

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ И МОБИЛИЗОВАННОЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Р.Ш. Ибрагимов¹, Е.В. Райкина^{1,2}, Е.Ю. Осипова^{1,2},
Н.Н. Зимина³, О.А. Майорова¹, М.В. Яковлева², С.А. Румянцев^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава;

²ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e_ossipova@mail.ru

Клеточный состав пуповинной крови (ПК) является быстропроходящим следствием родового стресса и напоминает клеточный состав периферической крови взрослых, полученной в результате мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), реализующим свое биологическое действие с помощью ряда вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния. В исследовании продемонстрирована сравнительная характеристика клеточного состава, в том числе субпопуляций лимфоцитов, CD34⁺- и CD133⁺-клеток, колониобразующей активности гемопоэтических клеток-предшественников, а также концентраций мобилизующих цитокинов (интерлейкин-8, матриксные металлопротеиназы 2 и 9) в ПК доношенных новорожденных и периферической крови после мобилизации при помощи Г-КСФ.

Соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством CD34⁺-клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя родовой стресс и позволяет объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

Ключевые слова: пуповинная кровь, мобилизация, CD34⁺-клетки, CD133⁺-клетки, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF HEALTHY NEWBORNS CORD BLOOD CELL COMPOSITION AND G-CSF-MOBILIZED BLOOD FROM HEALTHY DONORS

R.Sh. Ibragimov¹, E.V. Raikina^{1,2}, E.Yu. Osipova^{1,2}, N.N. Zimina³, O.A. Maiorova¹, M.V. Yakovleva², S.A. Roumiantsev^{1,2}

¹Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow;

²Moscow Stem cells bank; ³Moscow Center of family planning and reproduction

Cord blood cell composition is a short-lasting delivery stress consequence and is similar on adult G-CSF-mobilized peripheral blood. G-CSF realizes biological effect by number of secondary messengers, many of which are also natural effectors of stress. In this research comparative characteristics of cell composition, including lymphocytes subpopulations, CD34⁺ and CD133⁺ cells, hematopoietic progenitor cells colony-forming activity and mobilizing cytokines concentration (IL-8, MMP-2, MMP-9), between term newborns cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood is shown.

Mobilized cytokines concentration ratio in combination with CD34⁺ cells count in cord blood and mobilized peripheral blood suggests that delivery stress possibly is not single cause of cord blood features.

Key words: cord blood, mobilization, CD34⁺ cells, CD133⁺ cells, granulocyte colony stimulated factor

Известно, что пуповинная кровь (ПК) не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенности ее клеточного состава являются быстропроходящими последствиями родового стресса, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью [1]. С учетом того, что состав мобилизованной при помощи препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) крови в значи-

тельной степени отличается от физиологического состояния, что обусловлено действием вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния, представляется интересным сравнить клеточный состав ПК с кровью доноров после применения препаратов Г-КСФ.

Ранее было показано, что экспрессия рецептора к Г-КСФ (CD114), через который реализуется эф-

фект Г-КСФ на клетку, на поверхности CD34⁺-клеток довольно незначительна и составляет 4—5% [2—5]. Такой уровень экспрессии рецептора к Г-КСФ дает основания предполагать, что Г-КСФ не оказывает непосредственного влияния на CD34⁺-клетки, а действие его опосредовано другими клетками, несущими на поверхности CD114. Гранулоциты и, в меньшей степени, моноциты имеют большое число рецепторов к Г-КСФ и, вероятно, являются основными мишенями для реализации биологического действия Г-КСФ в организме. Динамика количества клеток в результате использования Г-КСФ демонстрирует нарастание доли CD15⁺CD114⁺-клеток и уменьшение — CD14⁺CD114⁺-клеток за счет более интенсивного роста гранулоцитов в ответ на Г-КСФ во всех исследованных группах [2, 3].

