Ανασκόπηση

Μηχανισμοί κινητοποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Παντελής Τσιρκινίδης[1], Γεώργιος Μπούτσικας[2], Μαρία Αγγελοπούλου[3]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Έχοντας διανύσει περίπου 4 δεκαετίες από την παρατήρηση της κυκλοφορίας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΑΑΚ) στο ανθρώπινο αίμα μετά από χορήγηση χημειοθεραπείας ή/και αυξητικών παραγόντων (με κύριο εκπρόσωπο τον G-CSF), η εντατική έρευνα έχει αποκαλύψει πλήθος κυττάρων, μορίων σηματοδοσίας και μηχανισμών που συμμετέχουν, τόσο στη διατήρησή των ΑΑΚ στο μικροπεριβάλλον της νησίδας όσο και στην κινητοποίηση τους. Καρποί της προόδου που συντελέσθηκε στον τομέα αυτό είναι η καλλίτερη κατανόηση της φυσιολογίας και κινητικής των ΑΑΚ και η εισαγωγή των CXCR4 ανταγωνιστών, δρώντες ως κινητοποιητικοί παράγοντες στην κλινική πράξη. Η ανασκόπηση αυτή εστιάζει με περιεκτικό τρόπο στην οργάνωση της νησίδας των ΑΑΚ και στους μηχανισμούς κινητοποίησης των HSC, παρουσιάζοντας πρόσφατα δεδομένα αναφορικά με τη συμμετοχή του οστίτη ιστού, του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και των καναβιννοειδών και σφιγγολιπιδίων στην «προσέλκυση» των ΑΑΚ στο αίμα. Βέβαια, οι μηχανισμοί αυτοί αλληλοεπικαλύπτονται, χωρίς να έχει εξακριβωθεί η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στην κινητοποίηση των ΑΑΚ. Όμως, πρέπει να τονιστεί ότι το βασικό εναρκτήριο γεγονός στη διαδικασία αυτή αποτελεί ο G-CSF είτε ο ενδογενής είτε ο εξωγενής, που προκαλεί έκπτυξη της μυελομονοκυτταρικής σειράς, η οποία οδηγεί στην επαγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων. Αυτά με τη σειρά τους οδηγούν στην διάσπαση των δεσμών των ΑΑΚ με το στρώμα, και κυρίως του δεσμού SDF-1/CXCR4. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μετακίνησή τους στο αίμα.

Haema 2013; 4(3): 201-209 Copyright ΕΑΕ

Εισαγωγή

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (ΑΑΚ) [hematopoietic stem cells, (HSC)], όρος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1909 από τον Alexander Maximov[1], περιγράφονται ως πρόδρομα, αδιαφοροποίητα κύτταρα, ικανά να δώσουν γένεση σε όλα τα κύτταρα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Για να αποφευχθεί η αποθεματική «εξάντλησή» τους, είναι επιπλέον ικανά να αυτοανανεώνονται μέσω κυτταρικής διαίρεσης, πλην όμως αν αυτή συμβεί ανεξέλεγκτα θα οδηγήσει σε νεοπλασία. Γίνεται αντιληπτό ότι χρειάζεται ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον στο οποίο να τηρείται αυστηρά αυτή η ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των ΑΑΚ. Αυτή επιτυγχάνεται με ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση: ένα ΑΑΚ διαιρείται σε 2 κύτταρα, εκ των οποίων το ένα παραμένει ως ΑΑΚ και το άλλο μεταναστεύει στο κυρίως διαμέρισμα του μυελού οστών (ΜΟ) για να δώσει γένεση αιμοποιητικών πολυδύναμων προβαθμίδων[2,3]. Το περιβάλλον αυτό περιγράφεται με τον όρο «νησίδα» των ΑΑΚ (niche), έννοια που προτάθηκε από τον Ray Schofield το 1978[4].

Οι νησίδες των ΑΑΚ

Ανατομικά, οι νησίδες αυτές εδράζονται κυρίως πλησίον της επιφάνειας του ενδόστεου των υμενογενών οστών και των επιφύσεων των χονδρογενών οστών και υποστηρίζονται από διάφορα κύτταρα και μόρια του οστού, τα

[1]Αιματολόγος, 401 Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών
[2]Ειδικευόμενος Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, ΕΚΠΑ
[3]Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, ΕΚΠΑ
Διεύθυνση αλληλογραφίας: Μαρία Αγγελοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, ΕΚΠΑ, Λαϊκό Νοσοκομείο, Αγίου Θωμά 17, Γουδί, Αθήνα, 11527, Τηλ.: +30 2107456902, +30 6945232144, Fax: +30 210 7456698, E-mail: mkangelop@gmail.com

οποία αναφέρονται γενικά ως «στρώμα». Οι κύριοι εκπρόσωποι του στρώματος είναι κύτταρα του οστίτη ιστού [οστεοβλάστες (OB), οστεοκλάστες (OC), οστεομακροφάγα πλησίον των ενδοοστικών OB (OMAC), χονδροκύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα], δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα), ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem cells: MSC), μυοκύτταρα και κύτταρα του νευρικού ιστού. Εκτός των κυττάρων-παικτών, έχει αναγνωρισθεί η σημασία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix: ECM), καθώς και πλειάδας άλλων ουσιών, όπως ίνες κολλαγόνου και μέταλλα[5].

Έχουν αναγνωρισθεί 3 τύποι νησίδων ΑΑΚ: η ενδοοστική (ή οστεοβλαστική), η δικτυωτή και η αγγειακή (ή ενδοθηλιακή). Η πρώτη εδράζεται στο απώτερο όριο της επιφάνειας του ενδόστεου και αποτελείται κυρίως από τους «CD45 αρνητικούς, N-cadherin θετικούς - ατρακτοειδείς OB» (spindle-shaped N-cadherin$^+$CD45$^-$ osteoblastic cells – SNO)[5]. Οι SNO υποστηρίζονται από τα OMAC[6,7]. Η δεύτερη αναπτύσσεται διάχυτα στο ΜΟ, σαν ένα «δίκτυο δεδομένων», και αποτελείται κυρίως από έναν περιορισμένο, ειδικό πληθυσμό δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων, ονομαζόμενο «κύτταρα με άφθονη έκφραση χυμοκίνης CXCL12» (CXCL12-abundant reticular cells: CAR). Η πλειοψηφία των CAR βρίσκεται σε στενή επαφή με ανοσιακά κύτταρα [Β-λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDC) και NK-λεμφοκύτταρα], με ενδοκολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και με MSC που εκφράζουν νεστίνη (nestin, Nes$^+$), μία πρωτεΐνη που εκφράζεται και στις προβαθμίδες των νευρικών κυττάρων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα[8]. Τέλος η τρίτη νησίδα αφορά ένα μικροπεριβάλλον σαφώς πιο πλούσιο σε οξυγόνο, με χαμηλότερη συγκέντρωση Ca^{++}, στηριζόμενο σε ένα λεπτό στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγειακών κολποειδών. Βασικός πρωταγωνιστής εδώ είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από το μυελικό στρώμα (BM-derived endothelial cells-BMEC), κύτταρα σε στενή συνάφεια με τα Nes$^+$MSC και τα CAR και πιθανολογείται ως ο κύριος τύπος νησίδας στην παθολογική εξωμυελική αιμοποίηση[7-10].

