

## Содержание эндотелиальных клеток-предшественников в пуповинной крови у доношенных и недоношенных новорожденных

И.Г. Попова, С.Б. Назаров, Г.Н. Кузьменко, Н.В. Крошкина, Н.Ю. Сотникова, Н.В. Харламова

Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова Минздрава России, Иваново, Россия

## Features of the content of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood of pre-term and full-term newborns

I.G. Popova, S.B. Nazarov, G.N. Kuzmenko, N.V. Kroshkina, N. Yu. Sotnikova, N.V. Kharlamova

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood n.a. V.N. Gorodkova of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

**Цель исследования:** определение содержания циркулирующих эндотелиальных клеток в пуповинной крови для оценки регенераторного потенциала эндотелия у новорожденных. Обследованы 29 новорожденных младенцев: 18 недоношенных детей (гестационный возраст 30–35 нед) и 11 доношенных детей (гестационный возраст 38–41 нед). У всех детей проводили определение в смешанной пуповинной крови количества циркулирующих эндотелиальных клеток, их фенотипирование осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител, меченных флуорохромами. Циркулирующие эндотелиальные клетки определяли как CD45<sup>–</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>, CD34<sup>–</sup>, эндотелиальные клетки-предшественники – как CD45<sup>–</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>. Выявлено, что у недоношенных новорожденных в пуповинной крови снижено как общее количество циркулирующих эндотелиальных клеток, так и количество эндотелиальных клеток-предшественников по сравнению с доношенными. Причем у недоношенных выше процент эндотелиальных клеток-предшественников, чем зрелых эндотелиоцитов. У доношенных новорожденных в крови больше содержание зрелых эндотелиоцитов по сравнению с эндотелиальными клетками-предшественниками, и их количество повышается при увеличении массы тела при рождении. Снижение количества эндотелиальных клеток-предшественников у недоношенных новорожденных ассоциировано с нарушением эндотелиальной функции. Клетки CD45<sup>–</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> участвуют в репарации поврежденного эндотелия, и снижение их числа в крови отражает снижение его регенераторного потенциала.

**Ключевые слова:** новорожденные дети, недоношенные, доношенные, пуповинная кровь, стволовые клетки, циркулирующие эндотелиальные клетки, эндотелиальные клетки-предшественники.

**Для цитирования:** Попова И.Г., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Крошкина Н.В., Сотникова Н.Ю., Харламова Н.В. Содержание эндотелиальных клеток- предшественников в пуповинной крови у доношенных и недоношенных новорожденных. Рос вестн перинатол и педиатр 2018; 63:(4): 58–62. DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-4-58-62

**The purpose of the study:** determination of content of circulating endothelial cells in umbilical cord blood in order to assess the regenerative potential of the endothelium in newborns. 29 newborn babies were examined: 18 pre-term infants (gestational age 30–35 weeks) and 11 full-term infants (gestational age 38–41 weeks). Determination of the number of circulating endothelial cells was determined in mixed umbilical cord blood of all children their phenotyping was carried out by cytofluorometry method using fluorochromes-labeled monoclonal antibodies. Circulating endothelial cells were defined as CD45<sup>–</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>, CD34<sup>–</sup>, endothelial progenitor cells were defined as CD45<sup>–</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>. It was revealed that in umbilical cord blood of pre-term infants was decreased both the total number of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells compared to full-term infants. Moreover, in pre-term infants was observed higher percentage of endothelial progenitor cells, rather than mature endothelial cells. In blood of full-term infants was observed higher percentage of mature endothelial cells compared to endothelial progenitor cells and their number increases with increasing birth weight of the newborn. The decrease in the number of endothelial progenitor cells in pre-term infants is associated with impaired endothelial function. CD45<sup>–</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells are involved in reparation of damaged endothelium and reduction in their number in the blood reflects the reduction of its regenerative potential.

**Key words:** newborns, pre-term infants, full-term infants, umbilical cord blood, stem cells, circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells.

