

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КОСТНОМОЗГОВЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Черных В.А.<sup>1</sup>, Пронкина Н.В.<sup>2</sup>, Шевела Е.Я.<sup>2</sup>, Ступак В.В.<sup>1</sup>,  
Рабинович С.С.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>2</sup>, Останин А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Ранее нами выявлено повышенное содержание циркулирующих костномозговых предшественников у пациентов в остром периоде черепно-мозговой травмы (ЧМТ) и продемонстрировано, что благоприятный исход сопряжен с ранней мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> гемопоэтических предшественников (ГП). Настоящая работа посвящена изучению особенностей системной воспалительной реакции и параметров иммунитета в группах пациентов с наличием и отсутствием ранней мобилизации ГП. Установлено, что пациенты с ЧМТ характеризуются повышенным содержанием в сыворотке крови С-реактивного белка (СРБ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF и IL-1ra, что свидетельствует о наличии системной воспалительной реакции. При этом у пациентов с отсутствием ранней мобилизацией ГП выявляется достоверно более высокое содержание в сыворотке крови СРБ, MCP-1, MIP-1 $\beta$  и G-CSF и меньший уровень VEGF. Кроме того, пациенты с отсутствием ранней мобилизации ГП отличаются достоверно более низкими показателями абсолютного содержания лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>T-клеток, CD4<sup>+</sup>T-клеток, CD16<sup>+</sup>NK-клеток и пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на КоНА, а также 4-кратно большей частотой инфекционных осложнений по сравнению с оппозитной группой. Предполагается, что сопряженность ранней мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток с благоприятным исходом при ЧМТ может быть отчасти обусловлена противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами циркулирующих костномозговых предшественников.

**Ключевые слова:** циркулирующие костномозговые предшественники, CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клетки, мобилизация клеток, иммуномодуляция, черепно-мозговая травма

## IMMUNOMODULATORY EFFECT OF CIRCULATING BONE MARROW PROGENITORS AS A POSSIBLE MECHANISM OF NEUROPROTECTION IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Chernykh V.A.<sup>a</sup>, Pronkina N.V.<sup>b</sup>, Shevela E.Ya.<sup>b</sup>, Stupak V.V.<sup>a</sup>,  
Rabinovich S.S.<sup>a</sup>, Chernykh E.R.<sup>b</sup>, Ostanin A.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics MH RF, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** We have previously shown that acute traumatic brain injury (TBI) is accompanied by increased level of circulating bone marrow progenitors, and favorable outcome is associated with early mobilization of

### Адрес для переписки:

Черных Вадим Александрович  
ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
E-mail: cell\_lab@mail.ru

### Address for correspondence:

Chernykh Vadim A.  
Institute of Clinical Immunology SB RAMS  
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Jadrincevskaja str., 14  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
E-mail: cell\_lab@mail.ru

### Образец цитирования:

В.А. Черных, Н.В. Пронкина, Е.Я. Шевела, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, Е.Р. Черных, А.А. Останин, «Иммуномодулирующий эффект циркулирующих костномозговых предшественников как возможный механизм нейропротекции при черепно-мозговой травме» // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 577-586.  
doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-577-586

### For citation:

V.A. Chernykh, N.V. Pronkina, E.Ya. Shevela, V.V. Stupak, S.S. Rabinovich, E.R. Chernykh, A.A. Ostanin, "Immunomodulatory effect of circulating bone marrow progenitors as a possible mechanism of neuroprotection in traumatic brain injury", Medical Immunology, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 577-586.  
doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-577-586

