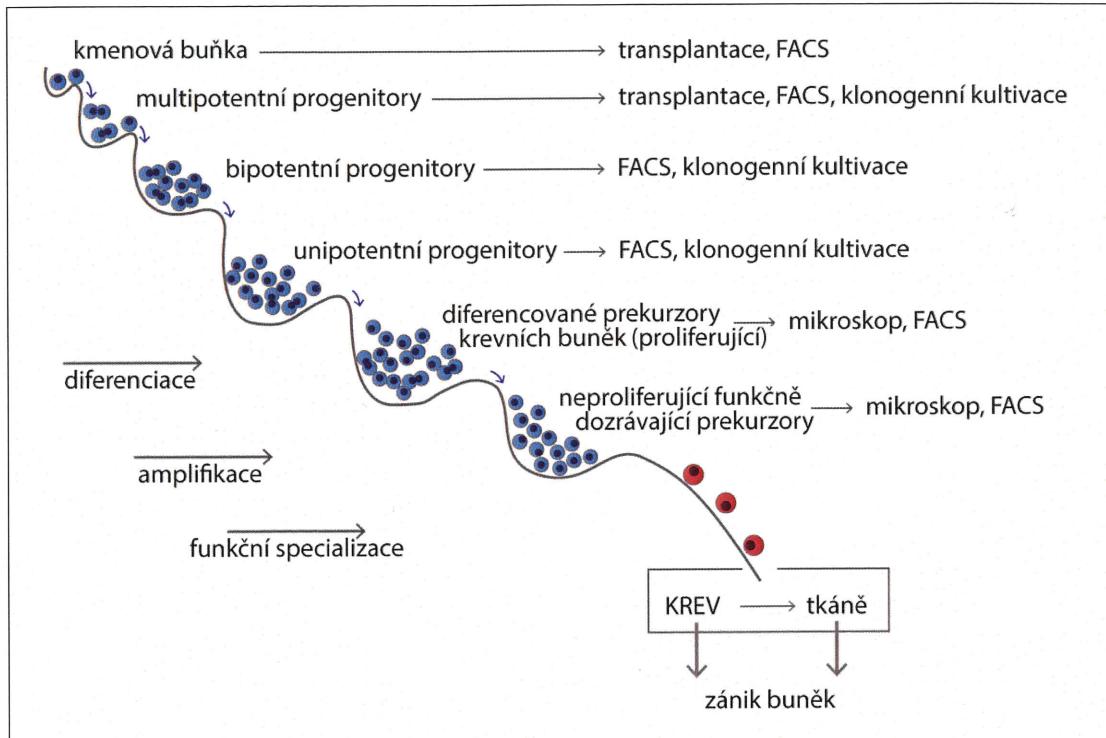
^hFiedner et al., 1966.

ⁱByl použit údaj pro neutrofilní granulocyty.

^jPoločas setrvání monocytů v krvi (van Furth et al., 1980).

^kPoločas setrvání trombocytů (Odell a McDonald, 1961).

^lProdukce trombocytů byla extrapolována na produkci „diploidních megakaryocytů“ použitím těchto předpokladů: megakaryocyt (N24) reprezentuje 12 „diploidních buněk“ a z jednoho megakaryocytu vznikne 1000 trombocytů (Stenberg a Levin, 1989).



Obr. 1: Tvorba a obnova buněk produkovaných krvetvornými tkáněmi. Jsou uvedeny také metody, kterými lze jednotlivé druhy krvetvorných buněk studovat. Krvetvorba je řízena stromatem krvetvorných tkání (buněčným kontaktem a místně působícími cytokinami), na obrázku znázorněným zvlněnou čarou, a systémovými faktory, jakými jsou erythropoetin a trombopoetin.

Krevní buňky vznikají jako produkt hierarchického procesu krvetvorby, na jejímž vrcholu jsou velmi málo početné krvetvorné buňky kmenové. Kmenové buňky se diferencují do buněk progenitorových, které jsou pak zdrojem prekurzorů zralých krevních buněk (obr. 1). Buněčná proliferace je zdrojem amplifikace počtu vytvářených buněk. Všechny buňky vzniklé amplifikací buňky, která se začala dělit, jsou jejím klonem. Pokud by tato buňka měla specifickou značku předávanou buňkám dceřiným, byly by všechny buňky patřící do tohoto klonu rozpoznatelné v kostní dřeni, krvi i ve tkáních, do kterých migrovaly. Za „klonální značky“ nejdříve posloužily specifické chromozomové aberace. Dnes jsou používány různorodé značky zjistitelné analytickými metodami molekulární biologie (viz např. Sun et al., 2014). Procesy krvetvorby jsou zdaleka nejvíce prozkoumány u myší, především u laboratorní myši kmene C57Bl/6.

KRVETVORBA U MYŠI

Výzkumné úsilí o poznání zákonitostí krvetvorby se soustředilo na krvetvorbu myší především z důvodu dostupnosti syngenních a kongenních myších kmenů, které umožňují transplantaci krvetvorných tkání a jejich buněk a sledování výsledku transplantace. Přenositelnost poznatků získaných při studiu myší krvetvorby na člověka potvrdila úspěšnost klinických transplantací kostní dřeně.

ZÁKLADNÍ EXPERIMENTÁLNÍ VÝZKUMNÉ METODY KRVETVORNÝCH TKÁNÍ

Experimentální výzkum myší krvetvorby si od jeho radiobiologických začátků na konci 40. let 20. století vypracoval řadu metod a experimentálních přístupů, z nichž některé jsou jen omezeně přenositelné na jiné tkáně. Experimentální výzkum krvetvorby používá:

- transplantaci kostní dřeně v syngenním a kongenním usporádání,
- transplantaci specifických buněk,
- poškození krvetvorné tkáně a její spontánní regeneraci,
- kultivaci krvetvorných buněk *in vitro*,
- průtokovou cytometrii (FACS),
- označení buněk a sledování buněčných klonů,
- přirozené mutace, které významně ovlivňují krvetvorbu,
- cílené manipulace genomu,
- pokročilé mikroskopické metody studia kostní dřeně,
- studium podpůrného a řídícího tkáňového mikroprostředí (stroma, niche), ve kterém se krvetvorba uskutečňuje,
- studium embryogeneze krvetvorné tkáně,
- analogie molekulárních mechanismů krvetvorby u ryby *Danio rerio* a u savců,
- znalost základních regulací krvetvorby prostřednictvím cytokinů a systémově působících humorálních faktorů (erythropoetin, trombopoetin, granulocyto-makrofágové růstové faktory).

Pro další výklad týkající se krvetvorných tkání myší jsou uvedeny základní postupy cytometrické analýzy kostní dřeně nejčastěji studovaného kmene laboratorní myši C57Bl/6. Pro krvetvornou tkáň, která nemá pevnou anatomickou strukturu, se stala průtovková cytometrie, spolu se separací buněk a jejich klonální kultivací a transplantací, základem pro poznání jejího hierarchického vývojového uspořádání. Pro pochopení dynamiky buněčných dějů v krvetvorné tkáni má základní význam sledování buněčných klonů odvozených od kmenových a progenitorových buněk (Bigildeev et al., 2019).