**For citation:** Popova I.G., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Kroshkina N.V., Sotnikova N. Yu., Kharlamova N.V. Features of the content of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood of pre-term and full-term newborns. Ros Vestn Perinatol i Pедиатр 2018; 63:(4): 58–62 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-4-58-62

© Коллектив авторов, 2018

**Адрес для корреспонденции:** Попова Ирина Геннадьевна – к.м.н., научн. сотр. лаборатории клинической биохимии, врач клинической лабораторной диагностики Ивановского НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова, ORCID: 0000-0003-1836-3523

Назаров Сергей Борисович – д.м.н., проф., зам. директора института по научной работе, зав. лабораторией клинической биохимии и генетики Ивановского НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова, ORCID: 0000-0003-1545-7655

Кузьменко Галина Николаевна – д.м.н., вед. научн. сотр. лаборатории клинической биохимии, зав. клинико-диагностической лабораторией Ивановского НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова, ORCID: 0000-0001-5772-9271

Крошкина Наталья Владимировна – к.б.н., научн. сотр. лаборатории клинической иммунологии Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова, ORCID: 0000-0002-0428-6945

Сотникова Наталья Юрьевна – д.м.н., проф., зав. лабораторией клинической иммунологии Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова, ORCID: 0000-0002-0608-0692

Харламова Наталья Валерьевна – д.м.н., вед. научн. сотр. отдела неонатологии и клинической неврологии детского возраста, проф. кафедры акушерства и гинекологии, неонатологии, анестезиологии и реаниматологии Ивановского НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова, ORCID: 0000-0003-2867-1693

153731 Иваново, ул.Победы, 20

Эндотелий признан важнейшим органом, играющим ключевую роль в регуляции гомеостаза, сосудистого тонуса и его структуры. Клетки эндотелия синтезируют и секретируют огромный спектр биологически активных веществ, которые являются мощными вазоконстрикторами, вазодилаторами, участвуют в процессах воспаления, тромбообразования, пролиферации и ремоделирования сосудистой стенки. Эндотелий сосудов чрезвычайно раним, но, с другой стороны, исследователи отмечают его огромные компенсаторные возможности при нарушении физиологических условий [1].

В последние годы большое внимание уделяется изучению циркулирующих эндотелиальных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников. Считают, что указанные клетки отражают состояние эндотелия, его повреждения и регенеративные возможности. Адекватный уровень циркулирующих эндотелиальных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников, по-видимому, играет важную роль в развитии и регулировании васкуляризации во время беременности [2]. Пуповинная кровь – богатейший источник кроветворных стволовых клеток, их содержание может достигать 1–2% от общего числа лейкоцитов (в среднем 0,3–0,5%). Пуповинная кровь считается наиболее обильным резервуаром клеток и имеет регенеративный потенциал для многих клинических применений.

Термин «стволовая клетка» определяет уникальную популяцию тканевых или циркулирующих в крови клеток-предшественников, обладающих способностью к многократному делению, самоподдержанию, дифференцировке (созреванию) в клеточные элементы различных органов и тканей. К настоящему времени разработаны критерии идентификации стволовых и прогениторных клеток (критерии ISHAGE – International Society for Hematotherapy and Graft Engineering). Установлено, что гемопоэтические стволовые клетки должны соответствовать критериям CD34+CD133+CD45dim. Для стволовых гемопоэтических клеток пуповинной крови характерна экспрессия CD34. При этом циркулирующие эндотелиальные клетки, наряду с маркерами гемопоэтических стволовых клеток CD34+ и CD133+, экспрессируют маркеры, присущие эндотелиоцитам, такие как VEGFR2 [3].

У матерей с высоким риском рака молочной железы при преэклампсии количество клеток с фенотипом CD34+ значительно снижено в пуповинной крови по сравнению с образцами при отсутствии преэклампсии [4]. В экспериментальных исследованиях показано, что при повреждении головного мозга восстановление церебрального эндотелия обеспечивается эндотелиальными прогениторными клетками костномозгового происхождения [5].

Показана возможность использования пуповинной крови для получения негематопоэтических

клеток, а также выделения конкретных подтипов клеток для лечения неврологических расстройств, инфарктов миокарда, нервных, метаболических, ортопедических, кардиологических и неопластических расстройств [6]. При сердечно-сосудистых заболеваниях уменьшается количество эндотелиальных клеток-предшественников в крови, снижается их жизнеспособность и функциональная активность [7]. Пониженный уровень циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников коррелирует с повышенным риском возникновения ишемической болезни сердца и инфаркта [8, 9]. Количество указанных клеток также снижено: у пациентов с гипертонической болезнью при высоком уровне систолического давления [10], у пациентов с диабетом и инсультом [11]. Количество эндотелиальных клеток-предшественников в пуповинной крови зависит от особенностей течения беременности и родов, наличия острой или хронической гипоксии плода, срока гестации, пола и массы новорожденного [12]. Уровень этих клеток при рождении не влиял на риск развития бронхолегочной дисплазии у глубоко недоношенных новорожденных; однако связь между низкими показателями эндотелиальных клеток-предшественников при рождении может быть клинически актуальной и заслуживает дальнейших исследований [13].