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-577-586>

© Черных В.А. и соавт., 2014

CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (HP). The present study was aimed at investigating whether patients with early HP mobilization differed from those with mobilization failure by systemic inflammatory reaction and immune parameters. The TBI patients were characterized by increased levels of serum C-reactive protein (CRP), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF and IL-1ra indicative for presence of systemic inflammatory response. Importantly, patients with lacking mobilization of early HPs were shown to have significantly higher serum levels of CRP, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and G-CSF and a lower level of VEGF. In addition, patients with lack of early HP mobilization differed by significantly lower absolute number of lymphocytes, CD3<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD16<sup>+</sup> NK cells and proliferative response of mononuclear cells to stimulation with ConA as well as by 4-fold higher rate of infectious complications compared with the opposite group. These data suggest that correlation of early mobilization of CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells with a favorable outcome in TBI patients may be partially mediated by anti-inflammatory and immunomodulatory effects of circulating bone marrow progenitors. (*Med. Immunol.* 2014, vol. 16, N 6, pp 577-586)

*Keywords: circulating bone marrow progenitors, CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells, cell mobilization, immunomodulation, traumatic brain injury*

## Введение

Мобилизация стволовых клеток из костного мозга в периферическую кровь является ответной реакцией организма на повреждающие и стресс-индуцирующие воздействия и рассматривается в качестве одного из механизмов репаративного ответа [7, 8, 16]. Действительно, содержание циркулирующих костномозговых предшественников (КМП) ассоциировано с эффективностью функционального восстановления при инфаркте миокарда [24], инсульте [19], пневмонии [27], а также с выживаемостью при сепсисе [17]. Кроме того, многочисленные исследования показали, что стимуляция процессов мобилизации или введение экзогенных стволовых клеток повышает эффективность репаративного ответа при повреждении различных органов и тканей [7].

Проведенные нами недавно исследования показали, что возрастание в периферической крови CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> гемопоэтических и CD34<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup> эндотелиальных предшественников является также характерным для острого периода черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [2]. Исследование циркулирующих КМП в динамике острого периода позволило выявить гетерогенность пациентов по кинетике мобилизации, в частности продемонстрировало, что у половины пациентов мобилизация CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток наблюдалась на 1-3 сутки (ранняя мобилизация), а у половины – на 7-10 сутки (поздняя мобилизация). При этом клинический анализ показал, что благоприятный исход ЧМТ четко ассоциировался с ранней мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток [1].

Выявленная взаимосвязь между количеством циркулирующих CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток и характером исхода ЧМТ послужила поводом для выяснения механизмов возможного влияния КМП на неврологическое восстановление. Согласно данным экспериментальных исследований, сти-

мулирующий эффект стволовых клеток костного мозга на процессы нейрорепарации может быть обусловлен несколькими механизмами, включая нейропротекцию, активацию нейрогенеза и синаптогенеза, а также стимуляцию ангио- и васкулогенеза [20, 26, 28]. Кроме того, как показали исследования последних лет, эффект КМП может быть связан с противовоспалительным и иммуномодулирующим действием стволовых и прогениторных клеток [22]. Хорошо известно, что исходы и характер неврологического восстановления при ЧМТ в значительной степени определяются выраженностью вторичных повреждений, развитие и прогрессия которых опосредуется с участием воспалительных медиаторов [25, 30]. Кроме того, избыточная воспалительная реакция является важным причинным фактором иммунной недостаточности [4, 23], обуславливающей высокую частоту инфекционных осложнений при ЧМТ и существенно повышающей риск развития летальных исходов [15]. С этой точки зрения, подавление воспалительной реакции может оказывать нейропротективный эффект и создавать благоприятное микроокружение для запуска репаративных процессов [22]. Действительно, Schwarting S. с соавт. в модели ишемического инсульта у мышей показали, что трансплантация гемопоэтических стволовых клеток существенно ослабляет выраженность активации иммунных клеток и воспалительной реакции в головном мозге животных [14]. Схожие данные получены при трансплантации стволовых клеток в модели геморрагического инсульта. Улучшение неврологических исходов в этом случае ассоциировалось с уменьшением церебрального отека, клеточной инфильтрации ткани мозга и уровня продукции провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$  и IL-6) [5]. Однако у человека иммуномодулирующая активность КМП при повреждениях головного мозга остается не исследованной.