CYTOMETRICKÁ ANALÝZA BUNĚK KMENOVÝCH A BUNĚK PROGENITOROVÝCH (PROGENITORŮ)

Znaky základní:

- CD45 – tyrosinová fosfatáza exprimovaná na povrchu krvetvorných buněk, kromě buněk erytroidních, umožňuje odlišit krvetvorné buňky od buněk stromatu,
- „Lin“ – souhrnné antigenní znaky různých differencovaných prekurzorů krevních buněk detekovatelné směsí protilátek proti liniovým znakům B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1 a Ter119,
- c-Kit – receptor pro cytokin stem cell faktor (SCF),
- Sca-1 antigen (stem cell antigen-1).

Znaky alternativní:

- CD201 – endotelový receptor pro protein C (EPCR),
- CD105 – endoglin; součást receptoru pro cytokin TGF β .

Znaky pomocné:

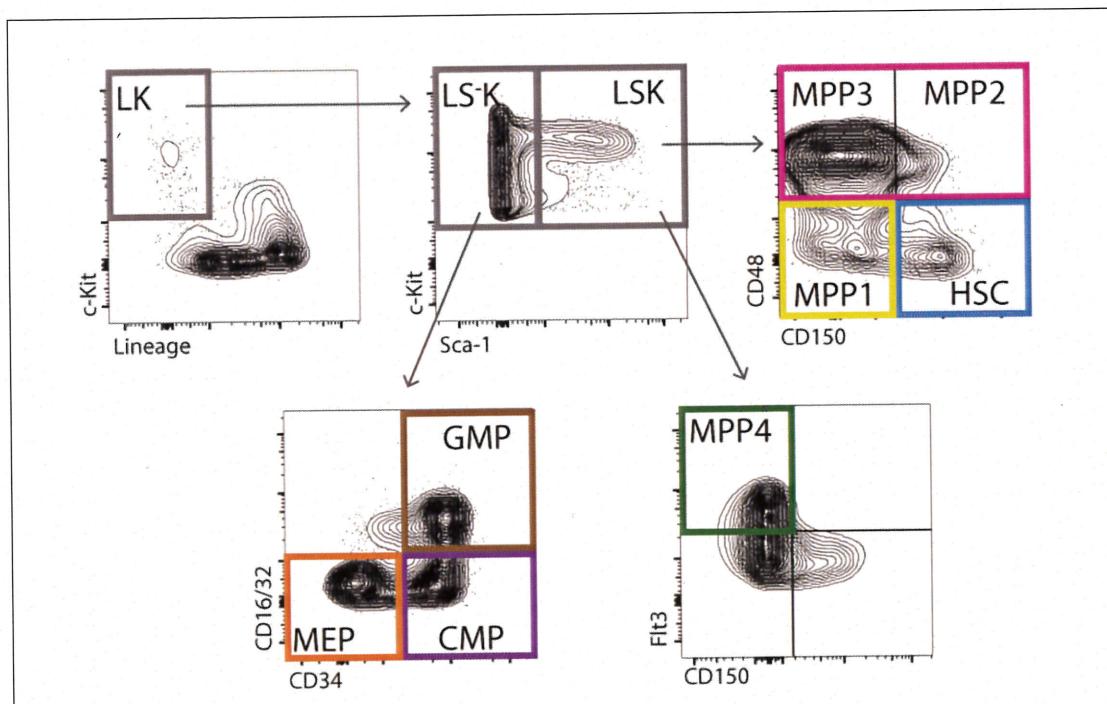
- CD150 – glykoprotein (signaling lymphocytic activation molecule 1, SLAMF1),
- CD48 – glykoprotein (signaling lymphocytic activation molecule 2, SLAMF2),
- CD41 – integrin $\alpha 2\beta$,
- CD34 – glykoprotein s předpokládanou adhezivní funkcí,
- CD135 – receptor Flt3 (Flk2) pro Flt-3 ligand,
- CD16/32 – receptory III/II pro Fc-fragment imunglobulinů,
- CD127 – receptor pro interleukin 7.

Na obrázku 2 je příklad rozlišení nezralých krvetvorných buněk, progenitorů a buněk kmenových, které ještě nemají znaky buněk diferencovaných.

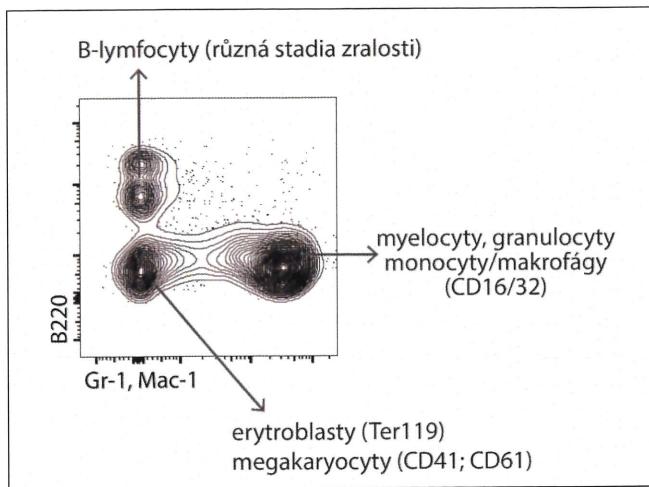
CYTOMETRICKÁ ANALÝZA DIFERENCOVANÝCH PREKURZORŮ KREVNÍCH BUNĚK A BUNĚK KREVNÍCH

Základní antigenní znaky differencovaných krevních buněk:

- Ter119 – antigenní znak erytroidních buněk od proerytroblastů po erytrocyty,
- CD71 – transferinový receptor 1,
- CD44 – glykoprotein, receptor pro hyaluronovou kyselinu a další látky v mimobuněčné hmotě (kolagen, osteopontin),
- CD41 – integrin $\alpha 2\beta$ (megakaryocyty),



Obr. 2: Základní cytometrická analýza nezralých kmenových a progenitorových buněk krvetvorby. Hustota kontur odráží množství buněk s určitým fenotypem. Fenotyp buněk je svázán s vývojovým potenciálem buněk. Viz seznam zkratek a obrázek 5.



Obr. 3: Diferencované vývojové linie krevních buněk v kostní dřeni. Také v periferní krvi lze pomocí znaku B220 a Gr-1/Mac-1 rozlišit lymfocyty a granulocyty spolu s monocyty.

- CD61 – integrin β_3 (trombocyty),
- Gr-1 – (Ly6C a Ly6G); Ly6G znak je jen na granulocytech, Ly6C je méně specifický, je na granulocytech i monocytech,
- Mac1 – integrin $\alpha_M\beta_2$; CR3 receptor komplementu; skládá se z CD11b (integrin α_M) a CD18 (integrin β_2); (monocyty),
- CD16/32 – receptory III/II pro Fc-fragment imunoglobulinů (granulocyty, monocyty),
- B220 – (CD45R), izoforma znaku CD45 specifická pro B-buňky,
- CD19 – transmembránový glykoprotein B-lymfocytů,
- CD11b – znak přítomný na monocytech, neutrofilních a eozinofilních granulocytech,

- CD11c – dendritické buňky,
- F4/80 – makrofágy,
- CD4 a CD8 – Th4 a Th8 lymfocyty.