**Цель исследования:** определение содержания циркулирующих эндотелиальных клеток в пуповинной крови для оценки регенераторного потенциала эндотелия у новорожденных.

#### Характеристика детей и методы исследования

В работе была использована плазма пуповинной крови 29 новорожденных младенцев. В группу исследования включены 18 недоношенных детей с гестационным возрастом от 30 до 35 нед, массой тела  $2067,3 \pm 76,7$  г. Из них 15 детей были рождены путем кесарева сечения, 3 родились через естественные родовые пути. Показаниями к выполнению кесарева сечения были фетоплацентарная недостаточность, преждевременное излитие вод, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты. Оценка по шкале Апгар у всех детей составила 8 баллов на 1-й и к окончанию 5-й минуты жизни. Ранний неонатальный период протекал с клиническими проявлениями респираторного дистресс-синдрома и внутриутробной пневмонии. Всем детям с момента рождения проводились необходимый динамический клиничко-метаболический мониторинг, инфузионная терапия, лечение антибактериальными препаратами, респираторная поддержка.

В контрольную группу были включены 11 доношенных детей, родившихся в гестационном возрасте от 38 до 41 нед с массой тела  $3380,2 \pm 57,2$  г. Беременность у матерей протекала без осложнений, экстрагенитальной патологии не выявлено. Оценка по шкале

Апгар у всех детей составила 8 баллов, к концу 5-й минуты жизни – 9 баллов. Период ранней адаптации протекал без патологических осложнений, и все дети данной группы были выписаны из родильного дома в удовлетворительном состоянии на 5–6-е сутки после рождения.

У всех детей проводили определение в смешанной пуповинной крови количества циркулирующих эндотелиальных клеток. Фенотипирование клеток осуществлялось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител на приборе FACSCanto II. Циркулирующие эндотелиальные клетки определялись как CD45–CD133+VEGFR2+CD34–, эндотелиальные клетки-предшественники – как CD45–CD133+VEGFR2+CD34+.

Статистический анализ результатов исследования выполнен с помощью компьютерной программы статистической обработки данных Statistica 6.0 («StatSoft») for Windows. Для усреднения параметрических признаков использованы медианы и квартили (*Me*, *Q25*; *Q75*). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, показатель достоверности *p* рассчитывали на основе рангового непараметрического критерия Манна–Уитни. В остальных случаях расчет проводили с помощью критерия Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы *p* принимался равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в таблице. Выявлено, что в пуповинной крови у недоношенных новорожденных общее количество циркулирующих эндотелиальных клеток меньше, чем у доношенных ( $p=0,009$ ). Обнаружено снижение количества как зрелых эндотелиоцитов с феноти-

пом CD45–CD133+VEGFR2+CD34–, так и эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ ( $p=0,009$ ;  $p=0,013$  соответственно рис. 1, 2). Отмечено, что у недоношенных новорожденных процент эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ выше в 1,9 раза, чем процент эндотелиоцитов с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34– ( $p<0,013$  и  $p<0,014$ ). У доношенных новорожденных содержание зрелых эндотелиоцитов с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34– в крови выше в 1,2 раза по сравнению с клетками-предшественниками. Отмечена тенденция к повышению количества клеток с фенотипом CD45–CD34+: у недоношенных новорожденных – 0,064%, у доношенных – 0,048% от общего числа ядросодержащих клеток, что, вероятно, связано с воспалительными процессами в организме.

При проведении корреляционного анализа выявлены положительные взаимосвязи у недоношенных новорожденных между количеством клеток с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34– и длиной тела ребенка ( $r_s=-0,56$ ;  $p=0,0016$ ), у доношенных новорожденных – между количеством клеток с фенотипами CD45–CD133+VEGFR2+CD34– и CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ и массой ребенка ( $r_s=0,85$ ; 0,75 соответственно;  $p=0,0015$ ). Эти данные согласуются с выводами авторов предыдущих работ [14, 15]. Кроме того, у недоношенных новорожденных установлено статистически значимое снижение количества клеток с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ при хронической гипоксии плода в период беременности ( $r_s=0,63$ ;  $p=0,0225$ ) и тенденция к повышению количества этих клеток при острой гипоксии плода во время родов, что также согласуется с данными литературы [16].

