Клин. онкогематол. 2014; 7(4): 501–510
ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ
ОБЗОРЫ

Klin. Onkogematol. 2014; 7(4): 501–510
ONCO clinical HEMATOLOGY
REVIEWS

Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток

Н.Ю. Семенова, С.С. Бессмельцев, В.И. Ругаль

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ, 2-я Советская ул., д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

РЕФЕРАТ

В статье представлены современные данные о роли стромальной ниши костного мозга в регуляции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Отражены этапы формирования концепции гемопоэтической ниши. Дана характеристика стромальных клеточных элементов, образующих ее, и освещены механизмы регуляции ГСК. Обсуждаются вопросы роли ниши в лейкозной трансформации ГСК. Представлены сведения о ее структурных изменениях при нарушении развития ГСК.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, костный мозг, ниша гемопоэтических стволовых клеток, микроокружение.

Принято в печать: 1 сентября 2014 г.

Для переписки: С.С. Бессмельцев, д-р мед. наук, профессор, 2-я Советская ул., д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; тел.: +7(812)717-67-80; e-mail: bsshem@hotmail.com

Для цитирования: Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток. Клин. онкогематол. 2014; 7(4): 501–510.

Biology of Hematopoietic Stem Cell Niche

N.Yu. Semenova, S.S. Bessmel'tsev, V.I. Rugal'

Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology under the Federal Medico-Biological Agency, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

ABSTRACT

The article presents up-to-date data on the role of bone marrow stromal niche in hematopoietic stem cells regulation (HSC). It describes stages of development of the hematopoietic niche concept. Characteristics of stromal cellular elements which form the niche are presented. Mechanisms of HSC regulation by the stromal niche are reported. The role of the niche in HSC leukemic transformation is discussed. It also presents data on structural changes in the niche in case of HSC development disorder.

Keywords: hematopoietic stem cell, bone marrow, hematopoietic stem cell niche, microenvironment.

Accepted: September 1, 2014

For correspondence: S.S. Bessmel'tsev, MD, PhD, DSci, Professor, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; Tel: +7(812)717-67-80; e-mail: bsshem@hotmail.com

For citation: Semenova N.Yu., Bessmel'tsev S.S., Rugal' V.I. Biology of Hematopoietic Stem Cell Niche. *Klin. Onkogematol.* 2014; 7(4): 501–510 (In Russ.).

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ НИШИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В конце прошлого столетия была сформулирована новая концепция относительно поведения и роли стволовых клеток взрослого организма в поддержании функциональных свойств быстро обновляющихся тканей: кроветворной, эпителия кишечника, эпидермиса и иных с менее интенсивной способностью к самообновлению. Основным положением указанной концепции был тезис о том, что длительное самоподдержание стволовых клеток и реализация генетической программы дифференцировки возможны только при условии их пребывания в специфическом микроокружении, которое формирует для них особую нишу. Примечательно, что впервые идея ниши была обозначена относительно гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в 1978 г. P. Schofield [1]. Ниша является не просто локальным местопребыванием ГСК, а имеет структурно-анатомические и функциональные характеристики. Вне ниши ГСК не способны выполнять свои ключевые функции. Так, ГСК могут циркулировать в кровеносном русле и, находясь практически в любых

тканях и органах, не функционируют тем не менее в качестве стволовых клеток. Хоминг, означающий способность мигрировать в свою нишу для получения соответствующих сигналов, — одно из основных свойств ГСК [2].

Следует отметить, что результаты большинства экспериментальных исследований гемопоэза на моделях животных были перенесены на гемопоэз человека. Тем не менее существуют некоторые различия в регуляции гемопоэза у человека и грызунов, особенно анатомическое расположение гемопоэза в течение жизни. У человека селезенка не обеспечивает гемопоэз после рождения, хотя экстрамедуллярный селезеночный гемопоэз может возникать в период гемопоэтического стресса [3]. В отличие от человека, селезенка грызунов гемопоэтически активна на всем протяжении жизни, более того, во всех костях грызунов происходит гемопоэз и длинные кости (особенно бедренная и большеберцовая) являются главными местами изучения гемопоэза [4]. В противоположность этому гемопоэз в длинных трубчатых костях человека, за исключением их проксимальных отделов, прекращается в возрасте 5–7 лет. В длинных трубчатых костях красный костный мозг замещается на гемопоэтически неактивную жировую ткань [5, 6]. У взрослых главные зоны гемопоэза — подвздошная кость и кости аксиального скелета (череп, грудина, ребра и позвонки) [6].

В организме человека ежедневно продуцируется и одновременно погибает 500 млрд клеток крови. Это ставит систему гемопоэза на 1-е место среди всех тканей и органов по темпам клеточного самообновления. В таких условиях для поддержания клеточного баланса требуется, прежде всего, определенное количество стволовых клеток с закрепленной генетической программой их развития в кроветворном направлении, а также наличие эпигенетических механизмов, регулирующих реализацию пролиферативного и дифференцировочного потенциала ГСК. У взрослых гемопоэз в нормальных условиях ограничивается костной тканью. В ней локальные регуляторные механизмы развития ГСК определяются гемопоэзиндуцирующим микроокружением, в котором ключевая «обучающая» роль принадлежит стромальным клеткам костного мозга (КМ). Ранее было показано, что помимо опорной функции, которую выполняет строма для костномозговой паренхимы, стромальные элементы ответственны за миграцию, сортировку, репликацию, пролиферацию и дифференцировку клеток КМ. Кроме того, стромальные клетки способны восстанавливать исходное микроокружение при повреждении органов, содержащих ретикулярную строму. Во всех случаях сначала восстанавливается строма, а затем происходит ее репопуляция кроветворными клетками. Стромальное микроокружение выполняет опорные функции и с помощью гуморальных факторов влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток КМ. Таким образом, между паренхимой КМ и элементами стромы, создающей микроокружение, существует тесная взаимосвязь [2, 7, 8].

Исследования, выполненные в лаборатории J.J. Trentin 40 лет назад, показали, что стромальные клетки играют активную роль в регуляции дифференцировки ГСК во все типы линий клеток крови. J.J. Trentin предположил, что это индуктивное воздействие, включающее взаимодействие стромальных клеток и ГСК. В связи с этим гемопоэтическая строма была названа гемопоэзиндуцирующим микроокружением (hematopoietic inductive microenvironment — HIM) [9, 10]. Первое подтверждение, что существуют различные HIM в разных гемопоэтических органах, было получено при исследовании, в котором имплантировали строму КМ (главное место гранулопоэза) в селезенку (поддержание эритропоэза) [10].

В этом эксперименте облученным мышам-реципиентам были введены клетки КМ для восстановления предшественниц ГСК. Через 18–24 ч после декапитации ткань КМ имплантировали в селезенки облученных вторичных реципиентов. Ткань селезенки выделили через 7 дней после трансплантации и ее участки визуализировали под световым микроскопом. Имплантированную строму КМ легко дифференцировать от стромы селезенки по различиям в соединительной ткани и по присутствию костных балок [10]. Интересно, что типы колоний, выявленных в участках селезеночной ткани, были зависимы от стромального микроокружения, в котором они развивались. Внутри стромы КМ колонии были преимущественно гранулоцитарные по своей природе, в то время как в строме селезенки — главным образом эритроидные, а в колониях, перекрывающих границы стром двух типов, линии были перемешаны. Этот эксперимент подтвердил тот факт, что строма различных органов индуцирует дифференцировку специфических линий клеток крови из гемопоэтических клеток-предшественниц, и с этого времени она получила название HIM [9, 10]. Были идентифицированы различные HIM [11, 12].

