KMENOVÉ BUŇKY KRVETVORBY V RADIOBIOLOGICKÉM POKUSU

Haemopoietic stem cells in radiobiological experiment

IX: 213–458, 2007

ISSN 1212–4117

Pavel Kuna

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie

Summary

Haemopoietic stem cells serve quantitative evaluation of post-irradiation damage in mammals since 1961, when the method of spleen endogenous and exogenous colonies was described by Till and McCulloch in mice.

Vacek et al. (1975) made possible extension of this method for experiment on young rats (of 4 to 5 weeks of age). The rat-donors, as well as rat-acceptors were of this young age. The stem cells in the body of rat-donors were tested after exposure to a dose of 3.5 Gy and after effects of radioprotectors, which were administered before the exposure of the rats to gamma-radiation. By whole body irradiation of rat-acceptors with a dose of 5-5.5 Gy before the transplantation, their own haemopoietic stem cells were destroyed. In this way, conditions were established for testing donor haemopoietic stem cells. The scheme of the process of the exogenous colony formation in young rats is the same as in mice in the scheme by Kalina (1982) shown in Fig. 4.

The observation of exogenous spleen colonies on the 11th to 12th days after the transplantation of the donor allogenic bone marrow to young rat-acceptors irradiated 2 h before this with a dose of 5-5.5 Gy and further described methods were chosen for the analysis of radioprotective effects of cystamine, AET (aminoethylisothiuronium), serotoninine (5-hydroxytryptamine) and mexamine (5-methoxytryptamine). All the rats were exposed to ⁶⁰Co gamma rays from the Chisotron (Chirana) radiation source. Each radioprotector, which was administered i.p. to rat-donors 15 min before the whole body exposure to a dose of 3.5 Gy, significantly increased numbers of colony forming units in the bone marrow of femora. Cystamine significantly increased the survival of lethally irradiated young rats (4-12 Gy) according to comparison of values LD_{50/30} with corresponding values of the dose reduction factor (DRF) 1.27-1.39. Mexamine did not improve the survival of lethally irradiated young rats.

The results support a concept that the survival of young rats after the exposure to a dose inducing the bone marrow form of the acute post-irradiation syndrome is dependent not only on the number of well protected haemopoietic stem cells. Further results are prepared for explanation of mechanisms of the efficacy of different chemical radioprotectors.

Key words: Haemopoietic stem cells – bone marrow post-irradiation syndrome – chemical radioprotectors – radiobiological experiment

Souhrn

Hemopoetické kmenové buňky krvetvorby sloužily pro kvantitativní vyhodnocení postradiačního poškození u savců od roku 1961, kdy metodu slezinných endogenních a exogenních kolonií popsali Till a McCulloch u myší.

Vacek a spolupracovníci (1975) umožnili rozšířit tuto metodu pro pokusy na mladých krysách (starých 4–5 týdnů). V uvedeném mladém věku byly jak krysy-dárce, tak krysy-příjemci. Kmenové buňky v těle dárcovských krys byly testovány po ozáření dávkou 3.5 Gy a po vlivu radioprotektivních látek, které byly podány před gama ozářením. Celotělovým ozářením krys-příjemců dávkou 5–5.5 Gy před transplantací byly zničeny jejich vlastní kmenové buňky krvetvorby. Tak byly vytvořeny podmínky k testování dárcovských kmenových buněk krvetvorby. Schematicky je proces tvorby

exogenních kolonií u mladých krys stejný jako u myši ve schematu Kaliny (1982) na obr. č. 4.

Pozorování exogenních slezinných kolonií 11.–12. den po transplantaci dárcovské allogenní kostní dřeně mladým krysám-příjemcům 2 hodiny před tím ozářených dávkou 5–5.5 Gy a další popsané metody byly vybrány pro analýzu radioprotektivních účinků cystaminu, AET (aminoetylisothiouronia), serotoninu (5-hydroxytryptaminu) a mexaminu (5-metoxytryptaminu). Všechny krysy byly ozařovány ^{60}Co gama zářením ze zdroje Chisotron (Chirana). Každá radioprotektivní látka, která byla i.p. podána krysám-dárcům 15 min. před celotělovou expozicí v dávce 3.5 Gy, významně zvýšila počet koloniformních jednotek v kostní dřeni femurů. Cystamin významně zvýšil přežití letálně gama ozářených mladých krys (4–12 Gy) podle srovnání hodnot $\text{LD}_{50/30}$ s odpovídajícími hodnotami redukčního faktoru dávky (DRF) 1.27–1.39. Mexamin nezvýšil přežití letálně ozářených mladých krys.

Výsledky podporují představu, že přežití mladých krys po ozáření dávkou, která vyvolává dřeňovou formu akutní nemoci z ozáření, nezávisí pouze na počtu dobře chráněných kmenových buněk krvetvorby. Další výsledky jsou připravovány k vysvětlení mechanismů účinnosti různých chemických radioprotektivních látek.