Исходя из сказанного, настоящее исследование было посвящено сравнительной характеристике системной воспалительной реакции и параметров иммунитета у пациентов ЧМТ с наличием и отсутствием ранней мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток.

Одним из клинических подходов к выявлению системной воспалительной реакции является оценка синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) по наличию 2-х и более из 4-х клинико-лабораторных критериев (1 – температура < 36 °С или > 38 °С; 2 – частота сердечных сокращений > 90 ударов/мин; 3 – частота дыхательных движений > 20 /мин; 4 – лейкоциты > 12,000 кл/мм<sup>3</sup> и/или количество незрелых форм нейтрофилов > 10%). Однако необходимость интубации и медикаментозная седация пациентов существенно затрудняет оценку ССВО при ЧМТ. Поэтому наличие и выраженность системной воспалительной реакции определяли по концентрации С-реактивного белка (СРБ), являющегося более чувствительным и адекватным биомаркером ССВО [11]. Кроме того, учитывая, что воспалительная реакция является отражением врожденного иммунного ответа и сопровождается возрастанием в сыворотке крови различных цитокинов [30], наряду с оценкой СРБ исследовали концентрацию ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6) и хемокинов (IL-8, MCP, MIP-1 $\beta$ ); ростовых факторов (G-CSF, IL-7, VEGF) и противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IL-1ra).

## Материалы и методы

### Общая характеристика больных

Работа основана на результатах проспективных исследований 50 пациентов с острой очаговой черепно-мозговой травмой и 30 сопоставимых по полу и возрасту здоровых доноров.

Рекрутирование пациентов проводили из числа мужчин и женщин в возрасте старше 18 лет в соответствии с критериями включения и исключения. Критериями включения являлись: 1) острые повреждения головного мозга в виде ушибов средней или тяжелой степени и/или сдавление головного мозга; 2) давность ЧМТ на момент оценки КМП от 6 до 72 часов. Критериями исключения являлись: 1) тяжелые экстракраниальные повреждения; 2) наличие тяжелых неконтролируемых инфекций; 3) декомпенсированные заболевания различных органов; 4) беременность; 5) прием гормональных или иммуносупрессивных препаратов; 6) трансфузии крови перед исследованием (> 800 мл). Сформированная группа включала 40 мужчин и 10 женщин, средний возраст которых составил 40 лет.

В 18 случаях пострадавшие имели ушибы головного мозга, в 32 случаях – сдавление головного мозга внутричерепными гематомами.

### Клинико-инструментальное обследование

Всем пациентам при поступлении выполнялись неврологическое обследование и мультиспиральная компьютерная томография головного мозга. Тяжесть состояния оценивалась в соответствии со шкалой ком Глазго (ШКГ). Исходы ЧМТ оценивали по 5-балльной шкале исходов Глазго (ШИГ) при выписке из стационара (в среднем на 27 день). Пациенты с уровнем 4-5 баллов по ШИГ (умеренная инвалидизация и хорошее восстановление соответственно) были отнесены в группу с благоприятным исходом (n = 21), с уровнем 1-3 балла (летальный исход, вегетативный статус и грубая инвалидизация) – в группу с неблагоприятным исходом (n = 29). У всех пациентов оценивали наличие инфекционных осложнений в период стационарного лечения.

### Оценка костномозговых предшественников

Количество циркулирующих КМП оценивали методом проточной цитометрии по содержанию в периферической крови CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> клеток, используя PE-меченные анти-CD34 и FITC-меченные анти-CD45 моноклональные антитела (BD PharMingen, San Diego, CA, США) в соответствии с рекомендациями международного общества гемотерапии (ISHAGE, 1996). При подсчете клеток в каждой пробе оценивали  $1 \times 10^5$  событий. Оценку КМП проводили на 1-3 сутки (но не ранее 6 ч после травмы). Возрастание в периферической крови CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток выше 3150 кл/мл (верхняя граница нормативного диапазона) расценивалось как наличие ранней мобилизации.