В 1978 г. R. Schofield, основываясь на наблюдениях коллег, предположил, что помимо микроокружения, которое индуцирует дифференцировку, также существует специфическая гемопоэтическая ниша стволовых клеток, которая фиксирует их на месте, предотвращает созревание, позволяя стволовым клеткам пролиферировать и поддерживать их свойства. Как только потомки ГСК покидают нишу, они дифференцируются [1]. Эти предположения были основаны на наблюдениях, что ГСК должны находиться в КМ, чтобы сохранять «бесконечный» пролиферативный потенциал. В то же время ГСК, которые располагались в селезенке и формировали колонии, были более ограничены в своей возможности поддерживать гемопоэз [1]. В течение последующих 25 лет исследования микроокружения КМ были главным образом основаны на микроскопических исследованиях или *ex vivo* культивируемых системах, особенно на долгоживущих КМ культурах, которые способны поддерживать гемопоэз в течение длительного времени [8, 13, 14]. В этих исследованиях КМ стромальные клетки были охарактеризованы как фибробласты, ретикулярные клетки, эндотелиальные клетки, адипоциты и остеобласты. Изучение стромы в момент активного гемопоэза в длительной культуре КМ показало, что в строме существуют дискретные участки микроокружения, в которых клетки дифференцируются по определенным линиям [15].

Однако точные отличительные черты клеточных типов, составляющих нишу ГСК, оставались неизвестными. В 2003 г. в двух экспериментах, проведенных на мышиных моделях, было показано, что формирующий кость остеобласт способен влиять на размер пула ГСК *in vivo*. Это означало, что остеобласт является важным компонентом ниши ГСК [16, 17]. В 2005 г. в других исследованиях была показана важная роль эндотелиальных клеток синусоидов КМ, что позволило предположить, что они также являются нишей для ГСК [18].

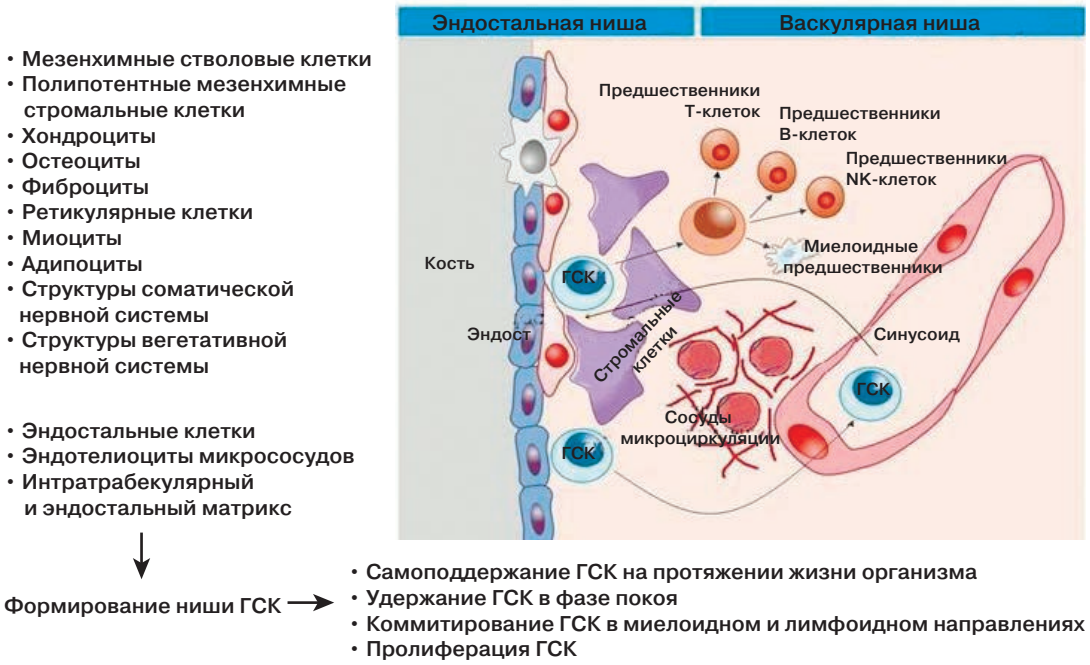

Рис. 1. Стромальное микроокружение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга. Схематическое изображение эндостальной и васкулярной ниш в костном мозге (http://raysports.com.br/site/wp-admin/css/hematopoietic-stem-cells-niche; с изменениями)

СТРОЕНИЕ НИШИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

По мере накопления знаний об «инструктивной» роли микроокружения в обеспечении жизнедеятельности ГСК и понимании того факта, что его функциональный потенциал обеспечивается тесным взаимодействием многих элементов стромы КМ, становилось очевидным, что роль отдельных ее образований, непосредственно влияющих на ГСК, неравнозначна. В последнее десятилетие экспериментальные исследования структуры и функций микроокружения ГСК позволили выделить из широкого спектра формирующих его элементов конкретные костномозговые стромальные образования, которые непосредственно контролируют жизнедеятельность ГСК, определяют их локализацию и запускают генетически детерминированную программу пролиферации и дифференцировки родоначальных клеток гемопоэза (рис. 1).

Понимание роли гемопоэтической ниши значительно возросло за последние несколько лет, что, по крайней мере частично, связано с развитием новых методов клеточных исследований.

В формировании ниши принимают участие многие типы клеток, включая остеобласты, клетки эндотелия, экспрессирующие CXCL12, ретикулярные клетки (CAR-клетки), полипотентные мезенхимные стромальные клетки (ПМСК), симпатические нервные волокна. В нише ГСК могут находиться в состоянии покоя, а могут активно пролиферировать. В настоящее время выделяют две ниши — эндостальную и васкулярную. Не исключено, что в ближайшем будущем появятся сведения о новых нишах [19].

Васкулярная ниша образована главным образом CAR-клетками, ПМСК и эндотелиоцитами синусоидов. ГСК в составе этих ниш, как правило, активно пролиферируют. Компонентами эндостальных ниш являются выстилающие кость клетки (эндост) и ПМСК. ГСК в эндостальных нишах обычно находятся в состоянии покоя. Определенные межклеточные взаимодействия и молекулярные механизмы, которые обусловливают статус клеточного цикла ГСК в разных костномозговых нишах, до сих пор остаются не до конца уточненными [19]. Мы рассмотрим некоторые из этих вопросов ниже.

Основные клеточные нишеобразующие элементы

Остеобласты

У взрослых гемопоэз поддерживается в костном мозге. Костная ткань постоянно претерпевает процесс ремоделирования через тесные связи между формированием кости из остеобластов и резорбцией ее остеокластами [20]. Остеобласты обычно располагаются вдоль эндоста между костью, КМ и периостом, который составляет внутренние и наружные поверхности кости соответственно. Главные функции остеобластов в ремоделировании кости заключаются в секреции неминерализованных белков матрикса (собирательно названных остеоидом) и клеток остеобластной линии, регулирующих дифференцировку остеокластов [20, 21]. В двух одновременно опубликованных исследованиях установлено, что остеобласты играют активную роль как часть регулирующего микроокружения ГСК [16, 17]. В одном исследовании, проведенном на мышах, был удален рецептор костного морфогенетического белка кости 1A (BMPR1A) [17]. Результатом этого стало эктопическое образование трабекулярной костеобразной области (trabecular bone-like area — TBLA) и значительное увеличение количества остеобластов N-кадгерин+ (SNO-клетки) в TBLA. Увеличение TBLA коррелировало с повышением числа ГСК (которые определялись по функциональным и фенотипическим свойствам), и было обнаружено, что ГСК прикреплялись к SNO-клеткам в ассоциации с N-кадгерином [17].

