

КОСТНО-МОЗГОВЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

¹Хонина Н.А., ²Черных Н.П., ²Сланова С.П., ³Дударева А.В., ¹Пронкина Н.В.,
²Кузьмин А.А., ³Пасман Н.М., ¹Черных Е.Р.

¹ФБГУ научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии,
Новосибирск, e-mail: nkhonina@mail.ru;

²Новосибирский Государственный медицинский университет, Новосибирск;

³Новосибирский Государственный университет, Новосибирск

Проведено исследование содержания CD34⁺CD45⁺ циркулирующих гемопоэтических предшественников и уровня С-реактивного белка (СРБ) у беременных с физиологической и осложненной гестацией в I и III триместрах. Полученные данные не выявили различий в содержании CD34⁺CD45⁺ клеток и концентрации СРБ у беременных в I триместре с отсутствием гестационных осложнений (n = 29) и с угрозой самопроизвольного выкидыша (n = 11). При физиологической беременности (n = 16) число CD34⁺CD45⁺ клеток в III триместре значимо возрастало, и было достоверно выше, чем у беременных с гестозом. Уровень СРБ, напротив, был достоверно выше у беременных с гестозом (n = 13) и преэклампсией (n = 7). У беременных с синдромом задержки развития плода регистрировалась тенденция к более низкому числу CD34⁺CD45⁺ клеток. Следовательно, мобилизация CD34⁺CD45⁺ наиболее выражена в III триместре при физиологическом течении беременности и отсутствует у женщин с поздними гестационными осложнениями.

Ключевые слова: гемопоэтические костно-мозговые предшественники, С-реактивный белок, беременность, гестационные осложнения

BONE MARROW HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN WOMEN WITH PHYSIOLOGICAL PREGNANCY AND PREGNANCY COMPLICATIONS

¹Khonina N.A., ²Chernykh N.P., ²Slanova S.P., ²Dudareva A.V., ¹Pronkina N.V.,
²Kuzmin A.A., ³Pasman N.M., ¹Chernykh E.R.

¹FBGU Research Institute for Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, e-mail: nkhonina@mail.ru;

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

³Novosibirsk State University, Novosibirsk

The content of circulating CD34⁺CD45⁺ hematopoietic progenitor cells and C-reactive protein (CRP) levels in pregnant women with physiological pregnancy and pregnancy complications in I and III trimesters was evaluated. No significant differences of CD34⁺CD45⁺ cells and CRP concentration in normal pregnant (n = 29) and pregnant with risk of spontaneous abortion (n = 11) were found. The number of CD34⁺CD45⁺ cells in the III trimester of normal pregnancy increased and was significantly higher than in women with mild preeclampsia (n = 13). In contrast, CRP levels was significantly higher in pregnant with mild and severe preeclampsia (n = 7). The number of CD34⁺CD45⁺ cells in pregnant with fetal growth retardation was a lower than in women without syndrome. Consequently, the CD34⁺CD45⁺ mobilization is most increased in the III trimester in normal pregnancy and was absent in women with preeclampsia. In pregnant with fetal growth retardation was a trend to a lower number of cells

Keywords: bone marrow hematopoietic precursors, C-reactive protein, pregnancy, pregnancy complications

Костномозговые предшественники (КМП), включающие гемопоэтические предшественники (ГП) и эндотелиальные прогениторные клетки (ЭП), играют важную роль в эндотелиальном гомеостазе и неоваскуляризации. Мобилизация КМП при стресс-индуцирующих и повреждающих воздействиях обеспечивается выбросом провоспалительных цитокинов и рассматривается в качестве одного из механизмов репаративного ответа. Кроме того, индукторами мобилизации КМП могут выступать половые гормоны – прогестерон и эстроген, которые не только рекрутируют КМП в циркуляцию, но и предохраняют их от старения и гибели [9]. Однако, значение феномена

