

снижению ангиогенеза и, как следствие, подавлению формирования макрометастазов. Эти факты свидетельствуют о том, BM-EPs могут иметь важную «инструктивную» функ-

цию в инициации формирования новых сосудов благодаря секреции многочисленных паракринных факторов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bergers G., Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 401–10.
2. Kaplan R., Riba R., Zacharoulis S. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820–7.
3. Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H., Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 1369–75.
4. Townson J., Chambers A. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 1744–50.
5. Holmgren L., O'Reilly M., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.

Nat. Med. 1995; 1: 149–53.

6. Peters B., Diaz L., Polyak K. et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med.* 2005; 11: 261–2.

7. Minami E., Laflamme M., Saffitz J., Murry C. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005; 112: 2951–8.

8. Nolan D., Ciarrocchi A., Mellick A. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007; 21: 1546–58.

9. Ruzinova M., Schoer R., Gerald W. et al. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 2003; 4: 277–89.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Gao D., Nolan D., Mellick A. et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008; 319: 195–8

Количество стволовых гемопоэтических клеток в кровотоке подвержено суточным колебаниям

Одним из наиболее эффективных методов лечения пациентов с заболеваниями системы крови (иммунопатии, лейкозы, лимфомы) является трансплантация клеток костного мозга [1, 2]. Эффективность операции определяется не только HLA-совместимостью клеточного материала, но и успешностью проведения предоперационных мероприятий – миелоабляции. Помимо ликвидации трансформированных клеток крови и освобождения костномозговых ниш от стволовых кроветворных клеток (СКК) реципиента радикальные способы предоперационной подготовки сопровождаются тяжелыми побочными эффектами в виде манифестации оппортунистических инфекций, остеопении, поражения эндокринных желез, печени, нервной и дыхательной систем [3].

С целью предотвращения побочных эффектов разрабатываются новые щадящие способы предтрансплантационных мероприятий. В частности, положительные результаты были получены при системном введении антител против c-kit (CD 117), экспрессирующегося СКК. В результате блокировались c-kit-зависимые процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и адгезии клеток, что вызывало временное высвобождение недифференцированных гемопоэтических клеток из занимаемых костномозговых ниш, нивелируя риск развития опасных побочных реакций [4]. Одновременно детализируются физиологические механизмы миграции недифференцированных гемопоэтических клеток, что создает предпосылки для разработки более совершенных предтрансплантационных методов [5].

В журнале *Nature* S. Mendez-Ferrer с соавт. опубликовали материалы исследования, в которых описали суточные колебания численности СКК в крови и идентифицировали механизмы высвобождения недифференцированных гемопоэтических клеток из костномозговых ниш.

Авторы показали, что максимальное содержание СКК в крови мышей приходится на 5 часов после начала воздействия светового стимула длительностью 12 часов, а самая низкая численность наблюдается через 5 часов

после прекращения его действия. Приняв выявленные циркадианные колебания за стандарт, исследователи показали, что при воздействии только светом в течение 2 недель происходит нарушение ритмичности изменения содержания СКК в крови, а при нахождении животных в темноте на протяжении 2 недель колебания численности имели ритмичный характер, который отличается от стандартного. Следовательно, изменение длительности светового раздражителя влияет на численность СКК в кровотоке.

