

# ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ CD34<sup>+</sup> КЛЕТОК У ДЕТЕЙ ПРИ РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ ВОСПАЛЕНИЯ

Долгушин И.И.<sup>1</sup>, Пешикова М.В.<sup>1</sup>, Бабик Р.К.<sup>1</sup>,  
Малахова С.И.<sup>2</sup>, Жуковская Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Росздрава», г. Челябинск

<sup>2</sup> ГЛПУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница», г. Челябинск

**Резюме.** Изучены особенности мобилизации CD34<sup>+</sup> клеток у детей на фоне различных заболеваний с учетом типа и распространенности воспалительного ответа. Установлено, что у детей на фоне острых тяжелых инфекций с признаками синдрома системного воспалительного ответа происходит достоверное повышение абсолютного и процентного содержания циркулирующих CD34<sup>+</sup> клеток; у часто болеющих детей на фоне острых эпизодов и у детей на фоне аллергических заболеваний в период обострения — значимое снижение процентного числа CD34<sup>+</sup> клеток в кровотоке. При этом у детей с аллергиями и часто болеющих детей в период ремиссии отклонений CD34<sup>+</sup> клеток от нормальных показателей не обнаружено.

**Ключевые слова:** CD34<sup>+</sup> клетки, воспаление, дети.

*Dolgushin I.I., Peshikova M.V., Babik R.K., Malakhova S.I., Zhukovskaya E.V.*

## FEATURES OF CD34<sup>+</sup> CELL KINETICS IN CHILDREN WITH DIFFERENT KINDS OF INFLAMMATION

**Abstract.** Characteristics of CD34<sup>+</sup> cells mobilization were studied in children suffering with various diseases, like as their dependence on type and extent of inflammatory response. It was revealed that the children with signs of systemic inflammatory response syndrome exhibit a significant increase of absolute content and percentage of circulating CD34<sup>+</sup> cells, whereas children with frequent infections, and with clinical signs of allergy during recurrence of their chronic allergic disease showed a significant decrease in CD34<sup>+</sup> cell percentage. Meanwhile, children with allergoses, and those with common recurrent infectious states did not reveal any deviations in CD34<sup>+</sup> cells from normal values. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 319-324)

**Keywords:** CD34<sup>+</sup> cells, inflammation, children.

## Введение

В состоянии гомеостаза большинство гемопоэтических клеток-предшественников удерживаются внутри костного мозга, лишь небольшая их часть непрерывно покидает его пределы и выходит в периферическую кровь. Лейкоцитоз — хорошо изученный патофизиологический

механизм, направленный на противостояние инфекции, обусловленный поэтапным высвобождением клеточных элементов из костного мозга. Мобилизация CD34<sup>+</sup> клеток происходит при нарушении баланса между прикреплением и высвобождением стволовых клеток. Если прикрепление обеспечивается специфической архитектурой костного мозга, молекулами адгезии и продукцией хемокинов, удерживающих фенотипически незрелые клетки в костном мозге, то мобилизация — результат действия «периферических» хемокинов (IL-8 и др.) и ремоделирования матрикса и базальной мембраны энзимами матрикса (коллагеназа-В или матриксметаллопротеиназа-9 (ММР-9) и др.) [4]. Концепция циркулирующих стволовых клеток впервые

### Адрес для переписки:

Пешикова Маргарита Валентиновна  
454006, Россия, г. Челябинск, ул. Российская, 63,  
корп. «б», кв. 145.

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН

Тел.: (351) 232-74-56.

Факс: (351) 731-61-88.