Klíčová slova: kmenové buňky krvetvorby – dřeňový syndrom po radiačním poškození – chemické radioprotektivní látky – radiobiologický pokus

ÚVOD

Útlum krvetvorby je rozhodujícím postradiačním poškozením savců po celotělových subletálních až minimálně absolutně letálních dávkách ionizujícího záření. U osob jsou takové celotělové dávky ionizujícího záření v rozsahu od 0.7 do 10 Gy. Vedle kmenových buněk krvetvorby jsou po ozáření poškozeny i další radiosenzitivní tkáně, především střevní a zárodečný epitel (Vávrová a Petýrek, 1998, Butomo et al., 2004, Kuna 1985, 1989). Vedou u člověka k rozvoji dominantního dřeňového syndromu akutní nemoci z ozáření (ANO) s poklesem nezbytných krevních elementů v periferní krvi, především bílé řady, spojený se snížením imunity, protinfekčních schopností a s rozvojem hemoragického syndromu (Bacq a Alexander, 1963, Pospíšil, J. et al., 1987).

V současnosti patří výzkum kmenových buněk různých tkáňových systémů savců k velmi nadějným postupům při léčení řady onemocnění. Přestože je existence kmenových buněk krvetvorby (KBK) nepochybná, jejich identifikace je značně obtížná (Neuwirt a Nečas, 1981, Filip et al., 2006).

Cílem naší práce je přiblížit zájemcům o kmenové buňky poznatky o možnosti využití kmenových buněk krvetvorby pro kvantitativní analýzu postradiačního poškození a jeho snížení různými přístupy a metodami, např. fyzikálním stíněním, hypoxií nebo podáním radioprotektivních látek. Ze značně rozsáhlé odborné radiobi-

ologické literatury vybírám pro čtenáře především výsledky českých a slovenských autorů.

NÁHRADA ZÁŘENÍM POŠKOZENÉ KOSTNÍ DŘENĚ

Náhrada zářením zničené krvetvorné dřeně transplantací autologní nebo homologní neozářenou kostní dřeně byla proto logickou etiopatogenetickou léčbou postradiačních dřeňových útlumů v prvních přístupech radiobiologů k řešení této problematiky v experimentu (Bacq a Alexander, 1961, 1963, Mazák et al., 1962, Mráz, 1964, Mráz et al., 1963, Legeza et al., 2000) i v klinické praxi (Mathé et al., 1959, Butomo, 1970, Butomo et al., 2004, Baranov et al., 1987, Gale et al., 1993).

Autologní kostní dřeň je kostní dřeň těla vlastní, pro možnou transplantaci musí být odebrána před případným ozářením a do použití odpovídajícím způsobem konzervována v tkáňové bance. Zpravidla si ji nechali odebrat a konzervovat pracovníci s vysokým rizikem možného zevního ozáření. Homologní kostní dřeň patří savci téhož druhu a může být aplikována jedinci téhož druhu při splnění určitých hematologických a imunologických podmínek, jako je identita krevních skupin v systému AB0 u dárce i příjemce. Dále je nutné prokázat identitu či úzkou blízkost dárce a příjemce v systému HLA (z anglického human leukocyte antigens). V radiobiologii a transplantologii se používá také označení transfuze či transplantace

syngenní (identické) nebo alogenní (neidentické) dřeně (Neuwirt a Nečas, 1981).

Významnou kvantitativní metodou, která oceňovala poškození krvetvorné dřeně u všech laboratorních zvířat v kostní dřeně a ve slezině, byla a zůstává její buněčnost, stanovovaná dle počtu jaderných buněk klasickou metodou počítáním jaderných buněk v suspenzi 1 ml fyziologického roztoku v Bürkerově komůrce. Dávkovou závislost poklesu jaderných buněk kostní dřeně u krys v tibii a ve femuru po ozáření krys expozicemi 100–700 R (přibližně 1–7 Gy) analyzovali např. Vodička et al. (1973). Prokázali, že lokální hypoxie naložením turniketu na dolní končetinu významně příznivě ovlivnila buněčnost kostní dřeně v tibii, ne však ve femuru (obr. č. 1). Vyhodnocení buněčnosti kostní dřeně po ozáření u myši a potkanů patří k zlatému fondu radiobiologických metod do současnosti, podobně jako srovnání letálních dávek záření, sledující hynutí laboratorních zvířat do 30. dne po expozici ionizujícím záření s následnou probit-logaritmickou analýzou s výpočtem letálních dávek, např. Dienstbier a Arient (1966), Dostál (1969, 1970), Kuna (1985, 1989), Kuna et al. (2004, 2004a, 2007), srovnej v obr. č. 2. Petýrek a Špelda (1994), Vávrová (1994), Vávro-

vá a Filip (1994) stanovují v pokusech na myších hematopoetické progenitorové buňky, zadane na vývoj granulocytů a makrofágů (CFU-GM). Juchelková et al. (1998), Hofer et al. (2000), Hofer a Pospíšil (1999, 2006) Pospíšil, M. et al. (2004), Vacek et al. (2007) a další soustředěně pokračují v dalším studiu postradiačních změn krvetvorby a její úpravě pomocí vhodných farmak.