В противоположность этому L.M. Calvi и соавт. изучили эффекты конститутивно активированного паратиреоидного гормона/паратиреоид-связанного белкового рецептора (PPR) под контролем остеобласт-специфического

промотора коллагена 2.3kBα1(1) [16]. PPR-трансгенные мыши имели значительное увеличение ГСК одновременно с увеличением площади, занимаемой трабекулярной костью, и повышенным числом трабекулярных остеобластов, которые экспрессировали лиганд Notch Jagged1. ГСК PPR-трансгенных мышей имели более активированный Notch, чем ГСК дикого типа. Более того, контакт между ГСК и Jagged1, экспрессируемыми остеобластами, требовался для мобилизации ГСК, а добавление ингибитора секретазы, который подавляет активацию Notch, к культурам стромальных клеток предотвращало этот эффект [16]. В заключение отметим, что обработка стромальных культур дикого типа паратиреоидным гормоном повторяла фенотипы, которые наблюдались у PPR-трансгенных мышей. Было также показано, что паратиреоидный гормон имеет терапевтический потенциал для мобилизации ГСК и восстановления гемопоэза после трансплантации через регуляцию размера остеобластной ниши ГСК в моделях мыши [16, 22].

Следует отметить, что эти *in vivo* модели были созданы преимущественно на основе предыдущей работы *in vitro*, в которой было отмечено, что остеобласты и остеобластные клеточные линии могут поддерживать гемопоэтические клетки в культуре. Было показано, что остеобласты человека поддерживают ГСК в *ex vivo* культивируемых системах [23–26]. В то время как увеличение количества остеобластов продемонстрировало прирост ГСК, уменьшение количества остеобластов не всегда равным образом коррелировало со снижением числа ГСК. Было показано, что удаление остеобластов ганцикловиром в трансгенных по тимидинкиназе мышах, экспрессируемой остеобластами, вызывает угнетение костномозгового и усиление экстрамедуллярного гемопоэза [27]. Это сопровождалось сокращением абсолютного числа примитивных гемопоэтических клеток в КМ, селезенке и печени [27]. Тем не менее дисфункция остеобластов у мышей, дефектных по бигликану, не отразилась на изменении количества ГСК в КМ [28]. Следовательно, каждый из специфических типов остеобластов вносит вклад в нишу или остеобласты не требуются для функции ниши и могут быть вытеснены другими типами клеток при условии постепенного снижения их числа. Было показано, что продукты остеобластов служат положительными регуляторами ГСК и включают в себя ангиопоэтин-1, тромбопоэтин и Jagged1, в то время как остеобласт-ассоциированные отрицательные регуляторы ниши ГСК включают остеопонтин и Dikkopf1 [16, 18, 29–36].

Остеобласты обильно экспрессируют хемокин CXCL12, который играет роль в хемотаксисе, хоминге и выживании ГСК, а также в удержании ГСК в КМ [37]. Хотя следует отметить, что другие неостеобластные ретикулярные клетки КМ также экспрессируют высокий уровень CXCL12 и могут играть роль в нише [38, 39]. Несмотря на то что остеобласты способствуют регуляции ГСК в КМ, остается неизвестным, требуется ли их контакт напрямую с ГСК.

Эндотелиальные клетки

Эндотелиальные клетки выстилают все сосуды в организме. В КМ они формируют барьер между гемопоэтическими клетками и кровью, регулируют циркуляцию клеток крови [40–42]. Факты, подтверждающие возможность того, что периваскулярная зона служит регуляторной нишей для стволовых клеток, были получены из 2 исследований. Исследование гемопоэтических клеток животных *in vivo* показало, что они располагаются рядом с особыми субсекциями микроциркуляторного русла КМ, где клетки сохраняются или увеличиваются в количестве за 70-дневный интервал [40]. Эти данные позволяют предположить, что периваскулярная зона служит потенциальной нишей, но изученные гемопоэтические популяции не были достаточно обогащены ГСК. Именно открытие SLAM-антигенов, помечающих ГСК, сделало возможным гистологическую оценку того, где ГСК располагаются в микроокружении КМ [18]. Исследования показали, что большинство ГСК находилось в периваскулярной зоне и только меньшинство (< 16 %) — в периэндостальной. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что периваскулярные участки также являются нишей, но есть несколько неоднозначных моментов. Самое важное это то, что ГСК двигаются внутрь и из кровяного русла. Таким образом, остается формально возможным, что клетки собираются вокруг сосудов, т. к. это важная точка в их движении. Если это так, то это не соответствует критериям ниши.

Кроме того, в трабекулярном регионе, где располагается большинство ГСК, тяжело распознать все микроанатомические связи, основываясь на двухмерных изображениях. Вопрос о том, представляет ли периваскулярная зона истинную нишу в КМ, до сих пор требует экспериментального подтверждения. Хотя возрастные изменения гемопоэза предположительно указывают на то, что периваскулярные участки, скорее всего, служат нишами, и существуют исследования *in vitro*, которые показывают, что эндотелиальные клетки, полученные из различных тканей, могут поддерживать ГСК-системы в культуре [41–43]. В эмбриональном развитии ГСК возникают в желточном мешке, плацента может также служить местом продукции ГСК. Печень плода становится областью, где располагаются ГСК в течение следующего триместра беременности, гемопоэз формируется в КМ несколько позже, во II триместре внутриутробного развития [44–46]. За исключением КМ, все области, где самообновление может быть изолировано в период внутриутробного развития, лишены остеобластов, но содержат эндотелиальные клетки, которые ассоциированы с ГСК [44–46].

ОДНА ИЛИ БОЛЬШЕ НИШ ГСК?

Идентификация двух различных типов клеток как важных компонентов ниши ГСК вызвала ряд вопросов, на которые до сих пор нет ответов. Остеобласты и эндотелиальные клетки входят в состав отдельных ниш или представляют одну нишу ГСК? Ниши для покоящихся и активированных ГСК одинаковые или различаются?

Исследования локализации ГСК в их нише *in vivo* преимущественно основывались на визуализации клеток в гистологических препаратах КМ [17–18, 29]. Эти двухмерные изображения не отражают действительную трехмерную структуру микроокружения КМ. Поэтому такие исследования могут быть лишены правильной анатомической структуры ниши ГСК, которая скорее состоит из различных клеточных типов, чем привязана к одному типу клеток. Очень вероятно, например, что содержащая

остеобласт ниша ГСК находится в тесной связи с эндотелиальными клетками. Доказательством этого служат данные о том, что КМ, включая эндостальную поверхность, сильно васкуляризирован [47, 48]. На самом деле васкуляризация хрящевой пластинки — очень важный процесс в формировании эмбриональной кости посредством эндохондрального окостенения, и уменьшение кровоснабжения значительно сокращает формирование кости [49–51]. Более того, кровоснабжение важно в продолжающемся процессе ремоделирования кости [49]. Следовательно, остеобластная ниша ГСК, возможно, находится по близости к эндотелиальным клеткам, и эти два типа клеток могут совместно формировать трабекулярную нишу ГСК. Однако существуют отдельные участки КМ, в которых эндотелиальные клетки не расположены рядом с остеобластами, в частности в областях, лишенных трабекулярной кости в центральном участке диафиза [47]. Еще предстоит изучить, локализуются ли одновременно эти эндотелиальные клетки также с ГСК или они отличаются от тех, что были идентифицированы как периваскулярная ниша ГСК. Тем не менее в некоторых недавних работах сделано предположение о существовании двух различных ниш ГСК, которые поддерживают неактивные или активированные ГСК.