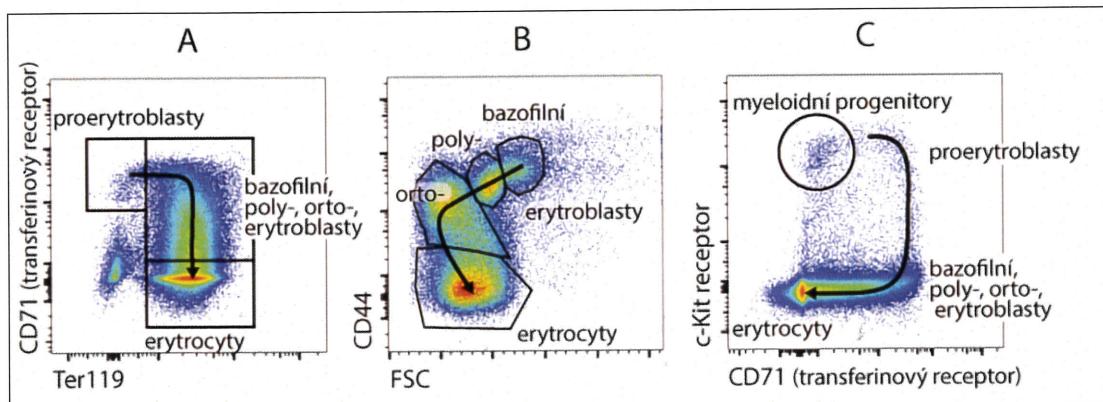
Na obrázku 3 je ukázáno rozložení B-buněk (B220 pozitivních), granulocytů-monocytů (Gr-1/Mac-1 pozitivních) a buněk negativních na tyto znaky. Mezi těmito „negativními“ buňkami převažují erytroblasty, které exprimují znak Ter119. Erytrocyty mají také znak Ter119, ale jsou z analýzy vyloučeny na základě své malé velikosti. Je také možné je odstranit lítou způsobenou expozicí hypotonickému alkaličkému prostředí. Na obrázku 4 jsou příklady toho, jak lze průtokovou cytometrií studovat erytropoezu.

VÝVOJOVÁ HIERARCHIE KRVETVORNÝCH BUNĚK

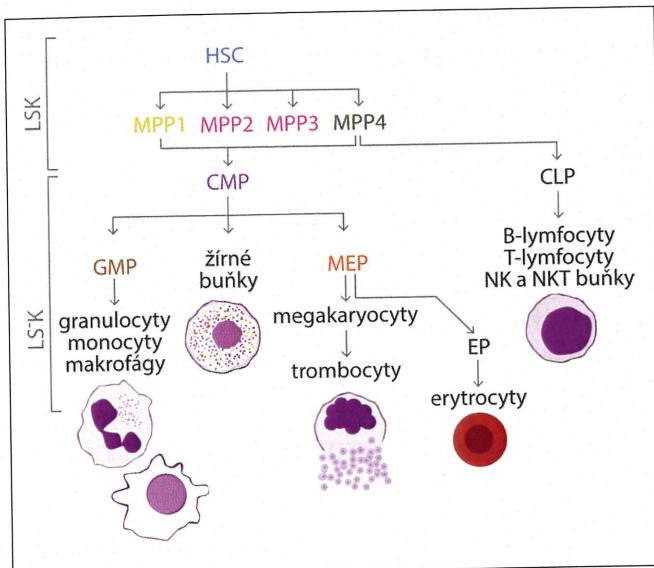
Pomocí cytometrických analýz, separace buněk a jejich klonální kultivace nebo transplantace byla stanovena vývojová hierarchie kmenových a progenitorových krvetvorných buněk, která předchází získání znaků a morfologie buněk diferencovaných (obr. 1 a 5). Na vrcholu buněčné vývojové hierarchie krvetvorby je multipotentní, myeloidní-lymfoïdní, krvetvorná kmenová buňka (HSC). Od kmenové buňky jsou odvozeny multipotentní progenitory (MPP), dále pak progenitory jen myeloidní (CMP) nebo jen lymfoidní (CLP), z nich progenitory pro specifické vývojové linie krevních buněk (GMP, MEP, EP, lymfoidní progenitory). Tyto progenitory jsou zdrojem diferencovaných prekurzorů určitého druhu krevních buněk. Ty se pak dále pomnožují, differencují a zrají v buňky krevní.

KMENOVÁ BUŇKA KRVETVORNÝCH TKÁNÍ

Klíčovými experimenty pro průkaz existence krvetvorné kmenové buňky se staly transplantace kostní dřeně a izolovaných buněk syngenním příjemcům s krvetvornou tkání



Obr. 4: Erytropoeza analyzovaná pomocí fluorescenčně značených protilátek a průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie (FACS) umožňuje, oproti vyšetření krvetvorných tkání mikroskopem, analyzovat desetitisíce buněk různými přístupy. Na tomto obrázku jsou místo kontur, které byly použity na obrázcích 2 a 3, znázorněny jednotlivé buňky jako body. Množství buněk se zvyšuje podle barevné škály od modré po červenou. A: Z analýzy byly vyloučeny B-lymfocyty, myelocyty, granulocyty a monocyty. B: Analyzovaný jsou pouze buňky erytroidní se znakem Ter119. FCS (forward scatter) odráží zhruba velikost buněk. CD44 je receptor pro hyaluronovou kyselinu. C: Z analýzy byly vyloučeny B-lymfocyty, myelocyty, granulocyty, monocyty a Sca-1 pozitivní buňky.



Obr. 5: Vývojová hierarchie a vývojové linie krevních buněk.

Viz seznam zkratek.

poškozenou účinkem ionizujícího záření (Ford et al., 1956). Hlavním znakem krvetvorné kmenové buňky se stala její schopnost transplantace a obnovení zničené krvetvorby. Rigorózní definice kmenové buňky vyžaduje, aby buňka po transplantaci začala produkovat všechny typy krevních buněk, tj. prokázala schopnost multipotentní diferenciace, a současně obnovila i svoji populaci transplantovatelných kmenových buněk, tj. prokázala schopnost sebeobnovy. Tento základní atribut kmenové buňky je vyjádřen jejím funkčním označením „dlouhodobě repopulující buňka“ (LTRC – long term repopulating cell). Pozdější výzkum ukázal, že ne všechny krvetvorné kmenové buňky jsou plně multipotentní a některé jsou dlouhodobým zdrojem jen určitých krevních buněk (Carrelha et al., 2018).

