



**Ибрагимов Р.Ш.¹, Райкина Е.В.¹, Осипова Е.Ю.^{1,2}, Майорова О.А.¹,
Яковлева М.В.², Румянцев С.А.¹**

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПУПОВИННОЙ И Г-КСФ МОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравоохранения России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

²Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы
Россия, 115516, Москва, Бакинская ул., 31

Клеточный состав пуповинной крови 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 путем ряда вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния. В настоящем 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 (IL-8, MMP-2, MMP-9) в пуповинной крови 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 ante- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

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

**Ibragimov R.Sh.¹, Raikina E.V.¹, Osipova E.Yu.^{1,2}, Maiorova O.A.¹, Yakovleva M.V.²,
Roumiantsev S.A.¹**

CELL COMPOSITION OF CORD BLOOD AND G-SCF-MOBILIZED BLOOD TRANSPLANTATIONAL MATERIAL

¹Federal Research Center of pediatric hematology, oncology and immunology
117/2 Leninskiy pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

²Moscow stem cell bank
31 Bakinskaya st., Moscow, 115516, Russia

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.

Keywords: Cord blood, mobilization, CD34+cells, CD133+cells, granulocyte colony stimulated factor (G-CSF).



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Известно, что пуповинная кровь не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенности клеточного состава ПК являются быстропроходящими последствиями родового стресса, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью [1]. Учитывая тот факт, что состав мобилизованной при помощи препаратов Г-КСФ крови в значительной степени отличается от физиологического состояния, что обусловлено действием множества 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 эффект Г-КСФ на клетку, на поверхности CD34+клеток очень невелика 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 количество рецептора 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 доли CD14+CD114+клеток за счет более интенсивного роста гранулоцитов в ответ на Г-КСФ во всех исследованных группах [2,3].

Известно, что повышение количества CD34+клеток в периферической крови может быть результатом действия других цитокинов [7-14]. В последнее время появились данные о мобилизации CD34+клеток под действием интерлейкина 8 (IL-8). Так, в исследовании PruijtJF et al. [11] на макаках Резус показано, что IL-8 стимулирует быстрое нарастание уровня фермента матрикс-металлопротеиназы-9 параллельно со значительным повышением количества CD34+клеток в периферической крови. В свою очередь, в исследовании Watanabe T et al. показано, что при мобилизации CD34+клеток при помощи Г-КСФ в сыворотке крови происходит 20-кратное повышение уровня IL-8, при отсутствии изменений в концентрации других исследованных цитокинов (MIP-1 α , TNF- α , IFN- γ) [15].

Эти данные позволяют высказать предположение, что в ответ на связывание Г-КСФ с рецептором, зрелые гранулоциты индуцируют секрецию IL-8, который, в свою очередь, вызывает повышение уровня в крови MMP-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, реализуя 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, в свою очередь, получив сигнал от Г-КСФ, инициируют выработку вторичных посредников, которыми могут быть другие цитокины (IL-8, IL-3, GM-CSF, SDF-1) или ферменты (коллагеназы), которые разрушают связь CD34+клеток со стромальными элементами костного мозга и усиливают миграцию CD34+клеток в периферическую кровь [2,11].

Материалом исследования служили:

Пуповинная кровь 1013 доношенных новорожденных, родившихся на 37–41 неделе гестации (медиана составила 40 недель) в ЦПСиР ДЗ г. Москвы (гл. врач – д.м.н., проф. Курцер М.А.) и Родильном доме №10 Управления здравоохранения ЮЗАО г. Москвы (гл. врач – Оземковская Е.П.) за период с 2005 по 2008 год.

Концентрат ПК (n=1013), полученный при помощи седиментации эритроцитов раствором гидроксипропилкрахмала (HES) в ГУЗ «Банк стволовых клеток» ДЗ г. Москвы за период с 2005 по 2008 год.

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 за период с 2000 по 2008 год.

Получение пуповинной крови.