Každá jiná transplantace krvetvorné dřeně než autologní (identická) je zatížena rizikem reakce štěpu proti hostiteli (GVHR – graft versus host reaction, též GVHD – g.v.h. disease) a je jasnou limitací tohoto léčebného postupu. V radiobiologických pokusech na myších analyzovali např. vliv tymosinu na GVHR Vávrová et al. (1979).

Omezení transplantací léčby v klinice přehledně dokumentovali Vávrová s Petýrkem (1998) v rozboru uskutečněných transplantací kostní dřeně u ozářených osob, např. při radiačních haváriích ve světě ve Vinči v bývalé Jugoslávii (Mathé et al., 1962), v Černobyli na Ukrajině v roce 1987 (Baranov et al., 1987). Možnosti imunoprese u příjemců kostní dřeně cyklofosfamidem nebo celotělovým ozářením ionizujícím zářením rozebírají Neuwirt a Nečas (1981).

Obr. č. 1 Závislost podílu persistujících jaderných buněk (dle Vodičky et al., 1973)

Závislost podílu persistujících jaderných buněk (N/N_0) v kostní dřeně levé tibie a levého femuru na expozici gama záření (R) 4. (plné čáry, kroužky) a 10. (přerušované čáry, trojúhelníky) den po celotělovém ozáření u krys nechráněných (plné kroužky a trojúhelníky) a chráněných turniketem (prázdné kroužky a trojúhelníky).

Obr. č. 2 Hodnoty letálních dávek neutronů a gama záření u myši

Příklad výpočtu hodnot letálních dávek ($LD_{50/30}$) pomocí probit-logaritmové metody u myších samic (vlevo) a myších samců (vpravo) po celotělovém ozáření neutrony štěpení (NS) v tepelné koloně reaktoru VVR-S, rychlými neutrony (RN) v cyklotronu U-120 a po gama ozáření z ^{60}Co zdroje Chisotronu (Chirana). Je zřejmá nejvyšší relativní biologická účinnost štěpných neutronů, pak rychlých neutronů a nejnižší letální účinek (vysokou hodnotu $LD_{50/30}$) má gama záření (dle Kuny, Navrátila a Singera, 2007). Osa X: dávky v Gy, osa Y: % letality (vlevo) a probity letality (vpravo).

KMENOVÉ BUŇKY KRVETVORBY A RADIAČNÍ POŠKOZENÍ

K posouzení závažnosti radiačního poškození kmenových buněk krvetvorné dřeně kvantitativně zásadně přispěli Till a McCulloch (1961, 1963) objevem tzv. slezinných kolonií u ozářených myši. Metody stanovení endogenních a exogenních slezinných kolonií u ozářených myši umožnily kvantitativně stanovit rozsah postradiačního poškození kmenových buněk krvetvorby (KBK). Principem je mimořádná schopnost myších slezin vytvořit prostředí na dělení a diferenciaci KBK, které podmiňují vznik slezinných kolonií. K vyjádření proliferativní schopnosti KBK zavedli Till a McCulloch jednotku vzniku slezinné kolonie CFU-S (colony forming unit-spleen). Hematopoietické slezinné kolonie u ozářených myši rozdělujeme podle použité originální metodiky na dva druhy: exogenní a endogenní.

Endogenní kolonie vznikají na povrchu sleziny ze zachovalých KBK subletálně ozářených myši a odečítají se po utracení zvířete a fixaci sleziny 8. –9. den po ozáření. Pokles

počtu endogenních slezinných kolonií neboli pokles proliferativní aktivity KBK v závislosti na dávce celotělového ozáření ionizujícím zářením demonstrovali mimo jiné Petýrek (1979), Kalina (1982) a další. Radioprotektivní účinek chemických radioprotektiv prokázala celá řada autorů, např. Tkadleček a Jurášková (1967), Novák et al. (1974), Vacek et al. (1975), Kuna (1981a, 1983a), viz obr. č. 3, kde vedle endogenních kolonií je posouzena erytropoetická aktivita inkorporací radioželeza a intenzita syntézy DNA ve slezině záchytem ^{125}I -ioduridinu. Z výsledku je zřejmé, že způsob aplikace (i.p. nebo i.m.) ochranné dávky cystaminu není výrazně rozdílný.