RŮZNORODOST A HIERARCHIE KMENOVÝCH BUNĚK

Kostní dřeň myší obsahuje kmenové buňky (LTRC) s různým vývojovým potenciálem, v naprosté převaze jak

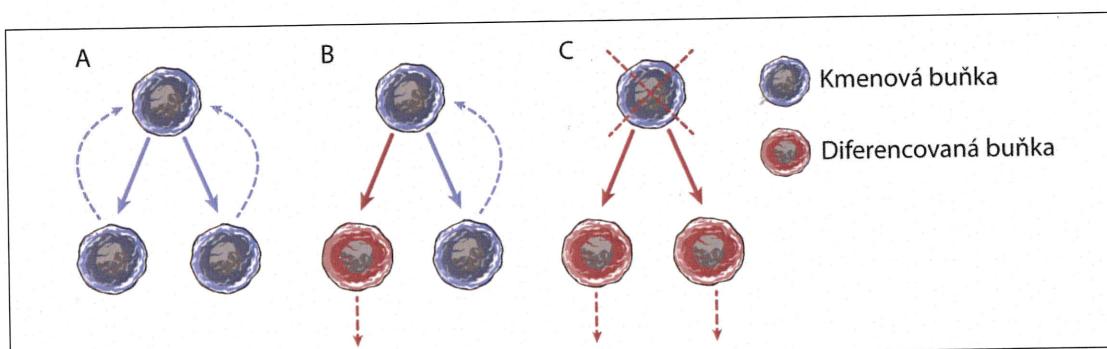
myeloidním (tvorba erytrocytů, granulocytů, makrofágů, megakaryocytů, žírných buněk), tak i lymfoidním (tvorba B-lymfocytů, T-buněk, NK- a NKT-buněk). Rozdíly mezi nimi spočívají v tom, že některé tyto buňky jsou převážně zdrojem krevních buněk myeloidních a minoritním zdrojem buněk lymfoidních a obráceně. Myeloidní-lymfoidní kmenové buňky jsou tedy zdrojem obou typů buněk, ale v různém poměru (Dykstra et al., 2007). Existují experimentální doklady o tom, že kmenové buňky v kostní dřeni mají hierarchické uspořádání, přičemž na samém vrcholu jejich hierarchie je kmenová buňka se silným potenciálem pro tvorbu megakaryocytů (Carrelha et al., 2018). Na dolním konci hierarchie krvetvorných kmenových buněk jsou pak buňky specializované buď jen pro myelopoezu, nebo jen pro lymfopoezu.

SCHOPNOST SEBEOBNOVY A DIFERENCIACE KMENOVÉ BUŇKY

Sebeobnovná schopnost kmenových buněk buněčným dělením je jejich klíčovým definičním znakem. Schopnost sebeobnovy předpokládá, že po rozdělení buňky aspoň jedna dceřiná buňka, případně obě, je/sou zcela identické s buňkou, která se rozdělila. Po buněčném dělení se tím buňka obnovila, a ve tkáni je proto stále přítomná nebo se jejich počet zvýší (obr. 6).

Se sebeobnovnou schopností buněk se váže pojem asymetrického a symetrického buněčného dělení. V souvislosti s rozdělením buňky a její případnou diferenciací mohou nastat tři možnosti: výsledek buněčného dělení může být symetricky sebeobnovný, asymetrický sebeobnovný-diferenciační a symetricky diferenciační, při kterém buňka, která se rozdělila, nebyla nahrazena žádnou buňkou dceřinou (obr. 6A, B, C).

Důkazy o sebeobnovné schopnosti krvetvorné kmenové buňky symetrickým sebeobnovným dělením poskytla transplantace velmi malého počtu kmenových buněk, kdy výsledkem byla dlouhodobá monoklonální krvetvorba, tj. plnohodnotná krvetvorba odvozená jen od jedné buňky (Brecher et al., 1993; Morita et al., 2010). Protože kostní dřeň s monoklonální krvetvorbou lze transplantovat několika myším, znamená to, že obsahuje více kmenových buněk, které vznikly původně z buňky jedné.



Obr. 6: Buněčné dělení spojené se sebeobnovou nebo diferenciací buňky: A – symetrické sebeobnovné dělení, B – asymetrické sebeobnovné a diferenciační dělení, C – symetrické diferenciační dělení.

Podkladem asymetrického výsledků buněčného dělení je nerovnoměrné rozdělení cytoplazmatických faktorů, které následně ovlivňují expresi genů (Loeffler et al., 2019). Je to příklad tzv. vnitřní asymetrické mitózy. Asymetrická mitóza může být také indukována různým okolím dceřiných buněk, zevními vlivy, které různě ovlivní buněčnou genovou expresi prostřednictvím receptorů a signálních drah. Asymetrický vývoj buněk je indukován zevními faktory, morfogeny, např. Wnt, Hedgehog, BMP (Santoro et al., 2016). V případě krvetvorných kmenových buněk se předpokládá, že mechanismus zevní asymetrické mitózy udržuje stálý počet kmenových buněk a zároveň je zdrojem buněk, které se diferencují a zrají do buněk krevních (Forgáčová a Nečas, 2013). V případě krvetvorných kmenových buněk však o tomto přímé doklady nejsou.

Studovali jsme buněčný cyklus u progenitorových buněk LSK a myeloidních progenitorových buněk LS-K v kostní dřeni myší (Páral et al., 2018). Výsledky ukázaly, že přibližně polovina buněk LSK ztratí znak Sca-1 po svém rozdělení, což je v souladu s představou asymetrické mitózy buněk LSK. Naproti tomu obě dceřiné buňky vzniklé rozdelením myeloidních progenitorů LS-K znova zahájí přípravu k dalšímu buněčnému dělení. To odpovídá symetrickému sebeobnovnému buněčnému dělení buněk LS-K (Páral et al., 2018).

O sebeobnově krvetvorných kmenových buněk a jejich diferenciaci rozhoduje jak jejich vnitřní stav určený expresí specifických genů, tak i vlivy z okolí buněk, které ve svém souhrnu mají i řídící vliv na vlastní krvetvorbu.

STROMA KRVETVORNÝCH TKÁNÍ A NICHE KMENOVÝCH BUNĚK

Krvetvorba se uskutečňuje ve specifických tkáních: kostní dřeni a ve tkáních lymfatických. U hlodavců je i v dospělosti krvetvornou tkání slezina. Krvetvorba, která se uskutečňuje jinde než v kostní dřeni, se označuje jako hematopoeza extramedulární. Extramedulární hematopoeza se však může přechodně velmi zesítit po poškození kostní dřeně (Šefc et al., 2003). V embryonálním vývoji jsou důležitými krvetvornými orgány žloutkový vak a fetální játra. Krvetvorba tedy musí být podporována specifickým tkáňovým prostředím, přičemž okolí krvetvorných buněk je zdrojem vitálních a řídících faktorů, které do velké míry určují osud krvetvorných buněk. Tkáňové mikroprostředí, jež umožňuje funkci kmenových buněk, se označuje jako „niche“ (nika, hnizdo, dále niche). Předpokládá se, že podněty a informace z niche určují, zda kmenová buňka:

- setrvá v klidovém stavu, a nebude proto v krvetvorbě aktivní („spící“ kmenová buňka),
- rozdělí se symetrickým nebo asymetrickým sebeobnovným dělením,
- podlehne přímo diferenciaci nebo se rozdělí symetrickým diferenciacioním dělením,
- opustí niche místní migrací nebo migrací prostřednictvím cirkulace,
- podlehne apoptotické smrti (obr. 7).