E-mail: peshikova@mail.ru

была представлена в начале XX века А.А. Максимовым [17], значительно позже было экспериментально доказано их присутствие в циркуляции [15]. Данные о кинетике CD34<sup>+</sup> клеток на фоне воспалительного процесса скудны и противоречивы. Так, например, F. Mastrandrea и соавт. (2005) сообщают, что у пациентов с аллергическим воспалением содержание циркулирующих CD34<sup>+</sup> клеток достоверно выше, чем у пациентов с лихорадкой инфекционного генеза и доноров [16]. Другими же исследователями установлено, что у пациентов с аллергическими заболеваниями, как в период ремиссии, так и в период обострения, по сравнению со здоровыми лицами, сопоставимыми по гендерному признаку, уровень CD34 лимфоцитов в периферической крови не изменяется [1, 6, 8]. У пациентов с острыми вирусными гепатитами В, С, В+С [5, 13], у детей с септическими осложнениями химиотерапии гемобластозов [9] и острой кишечной инфекцией [10], а также на фоне системного воспаления [21] описано значимое повышение содержания фенотипически незрелых клеток в циркуляции и прямая корреляция с уровнем С-реактивного белка [21]. Отсутствие стратификации пациентов по тяжести воспаления, гетерогенность групп и средний уровень доказательности (нет мультицентровых исследований по данной проблеме) не позволяют судить о закономерностях мобилизации фенотипически незрелых клеток.

Учитывая универсальность механизмов воспаления, не зависящих от этиологии патологического процесса, а также опираясь на результаты собственных исследований и приведенные выше данные других авторов, мы сформулировали гипотезу о том, что тяжесть воспалительной реакции коррелирует с уровнем CD34<sup>+</sup> клеток в кровотоке.

**Цель** — изучить особенности мобилизации CD34<sup>+</sup> клеток у детей на фоне различных воспалительных процессов с учетом типа (острый или хронический) и распространенности (локальный или генерализованный) воспалительного ответа.

## Материалы и методы

В проспективное исследование вошли 183 ребенка от 1 года до 16 лет, средний возраст  $6,4 \pm 0,5$ , соотношение мальчиков и девочек 1,6:1. Стратификацию пациентов на группы осуществляли с учетом типа воспаления и выраженности воспалительного субстрата: I группа — «острые тяжелые

инфекции с признаками синдрома системного воспалительного ответа (ССВО)» [14] — 25 детей с тяжелыми инфекционными осложнениями цитостатической терапии различных онкогематологических заболеваний — гемобластозы, солидные опухоли (на момент обследования все дети были в состоянии клинко-гематологической ремиссии по основному заболеванию); II группа — «острые инфекции без признаков ССВО» — 68 часто и длительно болеющих детей, из них 32 — на фоне острых инфекционных эпизодов, 36 — в период ремиссии; III группа — «хронические аллергические заболевания» — 90 детей с хроническими аллергическими заболеваниями (давность заболевания не менее 6 мес.) — бронхиальная астма, круглогодичный или сезонный аллергический ринит, атопический дерматит и др., из них 48 — в период обострения, 42 — в период ремиссии.

Контрольную группу составили 55 здоровых детей, сопоставимые по гендерному признаку, выявленные на медицинском профилактическом осмотре, не состоящие на учете у аллерголога-иммунолога, не имевшие на момент обследования острых и хронических заболеваний инфекционной и неинфекционной природы и маркеров воспаления.

Для подсчета стволовых кроветворных клеток в периферической крови руководствовались принципами, предложенными International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE, 1995) [22].

1) Подсчет абсолютного количества лейкоцитов на гематологическом анализаторе LH-500 (Beckman Coulter, США).

2) Определение витальности и иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови в многопараметрическом анализе с поэтапным гейтированием на проточном лазерном цитофлуориметре «Facs Canto II» (Becton Dickinson, США) с использованием витального красителя 7-аминоактиномицина-Д (7-AAD), моноклональных антител CD45, меченных изотиоцианатом флуоресцеина (CD45 FITC) и CD34, меченных фикоэритрином (CD34 PE), реагентов пробоподготовки и контроля качества производства Beckman Coulter, США; Becton Dickinson, США.

Наличие маркера CD45 характерно для лейкоцитов, является общелейкоцитарным антигеном; CD34 — экспрессируется на мембране гемопоэтических клеток-предшественников, эндотелии, нейронах, выполняет функцию межклеточной адгезии [7].