**Таблица.** Содержание эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ в пуповинной крови доношенных и недоношенных новорожденных, *Me*(25–75%)

**Table.** Content of endothelial progenitor cells with the phenotype CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ in umbilical cord blood of full-term and premature newborns, *Me*(25–75%)

| Показатель   | Новорожденные дети                |                                  | <i>p</i>       |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------|
|  | доношенные, <i>n</i> =11          | недоношенные, <i>n</i> =18       |                |
| Общее количество ядросодержащих клеток                   | 892 426<br>(746 650–958 602)      | 456 764*<br>(319 346–709 288)    | 0,015          |
| Общее количество эндотелиоцитов                          | 684<br>(478–1612)                 | 193*<br>(126–360)                | 0,009          |
| Клетки с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+:              |                                   |                                  |                |
| абс. % от общего количества эндотелиоцитов               | 403 (222–697)<br>45,5 (46,2–59,1) | 132* (97–205)<br>65,7* (37,5–75) | 0,013<br>0,013 |
| Клетки с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34–:              |                                   |                                  |                |
| абс. % от общего количества эндотелиоцитов               | 304 (245–921)<br>54,5 (48,1–64)   | 61* (34–122)<br>34,3* (25–62,5)  | 0,009<br>0,014 |
| CD45–CD34+, % от общего количества ядросодержащих клеток | 0,048<br>(0,022–0,104)            | 0,064<br>(0,028–0,151)           |                |

*Примечание.* \* – Значимость различий ( $p<0,05$ ) с показателями у доношенных новорожденных.

## Заключение

Таким образом, у недоношенных новорожденных в пуповинной крови снижено как общее количество циркулирующих эндотелиальных клеток, так и количество эндотелиальных клеток-предшественников по сравнению с доношенными детьми. Причем у недоношенных детей в крови выше процент эндотелиальных клеток-предшественников, чем зрелых эндотелиоцитов. У доношенных новорожденных в крови выше процент зрелых эндотелиоцитов по сравнению

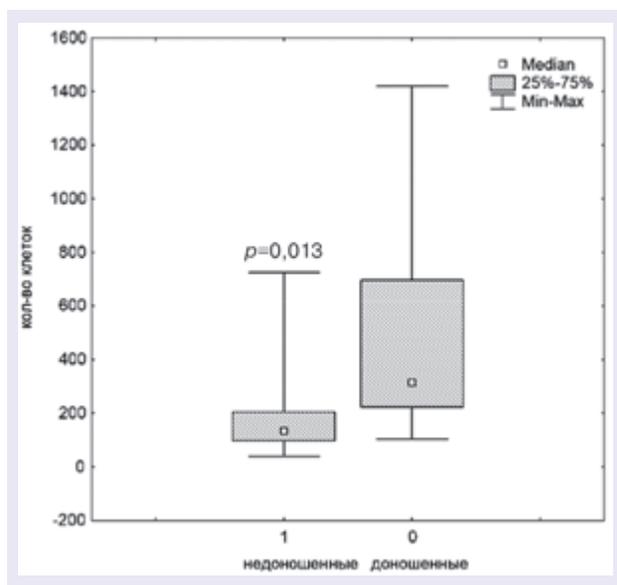


Рис. 1. Количество эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ в пуповинной крови доношенных и недоношенных новорожденных. (Составлено автором)

Здесь и на Рис. 2: Различия между группами доношенных и недоношенных новорожденных (критерий Манна–Уитни) статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Fig. 1. The number of endothelial progenitor cells with the phenotype CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ in cord blood of full-term and premature newborns. (Compiled by the author)

Here and in Fig. 2: Differences between groups of full-term and preterm infants (Mann–Whitney test) statistically significant ( $p < 0.05$ )

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Arien-Zakay H. Human Umbilical Cord Blood Stem Cells: Rational for Use as a Neuroprotectant in Ischemic Brain Disease. *Int J Mol Sci* 2010; 11(9): 3513–3528. DOI: 10.3390/ijms11093513
2. Szpera-Gozdziewicz A., Breborowicz G.H. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 1(19): 734–746.
3. Schmidt-Lucke C., Fichtlscherer S., Aicher A., Tschöpe C., Schultheiss H.P., Zeiher A.M. Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol. *PLoS One* 2010; 5(11): e13790. DOI: 10.1371/journal.pone.0013790
4. Qiu L. Effect of preeclampsia on umbilical cord blood stem cells in relation to breast cancer susceptibility in the offspring. *Carcinogenesis* 2015; 36(1): 94–98. DOI: 10.1093/carcin/bgu231
5. Салмина А.Б. Эндотелиальные прогениторные клетки в развитии и восстановлении церебрального эндотелия (обзор). *Современные технологии в медицине* 2014;

с эндотелиальными клетками-предшественниками и их количество повышается при увеличении массы тела новорожденного. У недоношенных новорожденных такой тенденции не выявлено. Снижение количества эндотелиальных клеток-предшественников у недоношенных новорожденных ассоциировано с нарушением эндотелиальной функции. CD45–CD133+VEGFR2+CD34+ клетки участвуют в репарации поврежденного эндотелия, и снижение их числа в крови отражает снижение его регенераторного потенциала. Повышение количества эндотелиальных клеток-предшественников у недоношенных детей, вероятно, свидетельствует о компенсаторных возможностях организма.