мобилизации КМП при беременности остается во многом неясным. Хорошо известно, что процессы ангиогенеза и васкулогенеза во время беременности играют ведущую роль в обеспечении фето-плацентарной васкуляризации, обеспечивающей нормальное развитие плаценты. Учитывая способность КМП продуцировать проангиогенные факторы, можно полагать, что циркулирующие КМП могут опосредовать и активировать процессы васкулогенеза и ангиогенеза. С другой стороны в последние годы появились данные об иммуномодулирующих свойствах КМП, которые связывают с продукцией иммуносупрессорных цитокинов/медиаторов (IL-6, SDF-1, VEGF), способно-

стью индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов и стимулировать генерацию регуляторных Т-клеток [1]. В этом аспекте циркулирующие КМП могут способствовать формированию иммунологической толерантности, обеспечивающей физиологическое течение беременности. Соответственно, снижение эффективности мобилизации КМП может быть сопряжено с развитием патологии беременности вследствие нарушения процессов плацентации и формирования иммунологической толерантности.

Данные литературы о содержании циркулирующих КМП при физиологической и осложненной беременности немногочисленны и неоднозначны. Что касается содержания $CD45^+CD34^+$ клеток при беременности, то в работе Васса с соавторами показано их наличие в децидуальной ткани и возможность дифференцировки в натуральные киллерные клетки [10]. В исследованиях, касающихся динамики ЭП при беременности, показано нарастание числа $CD45^{dim}CD34^+KDR^+$ клеток в течение гестационного процесса [5] и снижение этих клеток у женщин с преэклампсией (ПЭ) [3, 5]. Противоположные результаты были получены Matsubara с соавторами, которые не нашли различий в содержании $CD34^+CD133^+VEGFR2^+$ клеток у небеременных и беременных в первом триместре гестации, выявили снижение доли ЭП в динамике физиологической беременности и не обнаружили различий в количестве этих клеток у женщин с ПЭ и здоровых беременных [6].

Развитие гестационных осложнений сопряжено как с эндотелиальной дисфункцией, так и с воспалительным процессом, который сопровождается повышением продукции провоспалительных цитокинов и медиаторов. Одним из чувствительных биомаркеров системной воспалительной реакции является С-реактивный белок (СРБ), уровень которого существенно повышен у беременных с ПЭ [8]. Системная воспалительная реакция вызывают мобилизацию КМП, однако в высоких концентрациях провоспалительные цитокины способны оказывать токсическое действие на прогениторные клетки. Поэтому развитие системной воспалительной реакции может негативно влиять на количество КМП.

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе планировалось охарактеризовать количественное содержание гемопозитических предшественников при физиологической беременности, а также у женщин с осложненной гестацией и исследовать взаимосвязь между количеством циркулирующих ГП и уровнем С-реактивного белка.

Материалы и методы исследования

Работа основана на результатах иммунологического и клинико-лабораторного обследования беременных, которое включало ультразвуковое исследование плода, доплерографию, кардиотокографию, клинико-лабораторные, биохимические и иммунологические исследования. Степень тяжести гестационных осложнений оценивалась по совокупности клинических и лабораторных показателей, данных УЗИ, КТГ и доплерометрии. В исследование были включены 60 беременных и 16 небеременных женщин репродуктивного возраста. В I триместре было обследовано 40 беременных, из них у 29 женщин (группа 1) беременность протекала без осложнений, у 11 женщин (группа 2) была диагностирована угроза самопроизвольного выкидыша (УСВ). Сформированные группы были сопоставимы по возрасту ($27,6 \pm 0,8$ vs $28,3 \pm 0,9$ лет; соответственно) и срокам гестации ($9,5 \pm 0,5$ vs $8,4 \pm 0,8$; соответственно). Шестнадцать женщин с физиологической беременностью (из группы 1) были обследованы повторно в III триместре. Отдельную группу составили 20 беременных в III триместре, имеющих поздние гестационные осложнения, включая 13 – с тяжелыми формами гестоза и 7 – с преэклампсией. Беременные с физиологической и осложненной беременностью в III триместре были сопоставимы по возрасту ($28,5 \pm 1,0$ vs $30,2 \pm 1,1$ лет; соответственно) и срокам гестации ($31,0 \pm 1,0$ vs $29,5 \pm 1,1$; соответственно). На момент исследования у всех беременных отсутствовали хронические заболевания в стадии обострения, острые инфекционные заболевания, эндокринная патология, тяжелая экстрагенитальная патология. Контрольная группа небеременных включала 16 фертильных женщин без отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза, с регулярным менструальным циклом. Средний возраст женщин составил $29,6 \pm 2,9$.