Пуповинную кровь получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37–41 недель гестации (медиана – 40 недель)) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережатия и пересечения пуповины, производили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA. Сбор крови осуществляли в течение 2–15 минут после родов (менее 5 минут – 849 случаев (84,4%), от 5 до 10 минут – 90 случаев (8,7%) и более 10 минут – 69 (6,9%)), до отделения плаценты (n=998 (98,5%)). В случае сбора 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 часов после процедуры сбора ПК.

Процедура получения концентрата клеток пуповинной крови.

Выделение клеточного концентрата, содержащего стволовые клетки, проводилось в асептических условиях, в «чистом» помещении класса D ГУЗ Банк стволовых клеток ДЗМ за период 2005–2008 годы двумя методами: методом двойного центрифугирования и аппаратным методом с помощью аппарата «SepaxS100», Biosafe, Switzerland (539 и 554 образца, соответственно).

Исходный рабочий протокол метода двойного центрифугирования был разработан Нью-Йоркским банком пуповинной крови (P. Rubinstein et al. 1995) Международные стандарты сбора, обработки, тестирования, хранения и отбора пуповинной крови при использовании роботизированного криокомплекса «BioArchive», ThermoGenesis, USA утверждены FDAUSA, NetCord и FАHCT. Плазмоэкстракция проводилась при помощи автоматического плазмоэкстрактора «AutoVolumeExpressor», ThermoGenesis, USA. Введение криопротектора - Диметилсульфоксида (DMSO) – осуществлялось с помощью шприцевого насоса TE-331, TerumoTerufusion, Belgium

Метод автоматического выделения с использованием аппарата «SepaxS100», Biosafe, Switzerland и криокомплекса «BioArchive», ThermoGenesis. Аппарат для сепарации клеток управляется компьютерной программой, в основу



которой заложен принцип спектрометрического анализа фракций крови, а также принцип двойного центрифугирования. Во время первого кровь разделяется на три фракции – клеточная плазма, 1-я порция лейкоцитарного концентрата и эритроциты; во время второго происходит разделение на бесклеточную плазму, 2-ю порцию лейкоцитарного концентрата и остаточные эритроциты. Для обработки пуповинной крови этим методом использовались комплекты для автоматической обработки пуповинной крови “SepaxCS-530”, Biosafe, Switzerland. DMSO вводилось при помощи аппарата для перемешивания и охлаждения концентрата пуповинной крови “CoolmixAS-210”, Biosafe, Switzerland.

Все обработанные образцы были подвергнуты криоконсервации в роботизированном криокомплексе “BioArchive”, ThermoGenesis, USA. Непосредственно перед криоконсервацией, в каждый образец добавлялся криопротектор DMSO в смеси с декстраном-40 в количестве 20% от объема конечного продукта для предотвращения разрушения клеток концентрата пуповинной крови под воздействием сверхнизких температур. Затем концентрат помещался в металлическую канистру и погружался в программном замораживателе криокомплекса в пары азота для предварительного охлаждения и его предзаморозки по заданному температурному профилю до -50°C . Процесс начинается с охлаждения до -1°C . Затем следует этап предзаморозки со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -11°C . Конечным этапом является постзаморозка со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -50°C . Данный профиль, полученный экспериментальным путем фирмой-производителем ThermoGenesis, USA совместно с Нью-Йоркским банком пуповинной крови, контролируется программно. Затем канистра с образцом автоматически погружается криокомплексом в жидкий азот с температурой -196°C в заранее автоматически выбранную пустую ячейку для бессрочного хранения. Каждая ячейка имеет свой индивидуальный адрес хранения.

Определение клеточного состава пуповинной крови.

Подсчет клеток крови производился двумя методами:

1) все 1013 образцов пуповинной крови были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови AVXPentra 60 C+ 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 так же дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам – лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, выявление атипичных лимфоцитов (ALY), больших незрелых клеток (LIC) и нормобластов (NRBC);

2) для точной морфологической характеристики клеток пуповинной крови использовали мазки пуповинной крови, окрашенные 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 $\times 100$). При подсчете лейкоцитарной формулы анализировали не менее 200 клеток;

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

Определение количества субпопуляций лейкоцитов и стволовых клеток

Количество субпопуляций лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток определяли по экспрессии мембранных маркеров (CD – clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD16, CD19, CD25, CD30, CD31, CD33, CD34, CD38, CD44, CD45, CD56, CD61, CD62L, CD62E, CD71, CD90, CD106, CD117, CD133, HLA-DR «BectonDickinson», США при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCalibur «BectonDickinson», США.