Ο αριθμός των ΑΑΚ στον ΜΟ υπολογίζεται σε ποσοστό 0.005% όλων των κυττάρων ενώ οι αιμοποιητικές πολυδύναμες προβαθμίδες προσεγγίζουν το 0.1% (στον ενήλικα, η μάζα του ΜΟ είναι περίπου 2,6kg, με αριθμό κυττάρων 123×10^{10}). Στον ομφάλιο λώρο ο αριθμός των ΑΑΚ φθάνει έως και 23×10^9/ml[5] ενώ στο αίμα είναι μόλις 4×10^3/ml (0.06% των εμπύρηνων κυττάρων)[11]. Τα ΑΑΚ στον άνθρωπο τυποποιούνται ανοσοφαινοτυπικά ως CD34$^+$, CD38$^-$, CD45RA$^-$ και CD90$^+$. Ωστόσο η μόνη απόδειξη της «ταυτότητας – ΑΑΚ», δηλαδή της ικανότητας αυτοανανέωσης, γένεσης και διατήρησης μακροχρόνιας αιμοποίησης, προέρχεται από in vivo λειτουργικές δοκιμασίες όπως οι long-term repopulating assay-LTRA, competitive repopulation unit (CRU) assay, SCID repopulating cell (SRC) assay και limiting dilution assay[12].

Μηχανισμοί "σιώπησης" και αυτοπροστασίας των ΑΑΚ

Οι νησίδες των ΑΑΚ τα διατηρούν «σιωπηλά», δηλαδή εκτός κυτταρικού κύκλου. Περισσότερο από 70% των ΑΑΚ βρίσκονται στη φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου ενώ μόλις 10% των υπόλοιπων προβαθμίδων είναι σιωπηλά[13]. Έχει καταδειχθεί ότι ένας σιωπηλός πληθυσμός των ΑΑΚ (περίπου 30%) διαιρείται κάθε 145-193 ημέρες και ένας πιο ενεργός πληθυσμός διαιρείται κάθε 28-36 ημέρες[13]. Προφανώς αναφερόμαστε αντίστοιχα στα «μακράς διαρκείας» ΑΑΚ (long-term, LT-HSC), ικανά να συντηρούν την αιμοποίηση από μήνες έως διά βίου, και στα «βραχείας διαρκείας» (short-term, ST-HSC), δρώντα για μερικές εβδομάδες. Υπολογίζεται ότι τα LT-HSC απαντώνται στο μυελικό πληθυσμό με αναλογία $1/10^4$ κύτταρα και ουσιαστικά τροφοδοτούν τη δεξαμενή των ST-HSC.

Τα LT-HSC αυτοπροστατεύονται από τις βλάβες του DNA περιορίζοντας τη συχνότητα της κυτταρικής τους διαίρεσης. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσής του DNA κυρίως αφορούν τη μη-ομόλογη σύνδεση (non-homologous end-joining: NHEJ)[14]. Ένα άλλο γνώρισμα των ΑΑΚ είναι η δυνατότητα μεταφοράς εκτός των κυττάρων τοξικών ουσιών, μέσω ATP-εξαρτώμενων μεταφορέων, όπως ο Bcrp 1)[15]. Άλλοι μηχανισμοί σιώπησης των ΑΑΚ αποτελούν: α) η μοριακή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [κυκλίνες, κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (cyclin-dependent kinases: CDK), αναστολείς CDK (CDK inhibitors-CKIs)], β) η σηματοδοσία μέσω κυτοκινών [θρομβοποιητίνη (TPO), παραγόμενη από τους SNO, ο transforming growth factor β: TGF-β, παραγόμενος από ενδοθηλιακά και Schwann κύτταρα], γ) το μονοπάτι ουμπικιουιτίνης-πρωτεασώματος, δ) οι πολλαπλοί τρόποι μείωσης των δραστικών ριζών O_2 (reactive oxygen species-ROS): κινάση ATM, μονοπάτια P13K-Akt, mTOR, Mdm2/p53, παράγοντας HIF-1α (hypoxia-induced factor-1α)[16], πρωτεΐνη Cripto[17], ευόδωση της αυτοφαγίας των μιτοχονδρίων[18,19], αύξηση των μεταγραφικών παραγόντων forkhead homeobox type 0 (FoX0)[20], οξυγενάση-1 της αίμης (heme oxygenase-1: HO-1)[21], ε) η εξωκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} μέσω αντίστοιχων υποδοχέων στα ΑΑΚ, τους CaRs (calcium-sensing receptors), στ΄) η οστεοποντίνη (osteopontin-OPN), παραγόμενη κυρίως από τους SNO[16], και ζ) τα μονοπάτια Notch και Wnt (wingless-related integration)[16,22].

Η σημασία της υποξίας

Οι τροφικές αρτηρίες που διεισδύουν στον οστικό φλοιό, οδεύουν στο μυελώδη χώρο του οστού και κατό-

πιν αποκτούν μία ιδιαίτερη σπειροειδή διάταξη στη μετάφυση. Περαιτέρω διαχωρίζονται σε αρτηριακά τριχοειδή, τα οποία εισέρχονται εντός των μυελικών κολποειδών, πλησίον του ενδόστεου[23]. Έχει βρεθεί ότι η μερική πίεση του O_2 (pO_2) υποδεκαπλασιάζεται, κατά την ελάχιστη απομάκρυνση των κυττάρων από το πλησιέστερο τριχοειδές[24]. Η μέση pO_2 στον ΜΟ είναι περίπου 55mmHg και ο διάμεσος κορεσμός O_2 ($SatO_2$) περίπου 87,5%[25] ενώ η άρδευση των τριχοειδών στο ενδόστεο είναι εξαιρετικά αργή. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει την υπεροχή/σταθερότητα των μυελικών καλλιεργειών και τη διατήρηση σιώπησης των ΑΑΚ σε υποξικό περιβάλλον *in vitro*[26]. Πλην όμως η αιματική ροή στον ΜΟ υπολογίζεται περίπου 0.2ml/min, πλησίον δηλαδή αυτής του εγκεφάλου (0.5ml/min), ο οποίος είναι ένα σαφώς οξυγονωμένο όργανο, και αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη αιματική ροή του υποξικού λιπώδους ιστού (0.04ml/min)[27,28]. Η παρατήρηση της μειωμένης pO_2 στον ΜΟ (55mmHg) σε σχέση με το αρτηριακό αίμα (100mmHg) είναι απλά μία «φυσική» παρατήρηση, ακριβώς όπως και το ότι η μέση pO_2 στον εγκέφαλο είναι 15-30mmHg[29]! Τέλος, δεν έχει τεκμηριωθεί μέχρι σήμερα η υπεροχή της ικανότητας αυτοανανέωσης των ΑΑΚ σε υποξικό περιβάλλον. Η χρήση λοιπόν του όρου «υποξία» έχει νόημα σε σύγκριση μόνο με το αίμα[30].

