

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

начало всем трем субпопуляциям, CD90⁺CD45RA⁻ клеточная популяция дифференцировалась в CD90⁺CD45RA⁺, а CD90⁺CD45RA⁺ клетки давали начало только себе подобным. В совокупности эти данные устанавливают иерархию клеток *in vitro*, в которой CD90⁺CD45RA⁻ клетки дают начало CD90⁺CD45RA⁻ клеткам, а те в свою очередь дают начало CD90⁺CD45RA⁺ клеткам.

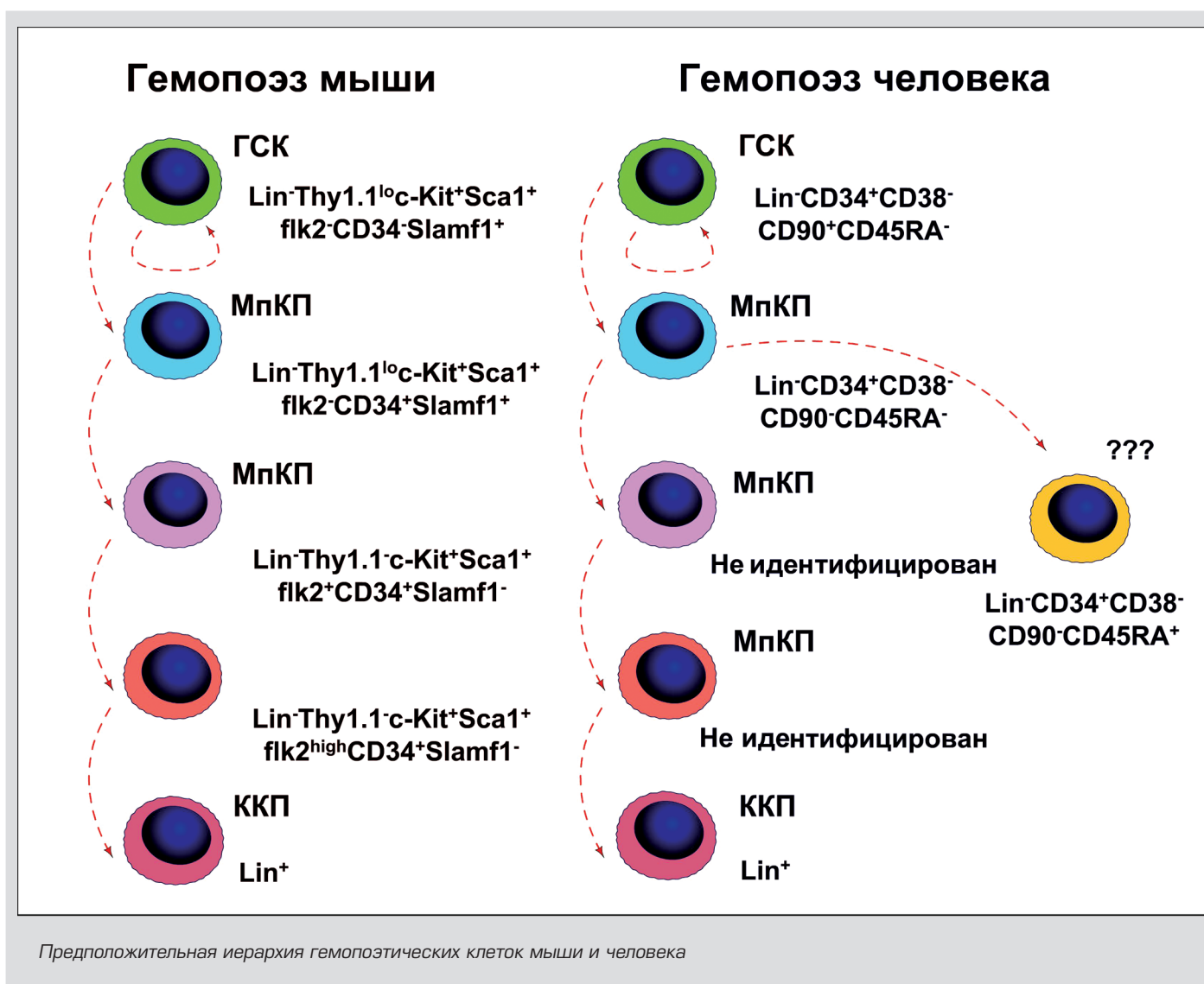
Для экспериментов по трансплантации клеток *in vivo* авторы статьи использовали новорожденных мышей линии NOD/SCID/IL-2Rg null (NOG), предварительно подвергнув их облучению в сублетальных дозах. Трансплантация как CD90⁺CD45RA⁻, так и CD90⁺CD45RA⁺ клеток приводила к тому, что через 12 недель в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей отмечались CD45⁺ человеческие миелоидные и В-лимфоидные клетки. В пересчете на 100 трансплантированных клеток, у животных, которым были пересажены CD90⁺CD45RA⁻ клетки наблюдался в несколько раз более высокий уровень химеризма (в 7–9 раз) и обнаруживалось больше человеческих миелоидных клеток (также в 7–9 раз), чем у мышей, которым были пересажены CD90⁺CD45RA⁺ клетки.

При трансплантации CD90⁺CD45RA⁺ клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке животных не

отмечалось человеческих клеток даже на сроке 4-х недель после трансплантации.