Иммунологическое обследование осуществляли с информированного согласия женщин. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколл-гипак ($p = 1,078$). Количественное содержание гемопозитических ($CD34^+CD45^+$) предшественников оценивали методом проточной цитометрии (Becton Dickinson, США) с использованием анти- $CD45$ mAb, меченных FITC (BD PharMingen, San Diego, CA, США), анти- $CD34$ mAb, меченных PE с применением программы Cell Quest (рисунок). Абсолютное содержание $CD34^+CD45^+$ клеток рассчитывали по формуле – лейкоциты $\times 10^6/L \times CD34^+CD45^+$ (%). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

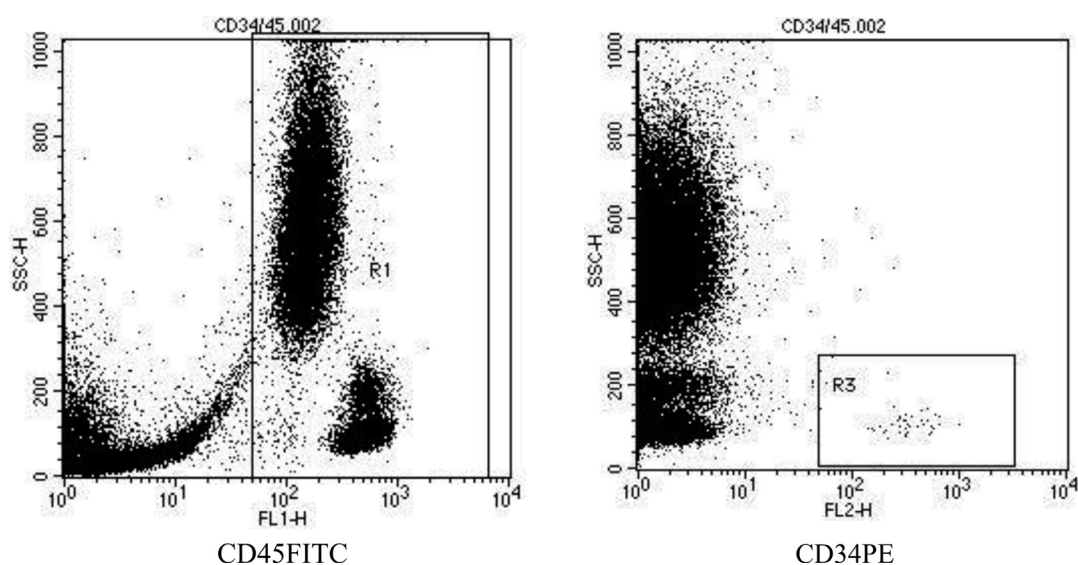
Оценка $CD34^+45^+$ клеток в периферической крови небеременных фертильных женщин показала, что абсолютное количество ГП варьировало от $0,69$ до $3,89 \times 10^9/L$ клеток. У женщин с физиологической беременностью в I триместре гестации

достоверных различий с группой небеременных не регистрировалось (табл. 1). Однако, индивидуальный анализ показал, что в 44% случаев (13/29) содержание ГП превышало верхнюю границу интерквартильного диапазона (у небеременных женщин). У беременных с УСВ содержание $CD34^+CD45^+$ клеток также значимо не отличалось от такового у небеременных. Индивидуальный анализ выявил превышение верхней границы нормативного диапазона в 36% случаев (4/11). Концентрация СРБ как у женщин с физиологической беременностью, так и у беременных с УСВ находилась в пределах нормативного диапазона. При этом уровень СРБ не зависел от содержания ГП.