### Оценка цитокинов и С-реактивного белка в сыворотке крови

Содержание в сыворотке крови IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$  и G-CSF определяли при помощи проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе BioPlex Protein Assay System (BioRad, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Уровень IL-1 $\beta$ , IL-1ra и VEGF в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием соответствующих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Вектор-Бест», г. Новосибирск и «Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Концентрацию СРБ в сыворотке крови определяли с помощью автоматизированного анализатора Olympus AU400 (колориметрический фотометрический тест) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

### Оценка иммунного статуса

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови стандартно в градиенте плотности фиколла-верографина. Относительное содержание различных субпопуляций лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20) определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием соответствующих моноклональных антител (Becton Dickinson, США). Для оценки пролиферации лимфоцитов МНК ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в полной культуральной среде в отсутствие (спонтанная пролиферация) и присутствии Т-клеточного митогена конканавалина А (КонаА, 15 мкг/мл, Sigma). Интенсивность пролиферации оценивали через 72 ч по включению  $^3\text{H}$ -тимидина (1 мКю/лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. Показатель функциональной активности нейтрофилов (ПАН) оценивали по способности клеток лейкоцзвеси к продукции перекиси водорода и выражали в виде индекса влияния, отражающего отношение продукции перекиси водорода в культурах, стимулированных зимозаном, к уровню в нестимулированных культурах.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки достоверности различий использовали точный критерий Фишера (для дискретных переменных) и критерий Вилкоксона–Манна–Уитни (для сравнения непрерывных переменных). Для исследования ассоциаций количественных показателей использовали коэффициент корреляции Спирмена.