Установлено, что повышение числа CD34⁺-клеток в периферической крови может быть результатом действия других цитокинов [6—14]. В последнее время появились данные о мобилизации CD34⁺-клеток под действием интерлейкина-8 (ИЛ-8). Так, в исследовании J.F. Ruijt и соавт. [15] на макаках-резусах, показано, что ИЛ-8 стимулирует быстрое нарастание уровня фермента матрикс-металлопротеиназы-9 (ММП-9) параллельно со значительным повышением числа CD34⁺-клеток в периферической крови. В исследовании T. Watanabe и соавт. [15] выявлено, что при мобилизации CD34⁺-клеток при помощи Г-КСФ в сыворотке крови происходит 20-кратное повышение уровня ИЛ-8 при отсутствии изменений в концентрации других исследованных цитокинов (макрофагальный воспалительный белок-1α — МВБ-1α, фактор некроза опухоли-α — ФНО-α, интерферон-γ — ИФН-γ) [15].

Эти данные позволяют предположить, что в ответ на связывание Г-КСФ с рецептором зрелые гранулоциты индуцируют секрецию ИЛ-8, который, в свою очередь, вызывает повышение в крови уровня ММП-9, разрушающей молекулы адгезии, фиксирующие CD34⁺-клетки к строме костного мозга, и приводящей таким образом к выходу CD34⁺-клеток в периферическую кровь.

Таким образом, Г-КСФ, вероятно, не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), поскольку реализует свой эффект мобилизации CD34⁺-клеток через клетки-мишени, имеющие рецепторы к Г-КСФ, которыми являются нейтрофильные гранулоциты и, возможно, моноциты [9—11, 16]. Эти клетки после получения сигнала от Г-КСФ инициируют выработку вторичных посредников, которыми могут быть другие цитокины (ИЛ-8, ИЛ-3, гранулоцитарно-макрофагальный КСФ — ГМ-КСФ, SDF-1 — stromal cell-derived factor-1, фактор, продуцируемый стромальными клетками-1) или ферменты (коллагеназы), разрушающие связь CD34⁺-клеток со стромальными элементами костного мозга и усиливающие миграцию CD34⁺-клеток в периферическую кровь [2, 11].

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ПК 1013 доношенных новорожденных, родившихся на 37—41-й (медиана — 40) неделе гестации в ЦПСИР ДЗ и Родильном доме №10 Управления здравоохранения ЮЗАО Москвы в период с 2005 по 2008 г.

Материал мобилизации CD34⁺-клеток крови и кровь 23 здоровых доноров ГСК, которые получали препараты Г-КСФ с целью мобилизации CD34⁺-клеток в периферическую кровь для сбора и последующей аллогенной трансплантации в ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава в период с 2000 по 2008 г.

Получение ПК. ПК получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37—41-я неделя гестации, медиана — 40) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережата и пересечения пуповины производили пункцию ее сосудов специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта СРДА. Сбор крови осуществляли в течение 2—15 мин после родов [< 5 мин — 849 (84,4%) случаев, 5—10 мин — 90 (8,7%) и > 10 мин — 69 (6,9%)] до отделения плаценты ($n=998$, 98,5%). При сборе крови после отделения плаценты ($n=15$, 1,5%) плацента помещалась в специальную стерильную стойку и проводилась аналогичная процедура сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 ч после процедуры сбора ПК.

Определение клеточного состава ПК. Подсчет клеток крови осуществляли следующими методами:

— все 1013 образцов пуповинной крови были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови АВХ Pentra 60 С+ в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов по объему, двумерную диаграмму, отражающую плотность популяции лейкоцитов и ее состав, а также дифференцировку лейкоцитов по 5 параметрам — лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, выявление атипичных лимфоцитов (ALY), больших незрелых клеток (LIC) и нормобластов (NRBC);

— для определения точной морфологической характеристики клеток ПК использовали мазки, окрасенные по методу Паппенгейма — Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая — Грюнвальда и краской Романовского). Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоцитарная формула) проводился при использовании иммерсионных объективов ($\times 40$ и 100). При подсчете лейкоцитарной формулы анализировали не менее 200 клеток;

— число нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100 лейкоцитов).

Определение числа субпопуляций лейкоцитов и ГСК. Количество субпопуляций лейкоцитов и ГСК вычисляли по экспрессии мембранных маркеров (CD — clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, 4, 8, 13, 14, 16, 19, 25, 30, 31, 33, 34, 38, 44, 45, 56, 61, 62L, 62E, 71, 90, 106, 117, 133, HLA-DR при помощи метода проточной цитометрии на приборе FACSCalibur («Becton Dickinson», США).