Сравнение количества циркулирующих ГП в группе 16 женщин с физиологическим течением беременности в I и III триместре выявило значимое возрастание абсолютного содержания $CD34^+CD45^+$ клеток по мере увеличения гестационного срока (табл. 2). Так количество ГП в III триместре было почти в 3 раза выше, чем в I триместре. При этом частота беременных с повышенным уровнем $CD34^+CD45^+$ клеток составляла 75% (12/16). Возрастание доли ГП регистрировалось на фоне увеличения абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов. Также регистрировалась тенденция к возрастанию относительного содержания $CD34^+45^+$ клеток. В то же время, несмотря на возрастание ГП в III триместре беременности, уровень СРБ в эти сроки не отличался от такового в I триместре.

Далее было проведено сравнительное исследование показателей мобилизации ГП в группах женщин в III триместре физиологической и осложненной беременности (табл. 3). Беременные с гестозом отличались от женщин с физиологической беременностью достоверно более низким содержанием $CD34^+CD45^+$ клеток. Если у женщин с неосложненной гестацией возрастание ГП наблюдалось в 75% случаев (12/16), то у беременных с гестозом – только в 7% случаев (1/13). Более того, содержание ГП при гестозе было сравнимо с показателями у небеременных женщин. Характерно, что низкое содержание ГП у беременных с гестозом регистрировалось на фоне повышенного уровня СРБ. Более того, анализ корреляционной зависимости между концентрацией СРБ в сыворотке крови и количеством ГП у женщин в III триместре беременности выявил достоверную обратную взаимосвязь между указанными параметрами ($r_{sp} = -0,46$; $p > 0,05$).

В группе беременных с ПЭ снижение содержания $CD34^+CD45^+$ клеток было менее выраженным и проявлялось в виде тенденции, что было обусловлено значительной вариабельностью количества ГП ($0,9 \times 10^6/L - 8,2 \times 10^6/L$). Возрастание ГП наблюдалось у 3 из 7 беременных (42%), тогда как у 4 беременных количество $CD34^+CD45^+$ клеток оставалось в пределах нормативного диапазона. Уровень СРБ у беременных с ПЭ в 7 раз превышал аналогичный показатель у женщин с физиологической беременностью, однако не коррелировал с количеством ГП.



CD45⁺CD34⁺ клетки были выделены путем последовательного гейтирования

Таблица 1

Содержание циркулирующих предшественников костномозговых клеток у женщин в I триместре гестации и небеременных женщин

Параметры	Группы		
	Небеременные (n = 16)	Беременные 1 триместр (n = 29)	Беременные с УСВ (n = 11)
Лейкоциты x10 ⁶ /L	5,1 (4,3–6,1)	5,0 (3,7–7,4)	5,5 (4,3–6,1)
Лимфоциты x10 ⁶ /L	1,8 (1,3–2,5)	1,7 (1,0–2,0)	1,4 (1,1–1,8)
CD34 ⁺ 45 ⁺ (%)	0,04 (0,03–0,08)	0,03 (0,03–0,06)	0,03 (0,02–0,07)
CD34 ⁺ 45 ⁺ x10 ⁶ /L	1,9 (0,9–2,7)	1,65 (1,2–2,5)	1,35 (0,8–2,8)
СРБ мг/L	2,0 (1,8–2,5)	1,6 (0,1–2,1)	1,7 (0,6–1,8)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и значений интерквартильного диапазона.

Таблица 2

Содержание циркулирующих предшественников костномозговых клеток у беременных в I и III триместрах гестации

Параметры	Группы	
	Беременные I триместр (n = 16)	Беременные III триместр (n = 16)
Лейкоциты x10 ⁶ /L	5,5 (4,2–7,1)	8,7 (6,8–10,6)*
Лимфоциты x10 ⁶ /L	1,7 (1,0–2,0)	2,4 (2,1–2,9)*
CD34 ⁺ 45 ⁺ x10 ⁶ /L	1,3 (0,9–2,6)	3,7 (2,7–6,0)*
CD34 ⁺ 45 ⁺ (%)	0,03 (0,02–0,05)	0,046 (0,03–0,06)
СРБ мг/L	1,5 (0,01–1,3)	1,2 (0,6–2,0)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и значений интерквартильного диапазона; * p < 0,05 – достоверность различий между группами беременных.