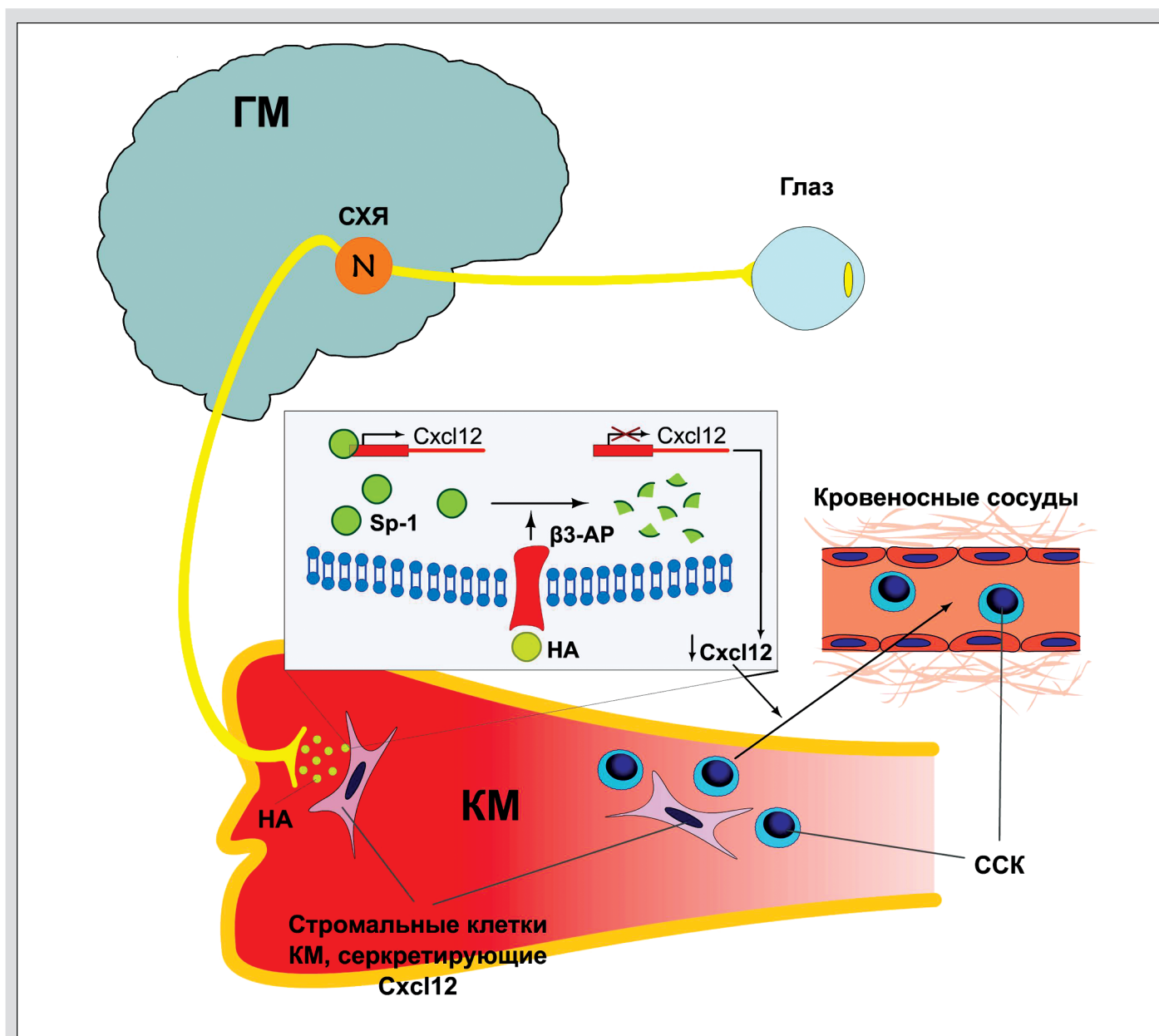
Одним из основных цитокинов, ответственных за миграцию недифференцированных гемопоэтических клеток, является CXCL12 (SDF-1) [6, 7]. Механизм действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), применяющегося в клинической практике для мобилизации СКК в кровоток, реализуется, как считается, через индукцию биодеградации CXCL12 и супрессию синтетической активности остеобластов [8]. Исследователи установили, что протеолизу подвергается лишь та фракция цитокина, которая синтезируется остеобластами, а циркадианным колебаниям подвержен уровень экспрессии мРНК CXCL12 в преостеобластах и ретикулярных клетках.