Osud buňky předurčuje její vnitřní nastavení závislé na specifickém nastavení genové exprese. Na něm je pak

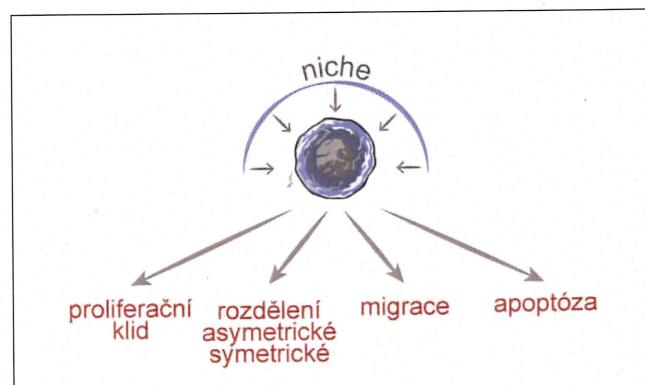
závislá reaktivita na podněty z mikroprostředí (niche) i reaktivita na podněty působící systémově.

Výzkum niche krvetvorných kmenových buněk je obtížný. Pokud niche obsahuje jen jednu buňku kmenovou, pak je u myší jen několik tisíc niche nacházejících se v kostní dřeni distribuované do velkého počtu kostí. Pokud niche obsahuje více než jednu kmenovou buňku, pak je počet niche ještě menší (Forgáčová a Nečas, 2013). Protože jsou krvetvorné kmenové buňky heterogenní z hlediska svého vývojového potenciálu (viz výše), lze předpokládat, že i jejich niche jsou specializované. Předpokládá se existence specifických niche pro různé buňky progenitorové odvozené od buněk kmenových (Morrison a Scadden, 2014). Vývoj erytroblastů se uskutečňuje kolem centrálního makrofágu (Manwani a Bieker, 2008), který lze považovat za niche pro erytroblasty.

Zpočátku bylo niche pro krvetvornou kmenovou buňku spojováno s osteoblasty na endosteum kosti. Pozdější výzkumy však lokalizovaly krvetvorné kmenové buňky v blízkosti cévních sinusoid (perivaskulárně) a bezprostřední blízkosti buněk, které vytváří cytokin stem cell faktor (SCF) a chemoattractant CXCL12 (též SDF-1). Převážným zdrojem těchto faktorů jsou mezenchymové stromální buňky, částečně endotelie a adipocyty. Osteoblasty tyto cytokiny netvoří a jejich úloha v podpoře a řízení kmenových buněk je pravděpodobně nepřímá. Nebyl také potvrzen nízký parciální tlak kyslíku (hypoxie) v místech lokalizace krvetvorných kmenových buněk (Morrison a Scadden, 2014). Lze předpokládat, že podpora stromálních buněk a řízení krvetvorby jsou blízce spojeny od samého počátku vzniku krvetvorby v embryu a podmiňují přesuny krvetvorby během embryonálního a fetálního vývoje (viz dále).

TRANSPLANTAČNÍ SCHOPNOST KRVETVORNÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

Schopnost transplantace a obnovení poškozené krvetvorné tkáně je základním definičním znakem krvetvorné kmenové buňky. Je také podkladem léčby transplantací kostní dřeně nebo krvetvornými buňkami získanými z krve (Cetkovský et al., 2016). Biologické pochody podmiňující



Obr. 7: Chování a osud kmenové buňky určuje její vnitřní stav genové exprese a okolí buňky. Pro bezprostřední okolí kmenových a progenitorových buněk se vžilo označení niche.

transplantaci kmenových krvetvorných buněk jsou však stále známy jen částečně. Buňky kostní dřeně nebo separované krvetvorné buňky jsou zavedeny do krevního oběhu. Účinnost, s jakou se kmenové buňky uchytí v kostní dřeni, je velmi vysoká. Morita et al. (2010) uvádějí, že intravenózně transplantovali více než 2000 myší jednotlivou buňkou nesoucí znaky buňky kmenové; až 50% těchto buněk se stalo v příjemci zdrojem buněk krevních. My jsme prokázali vysokou účinnost transplantace kmenových buněk kompetitivní transplantací. Prakticky všechny kmenové buňky obsažené v kostní dřeni zavedené do krevního oběhu příjemcům vystaveným různým dávkám ionizujícího záření začaly dlouhodobě produkovat krevní buňky (Forgacova et al., 2013).

Transplantaci jednotlivých buněk předchází odebrání kostní dřeně a její i několikahodinová manipulace *in vitro* spojená s působením vysokého parciálního tlaku kyslíku v atmosférickém vzduchu, barvením buněk protilátkami s navázanými fluorochromy a vystavení značným mechanickým silám při jejich sortování. Kmenové buňky jsou značně odolné vůči těmto manipulacím a nepříznivým podmínkám. Krvetvorné kmenové buňky přežijí i dvě hodiny úplné teplé ischemie, spojené s anoxií a acidózou kostní dřeně (Michalová et al., 2011).

Podstata navigace intravenózně podaných kmenových buněk do jejich niche je jen částečně známá. Předpokládá se, že její hlavní součástí je sekrece chemokinu CXCL12 buňkami niche a přítomnost jeho receptoru CXCR4 na kmenových buňkách (Vagima et al., 2011). Niche je také zdrojem cytokinu SCF, ligantu receptoru c-Kit, který je přítomný na membráně všech nezralých krvetvorných buněk. Ověřovali jsme možnou úlohu receptoru c-Kit v účinnosti transplantace krvetvorných kmenových buněk tím, že jsme před transplantací vyvolali internalizaci a degradaci tohoto receptoru na kmenových a progenitorových buňkách. Významné snížení receptoru c-Kit na transplantovaných buňkách však nesnížilo jejich transplantační účinnost (Chen et al., 2016). Během asi 12 hodin se však množství receptoru c-Kit obnovilo. Výsledky proto pouze ukázaly, že c-Kit receptor se neuplatňuje v časné fázi uchycení a přihojení transplantovaných kmenových buněk.

Schopnost navigace do kostní dřeně a nalezení vhodných niche se zdá být výlučnou vlastností kmenových buněk a jejich nejbližších multipotentních progenitorů. Transplantovali jsme separované buňky LS-K (myeloidní progenitory) a buňky LSK (multipotentní progenitory zahrnující i buňky kmenové), které byly označeny přítomností GFP (green fluorescent protein). Za 20 nebo 42 hodin jsme transplantované buňky detekovali vyšetřením kostní dřeně a sleziny průtokovou cytometrií. I při extrapolaci výsledků na celou kostní dřeně a celou slezinu jsme našli pouze 1–2 % transplantovaných buněk (nepublikované výsledky).

KRVETVORBA V EMBRYU A FETU

Krvetvora založená na transplantovatelné kmenové buňce je ustavovena během embryonálního vývoje u myší až kolem desátého embryonálního dne (E10) v oblasti dorzální aorty a poté pokračuje ve fetálních játrech a kostní dřeni.

První krvetvorné progenitory jsou však identifikovatelné ve žloutkovém vaku již kolem sedmého dne (E7). Krvetvorný systém je tedy funkční ještě předtím, než v organismu vzniknou první transplantovatelné buňky kmenové (Dzierzak a Bigas, 2018).