Таблица 3

Содержание циркулирующих предшественников костномозговых клеток у женщин с физиологической и осложненной беременностью

Параметры	Группы		
	Физиологическая беременность (n = 16)	Беременные с гестозом (n = 13)	Беременные с ПЭ (n = 7)
Лейкоциты x10 ⁶ /L	8,7 (6,8–10,6)	7,8 (6,6–10,3)	10,5 (7,7–13,8)
CD34 ⁺ 45 ⁺ x10 ⁶ /L	3,7 (2,7–6,0)	1,9 (0,8–2,2)**	2,5 (0,9–4,4)
СРБ мг/L	1,2 (0,6–2,0)	5,3 (2,6–15,4)*	8,5 (2,5–27)*

Примечание. * p < 0,05; **p < 0,01 – достоверность различий между группами с физиологической беременностью и с осложненной беременностью (гестозом и ПЭ).

Таблица 4

Содержание циркулирующих предшественников костномозговых клеток в группах женщин с гестозом с наличием и отсутствием СЗРП

Параметры	Группы	
	СЗРП (–), n = 10	СЗРП (+), n = 10
Лейкоциты x10 ⁶ /L	7,6 (6,6–9,2)	9,4 (7,7–13,1)
Лимфоциты x10 ⁶ /L	1,7 (1,3–2,3)	1,5 (1,4–2,1)
CD34 ⁺ 45 ⁺ (%)	0,03 (0,02–0,05)	0,01 (0,009–0,03)
CD34 ⁺ 45 ⁺ x10 ⁶ /L	2,2 (1,0–2,5)	1,3 (0,9–2,5)
СРБ мг/L	5,3 (2,6–8,5)	8,1 (3,9–18,2)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и значений интерквартильного диапазона.

Следует отметить, что у 3 из 13 беременных с тяжелым гестозом и у всех беременных с ПЭ регистрировался СЗРП. Сравнительное исследование между беременными с наличием и отсутствием СЗРП выявило тенденцию к более низкому содержанию CD34⁺45⁺ клеток и повышению СРБ у женщин с наличием СЗРП (табл. 4).

В обзоре литературы представлены немногочисленные данные об изменении КМП в динамике гестационного процесса, при этом в большинстве случаев исследования касаются популяции ЭП. Результаты, полученные авторами, достаточно противоречивы, так как в одних работах отмечается повышение числа ЭП [5], в других – снижение ЭП в III триместре гестации [6]. Изменения в содержании другой популяции КМП, гемопоэтических прекурсоров, показаны при сердечно-сосудистой патологии и воспалительных процессах. В нашей работе мы проанализировали содержание CD34⁺CD45⁺ клеток у беременных в I и III триместрах гестации. Полученные данные выявили тенденцию к повышению содержания CD34⁺CD45⁺ клеток у женщин при наступлении беременности (по сравнению с группой небеременных). При этом сходные тенденции к увеличению доли ГП регистрируются как при физиологической беременности, так и у женщин с УСВ. Характерно, что в динамике физиологической беременности доля CD34⁺CD45⁺ клеток нарастает и в III триместре уже значительно отличается от содержания КМП у небеременных и беременных в I триместре. Мобилизация КМП в циркуляцию при беременности может быть обусловлена повышением продукции эстрогенов при беременности и формированием фето-плацентарного комплекса (ФПК). Так, в экспериментальной работе Shing с соавторами показано наличие рецепторов к эстрогенам на ГП и непосредственное влияние на них эстрадиола [4].

Наиболее частым осложнением второй половины беременности является фето-плацентарная недостаточность (ФПН), развитие которой ассоциировано с эндотелиальной дисфункцией, что в свою очередь приводит к развитию у беременных гестоза и ПЭ. В литературе имеются данные о более низком содержании ЭП у беременных с ПЭ [3], либо отсутствии различий в их содержании [5, 6]. В своей работе мы провели сравнительное исследование содержания ГП у женщин в III триместре физиологической и осложненной беременности. Согласно полученным данным у женщин с гестозом

выявлено достоверно более низкое число CD34⁺CD45⁺ клеток по сравнению с беременными, не имеющими осложнений. В группе беременных с ПЭ выявлена тенденция к снижению доли циркулирующих ГП. При исследовании влияния СЗРП на мобилизацию ГП было выявлено снижение их количества в 1,7 раза у беременных с СЗРП, но различия проявлялись в виде тенденции. Сходные данные о снижении ЭП у беременных с СЗРП были получены Monga с соавторами [7].