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ, ЛИМФОЦИТОВ И 7-AAD-CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТНОГО ПЕРИОДА

Возрастной период	Стат. показат.	Показатели/единицы измерения			
		Лейкоциты (абс)	Лимфоциты (%)	CD34 лимфоциты	
				%	абс.
1-6 лет	n	29	29	29	29
	M±m	7,39±0,46	42,89±2,06*	0,1±0,03	0,003±0,001
7-17 лет	n	26	26	26	26
	M±m	6,49±0,45	35,65±2,43	0,16±0,04	0,003±0,0008

**Примечание.** Использовали критерий Манна–Уитни; отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ ; \* – достоверное отличие детей в возрасте 1-6 лет от детей в возрасте 7-17 лет.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ, ЛИМФОЦИТОВ И 7-AAD-CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА

Пол	Стат. показат.	Показатели/единицы измерения			
		Лейкоциты (абс)	Лимфоциты (%)	CD34 лимфоциты	
				%	абс.
Мальчики	n	39	39	39	39
	M±m	7,12±0,44	38,73±2,03	0,1±0,03	0,002±0,0006
Девочки	n	16	16	16	16
	M±m	6,61±0,37	40,88±2,86	0,17±0,06	0,005±0,002

**Примечание.** Использовали критерий Манна–Уитни; отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ, ЛИМФОЦИТОВ И 7-AAD-CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ НА ФОНЕ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Нозология		Стат. показат.	Показатели/единицы измерения			
			Лейкоциты (абс)	Лимфоциты (%)	CD34 лимфоциты	
					%	абс.
Аллергозы (период обострения)	n	48	48	48	48	48
	M±m	7,48±0,47*	39,83±3,81*	0,06±0,01 * ** ***	0,002±0,0002*	
Аллергозы (период ремиссии)	n	42	42	42	42	42
	M±m	6,61±0,51*	38,9±2,88*	0,12±0,03*	0,003±0,001*	
Часто болеющие (острые инфекционные эпизоды)	n	32	32	32	32	32
	M±m	8,87±1,21*	37,89±2,56*	0,08±0,02* ***	0,002±0,0005*	
Часто болеющие (период ремиссии)	n	36	36	36	36	36
	M±m	8,07±0,5*	43,37±2,58*	0,11±0,03*	0,004±0,001*	
Инфекции с признаками ССВО	n	25	25	25	25	25
	M±m	0,85±0,45***	80,0±3,65***	0,83±0,03***	0,008±0,001***	
Здоровые дети	1-6 лет	n	29	29	55	55
		M±m	7,39±0,46	42,89±2,06	0,16±0,04*	0,002±0,0004*
	7-17 лет	n	26	26		
		M±m	6,49±0,45	35,65±2,43		

**Примечания.** Использовали критерий Манна–Уитни; отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ ; \* – достоверное отличие от пациентов с инфекциями с признаками ССВО; \*\* – достоверное отличие пациентов в периоде обострения от пациентов в периоде ремиссии; \*\*\* – достоверное отличие пациентов от здоровых доноров.

7-AAD витальный краситель — реагент, способный интеркалироваться между цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК и позволяющий дифференцировать живые и неживые клетки с помощью проточной цитометрии; применение этого красителя удобно в комбинации с антителами, мечеными FITC и PE, поскольку 7-AAD-ДНК-комплекс имеет минимальное перекрытие спектра с вышеупомянутыми флуорохромами [20].

3) Абсолютные значения субпопуляций лимфоцитов вычислялись двух-платформенным методом [22].

Исследования проводили на базе ГЛПУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница», Челябинск.

Данные, обработанные методами вариационной статистики, выражали в виде среднего арифметического значения и его стандартной ошибки. При объеме выборки больше 20 наблюдений проверялась статистическая гипотеза о нормальности распределения данных по критерию Колмогорова—Смирнова; в случае принятия нулевой гипотезы использовались параметрические критерии; при множественном сравнении применялась поправка Бонферрони. Результаты исследований обрабатывали на ПЭВМ IBM с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» [2].

## Результаты и обсуждение

Установлено, что у здоровых детей содержание циркулирующих CD34<sup>+</sup> клеток не зависит от гендерного признака ребенка ( $p > 0,05$ ) (табл. 1, 2).