Определение колониеобразующей активности

Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции пуповинной крови определяли двумя методами:

1. культивирование в течение 14 суток в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста «MethoCult 4338, StemCellTehnologies, Canada) с подсчетом количества КОЕ-mix, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

• Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на 1×10^5 эксплантированных клеток

• Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл пуповинной крови, 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 суток с расчетом следующих показателей:

• колониеобразующая (КОС) и кластерообразующая (КлОС) способность – число колоний (малые – 20–40 клеток, средние – 41–100 клеток и большие – более 100 клеток) и кластеров (малые – 5–9 клеток, большие – 10–19 клеток) на 1×10^5 эксплантированных клеток.

• эффективность клонирования (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 уровня спонтанного апоптоза и некроза клеток

Определяли уровень некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов пуповинной крови. Исследование проводили при помощи проточной цитофлюориметрии двумя методами: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidiumiodid (PI) и определение числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием Annexin V FITC («PharMingen»), согласно инструкциям производителей.

Результаты реакции анализировали на проточном цитофлюориметреFACScan («BectonDickinson», США). Обработку полученных данных производили при помо-



щи программы WinMDI 2.8 for Windows. Уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов пуповинной крови определяли как сумму PI+/Annexin V+ и PI-/Annexin V+ клеток, а уровень некроза, как количество PI+/Annexin V- клеток.

Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь.

Для мобилизации CD34+ клеток у здоровых доноров препараты Г-КСФ вводились в дозе 5-10 мкг/кг/сут в течение 5 дней. На пятый день от начала стимуляции проводили первый сеанс цитафереза.

Получение CD 34+ клеток периферической крови.

Периферические CD34+ клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе «BaxterCS-3000 Plus». Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Сепарации всегда подвергали постоянный объем периферической крови (7000 мл), поэтому в зависимости от массы тела, за один сеанс через гемосепаратор проходило более одного объема циркулирующей крови донора. Объем циркулирующей крови (ОЦК) донора определяли по таблицам в зависимости от массы тела и возраста.

Иммуноферментный анализ.

Для количественного определения концентрации G-CSF, IL-8, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа.

Принцип реакции следующий: антигены исследуемых сывороток реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антителами. После удаления избытка смеси в реакцию вносятся 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.

В настоящем исследовании использовали следующие наборы реагентов: «HumanMMP-9 (total)», «Human/mouseMMP-2(total)», «HumanTIMP-2» («Quan-tikine» R&DSystemsInc., USA), «HumanTIMP-1» (BiosourceInternationalInc., USA), «HumanIL-8 ELISAKitII» (BDOptEIA™ BDBiosciencesPharmingen, USA). К каждому набору прилагалась собственная инструкция для выполнения эксперимента.

Статистическая обработка.

Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с помощью однофакторного дисперсионного анализа и оценкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена-Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением с помощью критерия Крускалла-Уоллеса и критерия Манна-Уитни. Для оценки равенства долей использовали Z-тест. Корреляционный анализ проводили 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

Клеточный состав пуповинной и Г-КСФ-мобилизованной периферической крови

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

Таблица 1

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

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

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

Таблица 2

Содержание субпопуляций лимфоцитов в Г-КСФ мобилизованной и ПК

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

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 пуповинной и, соответственно, выше уровень остальных цитокинов, участвующих в процессе мобилизации. Тем не менее, количество 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 в ПК, а ГСК, в основном, представлены гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками (табл. 5).