Exogenní kolonie vznikají po podání letálně ozářeným myším KBK v kostní dřeni od jiných myši (dárce), jejichž KBK chceme vyšetřit. Počet exogenních slezinných kolonií se zjišťuje po vyjmutí sleziny a její fixaci 9.–11. den po transplantaci. Přesné schéma pokusu s ukázkou slezinných kolonií (obr. č. 4–6) přinesl např. Kalina (1982), jejich vlastnosti detailně popsali Neuwirt a Nečas (1981), Vávrová a Petýrek (1998).

Obr. č. 3 Radioprotekce slezinné krvetvorby (dle Kuny, 1981a)

Radioprotection of spleen hemopoiesis by i.m. cystamine ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) against whole body gamma irradiation (8 Gy). The estimation on the 8th day following exposure of mice. On the left: number of endogenous spleen colonies; in the middle: incorporation of ^{59}Fe per 10 mg of dry mass of spleen in %; on the right: uptake of ^{125}IUd per 10 mg of dry mass of spleen in %. White column for controls, black one for cystamine protected mice. Triangle indicates the significant difference from control value

Překlad anglického textu pod obrázkem:

Radioprotekce slezinné krvetvorby podáním cystaminu ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) před celotělovým gama ozáření (8 Gy). Vyšetření 8. den po expozici myši. Vlevo: počet endogenních slezinných kolonií; ve středu: inkorporace ^{59}Fe do 10 mg sušiny sleziny v %; vpravo: záchyt ^{125}IUd v 10 mg sušiny sleziny v %. Bílé sloupky patří kontrolám, šrafované přísluší cystaminem chráněným myším. Trojúhelník označuje signifikantní rozdíl od kontrolní hodnoty.

Obr. č. 4 Schematické znázornění metody exokolomizačního testu (dle Kaliny, 1982)

Obr. č. 5 Slezinové kolonie 9 den po transplantaci buněk kostní dřeně letálně ozářeného příjemce (dle Kaliny, 1982)

Obr. č. 6 Závislost vzniku endogenních kolonií od dávky záření (dle Kaliny, 1982)

Poněvadž šlo o převratnou kvantitativní hematologickou pokusnou metodu a potkan bylo druhé nejčastěji používané zvíře v radiobiologických experimentech, podařilo se po intenzivním výzkumu Vackovi a spolupracovníkům z Biofyzikálního ústavu ČSAV v Brně prokázat možnost využití metody zevních slezinných kolonií u mladých potkanů (Vacek, Raková, Druzhinin, 1975).

Kmenové buňky krvetvorby byly izolovány také ze suspenze buněk myší sleziny s cílem oddělit KBK od imunokompetentních buněk (IKB) vyvolávajících GVH reakci v pokusech Petýrka a Mráze (1972, 1976, 1976a), v nichž použili hodnocení GVH reakce dle zvětšení popliteální uzliny neozařených F1 hybridů po podkožní aplikaci $1.1\text{--}1.2 \cdot 10^6$ ozařených buněk sleziny rodičovské (B 10) linie do pravé zadní tlapky, zatímco do levé zadní tlapky byl aplikován fyziologický roztok. Obě popliteální uzliny byly odebrány 7. den po aplikaci buněk, jejich váhy porovnány vypočítáním indexu zvětšení uzliny. Podrobnosti jsou uvedeny v práci Petýrka a Mráze (1976a).

V sérii našich pokusů na mladých krysách

(4–5 týdnů starých) jsme nejdříve potvrdili ochranu kmenových buněk krvetvorby krys cystaminem, prvně popsany u myši Tkadlečkem a Juráškovou v prestižním časopisu *Nature* v roce 1967. Tento ochranný účinek, hodnocený jak postradiační letalitou, buněčností 10 cm úseku tenkého střeva, tak myelosupresí dle hmotnosti sleziny, endogenních slezinných kolonií, inkorporací ^{59}Fe pro ocenění erytropoézy, byl snížen premedikací atropinem u myši (Kuna et al. 1978) i u mladých krys (Kuna, 1978). U krys byl hodnocen útlum kmenových buněk krvetvorby metodou exogenních slezinných kolonií dle Vacka et al. (1975). Pokusy byly součástí naší analýzy významu parasympatické stimulace v radioprotektivním účinku cystaminu, který v ochranných dávkách vyvolává bradykardii a hypotenzi (Kuna, 1983c, Kuna et al., 1983d).

Na základě rozsáhlé experimentální a preklinické studie prof. P. G. Žerebčenko (1971) byl povolen mexamin (5-methoxytryptamin), také zkracovaný jako 5-MT nebo 5-MOT ke klinickým zkouškám v tehdejší SSSR. Jeho ochranný účinek spočívá v postvazokonstriktorické hypoxii. Pokles krevního průtoku

a parciálního tlaku kyslíku v radiosenzitivních tkáních jsme popsali v pokusech na dospělých kryších (Kuna a Vodička, 1973, Kuna et al., 1983e) po ochranných dávkách 5-MT.