Изучая кинетику фенотипически незрелых клеток у пациентов на фоне различных патологических состояний обнаружено достоверное повышение процентного и абсолютного числа CD34 лимфоцитов в кровотоке детей с инфекцией, протекающей с признаками ССВО по сравнению как со здоровыми детьми ( $p = 0,000001$ ), так и детьми с аллергическими заболеваниями ( $p = 0,000001$ ) и часто болеющими ( $p = 0,000001$ ) (табл. 3). Феномен повышенной мобилизации фенотипически незрелых клеток у пациентов данной группы уже был зафиксирован нами ранее при использовании другого способа учета реакции иммунофлюоресценции [19].

Нами не отмечено существенных различий в содержании CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> клеток у детей с аллергиями и часто болеющих детей в период ремиссии по сравнению со здоровыми детьми ( $p > 0,05$ ) (табл. 3).

В периферической крови детей с аллергическими заболеваниями в период обострения и часто болеющих детей на фоне острых эпизодов процентное число CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> клеток значительно ниже, чем у здоровых детей ( $p = 0,002$  и  $p = 0,02$ , соответственно). При этом у детей с аллергопатологией уровень изучаемой популяции лимфоцитов ниже (в виде тенденции), чем у часто болеющих детей ( $p = 0,05$ ) (табл. 3).

Наиболее хорошо изучен G-CSF-индуцированный механизм повышения в периферической крови уровня CD34<sup>+</sup> клеток [11]. G-CSF реализует эффект мобилизации гемопоэтических стволовых клеток через клетки-мишени, имеющие к нему рецепторы, а именно, нейтрофилы, моноциты. В ответ на инфекцию, под действием IL-8, коллагеназа-B (MMP-9) быстро высвобождается из гранул нейтрофилов, разрушает молекулы адгезии, фиксирующие зрелые нейтрофилы, лимфоциты в тканях и паравасальных пространствах, а также CD34<sup>+</sup> клетки к строме костного мозга и происходит их миграция из тканевых депо в периферическую кровь. Возможно существование и других пусковых механизмов и путей реализации эффекта мобилизации фенотипически незрелых клеток ( $\alpha 4\beta 1$ -интегрин-зависимый и CXCR4/CXCL12-зависимый механизмы), что подтверждают недавние экспериментальные исследования [18].

В нашем исследовании прослеживаются особенности реагирования фенотипически незрелых клеток в ответ на различные типы и распространенность воспалительного ответа. Так, например, при тяжелых острых инфекциях с признаками ССВО происходит повышение CD34<sup>+</sup> клеток в кровотоке, что вероятно связано с феноменом мобилизации последних под влиянием вышеперечисленных факторов. При хроническом аллергическом воспалении и на фоне повторяющихся инфекционных эпизодов у часто болеющих детей мы видим снижение CD34<sup>+</sup> клеток, происходящее, на наш взгляд, за счет потребления пула стволовых кроветворных клеток на фоне относительно низкого уровня провоспалительных цитокинов, не способного обеспечить значимой по объему мобилизации фенотипически незрелых клеток из костного мозга. Считается, что при хроническом стрессе период восстановления становится малозаметным или совсем отсутствует и организм плавно переходит в состояние вторичной иммунологической недостаточности со стероидозависимой инволюцией лимфоидных органов [3]. Однако отсутствие изменений в абсолютных показате-



лях при подобных состояниях может говорить о компенсаторных возможностях организма и способности к восстановлению, в отличие от септического процесса, где изменения затрагивают и абсолютные значения. Рассматривая развитие инфекции как один из видов стресса, а лейкоцитоз — как универсальный тип клеточных реакций, можно предположить, что описанная кинетика стволовых клеток соответствует проявлениям адаптационного синдрома различного уровня [12].

## Заключение

Соответствие между содержанием CD34<sup>+</sup> клеток в периферической крови и особенностью воспалительного ответа формирует предпосылки для использования кинетики клеточного пула стволовых кроветворных клеток для биомониторинга тяжести воспаления. Дальнейшее изучение параметров стрессоустойчивости, в том числе, клеточных реакций организма человека, призвано обеспечить разработку мероприятий по модификации стрессопосредованных реакций.