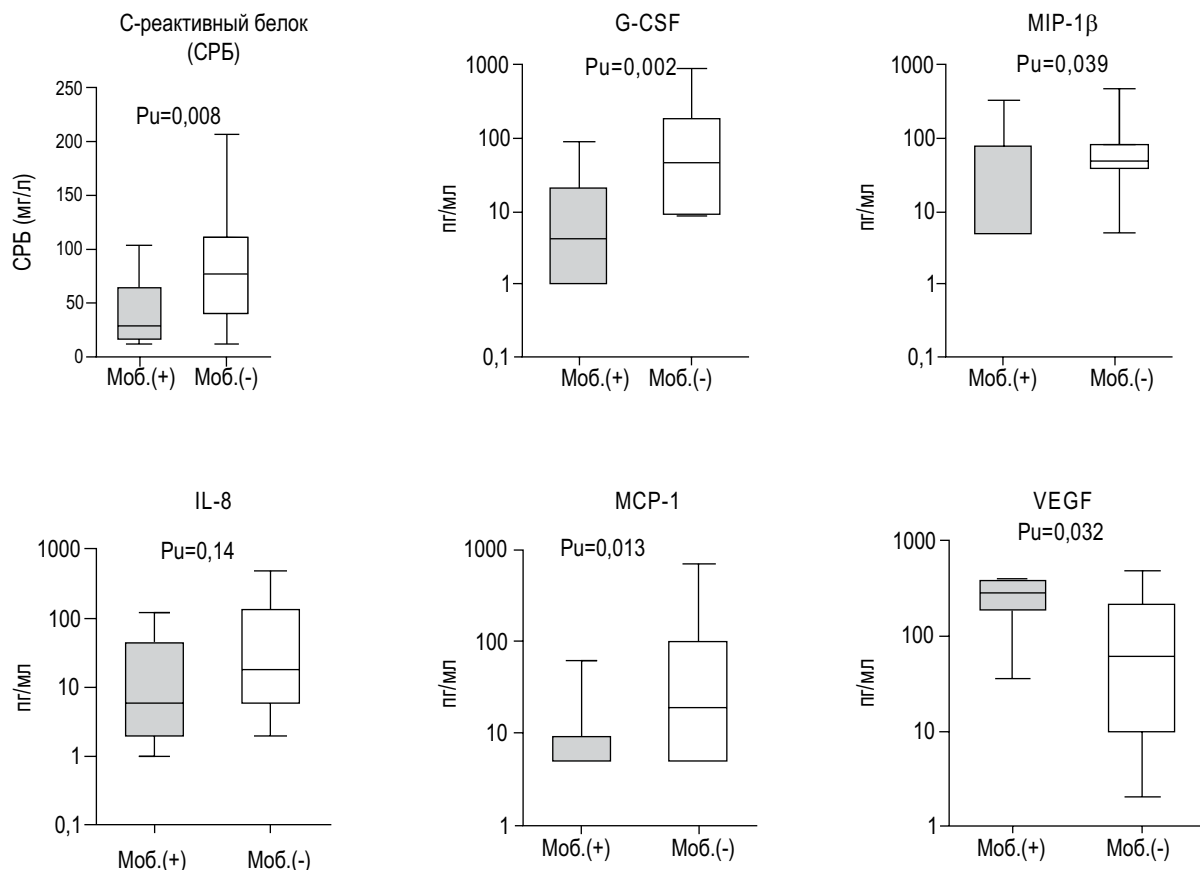
### Результаты

Оценка параметров системной воспалительной реакции была проведена у 41 пациента с ЧМТ. По сравнению со здоровыми донорами пациенты с ЧМТ характеризовались 36-кратным возрастанием среднего уровня СРБ (табл. 1), значимым увеличением в сыворотке крови цитокинов и хемокинов с провоспалительной активностью – IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1 и G-CSF, а также противовоспалительного медиатора IL-1ra. Выявленные изменения свидетельствовали о наличии у пациентов системной воспалительной реакции. Характерно, что уровень сознания по ШКГ обратно коррелировал с концентрацией IL-1ra ( $R_s = -0,59$ ;  $p = 0,03$ ), а балл по ШИГ – с концентрацией СРБ ( $R_s = -0,31$ ;  $p = 0,05$ ), MCP-1 ( $R_s = -0,44$ ;  $p = 0,01$ ) и G-CSF ( $R_s = -0,51$ ;  $p = 0,001$ ), ука-

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ СРБ, ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ЧМТ**

Параметр	Доноры (n = 15-30)*	Пациенты ЧМТ (n = 41)	$P_U$
СРБ, мг/л	2,1 (1,7-4,7)	77 (33-107)	0,00000
IL-1 $\beta$ , пг/мл	0,5 (0,5-0,5)	2,1 (0,6-3,7)	0,007
IL-6, пг/мл	1,1 (1-4)	37 (2-146)	0,00004
IL-8, пг/мл	2,1 (1,0-2,2)	14 (4,3-72)	0,00000
MCP-1, пг/мл	1 (1-5)	12 (5-59)	0,000006
MIP-1 $\beta$ , пг/мл	26,21 (11-38)	35 (5-60)	0,32
G-CSF, пг/мл	1,0 (1,0-1,0)	24 (8-144)	0,00000
IL-7, пг/мл	2,5(1-4,8)	2,0 (1-5,8)	0,48
VEGF, пг/мл	101 (48-173)	152 (20-292)	0,44
IL-10, пг/мл	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1-4)	0,77
IL-1ra, пг/мл	304 (284-693)	1441 (1118-3500)	0,00005

**Примечание.** Данные представлены в виде значений медианы и интерквартильного диапазона.  $p_U$  – достоверность различий с донорами, U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. \* – концентрация IL-1 $\beta$ , IL-1ra и VEGF у доноров определялась в группе 15 человек, остальных цитокинов – в группе 30 человек.



**Рисунок 1. Сывороточный уровень СРБ и цитокинов / хемокинов в подгруппах пациентов с ЧМТ, оппозитных по мобилизации КМП**

**Примечание.** Данные представлены в виде медианы, интерквартильных диапазонов, минимума и максимума;  $p_U$  – достоверность различий между группами, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

зывая, что повышенный уровень цитокинов сопряжен с тяжестью и неблагоприятным исходом ЧМТ.