Pro metodu exogenních kolonií u mladých kryš 4–5 týdnů starých jsme dárce, u nichž jsme hodnotili ochranný efekt 5-MT, celotělově gama ozářili dávkou 3,5 Gy přístrojem Chisotron s radiokobaltovým zdrojem ^{60}Co . K nejhlubšímu poklesu CFU krvetvorných tkání dochází v intervalu 1 a 3 dnů po celotělovém ozáření expozicí 300 R (Pugačeva et al., 1973). Proto jsme krysy-dárce v experimentálních skupinách po 20 jedincích vyšetřili 3. den po ozáření. Od každého zvířete jsme odebrali kostní dřeň z obou femurů do vychlazeného Hanksova roztoku. Po stanovení počtu jaderných buněk jsme odebrané dřeňové buňky v počtu $5 \cdot 10^6$ jaderných buněk převedli i.v. injekcí krysám-příjemcům.

K potlačení vlastních CFU buněk u příjemců jsme 2 hodiny před transplantací krysy-příjemce ozářili celotělově dávkou 5–5,5 Gy gama záření. U dárcovských kryš jsme stanovili počty jaderných buněk v kostní dřeni obou femurů 3. den po celotělové dávce 5 Gy; před ozářením jsme aplikovali i.p. nebo i.m. testované radioprotektivní látky, kontrolám jsme aplikovali fyziologický roztok. U kontrolních nechráněných kryš byly hodnoty nejnižší. Krvetvornou aktivitu u kryš-příjemců jsme vyšetřili 11. den po ozáření a transplantaci testované krvetvorné dřeň dárce v konstantním množství jaderných buněk 5×10^6 nitrožilně. 11. den po transplantaci 4 hodiny před utrácením kryš-příjemců jsme jim i.p. podali radioželezo ^{59}Fe k ocenění erytropoetické aktivity. Po dekapitaci jsem odebrali slezinu a oba femury. Slezinu jsme přelili fixačním roztokem na dobu 2 hodin a radioaktivitu změřili v odebraných orgánech v automatickém scintilačním detektoru Gammazint BF 5300. Počet makroskopických viditelných kolonií v průměru větších než 1 mm na parietální ploše sleziny byl zjištěn vizuálně. Výsledky byly statisticky hodnoceny Studentovým t-testem pro nepárové soubory pro $p = 0.05$ a méně v Laboratoři lékařské kybernetiky VLVDÚ JEP v Hradci Králové.

Uvedenou metodou jsme postupně prokázali významnou ochranu kmenových krvetvorných buněk u mladých kryš pomocí radioprotektivních látek cystaminu (Kuna, 1978), 5-

methoxytryptaminu (Kuna, 1982). Podrobnější srovnávací studie vlivu chemických radioprotektivních látek cystaminu, AET, serotoninu (5-hydroxytryptaminu) a mexaminu (5-methoxytryptaminu) na postradiační útlum krvetvorných kmenových buněk u mladých kryš v korelaci s vlivem těchto látek na postradiační přežití (Kuna, 1983) jsme zjistili, že cystamin v dávkách 60, 90 a $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ signifikantně zvyšoval přežití celotělově gama ozářených mladých kryš podle hodnot $\text{LD}_{50/30}$ s odpovídajícími veličinami DRF 1.27, 1.36 a 1.39. Dosis reduction factor = DRF v nejjednodušší podobě vypočítáme poměrem hodnot středně smrtné dávky ionizujícího záření při sledování letality denně do 30. dne po ozáření – $\text{LD}_{50/30}$ u chráněných, případně léčených jedinců děleno hodnotou $\text{LD}_{50/30}$ kontrolních, nechráněných a neléčených zvířat, která je zpravidla nižší, takže hodnota $\text{DRF} \geq 1$ (Roth et al., 1962). Mexamin sice významně chránil kmenové buňky krvetvorby, ale příznivý vliv na přežití letálně ozářených mladých kryš nepotvrdil.

Z toho jsme usoudili, že z příznivého ovlivnění pouze hematopoetických ukazatelů v časném údobí po ozáření (v našich pokusech 3. den po dávce 5 Gy) nelze rozhodnout, zdali ozářený jedinec skutečně přežije, nebo radiační traumě podlehně.

ZÁVĚR

Analýza kvantitativních změn kmenových buněk krvetvorby po ozáření ionizujícím zářením se stala v průběhu desetiletí od svého objevu v roce 1961 u myši (Till a McCulloch) a u kryš v roce 1975 (Vacek, Raková a Druzhinin) jednou z nejvýznamnějších metod v radiobiologickém experimentu. Ke správnému závěru je ovšem nezbytné korelovat tyto výsledky s testy letality do 30.–90. dne po ozáření a probit-logaritmickou metodou vypočítat a srovnat letální dávky ($\text{LD}_{5/30}$, $\text{LD}_{50/30}$ a $\text{LD}_{95/30}$) u jednotlivých experimentálních skupin zvířat, jak je známo z farmakologických studií.