Επιπλέον, ο διαχωρισμός των 3 νησίδων ανατομικά γίνεται για λόγους κατανόησης, καθώς αγγεία και οστέινες επιφάνειες δεν απέχουν ποτέ περισσότερο από μερικά μm. Είναι προφανές ότι οι νησίδες HSC δεν είναι «πόλεις-κράτη» και, έχοντας στόχο τη διατήρηση σταθερού αριθμού ΑΑΚ σε όλες τις θέσεις και ανά πάσα στιγμή, απελευθερώνουν με βραδύ ρυθμό «ελάχιστα» ΑΑΚ στο αίμα. Οι μηχανισμοί που διέπουν τη διακίνηση αυτή καθώς και την πιο μαζική αύξηση των ΑΑΚ στο αίμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Αντίθετα, η «προκλητή» κινητοποίησή τους έχει μελετηθεί λεπτομερέστερα αλλά δεν είναι ξεκάθαρο εάν οι ίδιοι μηχανισμοί διέπουν και την "steady state" κινητοποίηση[30,31].

Παρατηρήθηκε ότι σε ειδικές συνθήκες, όπως σε περιπτώσεις λευκοερυθροβλαστικής αντίδρασης, σε εξωμυελική αιμοποίηση και κατά την έξοδο από την αιματολογική τοξικότητα συνεπεία χημειοθεραπείας, συμβαίνει μία «μαζική» έξοδος των ΑΑΚ στο αίμα, φαινόμενο χρονικής διάρκειας κυμαινόμενης από ώρες έως μερικές ημέρες. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως «κινητοποίηση» (ΚΙΝ) και απέκτησε εξαιρετική σημασία λόγω της ευρείας θεραπευτικής εφαρμογής του στον τομέα της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Πλέον ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ο ΜΟ ως μόσχευμα, σε σημείο που αντικαταστάθηκε ο παλαιότερος όρος «μεταμόσχευση μυελού οστών».

Μηχανισμοί Κινητοποίησης των ΑΑΚ

Η κατανόηση των μηχανισμών ΚΙΝ των ΑΑΚ προϋποθέτει βαθειά και λεπτομερή γνώση των αλληλεπιδράσεων τους με τη νησίδα. Μία συνοπτική παρουσίαση αυτών των αλληλεπιδράσεων φαίνεται στον Πίνακα[12] . Πλην των κυττάρων, των υποδοχέων τους και των αντίστοιχων συνδετών που αναφέρονται στον πίνακα, στο ρεπερτόριο αυτό συμμετέχουν και διάφορες κυτοκίνες (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-11, IL-13, IFN-γ), μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases-MMPs), με κυριότερο εκπρόσωπο την MMP-9, και άλλα

Πίνακας. Υποδοχείς, συνδέτες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που συμμετέχουν στην ομοιόσταση της νησίδας των ΑΑΚ

Έκφραση από ΑΑΚ		Έκφραση από το μυελικό στρώμα
Υποδοχείς Tie2	⟺	Ang-1
Υποδοχείς Mpl	⟺	TPO
Υποδοχείς c-kit (CD117)	⟺	SCF
Υποδοχείς CXCR4	⟺	SDF-1 (CXCL12)
Υποδοχείς TGF-β R	⟺	TGF-β
Υποδοχείς FGFR1-4	⟺	FGF
Υποδοχείς Notch	⟺	Jagged-1
		PTH-R
Υποδοχείς GRP78	⟺	Cripto
HIF-1α	⟺	Cripto
N-cadherin	⟺	N-cadherin
Υποδοχείς BMP-R2A	⟺	BMP
Ιντεγκρίνες VLA4	⟺	VCAM-1
Υποδοχείς Frizzled	⟺	Wnt (ECM)
Υποδοχείς FLT-3 (CD135)	⟺	FLT3 ligand
Υποδοχείς CaR	⟺	Ca^{++} (ECM)
HCAM (CD44)	⟺	Hyaluronan (ECM)
Ιντεγκρίνες LFA-1	⟺	ICAM-1
VEGF	⟺	VEGFR
Υποδοχείς Agrin-R	⟺	Agrin proteogkycan (ECM)
Υποδοχείς $S1P_1$	⟺	S1P (διάχυτα)

Επεξηγήσεις: Ang-1: angiopoietin-1, SCF: stem cell factor, SDF-1: stromal-derived factor-1, FGF: fibroblast growth factor, PTH-R: υποδοχέας παραθορμόνης, Cripto: γνωστή και ως teratocarcinoma derived growth factor-1 / TDGF-1), BMP: bone morphogenic protein, VLA4: very late antigen 4, VCAM-1: vascular cellular adhesion molecule-1, FLT-3: fms-like tyrosine kinase 3, HCAM: hyaluronan binding-cellular adhesion molecule, LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1, VEGF: vascular endothelial growth factor, S1P: sphingosine-1-phosphate, ECM: extracellular matrix

ένζυμα[12,32]. Τέλος υπενθυμίζεται ότι τα κύτταρα που διαθέτουν υποδοχέα G-CSFR (CD114) ανήκουν στη μυελομονοκυτταρική σειρά, στην οποία κατατάσσονται και τα ΟΜΑC και τα μακροφάγα.

Πλην όμως τα δεδομένα αυτά προέρχονται από πειράματα είτε *in vitro* ή *in vivo* σε πειραματόζωα. Έτσι, δεν είναι απολύτως βέβαιο ότι οι μηχανισμοί της ΚΙΝ ανταποκρίνονται πλήρως στον άνθρωπο. Επιπλέον πρέπει να γίνει κατανοητό ότι οι μηχανισμοί αυτοί αλληλοεπικαλύπτονται, χωρίς να έχει εξακριβωθεί η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων της ΚΙΝ. Μία συνοπτική παρουσίαση των μηχανισμών αυτών αναπτύσσεται παρακάτω.