По аналогии с доказанной зависимостью секреции Г-КСФ от сигналов симпатической нервной системы (СНС) [9] авторы предположили, что продукция CXCL12 также регулируется симпатическим отделом вегетативной нервной системы. Подтверждением послужило отклонение суточного ритма экспрессии CXCL12 при денервации костного мозга как введением 6-гидроксидофамина (системная обратимая дисфункция СНС), так и односторонней резекцией бедренного и седалищного нервов вблизи выхода их из поясничного и крестцового сплетений соответственно. Десимпатизацию костного мозга подтверждали использованием антител против тирозинкиназы, что позволяет визуализировать волокна СНС при нормальном физиологическом состоянии [10]. Аритмичность колебаний секреции CXCL12 коррелировала с отклонением содержания СКК в кровотоке.

Для идентификации типа адренорецепторов, посредством которых реализуется влияние СНС на функционирование элементов костномозгового микроокружения, исследователи применяли селективные и неселективные адреномиметики и антагонисты. Было показано, что секреция CXCL12 изменяется лишь при воздействии на $\beta 3$ -адренорецепторы ($\beta 3$ -ар), которые экспрессируются преостеобластами и фибробластоподобными ретикулярными клетками, определяя незначительную роль зрелых остеобластов, содержащих $\beta 2$ -ар в регуляции циркадианых колебаний уровня СКК в кровотоке. При стимуляции $\beta 3$ -ар снижалась продукция транскрипционного фактора Sp-1 в связи с ингибированием цАМФ-зависимой протеинкиназы, снижалась экспрессия мРНК CXCL12, что ассоциировалось с повышением уровня недифференцированных гемопоэтических клеток в крови. Сходная тенденция наблюдалась при блокаде цАМФ-зависимой протеинкиназы специфическим ингибитором (H-89).

Напротив, блок $\beta 3$ -ар за час до инициации действия светового раздражителя предотвращал утреннее повышение содержания СКК в кровотоке, а применение β -адреномиметиков не влияло на колебание уровня недифференцированных гемопоэтических клеток мышей, лишенных гена *Adrb3*, кодирующего $\beta 3$ -ар.

Авторы показали определяющую роль основных генов «биологических часов» *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* и *Rev-erba* [11], активно экспрессирующихся как нейронами супрахиазмального ядра гипоталамуса, связанными с сетчаткой ретиногипоталамическими трактами, так и в периферических тканях. Однако основное значение в регуляции циркадианых колебаний численности СКК в кровотоке принадлежит именно структурам ЦНС, так как исследователи *in vitro* показали, что даже при отсутствии *Bmal1*, *Per1* или *Per2* в генотипе стромальных клеток при воздействии неселективного β -адреномиметика наблюдалось закономерное снижение экспрессии CXCL12.



Модель регуляции миграции СКК:

ГМ – головной мозг; СХЯ – супрахиазмальное ядро; КМ – костный мозг; $\beta 3$ -АР – $\beta 3$ -адренорецептор, НА – норадреналин

Нейроны супрахиазмального ядра имеют рецепторы к мелатонину – основному гормону эпифиза, регулирующему биоритмы организма [12]. Секреция гормона также подчинена циркадианным колебаниям с максимумом концентрации в крови в ночное время суток [13]. В этой связи, сбалансированная модуляция активности симпатической нервной системы мелатонином через клетки супрахиазмального ядра, контролирующаяся основными генами «биологических часов», определяет ритмичность выделения катехоламинов в костном мозге. В итоге обеспечивается физиологическая циркуляция СКК между костномозговыми нишами и периферическим кровотоком.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Buckley R., Schiff S., Schiff R. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 508–16.
2. Appelbaum F., Herzig G., Ziegler J. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85–95.
3. Wingard J.R., Vogelsang G.B., Deeg H.J. Stem Cell Transplantation: Supportive Care and Long-Term Complications. *Hematology* 2002; 422–44.
4. Czechowicz A., Kraft D., Weissman I. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* 2007; 318: 1296–99.
5. Mendez-Ferrer S., Lucas D., Battista M. et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452: 442–7.
6. Aiuti A., Webb I.J., Bleul C. et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD341 hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD341 progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 111–20.