Таблица 3

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

Параметры	CD34 (%)	CD34 (в мм ³)
Количество CD34+клеток в ПК доношенных новорожденных		
Количество наблюдений	618	618
Среднее значение	0,827 ± 0,023	100 ± 3
Количество CD34+клеток в Г-КСФ мобилизованной периферической крови здоровых доноров		
Количество наблюдений	23	23
Среднее значение	0,24 ± 0,09	44 ± 10
P	p<0,0001	p<0,0001

Таблица 4

Количество субпопуляций CD34+ и CD133+клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=47	n=15	
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 количество /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

Таблица 5

Эффективность клонирования Г-КСФ мобилизованной крови и ПК

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=226	n=15	
ЭК (105эксплантационных мононуклеарных клеток)			
Суммарное количество	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±0,5	0,007
Количество клеток-предшественников в 1 мл			
Суммарное количество	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

Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК статистически значимо не различался, имея, 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 БСК, тогда как периферическую кровь у доноров тестировали сразу после сбора, а Г-КСФ, известный как мощный антиапоптотический 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).

Таблица 6

Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=440	n=15	
Апоптоз лейкоцитов (%)	9,18±1,19	3,4±0,6	0,387
Лимфоцитов	4,32±0,7	3,6±0,15	0,855
Моноцитов	15,35±2,02	3,8±0,72	0,309
Гранулоцитов	28,22±2,51	2,51±0,67	0,069
CD34+ клеток	2,12±0,09	2,74±0,56	0,229

При сравнении уровня Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК уровень Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальный уровень сыровороточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5-10 мкг/кг в сутки в течение 5 суток, уровень сыровороточного 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 количества 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 уровня IL-8 в сыворотке ПК и Г-КСФ мобилизованной периферической крови было показано, что статистически значимое повышение концентрации IL-8 после применения Г-КСФ было отмечено на всех клинических моделях, независимо от степени угнетения кровотока. При этом, концентрация IL 8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 7).

Таблица 7

Концентрация IL-8 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация IL 8 в сыворотке		p
		до Г-КСФ	после Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	6,07 ± 0,39	47,0 ± 6,18	0,022
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15 ± 44,72	569,0 ± 159,0	0,013
Лечение медикаментозной цитопении	21	485,0 ± 158,0	1113,0 ± 250,0	0,040
Пуповинная кровь	45	19,83 ± 4,93		0,039*

*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Концентрация MMP-9 в сыворотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как концентрация MMP-9 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 8).

Таблица 8.

Концентрация MMP-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация MMP-9 в сыворотке		p
		до Г-КСФ	после Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	225,4 ± 33,6	3333,8 ± 608,2	< 0,0001
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	5	175,0 ± 79,7	819,4 ± 254,7	0,043
Лечение медикаментозной цитопении	10	24,2 ± 7,7	826,5 ± 180,3	< 0,0001
Пуповинная кровь	45	182,4 ± 23,7		0,521*

*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Такое 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.

Клеточный состав трансплантационного материала после процедур процессинга

В результате использования технологий, предложенных стандартом NetCord/FACT, получен трансплантационный материал, содержащий ГСК ПК. Учитывая возможность потери и перераспределения количество различных клеток в результате процессинга, концентрат ПК, готовый к криоконсервации был подробно исследован для определения количества и жизнеспособности ГСК. Результаты были сравнены с показателями трансплантационного материала, полученного при помощи стандартной сепарации (BaxterCS3000 Plus) периферической крови после проведения курса Г-КСФ у здоровых доноров. Показано, что количество лейкоцитов в продукте цитафереза значительно выше, чем в концентрате ПК (табл. 9), причем представлены они, в основном, лимфоцитами, в отличие от концентрата ПК, половину лейкоцитарного пула которого составляют гранулоциты.

Таблица 9

Клеточный состав трансплантационного материала (×10⁶/мл)

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 1013	n = 15	
Лейкоциты ×10 ⁶ /мл	39,0±0,48	188,4±16,3	<0,0001
Нейтрофилы ×10 ⁶ /мл	18,3±0,27	25,8±2,91	<0,0001
Лимфоциты ×10 ⁶ /мл	13,1±0,19	119,3±11,74	<0,0001
Моноциты ×10 ⁶ /мл	5,2±0,08	37,5±4,1	<0,0001
Эозинофилы ×10 ⁶ /мл	1,1±0,02	2,86±0,53	<0,0001
Базофилы ×10 ⁶ /мл	0,2±0,02	1,12±0,17	<0,0001

Продукт цитафереза содержит значительно большее количество всех субпопуляций лимфоцитов (табл. 10).