Некоторые исследователи отмечают, что содержащая остеобласт ниша представляет собой такую, в которой ГСК остаются неактивированными. К настоящему времени было показано, что по крайней мере три молекулы, найденные на поверхности остеобластов (N-кадгерин, ангиопоэтин-1 и тромбопоэтин), регулируют активацию ГСК через взаимодействие с их рецепторами (N-кадгерин, Tie-2 и Mpl соответственно) [17, 29–31, 52, 53]. Более того, результатом остеобласт-специфической экспрессии канонического ингибитора Wnt-пути Dikkopf1 стал выход ГСК из состояния покоя в дополнение к уменьшению потенциала трансплантата ГСК [32]. Эти данные позволяют предположить, что сигнальный путь Wnt в нише важен для поддержания покоя и самообновления ГСК. В периваскулярной нише, наоборот, ГСК находятся в более активированном состоянии. Таким образом, активированные ГСК включают в себя ГСК, находящиеся в митотическом цикле, и те ГСК, которые были подвергнуты стрессу, например, при добавлении химиотерапевтических препаратов (фторурацил, циклофосфамид) или цитокинов [53–56]. До сих пор неясно, может ли такая ниша быть временной для ГСК, представляет ли она собой стабильную нишу для отдельной популяции ГСК или ГСК в периваскулярной нише находились временно, когда их визуализировали.

Также неизвестно, имеют ли все остеобласты и эндотелиальные клетки одинаковый потенциал поддержки ГСК или специализированные остеобласты/эндотелиальные клетки и специфическое размещение остеобластов/эндотелиальных клеток играют разную роль в регуляции ГСК. Например, трабекулярные остеобласты изначально были идентифицированы как часть ниши ГСК, хотя обычно мы ссылаемся на нишу ГСК как на эндостальную поверхность, которая относится как к кортикальной, так и трабекулярной кости [16, 17]. Известно, что кортикальная и трабекулярная кости различаются по своему анатомическому положению, структуре и функциям. Кортикальный участок расположен в диафизе кости, он тонкий и плотный (80–90 % кальцифицированы), и считается, что он выполняет главным образом механические и защитные функции. И наоборот, трабекулярный участок локализуется в метафизе кости, он менее плотный (15–25 % кальцифицированы) и выполняет в большинстве своем метаболическую функцию [57]. Еще предстоит определить, имеют или нет остеобласты при различных анатомических локализациях разную роль в отношении регулирования ГСК. Подобным образом эндотелиальные клетки — это специализированные клетки, которые имеют разные функции в различных тканях и органах. Кроме того, существуют различия в свойствах и функциях эндотелиальных клеток, полученных из разного размера кровеносных сосудов, артерий и капилляров [58].

Более того, было показано, что ГСК привязаны к специфическим микродоменам, экспрессирующим CXCL12 в кровеносных сосудах КМ, а это позволяет предположить, что специфические участки эндотелиальных клеток могут функционировать как периваскулярная ниша ГСК [40].

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ НИШ

Регуляция гемопоэза — сложный многоступенчатый процесс, обеспечиваемый стромальными факторами, которые продуцируются непосредственно клеточным микроокружением, а также гормонами, витаминами и гемопоэтическими факторами, вырабатываемыми в других органах (тимус, печень, почки).

Регуляторный эффект стромального микроокружения КМ осуществляется путем прямых контактов стромальных клеток с кроветворными предшественниками, а также посредством нарабатываемых стромой гуморальных факторов стимуляции и ингибирования процессов пролиферации и дифференцировки ГСК. Сложная сеть сигнальных путей регуляции ГСК в настоящее время служит предметом интенсивных исследований.

Первые исследования, описывающие остеобластную нишу ГСК, идентифицировали два регулятора их размера: PPR и BMPR1A [16, 17]. Вероятно, существует намного больше регуляторов ниш ГСК, которые будут открыты в дальнейших исследованиях. Также возможно, что остеобластные и эндотелиальные ниши ГСК играют роль в регуляции друг друга.

В различных исследованиях было показано, что симпатическая нервная система играет важную роль в регуляции ниши ГСК [59–61]. Анатомические исследования выявили, что КМ высоко иннервирован как миелинизированными, так и немиелинизированными нервными волокнами, большинство из которых расположено рядом с артериолами в КМ [62–64]. Результатом хирургического разрыва бедренного нерва было уменьшение клеточности КМ, сопровождающееся значительной мобилизацией клеток-предшественниц [59]. Кроме того, последствием введения мышам нейротоксина 6-гидроксидопамина (результатом которого стала блокада синтеза нейротрансмиттера в адренергических и дофаминергических нервных волокнах) стало уменьшение клеточности КМ [59]. Недавно было показано, что нейротрансмиттер (нейромедиатор) норадреналин контролирует как супрессию остеобластов, так и снижение экспрессии CXCL12 в клетках кости, которая возникает в ответ на введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) [60]. Дополнительные исследования на мышиных моделях выявили, что циклическое высвобождение ГСК и экспрессия CXCL12 в микроокружении КМ регулировались

циркадной секрецией норадреналина посредством симпатической нервной системы [61]. Было также недавно продемонстрировано, что нейротрансмиттеры играют роль в мобилизации, пролиферации и дифференцировке ГСК у человека [65]. Другие типы клеток, которые играют возможную роль в регуляции ниши ГСК, включают хондроциты, адипоциты и CXCL12-богатые ретикулярные клетки [39, 66–68]. Потребуются дальнейшие исследования, чтобы объяснить, как каждый из этих типов клеток вносит свой вклад в нишу ГСК. Гемопоэтические клетки также играют роль в регуляции ниши ГСК. Например, было показано, что моноциты экспрессируют остеопонтин, который значительно сокращает передачу сигнала (сигналинг) Notch1 в ГСК, совместно культивируемых с поддерживающей линией стромальных клеток КМ, экспрессирующих Jagged1 [69, 70]. Кроме того, полученные из моноцитов остеокласты имеют значение в регуляции активности остеобластов и, следовательно, в потенциальном размере остеобластной ниши ГСК, а повышающаяся концентрация Ca^{2+}, высвобождаемых в течение остеобласт-опосредованной резорбции кости, может быть важной для содержащей остеобласт ниши ГСК [20, 35]. Предполагают, что остеокласты индуцируют мобилизацию ГСК из микроокружения КМ [71].

До сих пор неизвестно, есть ли перекрестное взаимодействие между остеобластами и эндотелиальными клетками в нишах ГСК, хотя существует свидетельство того, что эндотелиальные клетки и остеобласты могут обладать свойством взаиморегуляции. Ангиопоэтин-1, который экспрессируется линией остеобластов, взаимодействует с Tie-2, экспрессируемым эндотелиальными клетками, чтобы увеличить ангиогенез и сократить проницаемость сосудов [72, 73]. Точно так же остеобласты секретируют эндотелиальный фактор роста сосудов, который модулирует васкуляризацию и проницаемость эндотелиальных клеток и имеет значение в морфогенезе кости [74, 75]. Кроме того, был ряд сообщений, описывающих, что периваскулярная ниша служит нишей для мезенхимных стволовых клеток (МСК), предшественников остеобластов [76, 77]. До сих пор неясно, имеет ли периваскулярная ниша МСК ту же анатомическую локализацию и функцию, что и периваскулярная ниша ГСК. Определение того, участвуют ли МСК или ниша МСК в изменении ниши ГСК, представляется областью повышенного интереса.

Существуют доказательства того, что взаимодействие между нишей и гемопоэтическими клетками взаимное, однако этот процесс недостаточно изучен. Было выявлено *in vitro* и *in vivo*, что в течение 48 ч после стресса, вызванного острым кровотечением, ГСК секретируют белки BMP-2, BMP-6, направляющие развитие МСК по остеобластной линии [71]. Однако этот ответ проявлялся в меньшей степени у взрослых и страдающих остеопорозом животных. Кроме того, было показано, что мегакариоциты, локализованные вблизи эндоста, стимулируют остеобласты через увеличение содержания BMP-2, BMP-4 и BMP-6. Это доказывает, что гемопоэтические элементы вовлечены в формирование кости и проявляют активность в пределах ниши.