Роль ГП при беременности не ограничивается их участием в нео- и васкулогенезе, в работе Vassa с соавторами показано наличие в децидуальной ткани CD34⁺CD45⁺ клеток, которые способны дифференцироваться в киллерные клетки [10].

Снижение содержания ГП при развитии гестационных осложнений может быть обусловлено системным воспалительным ответом, который сопровождается усилением продукции провоспалительных цитокинов и биологически активных факторов (СРБ). Согласно данным литературы повышенный уровень СРБ регистрируется у женщин с гестационными осложнениями [2]. Также известно, что СРБ обладает способностью повреждать сосудистую стенку, снижать выживаемость, дифференцировку и активность КМП [8]. В нашем исследовании у женщин в III триместре регистрировалось повышение числа ГП, но уровень СРБ не изменялся. У беременных с гестозом и ПЭ доля ЭП снижалась, а уровень СРБ повышался. Из данных литературы известно о супрессорной активности КМП [1], поэтому снижение доли ГП может быть одной из причин повышения СРБ. Возможно, что нарушение физиологической иммуносупрессии при беременности и, как следствие, срыв толерантности, приводит к развитию системного воспалительного ответа. С другой стороны высокий уровень СРБ может приводить к усилению апоптоза ГП. Полученные данные не позволяют однозначно интерпретировать результаты, необходимы дальнейшие исследования.

Представленные результаты об изменении содержания ГП в динамике беременности и при развитии осложнений свидетельствуют об их участии в гестационном процессе. Мобилизация ГП наиболее выражена в III триместре гестации, только у женщин с физиологическим течением беременности и отсутствует при развитии гестационных осложнений. Снижение содержания ГП может служить косвенным биомаркером развития гестоза и ПЭ.

Список литературы

1. Bedke T., Pretsch L., Karakhanova S., Enk A.H., Mahnke K. (2010). Endothelial Cells Augment the Suppressive Function of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells: Involvement of Programmed Death-1 and IL-10 // *J. Immunol.* 184, 5562–70.
2. Cemgil Arikian D., Aral M., Coskun A., Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2012. – Vol. 25, № 9. – P. 1569–73.
3. Heimrath J., Paprocka M., Czekanski A., Ledwozyw A. Pregnancy-induced hypertension is accompanied by decreased number of circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitor cells // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2014. – Vol. 62, № 4. – P. 353–6.
4. Illing A., Liu P., Ostermay S., Schilling A., de Haan G. Estradiol increases hematopoietic stem and progenitor cells independent of its actions on bone // *Haematologica.* – 2012. – Vol. 97, № 8. – P. 1131–35.
5. Luppi P., Powers R.W., Verma V., Edmunds L. Maternal Circulating CD34+VEGFR-2⁺ and CD133+ VEGFR-2⁺ Progenitor Cells Increase During Normal Pregnancy but Are Reduced in Women With Preeclampsia // *Reprod. Sci.* – 2010. – Vol. 17. – P. 643–652.
6. Matsubara K., Abe E., Matsubara Y., Kameda K., Ito M. Circulating endothelial progenitor cells during normal pregnancy and pre-eclampsia // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2006. – Vol. 56, № 2. – P. 79–85.
7. Monga R., Buck S., Sharma P., Thomas R., Chouthai N.S. Effect of preeclampsia and intrauterine growth restriction on endothelial progenitor cells in human umbilical cord blood // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2012. – Vol. 25, № 11. – P. 2385–89.
8. Rebelo F., Schlüssel M.M., Vaz J.S., Franco-Sena A.B. C-reactive protein and later preeclampsia: systematic review and meta-analysis taking into account the weight status // *J. Hypertens.* – 2013. Vol. 31, № 1. – P.16–26.
9. Strehlow K., Werner N., Berweiler J. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107, № 24. – P. 3059–65.
10. Vacca P., Vitale C., Nontaldo E., Conte R. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 108, № 6. – P. 2402–07.