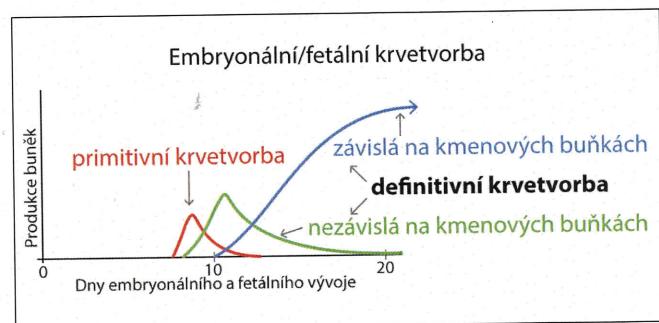
Vývoj embryonální krvetvorby je možné rozdělit do tří následných a překrývajících se vln (obr. 7). První vlna bývá označována jako primitivní krvetvorba. Za ní následují dvě vlny definitivní krvetvorby, přičemž kmenové buňky iniciují až druhou vlnu definitivní krvetvorby, která pak pokračuje po celý zbytek života.

PRIMITIVNÍ EMBRYONÁLNÍ KRVETVORBA

První krevní buňky se objevují časně po gastrulaci kolem sedmého embryonálního dne (E7) v krevních ostrůvčích žloutkového vaku mimo vlastní embryo. Obsahují primitivní erytroidní, megakaryocytární a makrofágové progenitory (Palis et al., 1999). Erytroidní progenitory jsou závislé na erythropoetinu (EPO) a jejich počet se rychle zvyšuje. Od E9 však již nejsou detektovatelné. Potenciál těchto primitivních erytroidních progenitorů je tedy extrémně limitovaný jak prostorově, tak i časově – jsou aktivní pouze 48 hodin (Palis et al., 1999). Mezi E9,5 a E12,5 dozrávají v krvi v primitivní erytroblasty, které se v krvi dále pomnožují symetrickým buněčným dělením a současně zrají v primitivní erytrocyty akumulací hemoglobinu, zmenšením velikosti, pyknózou jádra a snížením obsahu RNA. Na rozdíl od definitivních erytrocytů obsahují fetální hemoglobin. Přenáší kyslík během časné embryogeneze a přetrávají v cirkulaci ještě i několik dní po narození.

DEFINITIVNÍ EMBRYONÁLNÍ KRVETVORBA PŘED VZNIKEM KMENOVÝCH BUNĚK

Prvním zdrojem definitivní krvetvorby, která produkuje bezjaderné erytrocyty s fetálním a dospělým typem hemoglobinu a další myeloidní buňky, nejsou transplantovatelné buňky kmenové, nýbrž erytro-myeloidní progenitory (EMP) ve žloutkovém vaku. Jsou prokazatelné průtokovou cytometrií od E8,5 jako buňky c-Kit^{hi}, CD41⁺, 16/32⁺, VEC^{+/−}, CD45^{+/−} a Sca-1[−] (McGrath et al., 2015). EMP jsou zdrojem



Obr. 8: Primitivní a definitivní krvetvorba ve žloutkovém vaku, embryu a fetu (k porodu myších fetů dochází 20.–21. den po fertilizaci oocytu).

nejen erytrocytů, ale i granulocytů, monocytů a megakaryocytů, postrádají však schopnost diferenciace do lymfocytů. Od pozdějších kmenových buněk se liší expresí znaků CD16/32 a CD41 a tím, že neexprimují znak Sca-1, který je pro krvetvorné kmenové buňky myší kmene C57Bl/6 typický (viz obr. 2). Pokud jsou EMP transplantovány dospělému hostiteli, jsou schopny zajistit jen krátkodobou tvorbu erytrocytů. V embryonálním dni E9,5 jsou ve žloutkovém vaku již i buňky s lymfoidním potenciálem, které však nejsou součástí embryonálních progenitorových buněk EMP.

KRVETVORBA ODVOZENÁ OD KMENOVÝCH BUNĚK – DRUHÁ VLNA DEFINITIVNÍ KRVETVORBY

První krvetvorné kmenové buňky jsou v ontogenezi detekovatelné ve vrstvě endotelových buněk na ventrální stěně dorzální aorty, v oblasti označované zkratkou AGM (aorta-gonad-mesonephros), a to v E9,5 – E10,0 vývojovém embryonálním dni (Rybtssov et al., 2016; Dzierzak a Bigas, 2018). Vznikají diferenciací, endotelovou-krvetvornou transformací (EHT) endotelových buněk, ve kterých je aktivován gen pro transkripční faktor Runx1 (Menegatti et al., 2019). EHT a následný proces zrání prvních krvetvorných kmenových buněk probíhá ve čtyřech rozlišitelných krocích: pro → pre-1. typu → pre-2. typu → d (definitivní) kmenové buňky (Rybtssov et al., 2016). Až definitivní kmenové buňky (d) jsou transplantovatelné dospělým jedincům s poškozenou krvetvorbou, kterou obnoví (Rybtssov et al., 2016). Jejich vznik z méně zralých kmenových buněk je závislý na cytokinech SCF a IL3. Procesem EHT vznikne několik kmenových buněk, které jsou pak zdrojem klonů krvetvory od nich odvozených po celý život jedince. Normální krvetvora je proto polyklonalní².

Od E11,5 migrují embryonální krvetvorné kmenové buňky do fetálních jater (Rybtssov et al., 2016) a zde se jejich počet exponenciálně zvyšuje mezi dnem E12 a dnem E15. Jsou významným zdrojem erytrocytů a mají i lymfoidní vývojový potenciál (Chang et al., 2005). V poslední třetině jejich vývoje ve fetálních játrech nabývají citlivosti k tlumivému účinku estrogenů na B-lymfopoezu. Jsou-li získány z fetálních jater před E18,5 a transplantovány dospělým jedincům, není tvorba B-lymfocytů od nich odvozená tlumena působením estrogenů (Pelichovská et al., 2008; Hloběňová et al., 2012), což je vlastnost normální B-lymfopoezy.

ÚČAST KRVETVORNÝCH KMENOVÝCH BUNĚK V USTÁLENÉ KRVETVORBĚ DOSPĚLÉHO JEDINCE

V posledních letech byla otevřena otázka aktivní účasti kmenových krvetvorných buněk ve tvorbě buněk krevních. Sun et al. (2014) uvedli, že je krvetvora u dospělých myší udržována buňkami, které jsou hierarchicky níž oproti

buňkám kmenovým, multipotentními buňkami progenitorovými a nesplňují v transplantačním testu základní kritérium buňky kmenové, tj. schopnost dlouhodobé podpory krvetvorby. Usoudili, že kostní dřeň myší obsahuje značné množství multipotentních progenitorů s omezenou délkom podpory krvetvorby, a kmenové buňky proto nejsou pro normální krvetvorbu potřeba, pokud krvetvorná tkáň není poškozena. V normální krvetvorné tkáni jsou kmenové buňky přítomné, ale nejsou aktivní, jsou „záložní“. Toto sdělení vyvolalo značnou experimentální odezvu nejednotnou ve svých výsledcích. Problematika „spících“ a aktivních krvetvorných kmenových buněk a diskuse rozporných výsledků je předmětem sdělení McRae et al. (2019).