Таким образом, содержание недифференцированных гемопоэтических клеток в системном кровотоке регулируется в том числе и генами «биологических часов», ритмично индуцирующими секрецию катехоламинов синаптическими окончаниями СНС в костном мозге в корреляции с действием светового раздражителя и функционированием эпифиза (рис.). Данная закономерность может быть использована в выборе времени трансплантации недифференцированных гемопоэтических клеток – при максимальной концентрации СКК в кровотоке, а также в мобилизации СКК из костномозговых ниш путем воздействия на определенные звенья регуляции миграции СКК.

7. Wright D.E., Bowman E. P., Wagers A. J. et al. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 1145–54.
8. Levesque J. P., Hendy J., Takamatsu Y. et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 187–96.
9. Katayama Y., Battista M., Kao W.M. et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem and progenitor cell egress from bone marrow. *Cell* 2006; 124: 407–21.
10. Price J. An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulations. *J. Neurosci.* 1985; 5(8): 2051–9.
11. Levi F., Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47: 593–628.
12. Korf H.W., von Gall C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006; 252: 57–68.
13. Pelham R.W. A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy. *Endocrinology* 1975; 96 (2): 543–6.

Подготовил И.Я. Бозо
По материалам Mendez-Ferrer S., Lucas D., Battista M. et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452: 442–7

Определение иерархии среди мультипотентных гемопоэтических клеток человека

Мультипотентность и способность к долговременному самообновлению являются главными качествами гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Следующей ступенью в иерархии гемопоэтических клеток являются мультипотентные клетки-предшественницы (МПП), которые сохраняют множественный дифференцировочный потенциал, но утрачивают способность к долговременному самообновлению. Иммунофенотипические характеристики, определяющие иерархию среди этих популяций клеток человека, пока еще не были четко определены.

Ранее было показано, что фракции клеток костного мозга и пуповинной крови человека, содержащие ГСК, обогащены Lin⁺CD34⁺CD38[–]CD90⁺ клетками [1, 2]. R. Majeti и соавт. предложили использовать в качестве дополнительного маркера антиген CD45RA, с помощью которого удалось продемонстрировать, что Lin⁺CD34⁺CD38[–] фракция клеток костного мозга и пуповинной крови человека могут быть разделены на три субпопуляции: CD90⁺CD45RA[–], CD90[–]CD45RA[–] и CD90[–]CD45RA⁺ клетки.

Lin⁺CD34⁺CD38[–] клеточные субпопуляции были выделены из образцов пуповинной крови человека с помощью FACS, с чистотой >95%. Методом колониеобразующего теста в среде Methocult, авторы оценили дифференцировочный

потенциал всех трех субпопуляций. CD90⁺CD45RA[–] и CD90[–]CD45RA[–] клетки формировали все типы миелоидных колоний. Из 180 CD90⁺CD45RA⁺ клеток всего 6 образовали колонии, что свидетельствует об ограниченном дифференцировочном потенциале этой популяции. Для оценки способности к пролиферации, одиночные клетки (n=20) из каждой популяции помещались в среду без сыворотки, с добавлением Flt-3, SCF, TPO, IL-3, IL-6 и культивировались в течении 2-х недель, после чего подсчитывалось количество жизнеспособных клеток. CD90⁺CD45RA[–] клетки интенсивно пролиферировали (среднее количество образовавшихся клеток – 345000), CD90[–]CD45RA[–] клетки пролиферировали с меньшей скоростью (среднее количество образовавшихся клеток – 67500), и CD90[–]CD45RA⁺ клетки пролиферировали очень слабо с образованием всего нескольких живых клеток. Эти результаты позволяют предполагать, что CD90[–] субпопуляции клеток являются менее примитивными, по сравнению с CD90⁺ субпопуляциями.

Клетки каждой из популяций помещались в среду без сыворотки, с добавлением цитокинов и после 4-х дней культивирования анализировались на экспрессию CD90 и CD45RA. CD90⁺CD45RA[–] клеточная популяция давала