Чтобы проанализировать, имелись ли различия в выраженности системной воспалительной реакции у пациентов с наличием и отсутствием ранней мобилизации  $CD34^+CD45^+$  клеток, далее был проведен сравнительный анализ концентрации СРБ и цитокинов в указанных группах. Группу с наличием ранней мобилизации составили 11 пациентов, оппозитную группу – 30 пациентов. Из данных рисунка 1 видно, что пациенты с ранней мобилизацией  $CD34^+CD45^+$  клеток отличались практически 3-кратно меньшим уровнем СРБ, а также достоверно более низкой концентрацией MCP-1, MIP-1β и G-CSF. Сходные различия для IL-8 (меньший уровень в группе с мобилизацией КМП) проявлялся в виде тренда. Вместе с тем пациенты этой группы характеризовались более высоким уровнем VEGF и тенденцией к более высокому содержанию фактора роста лимфоцитов – IL-7 (медианные значения 4,4 против 1,6 пкг/мл,  $p_U = 0,12$ ). Таким обра-

зом, более низкий сывороточный уровень СРБ у пациентов первой группы четко свидетельствовал о меньшей выраженности системной воспалительной реакции у больных ЧМТ с ранней мобилизацией  $CD34^+CD45^+$  клеток, что дополнительно подтверждалось наличием значимой отрицательной корреляционной взаимосвязи количества  $CD34^+CD45^+$  клеток с концентрацией СРБ ( $R_s = -0,37$ ;  $p = 0,016$ ;  $n = 41$ ).

Полученные данные могли указывать не только на сопряженность феномена мобилизации  $CD34^+CD45^+$  клеток с выраженностью воспалительного ответа, но и на возможные иммуномодулирующие эффекты циркулирующих КМП, учитывая иммуносупрессорную активность VEGF, выраженное стимулирующее действие G-CSF на гранулоциты, а также способность MCP-1 и MIP-1β обеспечивать рекрутирование моноцитов и Т-клеток.

С целью проверки данного предположения, был проведен сравнительный анализ показателей иммунитета в подгруппах пациентов ЧМТ с наличием ( $n = 14$ ) и отсутствием ( $n = 22$ ) ранней

**ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ РАННЕЙ МОБИЛИЗАЦИИ CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> КЛЕТОК**

Параметр	Здоровые доноры (n = 16)	Мобилизация (+) (n = 14)	Мобилизация (-) (n = 22)	P <sub>U2-3</sub>
	1	2	3	
Лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> /л	1,9 (1,44-2,31)	2,8 (2,2-3,6)	1,8 (1,0-2,7)	0,026
CD3 <sup>+</sup> Т-клетки, × 10 <sup>9</sup> /л	1,2 (0,99-1,45)	1,92* (1,54-2,62)	1,46 (0,81-1,9)	0,047
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки, × 10 <sup>9</sup> /л	0,67 (0,61-0,89)	1,34* (1,1-1,67)	0,91 (0,52-1,27)	0,019
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки, × 10 <sup>9</sup> /л	0,45 (0,37-0,62)	0,61* (0,51-0,91)	0,49 (0,26-0,71)	0,085
CD20 <sup>+</sup> В-клетки, × 10 <sup>9</sup> /л	0,18 (0,13-0,25)	0,22 (0,19-0,31)	0,18 (0,09-0,35)	0,28
CD16 <sup>+</sup> NK-клетки, × 10 <sup>9</sup> /л	0,26 (0,14-0,36)	0,32 (0,17-0,61)	0,2 (0,12-0,23)	0,047
ПАН, усл.ед.	4,1 (3,6-4,8)	6,0* (5,3-8,1)	4,6 (3,8-7,0)	0,09
Спонт. пролиферация МНК, имп/мин	240 (174-280)	232 (180-360)	177 (130-286)	0,88
Ответ МНК на Кона, имп/мин	32334 (29413-38140)	36235 (21186-51500)	26950* (14027-35262)	0,044