LITERATURA

- BACQ, Z. M., ALEXANDER, P.: *Fundamentals of radiobiology*. Second edition. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press. 1961.
- BARANOV, A., GALE, R. P., GUSKOVA, A.: Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. *N. Engl. J. Med.*, 1987. Vol. 321, s. 205–212.
- BLÁHA, M. et al.: *Podpůrná léčba útlumů krvetvorby*. 1. vyd. Druhá část, Praha: Naše vojsko, 1986. s. 179–380.

- BOND, V.P., FLIEDNER, T.M., ARCHAMBEAU, J.O.: *Mammalian radiation lethality. A disturbance in cellular kinetics*. New York and London: Academic Press, 1965.
- BUTOMO, N.V.: *Transplantacija kostnogo mozga při lučevych poraženijach*. Leningrad: Medicina, 1970. s. 192.
- BUTOMO, N.V. et al.: *Osnovy medicinskoj radiobiologii*. Sankt-Petěrburg: Foliant, 2004. s. 382.
- DIENSTBIER, Z., ARIENT, M. a kol.: *Experimentální radiační syndrom*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1996. s. 304.
- DOSTÁL, M.: Akutní toxické a radioprotektivní účinky cystaminu kombinovaného s AET nebo se serotoninem. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, 1969. Vol. 43, s. 93–185.
- DOSTÁL, M.: The protective effect of cystamine, AET, serotonin and mexamine against fractionated lethal gamma irradiation. In: *Radiation protection and sensitization*. Ed. H. L. Moroson and M. Quintiliani, London: Taylor and Francis, 1970. s. 349–353.
- FILIP, S., MOKRÝ, J., HRUŠKA, I.: *Kmenové buňky. Biologie, medicína, filozofie*. 1. vyd., Praha: Galén, 2006. s. 223.
- FILIP, S., DELEJ, B., KUNA, P.: Radioprotektivní účinky cystaminu u myši lokálně ožiarených v oblasti hlavy. *Biologia*, Bratislava, 1985. Vol. 40, s. 319–326.
- GALE, R.P., BUTURINI, A., BARANOV, A.: Radiation accidents: primum non nocere. *Bone marrow transplantation*, 1993. Vol. 11, s. 421–424.
- HERČÍK, F. et al.: *Radiobiologické metody*. 1. vyd. Praha: Academia, 1966. s. 296.
- HOFER, M., POSPÍŠIL, M.: Clinically available drugs as potential curative means for treatment of radiation-induced myelosuppression. In: *Fundamentals for the Assessment of Risk from Environmental Radiation*. C. Baumstar-Khan et al. (eds.). Kluwer Academic Publisher: The Netherlands 1999. s. 421–426.
- HOFER, M., POSPÍŠIL, M., PIPALOVÁ, I.: Radioprotective properties of flurbiprofen. *Folia biol.* Praha, 1996. Vol. 42, s. 267–269.
- HOFER, M. et al.: Meloxicam, a cyclooxygenase 2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Radiat. Res.*, 2006. Vol. 166, s. 556–560.
- JUCHELKOVÁ, L., HOFER, M., POSPÍŠIL, M., PIPALOVÁ, I.: Radioprotective effect of flurbiprofen and its nitroderivative. *Physiol. Res.*, 1998. Vol. 47, s. 73–80.
- KALINA, I.: *Cytologické a cytogenetické zmeny krvotvorby pri chronickom ožarovaní*. 1. vyd., Bratislava: Veda, 1982. s. 144.
- KUNA, P.: Influence of atropine on cystamine effects in rats: radioprotection of hemopoietic stem cells in vivo. *Radiobiol. Radiother*, Berlin, 1978. Vol. 19, s. 361–364.
- KUNA, P.: Vliv diazepam na účinky cystaminu: Toxicita a radioprotektivní účinnost. *Voj. zdrav. Listy*, 1981. Vol. 50, s. 23–31.
- KUNA, P.: Protection of hemopoietic tissues in whole body gamma irradiated mice by cystamine given intramuscularly. *Radiobiol. Radiother*, Berlin, 1981a. Vol. 22, s. 315–317.
- KUNA, P.: Korelace mezi přežitím a ochranou krvetvorby mexaminem u celotělově gama ozařených mladých krys. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1982. Vol. 90, s. 23–43.
- KUNA, P.: Chemická ochrana kmenových buněk krvetvorby krys před radiačním poškozením. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1983. Vol. 93, s. 75–107.
- KUNA, P.: Radioprotection of small intestine and spleen hemopoiesis by gammaphos (WR-2721) or cystamine in whole body gamma irradiated mice. *Biologia*, Bratislava, 1983a. Vol. 38, s. 273–282.
- KUNA, P.: Význam parasympatické aktivace v radioprotektivním účinku cystaminu. *Voj. zdrav. Listy*, 1983c. Vol. 52, s. 241–249.
- KUNA, P.: *Chemická radioprotekce*. 1. vyd., Praha: Avicenum, 1985. Babákova sbírka č. 72, s. 148.
- KUNA, P.: Ochranný účinek cystaminu a gamafosu při vlivu gama záření a neutronů na savčí organismus. *Doktorská disertační práce*. Hradec Králové: Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně. 1985, s. 318.
- KUNA, P.: *Chimičeskaja radiozaščita*. Moskva: Medicina, 1989. s. 190.
- KUNA, P.: Chemické radioprotektivní látky: Minulost, současnost a budoucnost. *Kontakt*, České Budějovice: JU ZSF 2006. Vol. 8, s. 112–122.
- KUNA, P., NAVRÁTIL, L., SINGER, J.: Amifostine (WR-2721) as a radioprotector for the emergency workers. In: *Current problems of radiation research* (Eds. Grodzinsky, D. and Dmitriev, A.) National Academy of Science of Ukraine, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kyiv, 2007. s. 211–223.
- KUNA, P., PETÝREK, P., DOSTÁL, M.: Influence of atropine on radioprotective and toxic effects of cystamine in mice. *Radiobiol. Radiother*, Berlin, 1978. Vol. 5, s. 593–598.
- KUNA, P., VODIČKA, I.: Blood flow and oxygen tension in the spleen of rats following cystamine, AET, serotonin and mexamine. *Acta biol. med. germ.*, 1973. Vol. 31, s. 893–896.
- KUNA, P., VODIČKA, I., DOSTÁL, M.: Radioprotective and hemodynamic effects of 5-methoxytryptamine following different route of its administration in rats. *Radiobiol. Radiother*, Berlin, 1983. Vol. 24, s. 365–376.
- KUNA, P. et al.: Radioprotective and hemodynamic effects of WR-2721 and cystamine in rats: Time course studies. *Neoplasma*, 1983d. Vol. 30, s. 349–357.
- KUNA, P. et al.: Radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine on radiation damage and its repair in rats whole body irradiated to fission neutrons. *Acta medica*, Hradec Králové, 2004. Vol. 47, s. 19–23.
- KUNA, P. et al.: Acute toxicity and radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine in single whole body fission neutrons irradiated rats. *J. appl. Biomed.*, 2004a. Vol. 2, s. 43–49.
- LAMPROGLOU, I. et al.: Radiation-induced cognitive dysfunction: The protective effect of Ethylol in young rats. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2003. Vol. 57, s. 1109–1115.
- LEGEZA, V.I. et al.: Citokiny kak sredstva ranněj patogenničeskoj terapiji radiacionnyh poraženij. Effektivnosť i mehanizm dejstvija. *Radiac. biologija. Radioekologija*, 2000. Vol. 40, no. 4, s. 420–424.
- MATHÉ, G., JAMMET, H., PENDIC, B.: Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez de humains irradiés a haute dose accidentellement. *Rev. Franciase*