РОЛЬ НИШИ ГСК В ЛЕЙКОЗОГЕНЕЗЕ

Изменения стромальных структур микроокружения, включая нишеобразующие, при злокачественных заболеваниях системы крови достаточно широко освещены в литературе [78–82, 87, 100–103]. При этом в последние годы основной интерес сосредоточен на изучении механизмов, посредством которых дефекты микроокружения КМ приводят к гемопоэтическим нарушениям.

Дефицит ядерных γ-рецепторов ретиноевой кислоты приводит к миелопролиферативному синдрому (МПС) с увеличением количества гранулоцитарных/макрофагальных предшественников и повышением числа гранулоцитов в периферической крови, КМ и селезенке, которое полностью зависит от костномозгового микроокружения. Продемонстрировано, что этот эффект был связан с повышением уровня фактора некроза опухолей-α в измененном микроокружении КМ [67]. Удаление белка ретинобластомы в кроветворной системе привело к МПС и потере ГСК из костномозговой ниши вследствие мобилизации. Однако эти нарушения не являются внутренними свойствами гемопоэтических клеток, а зависят от роли этого белка при взаимодействии между миелоидными клетками и микроокружением КМ [68]. Инактивация Mib1 (сигнальный путь Notch) также приводила к развитию МПС у мышей и смерти в связи с инфильтрацией органов миелоидными клетками. МПС зависит от микроокружения, т. к. трансплантация кроветворных клеток в Mib1-дефицитное микроокружение приводит к миелопролиферации [83]. Кроме того, повторное введение нерегулируемого активного внутриклеточного домена Notch1 у Mib1-нулевых мышей привело к сокращению заболеваний. В то же время миелодиспластический синдром (МДС) с редкими случаями острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) наблюдался у мышей с клетками-предшественницами клеток костной ткани со специфическими нарушениями синтеза Dicer1, белка необходимого для интерференции РНК [84].

Нельзя исключить, что генетические нарушения, обнаруженные в клетках стромы КМ у пациентов с МДС и ОМЛ, могут быть вызваны этими заболеваниями [85]. Становится ясно, что определенные генетические заболевания увеличивают риск развития МДС/ОМЛ. Кроме того, онкогематологические заболевания доноров, как известно, возникают у реципиентов при аллогенной трансплантации ГСК [86].

У 70–80 % больных ОМЛ с помощью химиотерапии можно добиться полной ремиссии, однако у большинства из них развиваются рецидивы. Несмотря на прогресс в лечении, общая 5-летняя выживаемость при ОМЛ составляет всего 50 %, а безрецидивная 4-летняя — 44 %. Хотя в лечении хронического миелолейкоза (ХМЛ) начали использовать иматиниб (ингибитор тирозинкиназы), а в последующем ингибиторы тирозинкиназы второго поколения и гематологическая ремиссия получена у 95 % пациентов, случаи излечения от ХМЛ, включающие молекулярную ремиссию, редки. Кроме того, часто развиваются рецидивы после прекращения терапии иматинибом. Продолжаются усиленные поиски более совершенных методов лечения, в т. ч. нацеленные на нишу КМ, которая считается «убежищем» покоящихся лейкозных стволовых клеток (ЛСК). ЛСК определяются как редкий тип клеток, которые приобрели способность к самообновлению и устойчивость к большинству противоопухолевых средств, в то время как большая часть высокопролиферирующих лейкозных клеток была уничтожена [87].

При *in vivo* конфокальной микроскопии микрососудов в черепе живых мышей были обнаружены пре-

рывистые участки эндотелия с высокой экспрессией E-селектина или SDF-1α, которые определенно влияют на хоминг вводимых опухолевых клеточных линий. Нарушение взаимодействия с SDF-1, например, ингибирует хоминг и в конечном итоге приживление клеток острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) линии NALM-6 в этих сосудах. Это позволяет предположить, что молекулярные различия в сосудах могут быть ответственны за дифференциальное приживление опухолевых клеток в микроокружении КМ [40]. В последующих исследованиях было показано, что увеличение лейкозных клеток в микроокружении КМ повреждает нормальные ГСК в своей нише. Кроме того, это приводит к уменьшению количества предшественников ГСК, их мобилизации посредством снижения секреции фактора стволовых клеток лейкозными, что приводит к «захвату» ниши опухолевыми элементами [87].

Описание взаимодействия лейкозных стволовых клеток с их нишей было представлено в 2 исследованиях, в которых трансмембранный гликопротеид I типа и молекула адгезии CD44 представлены в качестве посредников между инициирующими лейкоз клетками и микроокружением КМ [88, 89]. CD44 широко экспрессируется в гемопоэтических и негемопоэтических тканях, связывается с гиалуроновой кислотой, остеопонтином, E-селектином и участвует в хоминге лимфоцитов, эмбриональном развитии и метастазировании опухоли [90–92]. В первой работе активация антител к CD44 позволила значительно сократить вторичное заселение NOD/SCID-мышей клетками ОМЛ человека, что привело к снижению числа ЛСК у этих животных при вторичной трансплантации. Эти эффекты обусловливают снижение миграции микроокружения КМ в ЛСК-поддерживающие ниши [88].

Во второй статье авторы показали, что CD44 необходим для хоминга и приживления клеток, дающих начало ХМЛ [89]. У мышей реципиентов дикого типа, которым был трансплантирован CD44-дефицитный КМ, преобразованный онкогеном BCR-ABL1, который вызывает развитие ХМЛ, показана лучшая выживаемость. Тем не менее было показано, что инъекции трансплантата от BCR-ABL1+ CD44-дефицитного донора или коэкспрессия CD44 способствовали восстановлению опухолевого клона при ХМЛ. Блокирование антител к CD44 нарушает индукцию ХМЛ у реципиентов, что предполагает важную роль CD44 как поставщика селектиновых лигандов для хоминга и приживления BCR-ABL1+ ЛСК. В аналогичном исследовании те же авторы показали, что дефицит E-селектина в костномозговом эндотелии нарушает приживление BCR-ABL1+ ХМЛ-инициирующих клеток. BCR-ABL1+ ХМЛ-инициирующие клетки, дефектные по P-селектину гликопротеидного лиганда-1 (PSGL-1) или по селектину лигандсинтезирующих ферментов β1-2,6-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы или фукозилтрансферазы IV/VII, вызывали нарушение приживления, а уничтожение селектина нейраминидазой полностью блокировало приживление лейкозных клеток. Эти результаты показывают, что хоминг и приживление BCR-ABL1+ ЛСК зависят в большей степени от селектинов и их лигандов, в т. ч. CD44 [93]. В другом исследовании показано, что нейтрализация антител к α-цепи рецептора интерлейкина-3 (CD123 клон 7G3) нарушает хоминг и приживление ЛСК ОМЛ у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, не связанным с диабетическим ожирением (NOD/SCID), и увеличивает выживание [94].

Многие публикации последних нескольких лет сосредоточены на защитных эффектах компонентов микроокружения КМ в поддержании жизнедеятельности лейкозных клеток. Микроокружение КМ, как полагают, обеспечивает «убежище» лейкозным клеткам во время химиотерапии, терапии ингибиторами тирозинкиназы или во время реакции «трансплантат против лейкоза» после аллогенной трансплантации ГСК. Считается, что микроокружение КМ содержит минимальную остаточную болезнь и обеспечивает сигналы выживания для лейкозных клеток. Это подтверждает тот факт, что уровень транскриптов гена *WT1*, хорошо известного маркера минимальной остаточной болезни при лейкозе, выше в КМ, чем в периферической крови у пациентов с ОМЛ и ОЛЛ [95]. С помощью ксенотрансплантационных анализов клеток ОМЛ человека у NOD/SCID-мышей авторы показали, что клетки ОМЛ возвращаются в богатые остеобластами области КМ, где они становятся неактивными и защищенными от апоптоза, индуцированного химиотерапией [96]. В последующих исследованиях авторы описывают, что принуждение ЛСК ОМЛ к входу в клеточный цикл путем введения Г-КСФ делает их более чувствительными к апоптозу, индуцированному цитостатиками, и приводит к устранению ЛСК и увеличению выживаемости у вторичных реципиентов [97]. Показатели полной ремиссии выше у больных ОМЛ, получающих химиотерапию и Г-КСФ в комбинированной схеме лечения, по сравнению с пациентами, получающими только химиотерапию. Это может быть связано с дифференцировкой некоторых клеток ОМЛ, расширением функций нейтрофилов или с отменой защитных воздействий стромы на ЛСК [98].