Определение колониеобразующей активности. Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции ПК определяли двумя методами.

1. Культивирование в течение 14 сут в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста MethoCult 4338, «Stem Cell Tehnologies», Canada) с подсчетом числа колониеобразующих единиц (КОЕ): смешанных — КОЕ-mix; гранулоцитарно-макрофагальных — КОЕ-ГМ; гранулоцитарных — КОЕ-Г; моноцитарных — КОЕ-М; эритроцитарных — КОЕ-Э. Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на 1×10^5 эксплантированных клеток. Для вычисления абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл ПК полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

2. Культивирование в полутвердой среде в системе агаровая капля — жидкая среда в течение 7 сут с расчетом следующих показателей:

— колониеобразующая (КОС) и кластерообразующая (КЛОС) способность — число колоний (малые 20—40, средние — 41—100 и большие — > 100 клеток) и кластеров (малые — 5—9, большие — 10—19) на 1×10^5 эксплантированных клеток;

— ЭК — общее число колоний и кластеров на 1×10^5 эксплантированных клеток;

— для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл крови или костного мозга полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови и на число миелокариоцитов в 1 мл костного мозга;

— пролиферативный потенциал (ПП) — отношение числа колоний к кластерам в культуре.

Определение уровней спонтанного апоптоза и некроза клеток. Устанавливали уровни некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов пуповинной крови. Иссле-

дование проводили при помощи метода проточной цитофлюориметрии двумя способами: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidium iodid (PI) и числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием Annexin V FITC («Phar Mingen») согласно инструкциям производителей.

Результаты реакции анализировали на проточном цитофлюориметре FACScan («Becton Dickinson», США). Обработку полученных данных осуществляли при помощи программы WinMDI 2.8 for Windows. Уровни спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов клеток ПК определяли как сумму PI⁺/Annexin V⁺ и PI⁻/Annexin V⁺-клеток, а уровень некроза — как количество PI⁺/Annexin V⁻-клеток.

Мобилизация ГСК в периферическую кровь. Для мобилизации CD34⁺-клеток у здоровых доноров препараты Г-КСФ вводили в дозе 5—10 мкг/кг/сут в течение 5 дней. На 5-й день от начала стимуляции проводили 1-й сеанс цитафереза.

Получение CD34⁺-клеток периферической крови. Периферические CD34⁺-клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе Baxter CS-3000 Plus. Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Сепарации всегда подвергали постоянный объем

Таблица 1. Клеточный состав Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК ($\times 10^9/\text{л}$)

Показатель	ПК (n=1013)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=23)	p
Лейкоциты	17,24±0,16	32,8±2,2	<0,0001
Нейтрофилы	8,41±0,1	27,6±2	<0,0001
Лимфоциты	5,54±0,06	2,9±0,4	<0,0001
Моноциты	2,42±0,03	2,2±0,4	0,28
Эозинофилы	0,64±0,01	1,2±0,21	<0,0001
Базофилы	0,23±0,01	0,17±0,04	0,37

Таблица 2. Содержание субпопуляций лимфоцитов в Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=62)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
Доля (%) от лимфоцитов:			
CD3 ⁺	56,03±1,67	67,8±3,04	0,002
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,44±1,4	48,76±2,76	0,004
CD3 ⁺ CD8 ⁺	15,65±0,81	19,27±2,07	0,065
CD19 ⁺	14,61±0,62	17,87±3,33	0,115
CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,85±1,83	8,62±0,96	0,169
Абсолютное число ($\times 10^6/\text{мл}$):			
CD3 ⁺	2,07±0,15	2,94±0,08	0,002
CD19 ⁺	0,55±0,06	0,56±0,05	0,928
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1,44±0,1	1,89±0,07	0,016
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,68±0,07	0,78±0,08	0,453
CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,76±0,11	0,36±0,05	0,048

периферической крови (7000 мл), поэтому в зависимости от массы тела за 1 сеанс через гемосепаратор проходило >1 объема циркулирующей крови (ОЦК) донора. Объем ОЦК донора определяли по таблицам в зависимости от массы тела и возраста.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для количественного определения концентрации Г-КСФ, ИЛ-8, ММП-9, ММП-2, тканевых ингибиторов металлопротеиназы (TIMP) 1 и 2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА сэндвич-типа. Принцип этой реакции следующий: антигены исследуемых сывороток реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антителами. После удаления избытка смеси в реакцию вводятся меченные ферментом антитела, которые связываются уже иммобилизованным антигеном. В данном случае ферментативная активность находится в прямо пропорциональной зависимости с количеством антигена в исследуемой сыворотке.