Ιστορική Αναδρομή

Το 1976 οι Richman et al ανέφεραν αύξηση των ΑΑΚ στο αίμα ασθενών υποβαλλόμενων σε χημειοθεραπεία[33]. Αργότερα παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση μετά από χορήγηση ανασυνδυασμένων αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων[34].

Ακολούθως αναδείχθηκε ότι ο G-CSF και η χημειοθεραπεία (με κύριο εκπρόσωπο την κυκλοφωσφαμίδη, το εναρκτήριο λάκτισμα της οποίας ήταν η διάσωση μέσω αυτής της ποντικίσιας αιμοποίησης, κατόπιν μυελοαφανιστικής θεραπείας με βουσουλφάνη) προκαλούν ΚΙΝ με τους ίδιους μηχανισμούς, μια και η χημειοθεραπεία προκαλεί αύξηση του ενδογενούς G-CSF[35]. Ο κύριος άξονας λοιπόν των μηχανισμών της ΚΙΝ είναι ο G-CSF, πλην όμως υπάρχει επιπλέον το σενάριο ότι η χημειοθεραπεία ειδικά, επιφέρει μείωση των αιμοποιητικών πολυδύναμων προβαθμίδων πλησίον των ΑΑΚ, γεγονός που ενεργοποιεί τη μετανάστευση των τελευταίων και την είσοδό τους σε κυτταρικό κύκλο[32]. Γενικά όμως η επαγόμενη από την χημειοθεραπεία υπερπλασία των ΑΑΚ και των αιμοποιητικών πολυδύναμων προβαθμίδων στον ΜΟ δεν οδηγεί σε ΚΙΝ, άνευ συνέργειας με τον G-CSF[35]. Παράλληλα, και το «υποξικό stress» που επιφέρει η χημειοθεραπεία παρατηρείται και στη χορήγηση G-CSF. Κλείνοντας λοιπόν εδώ, τονίζεται ότι το κινητοποιητικό αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας στηρίζεται μηχανιστικά στην αύξηση του ενδογενούς G-CSF και αυξάνεται σαφώς συνεργικά με τη χορήγηση G-CSF[36].

α. Ο ρόλος του G-CSF

Η χορήγηση G-CSF (ή η αύξηση του ενδογενούς G-CSF) προκαλεί υπερπλασία και ωρίμανση της μυελικής σειράς, ενώ παράλληλα επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μυελικό στρώμα με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση των ΑΑΚ. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην ΚΙΝ, η οποία στην κλινική πράξη μεταφράζεται σε αύξηση Χ60 των CD34+ κυττάρων στο ανθρώπινο αίμα[36]. Τι αφήνουν πίσω τους τα ΑΑΚ; Ένα μικροπεριβάλλον κατεστραμμένο από πρωτεάσες, «διάσπαση» της ενδοοστικής επιφάνειας με παροδική καταστολή της οστεοβλαστικής δραστηριότητας, σοβαρή απώθηση των ΟΜΑC και των μακροφάγων και «αποσταθεροποιημένα» αγγεία με αυξημένη διαπερατότητα, υπεύθυνα για την μετακίνηση των ΑΑΚ[37-44].

Εντυπωσιακά, τα ΑΑΚ στερούνται υποδοχέα G-CSF-R[45], άρα η κινητοποίηση τους μέσω του G-CSF γίνεται με έμμεσους μηχανισμούς:

- Απευθείας ενεργοποίηση (και κατόπιν εκσεσημασμένη μείωση/απώθηση) των ΟΜΑC και των μακροφάγων (τα οποία φέρουν G-CSFR), γεγονός που καταστέλλει τους γειτνιάζοντες SNO, αλλά και τα Nes$^+$ MSC και τα CAR, οδηγώντας στη μείωση έκφρασης και παραγωγής SDF-1. Σε αυτό το σημείο εμπλέκεται σηματοδοσία από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα (ΣΝΣ) στους SNO, Nes$^+$ MSC, CAR, ΟΜΑC και μακροφάγα, μέσω του G-CSF. Η απευθείας λοιπόν στόχευση του G-CSF στα μονοκύτταρα/μακροφάγα φαίνεται να είναι το πρώτο βήμα[7,46,47].
- Πρόκληση πρωτεολυτικής διάσπασης/κάθαρσης του SDF-1 (καθώς και πολλών άλλων χυμοκινών, κυτοκινών και υποδοχέων), η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση των CXCR4 υποδοχέων των ΑΑΚ με συνέπεια την αποδέσμευσή τους από το στρώμα. Ταυτόχρονα παρατηρείται και παροδική μείωση των CXCR4 στην επιφάνεια των ΑΑΚ. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι προκαλείται από πρωτεάσες, επαγόμενες από τον G-CSF, μέσω ενεργοποίησης της μυελομονοκυτταρικής σειράς, συνεπικουρούμενο από ταυτόχρονη αποδόμηση ανασταλτών των πρωτεασών[36].
- Η πλέον μελετημένη πρωτεάση είναι η MMP-9. Πλην όμως ο κριτικός ρόλος της στην ΚΙΝ δεν έχει επακριβώς κατανοηθεί, καθώς η πλήρης πειραματική εξάλειψη όλων των πρωτεασών δεν επηρεάζει καθόλου την ΚΙΝ μέσω G-CSF στα ποντίκια[48]. Ίσως πιο σημαντική αναδεικνύεται η διπεπτιδάση CD26, η οποία, εκτός πολλών άλλων στόχων, αδρανοποιεί τον SDF-1 σε ανενεργή μορφή και πειραματική της απώθηση ανέδειξε σαφώς μειωμένη ΚΙΝ[49]. Διάφορες άλλες πρωτεάσες όπως καθεψίνη G και ελαστάση των ουδετεροφίλων έχουν επίσης συνδεθεί με την ΚΙΝ. Επιπλέον πρωτεϊνικά συστήματα που δραστηριοποιούνται στην ΚΙΝ μέσω G-CSF είναι οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος[50] και το σύστημα ινωδόλυσης/πλασμινογόνου[51], ο ακριβής ρόλος των οποίων δεν έχει αποσαφηνισθεί.
- Με τον ίδιο μηχανισμό (πρωτεόλυση), προκαλείται αποδόμηση κυρίως του VCAM-1, αλλά και της φιμπρονεκτίνης και της OPN, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κυτταρική προσκόλληση των ΑΑΚ μέσω VLA4 στο στρώμα και την επακόλουθη μετανάστευση τους. Παράλληλα, συμβαίνει και μια παροδική μείωση της έκφρασης της ιντεγκρίνης VLA4 στα ΑΑΚ[36,52].
- Μετακίνηση των ΑΑΚ και αιμοποιητικών πολυδύναμων προβαθμίδων σε κεντρικότερες θέσεις στο μυελικό διαμέρισμα, πλησίον του αγγειακού ενδοθηλίου,

λόγω ανάγκης καλύτερης οξυγόνωσης[53].