Некоторые специфические для лейкозных клеток факторы способствуют их привлечению к нише. Избыточная экспрессия β-интегринов, в основном VLA-4, при лейкозах повышает адгезию к фибронектину в микроокружении КМ. Это способствует устойчивости к терапии и сохранению минимальной остаточной болезни, а также коррелирует с чувствительностью к химиотерапии через сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt/Bcl-2. При совместном применении цитарабина с блокирующим антителом к VLA-4 была достигнута 100%-я выживаемость мышей с минимальной остаточной болезнью, что показывает важность адгезии через интегрины для выживания лейкозных клеток. Кроме того, блокада VLA-4 натализумабом уменьшает адгезию лимфоидных B-клеток к стромальному фибронектину и преодолевает сопротивление анти-B-клеточных антител к ритуксимабу [99, 100].

Показано, что CXCR4, рецептор CXCL12 (SDF-1α), может избыточно экспрессироваться клетками при острых лейкозах и ХМЛ и служит предвестником плохого клинического прогноза за счет увеличения адгезии лейкозных клеток к строме, которая может обеспечить их антиапоптотическими сигналами. В случае ХМЛ было установлено, что этот механизм обеспечивает защиту клеток от гибели при применении ингибитора тирозинкиназы иматиниба через сокращение активации каспазы-3 и модуляцию антиапоптотического белка Bcl-XL [101]. Блокирование взаимодействия клеток ХМЛ с клеточными элементами стромы с помощью CXCR4-антагониста в сочетании с ингибитором тирозинкиназы второго поколения нилотинибом приводило к снижению адгезии *in vitro* и к значительному снижению тяжести течения лейкоза *in*

vivo на модели ХМЛ у мышей по сравнению с лечением только нилотинибом [102].

Микроокружение КМ также способствует выживанию нормальных и опухолевых ГСК с помощью секреции растворимых факторов во внеклеточный матрикс, хотя строма сама по себе может быть нарушенной, в частности, при гематологических опухолях (например, ХМЛ) [103]. Тип и концентрация выделяемых факторов, однако, могут отличаться в различных субдоменах микроокружения КМ. В экспериментах *in vitro* с BCR-ABL1+ K562-клетками, полученных из стромы кондиционированных сред, была вызвана устойчивость к иматинибу через Stat3-зависимый механизм, в то время как нокаут по Stat3 снимает устойчивость к иматинибу [104]. Одним из факторов, определенных в качестве посредника для выживания лейкозных клеток или для защиты от индуцированного лекарствами апоптоза, в случае Т-клеточного ОЛЛ является продуцируемый стромой КМ интерлейкин-7 [105]. Кроме того, экспрессия галектина-3 (Gal-3) индуцировалась в линии клеток ХМЛ при совместном культивировании со стромальной клеточной линией HS-5. Вынужденная экспрессия Gal-3 приводила к увеличению пролиферации клеток ХМЛ и повышенной устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы. *In vivo* гиперэкспрессия Gal-3 увеличивала поступление клеток ХМЛ в КМ. Предполагается, что Gal-3 может быть целью для уменьшения связи клеток ХМЛ со стромальными клетками КМ [106].

Важность сигналов окружения для локализации и дифференцировки лейкозных предшественников также была установлена. Было показано, что локализация и количество клеток, инициирующих ОМЛ, связанных с экспрессией онкогена MLL-AF9, не зависят от экспрессии остеобластами Wnt-ингибитора Dikkopf1 и от Wnt-сигналинга микроокружения. Число здоровых ГСК, напротив, снижается в таких условиях. Кроме того, экспрессия MLL-AF9 в CD34+ клетках-предшественницах из пуповинной крови человека может привести к лимфоидному, миелоидному или бифенотипическому лейкозу. Это зависит от факторов роста или штамма реципиента у мышей, что подтверждает важность сигналов микроокружения для лейкозной дифференциации [107, 108].

Ориентация на нишу ЛСК в сочетании с традиционными методами лечения, направленными на ЛСК, сама по себе может представлять новую парадигму для лечения некоторых видов злокачественных опухолей [109]. Во-первых, подходы, нацеленные на сигнальные пути, такие как Wnt или Notch, либо цитокин-опосредованные, например блокирование рецепторов интерлейкина-3 (CD123), известного маркера ЛСК, приобретают все большую значимость [110, 111]. Во-вторых, стратегия блокирования сигналов выживания, посылаемых стромальными клетками, представляется еще одной возможностью в поиске новых подходов к лечению. В настоящее время проверяется, может ли повышение паратиреоидного гормона в мышиных моделях подавить ХМЛ-инициирующие клетки и повысить выживаемость мышей. Некоторые полученные недавно данные указывают на то, что усиление обмена веществ в кости может непосредственно подавлять ХМЛ, и выдвигается гипотеза, что кости могут быть мишенью при лечении лейкоза [112]. В-третьих, было показано, что молекулы адгезии, такие как CD44 или интегрины, могут быть мишенью, воздействие на которую может нарушить взаимодействие ЛСК с ее нишей или уменьшить адгезию фибронектина в микроокружении КМ [88–90]. Кроме того, стратегии мобилизации ЛСК из ниш, защищающих от химиопрепаратов, например, с помощью Г-КСФ или AMD3100 были успешны, по крайней мере частично [37, 102]. И наконец, можно предположить, что мишенью для лечения может быть гипоксическая среда в костномозговых нишах ЛСК. При этом ингибиторы ангиогенеза могут снизить выживаемость нестволовых лейкозных клеток в микроокружении КМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остается много открытых вопросов о роли микроокружения КМ как у здоровых лиц, так и у пациентов со злокачественными опухолями. Кроме того, необходимо понять, насколько данные, полученные в исследованиях на моделях грызунов, можно переносить на ниши ГСК в организме человека. Тем не менее многие открытия изначально сделаны в исследованиях на мышах. Есть предположение, что ниши ГСК у грызунов по своей биологии сходны с таковыми у человека и, возможно, знания, полученные в исследованиях на мышах, представляют ценность и могут быть перенесены в клинику. Однако это требует проверки.

В исследованиях нормальной ниши ГСК усилия специалистов в настоящее время сосредоточены на секретируемых или мембраносвязанных цитокинах, рецепторах адгезии, широком спектре факторов связывания внеклеточного матрикса, которые играют роль в гомеостазе ГСК. Динамические взаимоотношения между эндостальной и сосудистой нишей и факторы, регулирующие возможность перемещения ГСК и их предшественников между этими нишами, должны быть выяснены, как и вопросы о том, какие типы клеток на самом деле напрямую связываются с ГСК и есть ли другие, возможно неизвестные, типы клеток, которые могут играть важную роль в нише ГСК. Применение этих знаний к нише ЛСК может внести ясность в вопрос об уязвимости ЛСК. Эти исследования помогут разработать новые способы терапии, которые дополнят существующий арсенал средств борьбы с заболеваниями системы крови.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Schofield R.* The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978; 4: 7–25.