В качестве ферментных меток использовали пероксидазу. При действии фермента на хромоген образуется окрашенный продукт, о содержании которого можно судить по оптической плотности фотометрируемого раствора.

Таблица 3. Количество CD34⁺-клеток в Г-КСФ мобилизованной крови и ПК

Число CD34 ⁺ -клеток	CD34	
	%	мм ³
В ПК доношенных новорожденных: количество наблюдений среднее значение	618 0,827±0,023	618 100±3
В Г-КСФ-мобилизованной периферической крови здоровых доноров: количество наблюдений среднее значение <i>p</i>	23 0,24±0,09 <0,0001	23 44±10 <0,0001

Таблица 4. Число субпопуляций CD34⁺- и CD133⁺-клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=47)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	<i>p</i>
Доля (%) от лимфоцитов:			
CD34 ⁺ CD133 ⁺	0,46±0,05	0,09±0,036	<0,0001
CD34 ⁺ CD133 ⁻	0,31±0,02	0,12±0,031	<0,0001
CD34 ⁺ CD38 ⁻	0,77±0,09	0,19±0,042	<0,0001
CD34 ⁺ CD71 ⁺	0,96±0,1	0,22±0,065	<0,0001
CD34 ⁺ CD62L ⁺	0,59±0,06	0,15±0,045	<0,0001
CD34 ⁺ CD44 ⁺	0,82±0,07	0,26±0,068	<0,0001
CD34 ⁺ CD117 ⁺	0,49±0,05	0,16±0,026	<0,0001
CD34 ⁺ CD61 ⁺	0,45±0,058	0,16±0,053	0,356
CD34 ⁺ CD38 ⁺	0,77±0,086	0,31±0,086	0,006
CD133 ⁺ CD106 ⁺	0,48±0,07	0,1±0,042	0,004
CD133 ⁺ CD31 ⁺	0,88±0,11	0,7±0,24	0,45
Абсолютное число/мкл			
CD34 ⁺ CD133 ⁺	59±7	3±0,9	<0,0001
CD34 ⁺ CD61 ⁺	58±8	5±1,1	<0,0001
CD34 ⁺ CD38 ⁺	103±16	9±1	0,002
CD34 ⁺ CD71 ⁺	131±20	6±0,9	<0,0001
CD133 ⁺ CD106 ⁺	58±8	3±0,9	<0,0001
CD133 ⁺ CD31 ⁺	116±17	20±2	0,002

В настоящем исследовании использовали следующие наборы реагентов: Human MMP-9 (total), Human/mouse MMP-2(total), Human TIMP-2 (Quantikine®, «R&D Systems Inc.», США), Human TIMP-1 («Biosource International Inc.», США), Human ИЛ-8 ELISA Kit II (BD OptEIA™, «BD Biosciences Pharmingen», США). К каждому набору прилагалась собственная инструкция для выполнения эксперимента.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с применением однофакторного дисперсионного анализа и оценок по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена — Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением — с помощью критерия Крускала — Уоллеса и Манна — Уитни. Для оценки равенства долей использовали Z-тест. Корреляционный анализ осуществляли с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена — для рядов с непараметрическим распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Результаты и обсуждение

Сравнение клеточного состава ПК и крови доноров показало, что Г-КСФ мобилизованная периферическая кровь содержит статистически значимо большее число лейкоцитов за счет статистически значимого большего количества нейтрофилов (табл. 1), в то время как число эозинофилов и базофилов не различается, а количество лимфоцитов, напротив, больше в ПК.

Мобилизованная при помощи Г-КСФ периферическая кровь содержит больше CD3⁺-лимфоцитов и меньше CD16⁺CD56⁺ (NK) -клеток (табл. 2).