- Ισχυρή δράση του G-CSF ως αναστολέας επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης (αποδείχτηκε κινητοποιητική συνέργεια G-CSF και μη-ειδικού τρικυκλικού αντικαταθλιπτικού, το οποίο δρα με αυτόν τον τρόπο)[54]. Αντίθετα, χημική συμπαθεκτομή/χορήγηση β-αναστολέων προκαλεί πειραματικά μείωση της επαγόμενης από τον G-CSF KIN στο ποντίκι[55]. Επίσης φαίνεται ότι η επίδραση του ΣΝΣ, ευοδώμενη από τον G-CSF, επιδρά στα Nes^+ MSC, τα CAR και τους SNO, έτσι ώστε μειώνεται σημαντικά η παραγωγή του SDF-1[56]. Το ΣΝΣ επιδρά απευθείας στα ανθρώπινα ΑΑΚ, μέσω β-αδρενεργικών υποδοχέων και υποδοχέων ντοπαμίνης που φέρονται στην επιφάνειά τους, οι οποίοι δραστηριοποιούνται κατόπιν χορήγησης G-CSF, μέσω του μονοπατιού Wnt[57]. Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι η β2-αδρενεργική σηματοδοσία αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων βιταμίνης D στους SNO, γεγονός αναγκαίο στην G-CSF KIN[58].

Είναι φανερό ότι στην επαγόμενη από G-CSF κινητοποίηση, οι 2 μηχανισμοί παρεμπόδισης των δεσμών SDF-1 / CXCR4 και VCAM-1 / VLA4 δραστηριοποιούνται μερικώς και όχι ολοκληρωτικά, μια και συγχορήγηση G-CSF + CXCR4 ανταγωνιστών ή G-CSF + anti-VLA4 αντισώματος, επιφέρουν συνεργικό και δυναμικότερο κινητοποιητικό αποτέλεσμα[36].

β. Ο ρόλος του άξονα SDF-1/CXCR4

Οι νεοεισαχθέντες στην κλινική πράξη ανταγωνιστές του CXCR4 με κύριο εκπρόσωπο το plerixafor (AMD3100), διασπούν τον άξονα SDF-1/CXCR4. Για τον μηχανισμό δράσης του έχουν προταθεί οι εξής υποθέσεις: α) Η αναστολή των υποδοχέων CXCR4 οδηγεί στην απώλεια της ευαισθησίας των ΑΑΚ στον SDF-1. Κατόπιν τούτου είτε προσελκύονται στο αίμα μέσω ενός θετικού ερεθίσματος (με κύριο υποψήφιο το σφιγγολιπίδιο S1P), είτε απωθούνται από τον ΜΟ ή παθητικά περνούν στην κυκλοφορία. β) Κατόπιν χορήγησης plerixafor, τα ΑΑΚ διατηρούν μεν την ευαισθησία τους στον SDF-1, πλην όμως το φάρμακο στοχεύει μόνο στα κύτταρα του στρώματος που παράγουν SDF-1, και ελαττώνοντας τα επίπεδά του, προκαλεί KIN. Αρκεί μία μικρή έως μέτρια μείωση των επιπέδων του SDF-1 στον ΜΟ για να αρχίσει η έξοδος των ΑΑΚ. γ) το plerixafor δεν προκαλεί KIN αλλά παγιδεύει τα ΑΑΚ στο αίμα, τα οποία διακινούνται «αυθόρμητα», και παρατείνει τη διαμονή τους εκεί, πλην όμως για να εξηγηθούν οι υψηλές τιμές των CD34+ κυττάρων στο αίμα θα πρέπει η αυθόρμητη αυτή κινητική των ΑΑΚ να είναι εξαιρετικά ταχεία[30].

Έχοντας ήδη περιγράψει τους βασικούς μηχανισμούς διάσπασης του δεσμού SDF-1/CXCR4 μέσω του G-CSF και των CXCR4 ανταγωνιστών, επισημαίνεται ότι η βασική διαφορά τους είναι η εξαιρετικά ταχύτερη και αποδοτικότερη KIN με τους CXCR4 ανταγωνιστές. Επιπλέον η υπερπλασία της μυελικής σειράς δεν παρατηρείται στη χρήση των τελευταίων[36]. Όμως έχει αποδειχθεί ότι η υπερπλασία δεν είναι αναγκαία για την KIN: πειράματα σε πιθήκους που κινητοποιήθηκαν με CXCL2 (Growth-regulated protein beta:GROβ) και σε ποντίκια κινητοποιούμενα με IL-8, απέδειξαν σημαντική υπερπλασία του ΜΟ αλλά πτωχή KIN[35,59].

γ. Ο ρόλος των λιπαρών οξέων, των προσταγλανδινών και των ενδοκανναβινοειδών

Ο άξονας SDF-1 / CXCR4 φαίνεται ότι επηρεάζεται και από τα σφιγγολιπίδια, με κύριο εκπρόσωπο τη S1P (πλούσια παραγωγή από τα ερυθρά αιμοσφαίρια)[60]. Η έρευνα στον τομέα αυτό είναι υπερεντατική, και υπάρχουν ενδείξεις ότι μέσω των υποδοχέων της στα ΑΑΚ, η S1P ρυθμίζει τη χημειοταξία τους μεταξύ ΜΟ, αίματος και ιστών. Χαρακτηριστικά αυξάνεται στο αίμα, ενώ μειώνεται στο ΜΟ στην κινητοποίηση και επιπρόσθετα αναστέλλει τον SDF-1 μέσω του μονοπατιού p38/Akt/mTOR[61,62]. Επιπλέον, πειραματική εξάλειψη των υποδοχέων $S1P_1$ οδηγεί σε μειωμένη κινητοποίηση μέσω CXCR4 ανταγωνιστών σε ποντίκια ενώ σε άλλο πείραμα, ενδοφλέβια χορήγηση αγωνιστών $S1P_1$ οδηγεί σε αύξηση της CXCR4 KIN[63,64]. Εκτός από τα σφιγγολιπίδια, η προσταγλανδίνη PGE_2 ρυθμίζει την έκφραση του CXCR4 στα ΑΑΚ και βοηθά στην προσέλκυση τους από τον SDF-1 στον ΜΟ[65]. Αντίθετα από αυτήν, τα ενδοκανναβινοειδή, μέσω των υποδοχέων τους που εκφράζονται διάχυτα στο ΜΟ, προκαλούν μείωση διαφόρων μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και των υποδοχέων CXCR4, οδηγώντας σε συνεργική με τον G-CSF KIN[66]. Εντυπωσιακά, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ουσίες αυτές οδηγούν σε ενδογενή αύξηση του G-CSF[67], ενώ είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς των κανναβινοειδών συνδέονται με τους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς και μεταφέρουν ερεθίσματα του ΣΝΣ[68].