2. *Пальцев М.А., Терских В.В., Васильев А.В.* Что есть стволовая клетка. В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Под ред. М.А. Пальцева. Т. 1. М.: Медицина, Шико, 2009: 13–31.

[Pal'tsev M.A., Terskikh V.V., Vasil'ev A.V. What is stem cell? In: Pal'tsev M.A., ed. *Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii*. (Biology of stem cells and cell technologies.) Vol. 1. Moscow: Meditsina Publ., Shiko Publ.; 2009. pp. 13–31. (In Russ.)]

3. *O'Malley D.P., Kim Y.S., Perkins S.L. et al.* Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. Mod. Pathol. 2005; 18: 1550–61.

4. *Weiss L. A.* Scanning electron microscopic study of the spleen. Blood. 1974; 43: 665–91.

5. *Kricun M.E.* Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions. Skeletal Radiol. 1985; 14: 10–9.

6. *Williams W., Nelson D.A.* Examination of the marrow. In: Hematology Williams. Ed. by E. Beulter, M.A. Lichtman et al. New York: McGraw-Hill, 1995: 15–22.
7. *Bradford G.B., Williams B., Rossi R., Bertoncello I.* Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. Exp. Hematol. 1997; 25: 445–53.
8. *Lichtman M.A.* The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. Exp. Hematol. 1981; 9: 391–410.
9. *Trentin J.J.* Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). Am. J. Pathol. 1971; 65: 621–8.
10. *Wolf N.S., Trentin J.J.* Hemopoietic colony studies: V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J. Exp. Med. 1968; 127: 205–14.
11. *Avecilla S.T., Hattori K., Heissig B. et al.* Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. Nat. Med. 2004; 10: 64–71.
12. *Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T. et al.* Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. Immunity. 2004; 20: 707–18.
13. *Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha et al.* Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells in vitro. J. Cell Physiol. 1973; 82: 461–73.
14. *Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G.* Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J. Cell Physiol. 1977; 91: 335–44.
15. *Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., Weissman I.L.* In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 3120–5.
16. *Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature. 2003; 425: 841–46.
17. *Zhang J., Niu C., Ye L. et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature. 2003; 425: 836–41.
18. *Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005; 121: 1109–21.
19. *Nagasawa T., Omatsu Y., Sugiyama T.* Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. Trends Immunol. 2011; 32(7): 315–20.
20. *Martin T.J., Sims N.A.* Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends Mol. Med. 2005; 11: 76–81.
21. *Lian J.B., Stein G.S., Aubin J.E.* Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Ed. by M.J. Favus. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003: 13–28.
22. *Adams G.B., Martin R.P., Alley I.R. et al.* Therapeutic targeting of a stem cell niche. Nat. Biotechnol. 2007; 25: 238–43.
23. *Taichman R.S., Emerson S.G.* Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. J. Exp. Med. 1994; 179: 1677–82.
24. *Taichman R.S., Reilly M.J., Emerson S.G.* Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood. 1996; 87: 518–24.
25. *Taichman R.S., Emerson S.G.* The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. Stem Cells. 1998; 16: 7–15.
26. *Taichman R.S., Reilly M.J., Emerson S.G.* The hematopoietic microenvironment: osteoblasts and the hematopoietic microenvironment. Hematology. 2000; 4: 421–6.
27. *Visnjic D., Kalajzic Z., Rowe D.W. et al.* Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. Blood. 2004; 103: 3258–64.
28. *Kiel M.J., Radice G.L., Morrison S.J.* Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. Stem Cell. 2007; 1: 204–17.
29. *Arai F., Hirao A., Ohmura M. et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell. 2004; 118: 149–61.
30. *Wilson A., Murphy M.J., Oskarsson T. et al.* C-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Genes Dev. 2004; 18: 2747–63.
31. *Yoshihara H., Arai F., Hosokawa K. et al.* Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. Cell Stem Cell. 2007; 1: 685–97.
32. *Fleming H.E., Janzen V., Lo Celso C. et al.* Wnt-signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. Cell Stem Cell. 2008; 2: 274–83.
33. *Nilsson S.K., Johnston H.M., Whitty G.A. et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. Blood. 2005; 106: 1232–9.
34. *Stier S., Ko Y., Forkert R. et al.* Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. J. Exp. Med. 2005; 201: 1781–91.
35. *Adams G.B., Chabner K.T., Alley I.R. et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. Nature. 2006; 439: 599–603.
36. *Yin T., Li L.* The stem cell niches in bone. J. Clin. Invest. 2006; 116: 1195–201.
37. *Broxmeyer H.E., Orschell C.M., Clapp D.W. et al.* Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J. Exp. Med. 2005; 201: 1307–18.
38. *Papayannopoulou T., Scadden D.T.* Stem-cell ecology and stem cells in motion. Blood. 2008; 111: 3923–30.
39. *Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T.* Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity. 2006; 25: 977–88.
40. *Sipkins D.A., Wei X., Wu J.W. et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. Nature. 2005; 435: 969–73.
41. *Ругаль В.И., Семенова Н.Ю.* Морфология синусоидальных сосудов гемопоэтической ниши костного мозга. В кн.: Актуальные вопросы медицинских морфологических дисциплин. Коллективная монография под ред. В.П. Волкова. Новосибирск: СибАК, 2014: 62–80.
[Rugal' V.I., Semenova N.Yu. Morphology of sinousoid vessels of the bone-marrow hematopoietic-stem-cell niche. In: Volkov V.P., ed. *Aktual'nye voprosy meditsinskikh morfologicheskikh distsiplin.* (Urgent problems of medical morphological disciplines.) Novosibirsk: SibAK Publ.; 2014. pp. 62–80. (In Russ.)]
42. *Rafii S., Shapiro F., Pettengell R. et al.* Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. Blood. 1995; 86: 3353–63.
43. *Li W., Johnson S.A., Shelley W.C., Yoder M.C.* Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. Exp. Hematol. 2004; 32: 1226–37.
44. *Cumano A., Godin I.* Ontogeny of the hematopoietic system. Ann. Rev. Immunol. 2007; 25: 745–85.
45. *Orkin S.H., Zon L.I.* Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell. 2008; 132: 631–44.
46. *Orkin S.H., Zon L.I.* SnapShot: hematopoiesis. Cell. 2008; 132: 712.
47. *de Saint-Georges L., Miller S.C.* The microcirculation of bone and marrow in the diaphysis of the rat hemopoietic long bones. Anat. Rec. 1992; 233: 169–77.
48. *Narayan K., Juneja S., Garcia C.* Effects of 5-fluorouracil or total-body irradiation on murine bone marrow microvasculature. Exp. Hematol. 1994; 22: 142–8.
49. *Brandi M.L., Collin-Osdoby P.* Vascular biology and the skeleton. J. Bone Miner. Res. 2006; 21: 183–92.
50. *Maes C., Carmeliet P., Moermans K. et al.* Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. Mech. Dev. 2002; 111: 61–73.
51. *Maes C., Kobayashi T., Kronenberg H.M.* A novel transgenic mouse model to study the osteoblast lineage in vivo. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1116: 149–64.
52. *Haug J.S., He X.C., Grindley J.C. et al.* N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2008; 2: 367–79.
53. *Wilson A., Oser G.M., Jaworski M. et al.* Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1106: 64–75.
54. *Morrison S.J., Wright D.E., Weissman I.L.* Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 1908–13.
55. *Randall T.D., Weissman I.L.* Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. Blood. 1997; 89: 3596–606.
56. *Zhang J., Li L.* Stem cell niche: microenvironment and beyond. J. Biol. Chem. 2008; 283: 9499–503.
57. *Baron R.* General Principles of Bone Biology. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Ed. by M.J. Favus. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003: 1–8.
58. *Belloni P.N., Tressler R.J.* Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells. Cancer Metastas. Rev. 1990; 8: 353–89.
59. *Afan A.M., Broome C.S., Nicholls S.E. et al.* Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. Br. J. Haematol. 1997; 98: 569–77.
60. *Katayama Y., Battista M., Kao W.M. et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell. 2006; 124: 407–21.
61. *Mendez-Ferrer S., Lucas D., Battista M., Frenette P.S.* Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature. 2008; 452: 442–7.
62. *Calvo W., Forteza-Vila J.* On the development of bone marrow innervation in new-born rats as studied with silver impregnation and electron microscopy. Am. J. Anat. 1969; 126: 355–71.
63. *Calvo W., Forteza-Vila J.* Schwann cells of the bone marrow. Blood. 1970; 36: 180–8.
64. *Yamazaki K., Allen T.D.* Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the «neuro-reticular complex». Am. J. Anat. 1990; 187: 261–76.
65. *Spiegel A., Shivtiel S., Kalinkovich A. et al.* Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. Nat. Immunol. 2007; 8: 1123–31.