Для установления иерархических взаимоотношений между исследуемыми популяциями *in vivo*, анализировали иммунофенотип человеческих Lin⁺CD34⁺CD38⁻ клеток в костном мозге привитых мышей. Все три субпопуляции были обнаружены у мышей привитых CD90⁺CD45RA⁻ клетками, только две CD90⁺ субпопуляции обнаруживались у мышей привитых CD90⁺CD45RA⁺ клетками. Таким образом, среди Lin⁺CD34⁺CD38⁻ клеток можно установить дифференцировочную иерархию *in vivo*, на верхней ступени которой находятся CD90⁺CD45RA⁻ клетки, далее следуют CD90⁺CD45RA⁺ клетки, и наконец, CD90⁺CD45RA⁺ клетки (рис.).

Способность к долговременному самообновлению является ключевой характеристикой отличающей ГСК от МПКП и определяется как способность к вторичной трансплантации. Исследователи протестировали способность CD90⁺CD45RA⁻ и CD90⁺CD45RA⁺ клеток к трансплантации вторичным реципиентам. Человеческие CD45⁺ клетки были отмечены у 100% (12 из 12) мышей, которым были пересажены клетки от CD90⁺ первичных реципиентов и только у 37,5% (3 из 8) мышей, которым были пересажены клетки от CD90⁺ первичных реципиентов.



R. Majeti и соавт. продемонстрировали, что популяция CD90⁺CD45RA⁻ клеток пуповинной крови является мультипотентной, обладает ограниченной способностью к самообновлению и в гематопозитической иерархии находится на ступень ниже CD90⁺CD45RA⁻ клеточной популяции. По мнению авторов, CD90⁺CD45RA⁻ клетки представляют фракцию мультипотентных клеток-предшественниц в гемопоэзе человека.

В данном исследовании впервые был применен подход с использованием набора маркеров Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻ и новорожденных NOG мышей, что позволило выделить фракцию клеток с ГСК активностью в гораздо меньшем числе клеток, чем в предыдущих работах.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kondo M., Wagers A., Manz M. et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. Annu. Rev. Immunol. 2003; 21: 759–806.
2. Ishikawa F., Yasukawa M., Lyons B. et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood 2005; 106: 1565–73.

Выделение новой фракции мультипотентных клеток предшественников может иметь большое значение для изучения и терапии острого миелобластного лейкоза. В серии экспериментов по ксенотрансплантации было показано, что стволовые клетки лейкоза (СКЛ) локализованы в Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺ фракции лейкозных клеток [3, 4]. Исследователи предполагают, что выделенная в данной работе фракция мультипотентных клеток-предшественников является теми самыми клетками, которые могут давать начало СКЛ. R. Majeti и соавт. надеются выявить генетические или эпигенетические изменения, которые ведут к трансформации МПП в способные к долговременному самообновлению СКЛ.

3. Blair A., Hogge D., Ailles E., Lansdorp P., Sutherland H. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. Blood 1997; 89: 3104–12.

4. Miyamoto T., Weissman I., Akashi K. AML1/ETO expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 7521–6.

Подготовила А.Д. Краснодембская

По материалам: Majeti R, Park C., Weissman I. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors. Cell Stem Cell 2007; 1: 635–45

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Эффективность дендритноклеточных вакцин на основе дендритных клеток I типа: результаты клинических исследований

Противоопухолевая вакциноterapia – это лечебный и профилактический метод активной специфической иммунотерапии, основанный на использовании опухолевых антигенов как с адъювантом, так и без него для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Особенностью действия противоопухолевых вакцин является индукция иммунного ответа, направленного на элиминацию иммунорезистентных опухолевых клеток. Противоопухолевый эффект достигается повторным введением антигенного материала в режиме вакцинотерапии [1].

Несмотря на то, что применение вакцин в терапии онкологических заболеваний в настоящий момент находится на стадии клинических испытаний, этот подход считается весьма перспективным. Дендритные клетки (ДК), как ключевое звено регуляции иммунных реакций, опосредованных Т-лимфоцитами [2], привлекают большой интерес в качестве возможных адъювантов для иммунной терапии различных заболеваний. В настоящее время результаты клинических исследований дендритноклеточных вакцин в терапии неоплазий были получены несколькими независимыми клиническими центрами. В большинстве проведенных тестов *in vivo* и *in vitro* было показано, что подобные вакцины стимулируют развитие

противоопухолевого иммунного ответа и не имеют тяжелых побочных эффектов [1, 3–5]. Однако до настоящего времени исследования были направлены на определение переносимости и токсичности вакцин, но не их эффективности.

Важным вопросом в разработке дендритноклеточных вакцин является вопрос о том, какие именно дендритные клетки следует использовать в качестве основы вакцины, а именно: зрелые или незрелые ДК. Использование зрелых ДК, как предполагают некоторые исследователи [6], более предпочтительно, так как они с меньшей вероятностью способны вызывать состояние толерантности к антигену. Незрелые дендритные клетки присутствуют в тканях организма, постоянно фагоцитируя антигены, находящиеся во внеклеточном матриксе [7, 8]. Связывание бактериальных продуктов с паттерн-распознающими рецепторами ДК [9], связывание рецептора CD40 на мембране ДК с его лигандом CD154 [10] на мембране Т-лимфоцита и IFN-γ [11] запускают процесс созревания дендритных клеток. В зависимости от природы антигена и, соответственно, от пути стимуляции незрелые ДК дифференцируются в ДК первого либо второго типа (ДК1 и ДК2 соответственно), которые мигрируют в регионарные лимфатические узлы [12].