Таблица 10

Субпопуляции лимфоцитов в трансплантационном материале

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 62	n = 15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD3+	53,91±1,62	70,0±3,08	<0,0001
CD3+CD4+	38,15±1,4	46,2±2,91	0,014
CD3+CD8+	14,37±0,8	22,1±2,64	<0,0001
CD19+	16,04±0,69	16,3±2,52	0,889
CD16+CD56+	15,16±1,57	12,61±1,74	0,444
Абсолютное количество (×10 ⁶ /мл)			
CD3+	8,29±0,63	82,8±6,24	<0,0001
CD19+	2,39±0,27	19,4±2,71	<0,0001
CD3+CD4+	5,72±0,5	56,6±4,63	<0,0001
CD3+CD8+	2,26±0,23	27,4±3,01	<0,0001
CD16+CD56+	3,68±0,01	14,6±2,39	<0,0001



Доля CD34+клеток была статистически значимо выше в продукте цитафереза, тогда как доля CD133+клеток статистически значимо выше в концентрате ПК. Однако, абсолютное количество ГСК статистически значимо выше в продукте цитафереза Г-КСФ мобилизованной периферической крови (табл. 11).

Таблица 11

Субпопуляции ГСК в трансплантационном материале

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 47	n = 15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD34+ (*)	1,37±0,029	1,13±0,25	0,44
CD34+CD133+	0,44±0,05	0,08±0,029	<0,0001
CD34+CD133-	0,56±0,16	0,72±0,029	0,577
CD34+CD38-	0,74±0,08	0,86±0,09	0,43
CD34+CD71+	0,79±0,09	1,02±0,09	0,176
CD34+CD62L+	0,61±0,06	0,87±0,08	0,028
CD34+CD44+	0,9±0,08	1,14±0,017	0,165
CD34+CD117+	0,46±0,04	0,1±0,03	<0,0001
CD34+CD61+	0,42±0,05	0,72±0,16	0,02
CD34+CD38+	0,74±0,074	1,1±0,12	0,018
CD133+CD106+	0,46±0,06	0,21±0,08	0,035
CD133+CD31+	0,8±0,08	0,84±0,22	0,832
Абсолютное количество /мкл			
CD34+ (*)	810±43	1256±126	0,23
CD34+CD133+	196±24	95±28	0,03
CD34+CD61+	198±35	857±112	<0,0001
CD34+CD38+	353±56	1309±217	<0,0001
CD34+CD71+	383±71	1124±198	<0,0001
CD133+CD106+	193±26	250±44	0,28
CD133+CD31+	367±46	1001±206	<0,0001

* - для расчетов общего количества CD34+клеток в концентрате ПК n = 1095

При этом эффективность клонирования выше в концентрате ПК, но абсолютное количество клеток предшественников всех линий гемопоэза, в том числе КОЕ-ГЕММ и КОЕ-Э, значительно выше в продукте цитафереза, тем не менее, основное количество клеток-предшественников в нем представлено гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками, в отличие от концентрата ПК, где преобладают наиболее ранние предшественники гемопоэза (КОЕ-ГЕММ) (табл. 12). Уровень спонтанного апоптоза остается также ниже в продукте цитафереза Г-КСФ мобилизованной периферической крови в отличие от концентрата ПК, повторяя картину ПК и периферической крови до проведения соответствующих процедур процессинга (табл. 13).

Таблица 12

Эффективность клонирования трансплантационного материала

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 178	n = 15	
ЭК (105 эксплантированных мононуклеарных клеток)			
Суммарное количество	104,7±8,3	87,63±12,34	0,555
КОЕ-ГЕММ	35,24±0,6	16,4±3,1	<0,0001
КОЕ-ГМ	22,22±0,82	26,31±3,17	0,17
КОЕ-Г	17,78±0,87	21,2±2,64	0,271
КОЕ-М	12,92±0,78	16,3±2,19	0,223
КОЕ-Э	16,53±0,33	9,2±1,6	<0,0001