AMPLIFIKACE BUNĚČNÉ PRODUKCE PŘI TVORBĚ KREVNÍCH BUNĚK

Z malého počtu kmenových buněk nebo multipotentních progenitorů vznikne v procesu krvetvorby mnohem větší počet krevních buněk. To je výsledkem buněčných dělení v procesu tvorby krevních buněk. Pokusili jsme se určit, ve kterém vývojovém stadiu krevních buněk je amplifikační faktor nejvýznamnější (Páral et al., 2018). Stanovili jsme délku buněčného cyklu různých progenitorů a jejich počet. To umožnilo odhadnout produkci těchto nezralých krvetvorných buněk na jejich různých vývojových stadiích. Největší amplifikace byla na úrovni myeloidních progenitorů LS-K, které již nemají znak Sca-1, ale stále ještě nemají znaky diferencovaných buněk příslušných k vývojovým liniím, nejsou ještě diferencovanými prekurzory krevních buněk. Na vývojovém stadiu progenitorů, ne diferencovaných prekurzorů, proto dochází k hlavní regulaci množství vytvářených krevních buněk (Páral et al., 2018). Tyto vývojově pozdní progenitory také nabývají schopnosti reagovat na systémově působící řídící a regulační faktory, jakým je příkladně erythropoetin. Tusi et al. (2018) stimulovali krvetvora injekcemi erythropoetinu a v souladu s naším závěrem pozorovali pomnožení buněk odpovídajících vývojově pozdním erytroidním progenitorům.

REAKCE KRVETVORNÉ TKÁNĚ NA ZMĚNĚNÉ POTŘEBY ORGANISMU

Poznatky a představy o krvetvorbě, stručně pojednané v tomto sdělení, se týkají fyziologického stavu. Reakce krvetvorných tkání na změněné potřeby organismu nebo na poškození krvetvorné tkáně dokládají nejen její významné funkční rezervy, ale i změny v hierarchii tvorby krevních buněk, které mohou v těchto případech nastat. Akutní stimulace tvorby erytrocytů erythropoetinem se uskutečňuje na úrovni pozdních erytroidních progenitorů CFU-E (Tusi et al., 2018). Dlouhodobá stimulace erythropoetinem však aktivuje krvetvora na mnohem vyšší úrovni, až na úrovni kmenových buněk. Stimulovaná erytropoeza se pak může

² Monoklonální krvetvora, kdy krevní buňky jsou odvozeny od jedné kmenové buňky, je patologická. Jedná se o leukemie vzniklé dominancí mutované buňky v produkci krevních buněk, a tedy o patologický klon krvetvorby.

odvíjet přímo od kmenových buněk a paralelně obcházet vývojovou hierarchii krvetvorby (Singh et al., 2018). Velmi zajímavé jsou také nové poznatky o tom, že erytrocyty vytvořené v podmínkách adaptace na hypoxické prostředí podléhají rychlému zániku tzv. neocytolýzou, poté když přestane hypoxicke prostředí na organismus působit (Song a Prchal, 2018). Naše studie kostní dřeně regenerující z malého počtu buněk, které přežily její akutní poškození, prokázala velkou expanzi pozměněných pozdních myeloidních progenitorů a podobnost tohoto přechodného stavu krvetvorby s definitivní embryonální krvetverbou uskutečňovanou před vznikem prvních kmenových buněk (Faltusová et al., 2020).

ZÁVĚR

Výzkum krvetvorby u myší umožnil poznání kvalitativních a kvantitativních aspektů tvorby krevních buněk. Poskytl především poznatky o úloze a účasti kmenových buněk v procesu krvetvorby jak během jejího embryonálního vývoje, tak i v dospělém jedinci. Poskytl i poznatky o průběhu obnovení struktury a funkce poškozené krvetvorné tkáně nebo její reakci na dlouhodobě změněné potřeby určitého druhu krevních buněk. Poznatky získané studiem myší krvetvorby jsou přenositelné na krvetvorbu u lidí, pro což svědčí uplatnění poznatků z experimentální transplantace kmenových buněk v klinických transplantacích kostní dřeně a krvetvorných kmenových buněk.

Poděkování: Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky, projektem 17-01897S.

Seznam zkrátek

BFU-E – (burst forming unit) vývojově časný erytroidní progenitor,
 BMP – (bone morphogenic protein) morfogen,
 CFU-E – (colony forming unit) vývojově pozdní erytroidní progenitor,
 CLP – společný (common) lymfoidní progenitor,
 CMP – společný (common) myeloidní progenitor,
 E – embryonální vývojový den,
 EMP – erytroidní-myeloidní progenitor,
 EP – erytroidní progenitor,
 GMP – granulocytovitý-makrofágový progenitor,
 FACS – průtoková cytometrie (fluorescence activated cell sorting),
 HSC – krvetvorná kmenová buňka,
 LK – buňky bez liniiových differenciálních znaků exprimující receptor c-Kit,
 LSK – LK buňka exprimující Sca-1 antigen,
 LS⁻K – LK buňka bez Sca-1 antigenu,
 MPP1-4 – multipotentní progenitory,
 MEP – megakaryocytovitý-erytroidní progenitor,
 SCF – stem cell faktor, Wnt – morfogen

prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.
 Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta,
 Ústav patologické fyziologie, Praha
 U Nemocnice 5
 128 53 Praha 2

e-mail: necas@cesnet.cz; emanuel.necas@lf1.cuni.cz

LITERATURA

- Bekkering S, Torensma R. Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol*, 2, 2013, s. 44.
- Bigildeev AE, Petinati NA and Drize NJ. How methods of molecular biology shape our understanding of the hematopoietic system. *Mol Biol*, 53, 2019, s. 626–37.
- Brecher G, Bookstein N, Redfearn W, Necas E, Pallavicini MG, Cronkite EP. Self-renewal of the long-term repopulating stem cell. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 1993, s. 6028–31.
- Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, Boukarabila H, Grasso F, Gambardella A, Grover A, Höglstrand K, Lord AM, Sanjuan-Pla A, Woll PS, Nerlov C, Jacobsen SEW. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*, 554, 2018, s. 106–11.
- Cetkovský P, Mayer J, Starý J, Hrinčinová M, et al. Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk. Praha: Galén 2016.
- Chang K-T, Sefc L, Psenák O, Vokurka M, Necas E. Early fetal liver readily repopulates B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Stem Cells*, 23, 2005, s. 230–39.
- Chen C-L, Faltusova K, Molik M, Savvulidi F, Chang K-T, Necas E. Low c-Kit expression level induced by stem cell factor does not compromise transplantation of hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 2016, s. 1167–72.
- Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, Lee SJ, Brinkman R, Eaves C. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell*, 1, 2007, s. 218–29.
- Dzierzak E, Bigas A. Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell Stem Cell*, 22, 2018, s. 639–51.
- Faltusová K, Chen C-L, Heizer T, Báječný M, Szikszai K, Páral P, Savvulidi F, Renéšová N, Nečas E. Altered erythro-myeloid progenitor cells are highly expanded in intensively regenerating hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol*, 8, 2020; 98. doi: 10.3389/fcell.2020.00098.
- Fliedner TM, Fache I, Adolphi C. On the turnover kinetics of leukocytes in germ-free mice. *Med Wochenschr*, 96, 1966, s. 1236–38.
- Forgacova K, Savvulidi F, Sefc L, Linhartova J, Necas E. All hematopoietic stem cells engraft in submyeloablative irradiated mice. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, 2013, s. 713–19.
- Forgáčová K, Nečas E. Availability of haematopoietic niches for transplanted stem cells. *Folia Biol*, 59, 2013, s. 1–14.
- Hlobenová T, Sefc L, Chang K-T, Savvulidi F, Michalová J, Nečas E. B-lymphopoiesis gains sensitivity to subsequent inhibition by estrogens during final phase of fetal development. *Dev Comp Immunol*, 36, 2012, s. 385–89.
- Lea F, Fettiger: Wintrobe's clinical hematology, Philadelphia, 1993.
- Lee M, Durch S, Dale D, Finch C. Kinetics of tumor-induced murine neutrophilia. *Blood*, 53, 1979, s. 619–32.
- Loeffler D, Wehling A, Schneiter F, Zhang Y, Müller-Bötticher N, Hoppe PS, Hilsenbeck O, Kokkaliaris KD, Endele M, Schroeder T.