**Примечание.** Данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов (в скобках). \* – достоверность различий по сравнению с донорами (p<sub>U</sub> < 0,05), p<sub>U2-3</sub> – достоверность различий между группами пациентов, p<sub>U</sub> – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток (табл. 2). Видно, что пациенты с наличием ранней мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток отличались от здоровых доноров повышенным абсолютным содержанием всех анализируемых субпопуляций Т-клеток и NK-клеток, а также более высоким уровнем активности нейтрофилов, тогда как в оппозитной подгруппе таких изменений не отмечалось. Более того, в этой группе количество CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Т-клеток и CD16<sup>+</sup>NK-клеток было значимо ниже, чем у пациентов с ранней мобилизацией КМП. Еще одной особенностью пациентов второй подгруппы была сниженная пролиферативная активность МНК в ответ на стимуляцию Кона.

Выявленные факты свидетельствовали о том, что отсутствие ранней мобилизации КМП у пациентов с ЧМТ ассоциировалось с более низкими количественными и функциональными показателями клеточного иммунитета. Данное заключение подтверждалось и на уровне индивидуальных значений. Так, наличие лимфопении,

диагностируемое при снижении абсолютного количества лимфоцитов менее 1,45 × 10<sup>9</sup>/л, наблюдалось у пациентов с ранней мобилизацией КМП лишь в 7% случаев (у 1 из 14 пациентов). В то же время в группе с отсутствием мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток лимфопения регистрировалась в 5 раз чаще (в 36% (8/22) случаев; p<sub>ТМФ</sub> = 0,037). Снижение пролиферативного ответа на Кона ниже < 30 000 имп/мин, как проявление угнетения функциональной активности Т-лимфоцитов, отмечалось в группе с мобилизацией КМП в 28,6% (4/14) случаев. В то же время в оппозитной группе снижение функциональной активности Т-клеток развивалось в 2 раза чаще – в 64% (14/22) случаев (p<sub>ТМФ</sub> = 0,043).

Известно, что нарушение иммунитета при ЧМТ является одной из причин развития инфекций, которые часто осложняют течение посттравматического периода и являются непосредственной причиной летальных исходов. Поскольку показатели клеточного иммунитета, играющего

**ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА И СТРУКТУРА ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В ГРУППАХ С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ РАННЕЙ МОБИЛИЗАЦИИ CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> КЛЕТОК**

Параметр	Мобилизация CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> клеток (+) n = 14	Мобилизация CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> клеток (-) n = 36	P <sub>ТМФ</sub>
Частота инфекционных осложнений	14,3%	58,3%	0,0052
Структура осложнений:			
– Бронхо-легочные инфекции	100%	71,4%	
– Сепсис	0%	4,8%	
– Внутричерепные инфекции	0%	9,6%	
– Прочее	0%	14,4%	

важную роль в противоинфекционной защите, у пациентов с ранней мобилизацией КМП были выше, мы предположили, что эти пациенты могли быть более устойчивы к развитию инфекционных осложнений. Действительно, сравнительный анализ инфекционных осложнений в группах, оппозирующих по наличию ранней мобилизации КМП, показал (табл. 3), что у пациентов с эффективной мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток инфекционные осложнения в виде пневмоний были зарегистрированы только в 14,3% (2/14) случаев. У пациентов с отсутствием мобилизации КМП инфекционные осложнения развивались достоверно чаще – в 58,3% (21/36) случаев. При этом в структуре инфекционных осложнений также доминировали бронхо-легочные инфекции, которые выявлялись в 71,4 % случаев всех инфекционных осложнений (у 15 из 21 пациентов). В 4,8 % случаев (у 1 из 21 пациентов) инфекционные осложнения имели генерализованный характер и манифестировали в виде сепсиса. Внутричерепные инфекции регистрировались в 9,6 % случаев (у 2 из 21 пациентов). У одного из этих пациентов верифицировался менингоэнцефалит, у другого – субдуральная эмпиема. В остальных трех случаях инфекционные осложнения проявлялись в виде гнойного гайморита (1/15), нагноения послеоперационной раны (1/15) и лихорадки неуточненного генеза, купируемой на фоне назначения антибактериальной терапии.