Продолжение табл. 12

Количество клеток-предшественников в 1 мл.			
Суммарное количество	21997±1259	94680±8826	<0,0001
КОЕ-ГЕММ	7158±426	14198±2361	<0,0001
КОЕ-ГМ	4382±228	24356±3117	<0,0001
КОЕ-Г	3626±296	19768±2726	<0,0001
КОЕ-М	2607±244	17126±2644	<0,0001
КОЕ-Э	3406±212	12232±1421	<0,0001
Соотношение клеток-предшественников.			
КОЕ-ГЕММ	33,65±1,72	18,34±1,93	0,011
КОЕ-ГМ	21,22±0,81	29,4±1,12	0,004
КОЕ-Г	16,98±0,83	23,71±1,17	0,021
КОЕ-М	12,34±0,76	18,23±0,93	0,027
КОЕ-Э	15,78±0,84	10,29±0,86	0,061

Таблица 13

Уровень спонтанного апоптоза клеток трансплантационного материала

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
Апоптоз лейкоцитов (%)	11,26±1,37	3,8±0,56	0,054
Лимфоцитов	4,42±0,77	3,4±0,58	0,639
Моноцитов	15,06±2,67	4,2±0,81	0,149
Гранулоцитов	29,17±2,96	2,7±0,78	0,002
CD34+ клеток	2,27±0,12	2,61±0,23	0,327

При сравнении уровня Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК уровень Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальный уровень сыровоточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг в сутки в течение 5 суток, уровень сыровоточного Г-КСФ в крови у доноров возрастает приблизительно в 1000 раз. Таким образом, уровень Г-КСФ в сыровотке ПК доношенных новорожденных не отличается от нормального уровня Г-КСФ в сыровотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении количества 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 уровня IL-8 в сыровотке ПК и Г-КСФ мобилизованной периферической крови было показано, что статистически значимое повышение концентрации IL-8 после применения Г-КСФ было отмечено на всех клинических моделях, независимо от степени угнетения кроветворения. При этом, концентрация IL 8 в сыровотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 14).

Таблица 14

Концентрация IL-8 в сыровотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация IL 8 в сыровотке		p
		До Г-КСФ	После Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	6,07 ± 0,39	47,0 ± 6,18	0,022
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15 ± 44,72	569,0 ± 159,0	0,013
Лечение медикаментозной цитопении	21	485,0 ± 158,0	1113,0 ± 250,0	0,040
Пуповинная кровь	45	19,83 ± 4,93		0,039*

*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.



Концентрация ММР-9 в сыворотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как концентрация ММР-9 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 15).

Таблица 15

Концентрация ММР-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация ММР-9 в сыворотке		p
		До Г-КСФ	После Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	225,4 ± 33,6	3333,8 ± 608,2	< 0,0001
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	5	175,0 ± 79,7	819,4 ± 254,7	0,043
Лечение медикаментозной цитопении	10	24,2 ± 7,7	826,5 ± 180,3	< 0,0001
Пуповинная кровь	45	182,4 ± 23,7		0,521*

*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что сывороточные концентрации IL-8 и ММР-9 значительно повышаются в результате использования Г-КСФ, причем степень этого повышения обратно пропорциональна их первоначальной концентрации. Концентрация другой матрикс-металлопротеиназы – ММР-2, также предполагающейся на роль посредника в реализации мобилизующего действия Г-КСФ, в результате его использования не меняется. Не меняется и концентрация в сыворотке естественных ингибиторов ММР-9 и ММР-2 – TIMP-I и TIMP-II. То есть, из наших данных следует, что эффективность мобилизации, как гранулоцитов, так и ГСК зависит от степени повышения сывороточной концентрации IL-8 и ММР-9.

При исследовании спонтанного апоптоза клеток крови перед началом введения Г-КСФ оказалось, что его уро-

вень у детей при развитии медикаментозной цитопении достоверно выше, чем у пациентов при мобилизации аутологичных CD34+клеток.