δ. Ο ρόλος των ιντεγκρινών (άξονας VCAM-1 / VLA-4)

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικοί υποδοχείς αποτελούμενοι από α και β υπομονάδες, έχοντας τη χαρακτηριστική ιδιότητα να μεταφέρουν ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα. Ο ρόλος τους είναι η ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος, της προσκόλλησης, της μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Η ιντεγκρίνη VLA-4 εκφράζεται στα ΑΑΚ και εξυπηρετεί την κυτταρική τους προσκόλληση στο στρώμα μέσω σύνδεσης κυρίως με το VCAM-1, τη φιμπρονεκτίνη και την OPN. Μελέτες σε ποντίκια, ανώτερα θηλαστικά και ανθρώπους απέδειξαν ότι η χρήση μονοκλωνικού αντι-

σώματος anti-VLA-4 είτε η εξάλειψη του ή εξάλειψη των συνδετών του απέδωσαν ισχυρό κινητοποιητικό αποτέλεσμα[69]. Βέβαια, η κάθαρση του VCAM-1 στο μυελικό στρώμα και η μείωση της έκφρασης VLA-4 στα κινητοποιημένα ΑΑΚ παρατηρούνται και στην ΚΙΝ από G-CSF και CXCR4 ανταγωνιστές, φαινόμενο που ίσως δεν επιτρέπει τη θεώρηση του άξονα VCAM-1/VLA-4 ως αυτόνομου κινητοποιητικού μηχανισμού. Για την OPN αξίζει να αναφερθεί ότι πειραματική της εξάλειψη οδηγεί σε ενδογενή ή/και μέσω χορήγησης G-CSF ΚΙΝ[70].

ε. Ο ρόλος του άξονα SCF/c-kit

Ο SCF είναι μία σημαντική χυμοκίνη που παράγεται από τους SNO και τα CAR. Η ενεργή του μορφή είναι διαμεμβρανική και συνδέεται με τον υποδοχέα c-kit των ΑΑΚ. Ο υποδοχέας αυτός (CD117), είναι τύπου ΙΙΙ τυροσινικής κινάσης και εκφράζεται στα ΑΑΚ, τα EPC (endothelial progenitors cells) και τα MSC. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυονική αιμοποίηση, την κυτταρική ωρίμανση και διαφοροποίηση καθώς και στην αγγειογένεση, συνδεόμενος με τον SCF, που εκφράζεται στο μυελικό στρώμα και το ενδοθήλιο.

Πειραματική εξάλειψη του c-kit σε ποντίκια κινητοποιούμενα με ant-VLA-4 ή plerixafor οδήγησε σε ελάττωση της ΚΙΝ, γεγονός που καταδεικνύει την σημασία του στη διαδικασία αυτή. Ωστόσο ο ακριβής του ρόλος δεν είναι διευκρινισμένος, καθώς τόσο η ενεργοποίηση όσο και η αναστολή της δραστικότητας του c-kit οδηγούν σε ΚΙΝ των ΑΑΚ. Επιπρόσθετα η σύνδεση του με τον SCF μόνη της δεν επαρκεί για να εξηγήσει το ρόλο του στην κινητοποίηση[71].

στ. Ο ρόλος των οστεοκλαστών (ΟC)

Χορηγώντας RANKL [receptor activator of NF-κB ligand, κυτοκίνη ανήκουσα στην υπερ-οικογένεια TNF (tumor necrosis factor)] σε ποντίκι, αναδείχθηκε μία αναμενόμενη αύξηση οστεοκλαστικής δραστηριότητας (λόγω του υποδοχέα RANK που φέρουν οι ΟC), ταυτόχρονα όμως παρατηρήθηκε σημαντική ΚΙΝ ΑΑΚ[72]. Στο ίδιο πείραμα, αναστολή των ΟC μέσω χορήγησης καλσιτονίνης επέφερε μείωση της επαγόμενης από G-CSF ΚΙΝ. Προτάθηκε ότι οι ΟC παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η καθεψίνη Κ, τα οποία αποδομούν σημαντικούς δεσμούς αλληλεπιδράσεων μεταξύ νησίδας και HSC, ευνοώντας την έξοδο των τελευταίων. Πλην όμως, άλλες μελέτες σε ποντίκια και ανθρώπους έχουν δείξει ότι η αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και της οστικής απορρόφησης καθώς και των ΟC στην G-CSF ΚΙΝ, συμβαίνει μερικές ημέρες αργότερα από το τυπικό peak στον άνθρωπο των 4-5 ημερών[73]. Επιπρόσθετα, χορήγηση διφωσφονικών, τα οποία αναστέλλουν τους ΟC δεν επηρεάζουν αρνητικά την ποντικίσια G-CSF ΚΙΝ αλλά αντίθετα μία μελέτη κατέληξε στο αντίθετο αποτέλεσμα[7], καθιστώντας αινιγματικό τον κινητοποιητικό ρόλο των ΟC.

Μελέτη προερχόμενη από το Τμήμα μας στον ορό ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες που κινητοποιήθηκαν με G-CSF+/- χημειοθεραπεία κατέδειξε τον σημαντικό ρόλο του οστίτη ιστού στη διαδικασία της ΚΙΝ. Έτσι βρέθηκε ότι ο λόγος RANKL / OPG (osteoprotogerin: δρα ως αρνητικός συνδέτης του RANK) αυξάνεται σημαντικά στην ΚΙΝ, γεγονός που υποδηλώνει ενεργοποίηση των ΟC. Εντυπωσιακά όμως, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας. Αντίθετα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της bone specific alkaline phosphatase (bALP) – ενζύμου που παράγεται από τους οστεοβλάστες και που αποτελεί τον πλέον ευαίσθητο δείκτη της οστεοβλαστικής δραστηριότητας. Παράλληλα η σημαντική μείωση του λόγου Ang-1/Ang-2 απεκάλυψε ότι η αποσταθεροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου είναι σημαντικός μηχανισμός στην ΚΙΝ. Επιπλέον προέκυψε ότι οι «πτωχοί» κινητοποιητές παρουσίαζαν αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα και χαμηλότερα επίπεδα Ang-1 προ της έναρξης του κινητοποιητικού σχήματος.