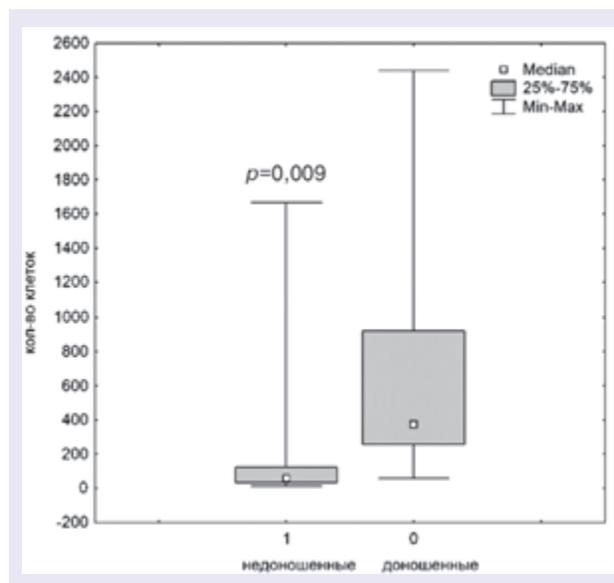


Рис. 2. Количество эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45–CD133+VEGFR2+CD34– в пуповинной крови доношенных и недоношенных новорожденных. (Составлено автором)

Fig. 2. The number of endothelial progenitor cells with the phenotype CD45–CD133+VEGFR2+CD34– in cord blood of full-term and premature newborns. (Compiled by the author)

- 6(4): 213–222. [Salmina A.B. Endothelial progenitor cells in development and reconstruction of cerebral endothelium (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine* 2014; 6(4): 213–222. (in Russ)]
6. Flores-Guzmán P. Concise Review: Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Basic Principles, Experimental Approaches, and Impact in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(11): 830–838. DOI: 10.5966/sctm.2013-0071
7. Urbich D. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int* 2005; 67(5): 1672–1676.
8. Chang H.W., Leu S., Sun C.K. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty: in vivo and in vitro studies. *Transl Res* 2010; 156(4): 251–263. DOI: 10.1016/j.trsl

9. *Fadini G.P., de Kreutzenberg S., Albiero M., Coracina A., Pagnin E., Baesso I., Cignarella A. et al.* Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 19(7): 496–503. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159558
10. *Werner N., Kosiol S., Schiegl T., Ahlers P., Walenta K., Link A. et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353(10): 999–1007.
11. *Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И.* Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез. *Успехи современной биологии* 2012; 132(1): 69–76. [Poveshchenko O.V., Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Endothelial progenitor cells and neovascularization. *Uspekhi sovremennoy biologii* 2012; 132(1): 69–76. (in Russ)]
12. *Румянцев А.Г., Румянцев С.А.* Пуповинная кровь как источник информации о состоянии плода. *Педиатрия* 2012; 91(3): 43–52. [Rumyantsev A.G., Rumyantsev S.A. Umbilical cord blood as a source of information about the status of the fetus. *Pediatriya* 2012; 91(3): 43–52. (in Russ)]
13. *Paviotti G., Fadini G.P., Boscaro E., Agostini C., Avogaro A., Chiandetti L., Baraldi E., Filippone M.* Endothelial progenitor cells, bronchopulmonary dysplasia and other short-term outcomes of extremely preterm birth. *Stem Cells* 2011; 29(7): 461–465. DOI: 10.1016/j.stem.2011.03.011
14. *Nunes R.D., Zandavalli F.M.* Association between maternal and fetal factors and quality of cord blood as a source of stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; 37: 38–42.
15. *Nakagawa R., Watanabe T., Kawano Y., Kanai S., Suzuya H., Kaneko M.* Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44(2): 262–267.
16. *Wen S.H., Zhao W.L., Lin P.Y., Yang K.L.* Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. *Transfus Apher Sci* 2012; 46(1): 39–45. DOI: 10.1016/j.transci.2011.10.031

Поступила 19.12.17

Received on 2017.12.19

**Конфликт интересов:**

*Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.*

**Conflict of interest:**

*The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.*