Если рассматривать ПК с точки зрения идентичного механизма мобилизации при помощи того же набора цитокинов, концентрация которых в ПК повышается в ответ на родовой стресс, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль, что терапевтическая концентрация Г-КСФ в периферической крови выше, чем в ПК, и, соответственно, выше уровень остальных цитокинов, участвующих в процессе мобилизации. Тем не менее число CD34⁺-клеток в Г-КСФ-мобилизованной

крови статистически значимо ниже, чем в ПК (табл. 3) за счет всех исследованных субпопуляций (табл. 4), что дает возможность предположить, что аналог мобилизации в процессе родового стресса является не единственной причиной повышенного количества CD34⁺-клеток в ПК. Это предположение отчасти подтверждается тем, что эффективность клонирования Г-КСФ мобилизованной периферической крови также ниже, чем таковая в ПК, а ГСК в основном представлены гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками (табл. 5).

Уровни спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК статистически значимо не различались, но имели, однако, тенденцию к значительному снижению в Г-КСФ-мобилизованной крови (табл. 6). Этот факт может быть связан с тем, что ПК перед началом тестирования проходила определенные технологические этапы сбора и транспортировки в Банк стволовых клеток, тогда как периферическую кровь у доноров тестировали сразу после сбора, а Г-КСФ, известный как мощный анти-апоптотический фактор [17—19], приводит к выбросу в циркуляцию наиболее жизнеспособных клеток. При этом уровень спонтанного апоптоза CD34⁺-клеток, подавляющая часть которых (96,6±1,2%) находится в G₀-фазе клеточного цикла, был наиболее низким и не различался (табл. 6).

При сравнении уровней Г-КСФ в периферической крови и ПК оказалось, что в ПК показатель Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальное значение сывороточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5—10 мкг/кг/сут в течение 5 сут содержание сывороточного Г-КСФ в крови у доноров возрастает приблизительно в 1000 раз. Таким образом, уровень Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных не отличается от нормального уровня Г-КСФ в сыворотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении числа лейкоцитов и CD34⁺-клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой стресс,

позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ-индуцированной мобилизации лейкоцитов и CD34⁺-клеток. При изучении содержания ИЛ-8 в сыворотке ПК и Г-КСФ-мобилизованной периферической крови показано, что статистически значимое повышение концентрации ИЛ-8 после применения Г-КСФ имело место на всех клинических моделях независимо от степени угнетения кроветворения. При этом концентрация ИЛ-8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 7).

Концентрация ММП-9 в сыворотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как содержание ММП-9 в сыворотке ПК не отличалось

Таблица 5. Эффективность клонирования Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Показатель	ПК (n=226)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
ЭК (×10⁵ эксплантированных мононуклеарных клеток):			
всего	116,8±4,47	19,2±3,6	<0,0001
КОЕ-ГЕММ*	41,95±2,2	1,3±0,6	<0,0001
КОЕ-ГМ	23,22±1,38	7,1±1,2	0,003
КОЕ-Г	20,44±1,04	4,6±0,6	<0,0001
КОЕ-М	15,93±1,14	3,8±0,6	0,007
КОЕ-Э	15,28±1,26	2±0,5	0,007
Число клеток-предшественников в 1 мл:			
всего	5490,2±419,3	478,6±112	0,002
КОЕ-ГЕММ	1789±121,9	38±6	<0,0001
КОЕ-ГМ	1144±117,1	181±24	0,036
КОЕ-Г	988,8±101,9	114±21	0,028
КОЕ-М	875,7±136	94±18	0,141
КОЕ-Э	692,8±76,4	46±11	0,03
Соотношение клеток-предшественников:			
КОЕ-ГЕММ	35,33±1,35	7,9±1,2	<0,0001
КОЕ-ГМ	19,28±0,75	37,8±4,7	<0,0001
КОЕ-Г	18,72±0,77	24,5±3,8	0,067
КОЕ-М	13,69±0,87	20,2±3,7	0,065
КОЕ-Э	12,99±0,88	10,6±2,9	0,495

*КОЕ-ГЕММ — колониеобразующая единица гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарная.