ζ. Ο ρόλος της υποξίας

Κεντρικός ρυθμιστής της υποξίας στην ενδοοστική νησίδα των ΑΑΚ είναι ο HIF-1. Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα, σε μορφή ετεροδιμερούς πρωτεΐνης, αποτελούμενης από τον HIF-1α, που συνδέεται με το O_2 και τον HIF-1β[74]. Σε συνθήκες επαρκούς οξυγόνωσης, ο HIF-1α είναι υδροξυλιωμένος και, σε αυτήν την κατάσταση, αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (VHL), η οποία οδηγεί στην αποδόμηση του συμπλέγματος μέσω ουμπικιουιτίνης-πρωτεασώματος[75]. Σε συνθήκες υποξίας, η υδροξυλίωση του HIF-1α δεν συμβαίνει, και ο πλήρως ετεροδιμερής HIF-1 συνδέεται με γονιδιακούς τόπους απάντησης στην υποξία (hypoxia response elements: HRE) αρκετών γονιδίων στόχων και ξεκινά τη μεταγραφική του δράση[75,76]. Η δράση αυτή είναι απαραίτητη, όπως προαναφέρθηκε, για την αντιμετώπιση των ROS που αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Έτσι ο HIF-1 προστατεύει τα ΑΑΚ και συμβάλλει στην διατήρηση της σιώπησής τους.

Κατά τη διάρκεια της ΚΙΝ με G-CSF επάγεται η έκφραση του HIF-1α στον MO[77]. Αντίθετα στο αίμα εθελοντών δοτών HSC μετά από G-CSF είναι υδροξυλιωμένος (ανενεργός)[78]. Μελέτες ανέδειξαν ότι ενεργοποίηση του mTOR και επακόλουθη αύξηση των ROS στα ΑΑΚ προάγει την κινητοποίησή τους ενώ αναστολή του mTOR με ραπαμυκίνη αναστέλλει την ΚΙΝ, προτείνοντας ότι ένα «κριτικό» επίπεδο ROS (και προφανώς HIF-1α) είναι αναγκαίο για επαρκή ΚΙΝ[79,80].

Επίλογος

Οι μηχανισμοί της κινητοποίησης των ΑΑΚ στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι και ελάχιστα αποσαφη-

νισμένοι. Η διαδικασία αυτή δεν μπορεί να εξηγηθεί με αποκλειστικά μηχανιστικό τρόπο, ενώ τα προτεινόμενα συστήματα δεν δρουν αυτόνομα, αλλά συμπληρωματικά. Ο κατάλογος των κυττάρων, μορίων και σηματοδοτικών οδών διευρύνεται διαρκώς, καθιστώντας τη δημιουργία «ενός ενιαίου μοντέλου» μηχανισμού κινητοποίησης αδύνατη. Εκτός από τη διάσπαση των δεσμών ΑΑΚ και νησίδας, φαίνεται ότι το αίμα, το ενδοθήλιο, το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και ο οστίτης ιστός συμμετέχουν ή/και καθορίζουν την διαδικασία της μετανάστευσης των HSC εκτός του μυελού των οστών. Η κατανόηση των μονοπατιών αυτών είναι το αντικείμενο της σύγχρονης έρευνας και ίσως οδηγήσει στην ανάδειξη φαρμακευτικών ουσιών χρήσιμων στην κλινική πράξη.

Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization

by Pantelis Tsirkinides[1], George Boutsikas[2], Maria Angelopoulou[3]

[1]Attending in Hematology, 401 General Army Hospital of Athens, Department of Hematology, [2]Fellow in Hematology, National and Kapodistrian University of Athens, Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, [3]Assistant Professor in Hematology, National and Kapodistrian University of Athens, Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Athens, Greece

ABSTRACT: Following chemotherapy and/or the administration of growth factors, such as G-CSF, the increased circulation of hematopoietic stem cells (HSC) in human blood has been well documented and studied. A number of cells, markers and mechanisms involved in the preservation and mobilization of the HSC have been identified through research over the last four decades. This review aims to systematically present the structure of the HSC "niche" and elucidate the mechanisms of their mobilization, based on current data. However, this field is constantly evolving and new pathways and molecules, such as the sympathetic system, the bone tissue, cannabinoids and sphingolipids have been shown to contribute to the mobilization process of HSC. Understanding the importance and the possible primary pathophysiologic role of each pathway is rather difficult, since they share various overlapping components. In everyday clinical practice, CXCR4 antagonists are now being used as mobilization agents in order to improve HSC mobilization and collection. It appears that the primary initiating event for the mobilization of HSC is chemotherapy-induced endogenous G-CSF production or exogenous G-CSF administration. G-CSF induces proliferation and expansion of the myelomonocytic series, which leads to proteolytic enzyme activation. These enzymes result in disruption of various receptor-ligand bonds, such as the SDF-CXCR4, that leads to the disanchorage of HSC from the bone marrow stroma and their free circulation in blood.

Βιβλιογραφία

1. Maximov A. Der lymphozyt als gemeinsame stammzelle der verschiedenen blutelemente in der embryonalen entwicklung und im posfetalen saugetiere. Folia Haematologica VIII. 1909; 8:125-134.
2. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. Science. 2000; 287:1427–1430.
3. Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell. 2004; 116:769–778.
4. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978; 4:7-25.
5. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. The Journal of Clinical Investigation. 2006; 116:1195-1201.
6. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. J Immunol. 2008; 181:1232-1244.
7. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. Blood. 2010; 116:4815-4828.
8. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. Inflammation & Allergy – Drug Targets. 2012; 11:201-206.
9. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005; 121:1109-1121.
10. 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; 86:3353-3363.
11. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Present in Circulation. Archives of Medical Research. 2003; 34:476-488.