## Список литературы

1. Биргер О.В. Анализ лабораторных показателей иммунной системы у больных спонтанной формой вторичного иммунодефицита и аллергическими заболеваниями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2002. — 24 с.
2. Боровиков В.П. Statistica: искусство анализа данных на компьютере. — СПб.: Питер, 2001. — 656 с.
3. Виноградов В.В. Стресс и патология. — Минск: Белорус. наука, 2007. — 351 с.
4. Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. Стволовые клетки в клеточной терапии // *Вопр. гематол./онкол. и иммунопатол. в педиатрии*. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 7-13.
5. Ефремов Д.В. Взаимодействие нитроксидергической и иммунной систем при острой HBV/HCV-инфекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2003. — 24 с.
6. Квятковская С.В. Иммунные механизмы и критерии прогноза развития аллергического процесса у здоровых лиц с «латентной сенсibilизацией» и у больных с аллергопатологией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2004. — 24 с.
7. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. — М. Тверь: Триада, 2005. — 168 с.
8. Маркина О.В. Состояние иммунной системы у больных атопическим дерматитом в сочетании с другими аллергиями и в комбинации с хроническими воспалительными заболеваниями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2003. — 24 с.
9. Пешикова М.В. Клинико-иммунологические особенности инфекционных осложнений у детей с острым лимфобластным лейкозом и не-В-клеточными неходжкинскими лимфомами, получающих химиотерапию по протоколу BFM-ALL-90(M): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2004. — 24 с.
10. Пшениснова А.С. Клинико-иммунологическая характеристика эшерихиозной инфекции и оценка эффективности лечения у детей раннего возраста: Автореф. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2006. — 24 с.
11. Румянцев С.А., Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. Механизмы Г-КСФ-индуцированной мобилизации гемопоэтических стволовых клеток // *Вопр. гематол./онкол. и иммунопатол. в педиатрии*. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 5-9.
12. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. — М.: Медгиз, 1960. — 255 с.
13. Смирнова Н.В. Особенности влияния реаферона на состояние иммунной системы и продукцию оксида азота у больных острыми вирусными гепатитами В и С: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2004. — 24 с.
14. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis // *Chest*. — 1992. — N 101. — P. 1644-1655.
15. Goodman J.W., Hodgson G.S. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice // *Blood*. — N 19. — 1962. — P. 702-714.
16. Mastrandrea F., Coradduzza G., Resta F., Cadario G., Rollo M.A., Marengo F., Mazza P., Pajno G., Di Pasquale G., Minardi A., Scarcia G., Serio G. Increased CD34<sup>+</sup> cell peripheral traffic appears to be an unique feature of the allergic inflammation // *Allerg. Immunol. (Paris)*. — 2005. — Vol. 37, N 1. — P. 30-33.
17. Maximow A.A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium // *Physiol. Rev.* — N 4. — 1924. — P. 533-563.
18. Papayannopoulou T., Scadden D.T. Stem-cell ecology and stem cells in motion // *Blood*. — 2008. — Vol. 111, N 8. — P. 3923-3930.
19. Peshikova M.V., Zhukovskaya E.V. CD34-positiv cell — the marker of the infections // *Medical*

and Pediatric Oncology: abstr. of SIOP XXXV meeting. – Cairo, Egypt, – Vol. 41, N 4. – 2003. – P. 336.

20. Schmid I., Uittenbogaart C.H., Keld B., Giorgi J.V. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry // J. Immunol. Methods. – 1994. – N 170. – P. 145.

21. Schömig K., Busch G., Steppich B., Sepp D., Kaufmann J., Stein A., Schömig A., Ott I. Interleukin-8 associated with circulating CD133<sup>+</sup> progenitor cells in acute myocardial infarction // Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27. – P. 1032-1037.

22. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34<sup>+</sup> cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering // J. Hematotherapy. – 1996. – Vol. 5, N 3. – P. 213-226.

*поступила в редакцию 10.02.2010*

*отправлена на доработку 22.02.2010*

*принята к печати 27.02.2010*