Etudes Clin. Biol., 1959. Vol. 4, s. 226–235.

MAZÁK, J. et al.: *Nemoc z ozáření*. 1. vyd., Praha: Naše vojsko, 1962. s. 164.

MRÁZ, J.: *Pokusná léčba akutní nemoci z ozáření homologů kostní dřeně a antibiotiky*. Habilitační práce. Hradec Králové: Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně, 1964. s. 59.

MRÁZ, J., ŠMÍD, A., MORÁVEK, F.: Pokusná léčba akutní nemoci z ozáření z ozáření u kryš s homologní kostní dřeně. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1963. Vol. 4, s. 9–26.

NEUWIRT, J., NEČAS, E.: *Kmenové buňky a krevní choroby*, 1. vyd., Praha: Avicenum, 1981, s. 224.

NOVÁK, L. et al.: The time course of the radioprotective effect and the formation of endogenous colonies of haemopoietic cells in mouse spleen following the administration of sodium fluoroacetate. *Folia biol.*, Praha, 1974. Vol. 20, s. 277–282.

PETÝREK, P.: Vliv aplikace Superanabolonu Spofa na regeneraci krvetvorby ozářených myší. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1979. Vol. 80, s. 3–21.

PETÝREK, P., MRÁZ, J.: Therapeutic effect in lethally irradiated mice of cell fractions obtained by gradient centrifugation of spleen homogenate in bovine serum albumin. *Folia biol.*, Praha, 1972. Vol. 18, s. 36–41.

PETÝREK, P., MRÁZ, J.: Posouzení účinnosti dělení buněk krvetvorných tkání centrifugací pro získání frakce kmenových buněk krvetvorby. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1976. Vol. 71, s. 67–76.