12. Wasnik S, Tiwari A, Kirkland MA, Pande G. Osteohematopoietic Stem Cell Niches in Bone Marrow. International Review of Cell and Molecular Biology. 2012; 298:95-133.
13. Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell. 2008; 135:1118-1129.
14. Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. Int J Hematol. 2011; 93:434-439.
15. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. Stem Cells. 2006; 24:3-12.
16. Matsumoto A, Nakayama KI. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. Biochimica et Biophysica Acta. 2013; 1830:2335-2344.
17. Bianco C, Rangel MC, Castro NP. Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression. Am J Pathol. 2010; 177:532-540.
18. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science. 2011; 331:456-461.
19. Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol. 2011; 13:132-141.
20. Suda T, Tabuko S, Semenza GL. Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche. Cell Stem Cell. 2011; 9:298-310.
21. Cao YA, Wagers AJ, Karsunky H, et al. Heme oxygenase-1 deficiency leads to disrupted response to acute stress in stem cells and progenitors. Blood. 2008; 112:4494-4502.
22. Bigas A, Espinosa L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. Blood. 2012; 119:3226-3235.
23. Draenert K, Draenert Y. The vascular system of bone marrow. Scan Electron Microsc. 1980; 4:113-122.
24. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, et al. Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophys J. 2001; 81:685-696.
25. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, et al; Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood. 2002; 99:394.
26. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood. 1993; 82:2031-2037.
27. Szabo Z, Szabo G. The effect of hemorrhage and bone fracture on bone marrow circulation. Res Exp Med. 1978; 172:7–17.
28. Karpe F, Fielding BA, Ardilouze JL, et al. Effects of insulin on adipose tissue blood flow in man. J Physiol. 2002; 540: 1087–1093.
29. Pennings FA, Schuurman PR, van den Munckhof P, Bouma GJ. Brain tissue oxygen pressure monitoring in awake patients during functional neurosurgery: the assessment of normal values. J Neurotrauma. 2008; 25:1173–1177.
30. Bonig H, Papayannopoulou T. Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions. Leukemia. 2013; 27:24-31.
31. Croizat H, Frindel E, Tubiana M. The effect of partial body irradiation on haemopoietic stem cell migration. Cell Tissue Kinet. 1980; 13:319–325.
32. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. TRENDS in Immunology. 2005; 26:426-433.
33. Richman C, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood. 1976; 47:1031-1034.
34. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A. Granulocyte macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet. 1988; 28:1194–1198.
35. Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC. The granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for the mobilization of murine hematopoietic progenitors into peripheral blood by cyclophosphamide or interleukin-8 but not flt-3 ligand. Blood. 1997; 90:2522–2528.
36. Bonig H, Papayannopoulou T. Mobilization of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: General Principles and Molecular Mechanisms. Methods Mol Biol. 2012; 904:1-14.
37. Greenbaum AM, Link DC. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. Leukemia. 2011; 25:211–217.
38. Levesque JP, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. Curr Opin Organ Transplant. 2008; 13:53–58.
39. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. J Clin Invest. 2003; 111:187–196.
40. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol. 2002; 30:973–981.
41. Fruehauf S, Seggewiss R. It‘s moving day: factors affecting peripheral blood st em cell mobilization and strategies for improvement. Br J Haematol. 2003; 122:360–375.
42. Cashen AF, Link D, Devine S, DiPersio J. Cytokines and stem cell mobilization for autologous and allogeneic transplantation. Curr Hematol Rep. 2004; 3:406–412.
43. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. Exp Hematol. 2002; 30:440–449.
44. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. Curr Opin Hematol. 2002; 9:183–189.
45. Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. Blood. 2000; 95:3025–3031.
46. Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. Blood. 2009; 114:1331–1339.
47. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. JEM. 2011; 208:421-428.
48. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. Blood. 2004; 104:65–72.
49. Christopherson KW, Cooper S, Hangoc G, Broxmeyer HE. CD26 is essential for normal G-CSF induced progenitor cell

mobilization as determined by CD26−/− mice. Exp Hematol. 2003; 31:1126–1134.
50. Molendijk WJ, van Oudenaren A, van Dijk H, Daha MR, Benner R. Complement split product C5a mediates the lipopolysaccharideinduced mobilization of CFU-s and haemopoietic progenitor cells, but not the mobilization induced by proteolytic enzymes. Cell Tissue Kinet. 1986; 19:407–417.
51. Gong Y, Hoover-Plow J. The plasminogen System in Regulating Stem Cell Mobilization. J Biomedicine and Biotechnology. 2012; 2012:1-7.
52. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. Blood. 2001; 98:1289–1297.
53. Winkler IG, Barbier V, Wadley R, Zannettino AC, Williams S, Levesque JP. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. Blood. 2010; 116:375–385.
54. Lucas D, Bruns I, Battista M, et al. Norepinephrine reuptake inhibition promotes mobilization in mice: potential impact to rescue low stem cell yields. Blood. 2012; 119:3962–3965.
55. Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell. 2006; 124:407–421.
56. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature. 2010; 466:829–834.
57. 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; 8:1123-1131.
58. Kawamori Y, Katayama Y, Asada N, et al. Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. Blood. 2010; 116:5528-5535.
59. King AG, Horowitz D, Dillon SB, et al. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta. Blood. 2001; 97:1534–1542.
60. Ratajczak MZ, Kim CH, Abdel-Latif A, et al. A novel perspective on stem cell homing and mobilization: review on bioactive lipids as potent chemoattractants and cationic peptides as underappreciated modulators of responsiveness to SDF-1 gradients. Leukemia. 2012; 26:63–72.
61. Golan K, Vagima Y, Ludin A, et al. The Chemotactic Lipid S1P Regulates Hematopoietic Progenitor Cell Egress and Mobilization Via Its Major Receptor S1P1 and by SDF-1 Inhibition In a p38/Akt/mTOR Dependent Manner. Blood. 2010; 116:Abstract 553.
62. Golan K, Vagima Y, Ludin A, et al. S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. Blood. 2012; 119:2478–2488.
63. Juarez JG, Harun N, Thien M, et al. Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. Blood. 2012; 119:707-716.
64. Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. Blood. 2004; 103:4478-4486.
65. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. Blood. 2009; 113:5444–5455.
66. Hoggatt J, Pelus LM. Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. Leukemia. 2010; 24:1993–2002.
67. Hegde VL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Cannabinoid receptor activation leads to massive mobilization of myeloid-derived suppressor cells with potent immunosuppressive properties. Eur J Immunol. 2010; 40:3358–3371.
68. Hudson BD, Hebert TE, Kelly ME. Physical and functional interaction between CB1 cannabinoid receptors and beta2-adrenoceptors. Br J Pharmacol. 2010; 160:627–642.
69. Zohren F, Toutzaris D, Klarner V, Hartung HP, Kieseier B, Haas R. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. Blood. 2008; 111:3893–3895.
70. Grassinger J, Haylock DN, Storan MJ, et al. Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with α9β1 and α4β1 integrins. Blood. 2009; 114:49-59.
71. Min Cheng, Gangjian Qin. Progenitor Cell Mobilization and Recruitment: SDF-1, CXCR4, α4-integrin and c-kit. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012; 111:243-264.
72. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat Med. 2006; 12:657-664.
73. Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Levesque JP. Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible for hematopoietic progenitor cell mobilization. Blood. 1998; 92:3465-3473.
74. Wang GL, Semenza GL; Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 1995; 270:1230-1237.
75. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell 2008; 30:393-402.
76. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. Semin Cancer Biol. 2009; 19:12-18.
77. Levesque JP, Winkler IG, Hendy J, et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. Stem Cells. 2007; 25:1954–1965.
78. Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions. FEBS Lett. 2007; 581:3111–3119.
79. Tesio M, Golan K, Corso S, et al. Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. Blood. 2011; 117:419–428.
80. Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, et al. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. J Clin Invest. 2009; 119:492–503.