- Asymmetric lysosome inheritance predicts activation of haematopoietic stem cells. *Nature*, 573, 2019, s. 426–29.
18. Manwani D, Bieker JJ. The erythroblastic island. *Curr Top Dev Biol*, 82, 2008, s. 23–53.
 19. McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, Bowen JR, Conway SJ, Catherman SC, Kingsley PD, Koniski AD, Palis J. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep*, 11, 2015, s. 1892–904.
 20. McRae HM, Voss AK, Thomas T. Are transplantable stem cells required for adult hematopoiesis? *Exp Hematol*, 75, 2019, s. 1–10.
 21. Menegatti S, Kruijf M, Garcia-Alegria E, Lacaud G, Kouskoff V. Transcriptional control of blood cell emergence. *FEBS Lett*, 593, 2019, s. 3304–15.
 22. Michalova J, Savvulidi F, Šefc L, Faltusova K, Forgacova K, Necas E. Hematopoietic stem cells survive circulation arrest and reconstitute hematopoiesis in myeloablated mice. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17, 2011, s. 1273–81.
 23. Mitruka BM, Vadehra DV, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. Masson Publ., USA, 1977.
 24. Morita Y, Ema H, Nakuchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*, 207, 2010, s. 1173–82.
 25. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505, 2014, s. 327–34.
 26. Necas E, Šefc L, Brecher G, Bookstein N. Hematopoietic reserve provided by spleen colony-forming units (CFU-S). *Exp Hematol*, 23, 1995, s. 1242–46.
 27. Novak JP, Necas E. Proliferation-differentiation pathways of murine hematopoiesis: correlation of lineage fluxes. *Cell Prolif*, 27, 1994, s. 597–633.
 28. Odell TT, McDonald TP. Life span of mouse blood platelets. *Proc Soc Exp Biol Med*, 106, 1961, s. 107–08.
 29. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 126, 1999, s. 5073–84.
 30. Páral P, Faltusová K, Molík M, Renéšová N, Šefc L, Nečas E. Cell cycle and differentiation of Sca-1⁺ and Sca-1⁻ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Cycle*, 17, 2018, s. 1979–91.
 31. Pelichovská T, Chang KT, Šefc L, Savvulidi F, Broulík P, Necas E. The late-stage foetal liver microenvironment is essential for later sensitivity of B-lymphopoiesis to suppression by oestrogens. *Folia Biol*, 54, 2008, s. 125–29.
 32. Pillay J, Braber I Den, Vrisekoop N, Kwast LM, Boer RJ De, Borghans AM, Tesselaar K, Koenderman L. Brief report in vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116, 2010, s. 625–27.
 33. Potts JR, Farahi N, Heard S, Chilvers ER, Verma S, Peters AM. Circulating granulocyte lifespan in compensated alcohol-related cirrhosis: a pilot study. *Physiol Rep*, 4, 2016.
 34. Russell ES, Bernstein SE. Blood and blood formation. In: *Biology of the laboratory mouse*. Blood, 1966, s. 351–72.
 35. Rybtsov S, Ivanovs A, Zhao S, Medvinsky A. Concealed expansion of immature precursors underpins acute burst of adult HSC activity in foetal liver. *Development*, 143, 2016, s. 1284–89.
 36. Santoro A, Vlachou T, Carminati M, Pelicci PG, Mapelli M. Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep*, 17, 2016, s. 1700–20.
 37. Šefc L, Pšenák O, Sýkora V, Šulc K, Nečas E. Response of hematopoiesis to cyclophosphamide follows highly specific patterns in bone marrow and spleen. *J Hematother Stem Cell Res*, 12, 2003, s. 47–61.
 38. Simon SI, Kim MH. A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood*, 116, 2010, s. 511–12.
 39. Singh RP, Grinenko T, Ramasz B, Franke K, Lesche M, Dahl A, Gassmann M, Chavakis T, Henry I, Wielockx B. Hematopoietic stem cells but not multipotent progenitors drive erythropoiesis during chronic erythroid stress in EPO transgenic mice. *Stem Cell Reports*, 10, 2018, s. 1908–19.
 40. Song J, Prchal JT. Evaluation of erythrocyte changes after normoxic return from hypoxia. *Methods Mol Biol*, 1742, 2018, s. 185–94.
 41. Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells*, 15, 1989, s. 23–47.
 42. Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis JB, Le L, Ho Y-J, Klein A, Hofmann O, Camargo FD. Clonal dynamics of native hematopoiesis. *Nature*, 514, 2014, s. 322–27.
 43. Tusi BK, Wolock SL, Weinreb C, Hwang Y, Hidalgo D, Zilionis R, Waisman A, Huh JR, Klein AM, Socolovsky M. Population snapshots predict early hematopoietic and erythroid hierarchies. *Nature*, 555, 2018, s. 54–60.
 44. Uchida T, Yamagiwa A. Kinetics of rG-CSF-induced neutrophilia in mice. *Exp Hematol*, 20, 1992, s. 152–55.
 45. Vácha J. Red blood cells of domestic mammals. Elsevier, 1983, s. 67–132.
 46. Vácha J, Holá J, Dungel J, Znojil V. The distribution of erythropoiesis over the various anatomical regions of the erythropoietic system in some inbred strains of mice. *Exp Hematol*, 10, 1982, s. 768–73.
 47. Vagima Y, Lapid K, Kollet O, Goichberg P, Alon R, Lapidot T. Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis. *Methods Mol Biol*, 750, 2011, s. 277–89.
 48. van Furth R, Diesselhoff-den Dulk MMC, Raeburn JA, van Zwet TL, Crofton R, van Oud Alblas AB. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. *Mononuclear Phagocytes*, 1980, s. 279–98.

ČESKOSLOVENSKÁ FYZIOLOGIE



"užitek fysiologie je nejpatrnější v lékařství...
lékařové byli po všechny časy nejhorlivější
pěstitelé fysiologické vědy..."

J. E. Purkyně 1851

2/2019