Таблица 6. Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ-мобилизованной крови и ПК

Уровень апоптоз, %	ПК (n=440)	Периферическая кровь после Г-КСФ-мобилизации (n=15)	p
Лейкоциты	9,18±1,19	3,4±0,6	0,387
Лимфоциты	4,32±0,7	3,6±0,15	0,855
Моноциты	15,35±2,02	3,8±0,72	0,309
Гранулоциты	28,22±2,51	2,51±0,67	0,069
CD34 ⁺ -клетки	2,12±0,09	2,74±0,56	0,229

Таблица 7. Концентрация ИЛ-8 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Группа	Число пациентов, абс.	Концентрация ИЛ-8 в сыворотке		P
		до применения Г-КСФ	после применения Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	6,07±0,39	47±6,18	0,022
Дети с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15±44,72	569±159	0,013
Больные медикаментозной цитопенией	21	485±158	1113±250	0,040
ПК	45	19,83±4,93		0,039*

*Здесь и в табл. 8 p — сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Таблица 8. Концентрация ММП-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Группа	Число пациентов, абс.	Концентрация ММП-9 в сыворотке		P
		до применения Г-КСФ	после применения Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	225,4±33,6	3333,8±608,2	<0,0001
Дети с онкогематологическими заболеваниями	5	175±79,7	819,4±254,7	0,043
Больные медикаментозной цитопенией	10	24,2±7,7	826,5±180,3	<0,0001
ПК	45	182,4±23,7		0,521*

от такового в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 8).

Такое соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с числом CD34⁺-клеток в результате мобилизации и в ПК дает возможность

предположить, что хотя наличие родового стресса и позволяет объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

Л и т е р а т у р а

- Baillie K.E., Irvine A.E., Bridges J.M., McClure B.G. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res* 1994;35(2):164-8.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Механизм мобилизующего действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на клетки крови у детей. *Вопр практ педиатр* 2007;(3):23-9.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Экспрессия рецепторов к Г-КСФ и ИЛ; на клетках крови в динамике терапии Г-КСФ. *Клет трансплантол ткан инженер* 2007;(2):61-3.
- Shimoda K., Okamura S., Harada N. et al. High-frequency granuloid colony-forming ability of G-CSF receptor possessing CD 34 antigen positive human umbilical cord blood hematopoietic progenitors. *Exp Hematology* 1992;23:226-8.
- Shinjo K., Takeshita A., Ohnishi K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at a various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymph* 1997;25:37-46.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Концентрация ИЛ-8 и матрикс-металлопротеиназ в сыворотке крови в динамике терапии Г-КСФ. *Клет трансплантол ткан инженер* 2007;(2):43-5.
- Chakrabarti S., Patel K.D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leuk Biol* 2005;78:279-88.
- Domanovic D., Wozniak G., Cernelc P. et al. Matrix metalloproteinase-9 and cell kinetics during the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis. *Transfus Apheres Sci* 2005;33:37-45.
- Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 2005;175:2647-54.
- Jilma B., Hergovich N., Homoncik M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD 114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol* 2000;111:314-20.
- Pruijt J.F., Fibbe W.E., Opendakker G. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10863-8.
- Robinson S.N., Pisarev V.M., Chavez J.M. et al. Use of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or FLT-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells* 2003;21:417-27.
- Robinson S.N., Seina S.M., Gohr J.C. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cell Develop* 2005;14:317-28.
- Thomas D.B., Yoffey J.M. Human fetal haemopoiesis. I. The cellular composition of fetal blood. *Br J Haematol* 1962;8:290-5.
- Watanabe T., Kawano Y., Kanamaru S. et al. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood* 1999;93(4):1157-63.
- Roberts A.W., Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood* 1995;86:1600.
- Philpott N.J., Prue R.L., Marsh J.C. et al. G-CSF-mobilized CD34 peripheral blood stem cells are significantly less apoptotic than unstimulated peripheral blood CD34 cells: role of G-CSF as survival factor. *Br J Haematol* 1997;97(1):146-52.
- Maianski N.A., Mul F.P., van Buul J.D. et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 2002;99(2):672-9.
- Maianski N.A., Roos D., Kuijpers T.W. Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 2004;172(11):7024-30.