66. *Jacenko O., Roberts D.W., Campbell M.R. et al.* Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for collagen X. Am. J. Pathol. 2002; 160: 2019–34.
67. *Walkley C.R., Olsen G.H., Dworkin S. et al.* A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. Cell. 2007; 129: 1097–110.
68. *Walkley C.R., Shea J.M., Sims N.A. et al.* Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. Cell. 2007; 129: 1081–95.
69. *Iwata M., Awaya N., Graf L. et al.* Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34+ cells. Blood. 2004; 103: 4496–502.
70. *Li L., Milner L.A., Deng Y. et al.* The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. Immunity. 1998; 8: 43–55.
71. *Kollet O., Dar A., Shivtiel S. et al.* Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat. Med. 2006; 12: 657–64.
72. *Fukuhara S., Sako K., Minami T. et al.* Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. Nat. Cell Biol. 2008; 10: 513–26.
73. *Saharinen P., Eklund L., Miettinen J. et al.* Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. Nat. Cell Biol. 2008; 10: 527–37.
74. *Ferrara N., Davis-Smyth T.* The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr. Rev. 1997; 18: 4–25.
75. *Zelzer E., Olsen B.R.* Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. Curr. Top. Dev. Biol. 2005; 65: 169–87.
76. *Sacchetti B., Funari A., Michienzi S. et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007; 131: 324–36.
77. *Shi S., Gronthos S.* Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J. Bone Miner Res. 2003; 18: 696–704.
78. *Duhrsen U., Hossfeld D.K.* Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. Ann. Hematol. 1996; 73: 53–70.
79. *Бессмельцев С.С.* Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть 1. Клин. онкогематол. 2013; 6(3): 237–58.
[Bessmel'tsev S.S. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part 1. *Klin. Onkogematol.* 2013; 6(3): 237–58. (In Russ.)]
80. *Semenova N., Bessmeltsev S., Rugal V.* Nicheforming stromal elements of bone marrow and lymph nodes in CLL. Haematologica. 2014; 99(s1): 743.
81. *Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю. и др.* Структурные особенности паренхимы и стромы костного мозга больных множественной миеломой. Биомедицинский журнал Medline.ru. 2012; 13: 515–23.
[Rugal' V.I., Bessmel'tsev S.S., Semenova N.Yu. et al. Structural features of bone marrow parenchyma and stroma in patients with multiple myeloma. *Biomeditsinskii zhurnal Medline.ru*. 2012; 13: 515–23. (In Russ.)]
82. *Bessmeltsev S., Rugal V.* Stromal microenvironment and stem cells niche in multiple myeloma. Haematologica. 2010; 95(25): 569–570.
83. *Kim Y.W., Koo B.K., Jeong H.W. et al.* Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. Blood. 2008; 112: 4628–38.
84. *Raajimakers M.H., Mukherjee S., Guo S. et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature. 2010; 464: 852–7.
85. *Blau O., Hofmann W.K., Baldus C.D. et al.* Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. Exp. Hematol. 2007; 35: 221–9.
86. *Sala-Torra O., Hanna C., Loken M.R. et al.* Evidence of donor-derived hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation. Biol. Blood Marrow Transpl. 2006; 12: 511–7.
87. *Colmone A., Amorim M., Pontier A.L. et al.* Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. Science. 2008; 322: 1861–5.
88. *Jin L., Hope K.J., Zhai Q. et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. Nat. Med. 2006; 12: 1167.
89. *Krause D.S., Lazarides K., von Andrian U.H., van Etten R.A.* Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. Nat. Med. 2006; 12: 1175–80.
90. *Miyake K., Underhill C.B., Lesley J., Kincade P.W.* Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. J. Exp. Med. 1990; 172: 69–75.
91. *Katayama Y., Hidalgo A., Chang J. et al.* CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. J. Exp. Med. 2005; 201: 1183–9.
92. *Dimitroff C.J., Lee J.Y., Rafii S. et al.* CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. J. Cell Biol. 2001; 153: 1277–86.
93. *Krause D.S., von Andrian U.H., van Etten R.A.* Selectins and their ligands are required for for homing and engraftment of BCR-ABL leukemia-initiating cells. Blood. 2005; 106: 106a.
94. *Jin L., Lee E.M., Ramshaw H.S. et al.* Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. Cell Stem Cell. 2009; 5: 31–42.
95. *Garg M., Moore H., Tobal K., Liu Yin J.A.* Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. Br. J. Haematol. 2003; 123: 49–59.
96. *Ishikawa F., Yoshida S., Saito Y. et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat. Biotechnol. 2007; 25: 1315–21.
97. *Saito Y., Uchida N., Tanaka S. et al.* Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in s a mouse model of AML. Nat. Biotechnol. 2010; 28: 275–80.
98. *Klyuchnikov E., Kroger N.* Sensitising leukemic cells by targeting microenvironment. Leuk. Lymphoma. 2009; 50: 319–20.
99. *Matsunaga T., Takemoto N., Sato T. et al.* Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. Nat. Med. 2003; 9: 1158–65.
100. *Mraz M., Zent C.S., Church A.K. et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. Br. J. Haematol. 2011; 155: 53–64.
101. *Vianello F., Villanova F., Tisato V. et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. Haematologica. 2010; 95: 1081–9.
102. *Weisberg E., Azab A.K., Manley P.W. et al.* Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. Leukemia. 2012; 26: 985–90.
103. *Bhatia R., McGlave P.B., Dewald G.W. et al.* Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. Blood. 1995; 85: 3636–45.
104. *Bewry N.N., Nair R.R., Emmons M.F. et al.* Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. Mol. Cancer Ther. 2008; 7: 3169–75.
105. *Scupoli M.T., Perbellini O., Krampera M. et al.* Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. Haematologica. 2007; 92: 264–6.
106. *Yamamoto-Sugitani M., Kuroda J., Ashihara E. et al.* Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108: 17468–73.
107. *Lane S.W., Wang Y.J., Lo Celso C. et al.* Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. Blood. 2011; 118: 2849–56.
108. *Wei J., Wunderlich M., Fox C. et al.* Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. Cancer Cell. 2008; 13: 483–95.
109. *Spitzer T.R., Dey B.R., Chen Y.B. et al.* The expanding frontier of hematopoietic cell transplantation. Cytometr. B. Clin. Cytom. 2012; 82(5): 271–9.
110. *Jordan C.T., Upchurch D., Szilvassy S.J. et al.* The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. Leukemia. 2000; 14: 1777–84.
111. *Kugler M., Stein C., Kellner C. et al.* A recombinant trispecific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting. Br. J. Haematol. 2010; 150: 574–86.
112. *Krause D.S., Fulzele K., Catic A. et al.* Parathyroid hormone-induced modulation of the bone marrow microenvironment reduces leukemic stem cells in murine chronic myelogenous-leukemia-like disease via a TGFbeta-dependent pathway. Blood. 2011; 118: 1670.