PETÝREK, P., MRÁZ, J.: Vliv in vitro ozáření na kmenové a imunokompetentní buňky transplantátu a jejich schopnost vyvolat reakci štěpu proti příjemci. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1976a. Vol. 71, s. 77–91.

PETÝREK, P., ŠPELDA, S.: Studium využití chinolonu při prevenci a léčbě septických komplikací radiačního poškození. In: *Sborn. věd. prací VLA JEP*, Hradec Králové, 1994. Vol. 119, s. 3–51.

POSPÍŠIL, J. et al.: *Postirradiation haemorrhagic syndrome*. Acta Univ. Carol. Med. Monographia CXIX, 1987. 189 s.

POSPÍŠIL, M. et al.: N^6 -Cyclopentyladenosine inhibits proliferation of murine haematopoietic progenitor cells in vivo. *Europ. J. Pharmacol.*, 2005. Vol. 507, s. 1–6.

PUGAČEVA, T. N., OVAKIMOV, V. G., JARMONĚNKO, S. P.: Količestvěnnaja ocelka zašity kostnogo mozga myšej při razdělnom i kombinirovannom primeněnniji radioprotěktorov. *Radiobiologija*, 1973. Vol. 13, s. 611–614.

ROTH, J. et al.: *Statistické metody v experimentální medicíně*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1962. s. 589.

TILL, J. E., McCULLOCH, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone-marrow cells. *Radiat. Res.*, 1961. Vol. 14, s. 213–222.

TILL, J. E., McCULLOCH, E. A.: Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating, *Radiat. Res.*, 1963. Vol. 18, s. 96–105.

TKADLEČEK, L., JURÁŠKOVÁ, V.: Kmenové buňky krvetvorby v kostní dřeně myší a jejich ochrana radioprotektivními látkami. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1967. Vol. 26, s. 87–124.

TKADLEČEK, L., JURÁŠKOVÁ, V.: Protective effect of cystamine and AET given at various intervals before irradiation. *Nature*, 1967. Vol. 213, s. 1267–1268.

TRAWIS, E. L., MAO-ZHONG FANG, BASIC, I.: Protection of mouse bone marrow by WR-2721 after fractionated irradiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 1988. Vol. 15, s. 377–382.

VACEK, A. et al.: Role of the route of administration of 5-methoxytryptamine in its protective effects on the haematopoietic stem cells of irradiated mice. *Strahlentherapie*, 1972. Vol. 143, s. 677–685.

VACEK, A. et al.: The role of G-CSF and IL-6 in the granulopoiesis-stimulating activity of murine blood serum induced by perorally administered ultrafiltered pig leukocyte extract, IMUNOR®. *Internat. Immunopharmacol.*, 2007. Vol. 7, s. 656–661.

VACEK, A., BARTONÍČKOVÁ, A., TKADLEČEK, L.: Age dependence of the number of the stem cells in haematopoietic tissue of rats. *Cell Tissue Kinet.*, 1976. Vol. 9, s. 1–8.

VACEK, A., RAKOVÁ, A., DRUZHININ, J. P.: Early changes in the number of haematopoietic stem cells in irradiated young rats. *Folia Biol.*, Praha, 1975. Vol. 21, s. 199–202.

VACEK, A., ŠIKULOVÁ, J., RAKOVÁ, A.: Protective effect of mixture of radioprotector substances (mexamine and cystamine) on the haematopoietic stem cells of mice. *Strahlentherapie*, 1975. Vol. 150, s. 336–343.

VÁVROVÁ, J.: Radioprotektivní efekt Ribomunylu. In: *Sborn. věd. prací VLA JEP*, Hradec Králové, 1994. Vol. 119, s. 53–66.

VÁVROVÁ, J., FILIP, S.: Modulace myší hematopoézy Ribomunylem. In: *Sborn. věd. prací VLA JEP*, Hradec Králové, 1994. Vol. 119, s. 67–87.

VÁVROVÁ, J., PETÝREK, P.: Kmenové buňky krvetvorby versus cytokiny. *Voj. zdrav. Listy*, 1998. Vol. 67, no 5, s. 161–166.

VÁVROVÁ, J., NOUZA, K., DRÁBER, P.: Průběh reakce štěpu proti hostiteli a její ovlivnění thymosinem. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1979. Vol. 80, s. 93–120.

VODIČKA, I. et al.: Ochranný účinek mechanicky vyvolané lokální hypoxie kostní dřeně u celotělově ozářených kryš. In: *Sborn. věd. prací VLVDÚ JEP*, Hradec Králové, 1973. Vol. 66, s. 57–73.

ŽEREBČENKO, P. G.: *Protivolučevyje svojstva indolilal-kilaminov*. Moskva: Atomizdat, 1971, s. 200.

Pavel Kuna
pavel.kuna@tiscali.cz