Г-КСФ известен как мощный антиапоптотический фактор. В настоящем исследовании было изучено влияние Г-КСФ на уровень спонтанного апоптоза клеток крови и костного мозга. Основанием для этого является предположение о том, что потеря стволовыми клетками связи со стромальным микроокружением при выходе в циркуляцию приводит к снижению их жизнеспособности и увеличению склонности к спонтанному апоптозу. С другой стороны, возможно, увеличение количества CD34+клеток и гранулоцитов периферической крови в ответ на Г-КСФ связано с блокированием в них программы апоптоза и, как следствие, повышением продолжительности их жизни.

Было установлено, что применение Г-КСФ привело к снижению уровня спонтанного апоптоза клеток крови и костного мозга, в том числе, гранулоцитов и CD34+клеток.

Такое изменение уровня спонтанного апоптоза может быть связано как с прямым антиапоптотическим действием Г-КСФ на клетки крови и костного мозга, так и с выходом в циркуляцию большого количества клеток с меньшим уровнем апоптоза за счет мобилизующего эффекта Г-КСФ.

Итак, результаты работы демонстрируют некоторые аспекты механизма действия Г-КСФ на систему кроветворения, подтверждающиеся при всех основных вариантах клинического использования Г-КСФ: при выполнении мобилизации CD34+клеток у здоровых доноров и у пациентов в ремиссии онкогематологических заболеваний, а также при коррекции цитостатическими угнетенного кроветворения. Основная роль в процессе реализации биологического действия Г-КСФ принадлежит зрелым гранулоцитам и моноцитам, имеющим рецепторы к Г-КСФ, а влияние на ГСК осуществляется путем процесса мобилизации, основными участниками которого являются провоспалительный цитокин IL-8 и матрикс-металлопротеиназа-9, финальным процессом является, по-видимому, деструкция связи ГСК со стромальными элементами костного мозга и миграция ГСК в периферический кровоток.

ЛИТЕРАТУРА

- Baillie KE, Irvine AE, Bridges JM, McClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery // *Pediatr Res.* - 1994 Feb. - №35(2). - P.164-8.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Механизм мобилизующего действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на клетки крови у детей // *Вопросы практической педиатрии.* - 2007. - №3. - С.23-29.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Экспрессия рецепторов к Г-КСФ и IL8 на клетках крови в динамике терапии Г-КСФ // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2007. - №2. - С.61-63.
- Shimoda K, Okamura S, Harada N. et al. High-frequency granulocyte colony-forming ability of G-CSF receptor possessing CD 34 antigen positive human umbilical cord blood hematopoietic progenitors // *Exp Hematology.* - 1992. - №23. - P.226-228.
- 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 Lymphoma.* - 1997. - №25. - P.37-46.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Концентрация IL-8 и матрикс-металлопротеиназ в сыворотке крови в динамике терапии Г-КСФ // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2007. - №2. - С.43-45.
- Chakrabarti S., Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils // *Journal of Leukocyte Biology.* - 2005. - №78. - P.279-288.
- Domanovic D., Wozniak G., Cernelc P. et al. Matrix metalloproteinase-9 and cell kinetics during the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis // *Transfusion and Apheresis Science.* - 2005. - №33. - P.37-45.
- Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor // *Immunol.* - 2005. - №175. - P.2647-2654.
- 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. - P.314-320.
- Pruijt JF, Fibbe WE, 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. - P.10863-10868.



12. Robinson SN, Pisarev VM, Chavez JM. 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. – P.417-427.
13. Robinson SN, Seina SM, Gohr JC. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9 //Stem Cells and Development. – 2005. - №14. – P.317-328.
14. Thomas DB, Yoffey JM. Human fetal haemopoiesis. I. The cellular composition of fetal blood //Br.J.Haemat. - 1962. - №8. – P.290-295.
15. 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). – P.1157-1163.
16. Roberts AW, Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines //Blood. – 1995. - №86. – P.1600.
17. Philpott NJ., Prue RL., Marsh JC. 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). – P.146-152.
18. Maianski NA, Mul FP, van Buul JD, Roos D, Kuijpers TW. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils //Blood. - 2002 Jan 15. - №99(2). – P.672-9.
19. Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW. 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 Jun 1. - №172(11). – P.7024-30.

ПОСТУПИЛА: 18.10.2010