В заключение следует отметить, что от эффективности мобилизации КМП в циркуляцию во многом зависела не только частота инфекционных осложнений в посттравматическом периоде, но и клинические исходы стационарного лечения ЧМТ. Так, по данным проспективного

анализа, в подгруппе пациентов с ранней мобилизацией КМП благоприятный исход (4-5 баллов по ШИГ) регистрировался у 13 из 14 пациентов (в 93% случаев), тогда как в группе с отсутствием мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток только у 8 из 36 пациентов (в 22% случаев), т.е. частота благоприятных исходов ЧМТ была снижена более чем в 4 раза (p<sub>ТМФ</sub> = 0,0001).

## Обсуждение

Полученные в целом данные свидетельствуют, что пациенты в остром периоде ЧМТ характеризуются наличием системной воспалительной реакции, выраженность которой сопряжена с тяжестью и исходом ЧМТ. При этом наличие ранней мобилизации CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток сопряжено с меньшей выраженностью системной воспалительной реакции, что подтверждается значимо более низкой концентрацией СРБ, MCP-1, MIP-1β и G-CSF и более высоким уровнем VEGF у пациентов данной группы.

Наличие системной воспалительной реакции при ЧМТ является хорошо известным фактом [4, 25]. В литературе также имеются данные о сопряженности IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 с тяжестью и неблагоприятным исходом ЧМТ [25]. В то же время нами впервые показано существенное возрастание у пациентов G-CSF и взаимосвязь данного фактора с тяжестью и неблагоприятным исходом. Эта взаимосвязь представляется вполне логичной, поскольку G-CSF является мощным активатором гранулоцитов, способных оказывать нейротоксический эффект [9, 13]. Новыми также являются данные о сопряженности неблагоприятного исхода ЧМТ с повышенным уровнем провоспалительных хемокинов – MCP-1, MIP-1β, способных потенцировать воспалительный от-

вет за счет рекрутирования и активации клеток иммунной системы. Кроме того, нами впервые продемонстрирована сопряженность между ранней мобилизацией КМП (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток) и меньшей выраженностью системного воспалительного ответа у пациентов с ЧМТ, и эти данные позволяют предполагать, что нейропротективный эффект стволовых клеток в значительной степени обусловлен противовоспалительным действием КМП [22].

Вторым важным моментом является выявленный факт, что снижение показателей клеточного иммунитета, ассоциированное с неблагоприятным исходом ЧМТ, характерно именно для пациентов с отсутствием мобилизации КМП. В то же время пострадавшие с повышенным уровнем CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток характеризуются сохраненными показателями клеточного иммунитета, что позволяет предполагать наличие иммуномодулирующей активности КМП за счет подавления системной воспалительной реакции. Клиническая значимость эффективности мобилизации КМП и сохранности клеточного иммунитета у пациентов ЧМТ подтверждалась значимым снижением частоты инфекционных осложнений (с 58,3 до 14,3%;  $p_{\text{ТМФ}} = 0,0052$ ), и более высокими показателями благоприятных исходов стационарного лечения ЧМТ (93 против 22%;  $p_{\text{ТМФ}} = 0,0001$ ).

Выявленное снижение количественных и функциональных параметров клеточного иммунитета у пациентов с неэффективной мобилизацией КМП и, как следствие, с высоким риском неблагоприятного исхода ЧМТ согласуется с данными литературы [4, 18]. В то же время впервые выявленная нами прямая взаимосвязь между уровнем циркулирующих CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток и показателями клеточного иммунитета свидетельствует также о возможной иммуномодулирующей активности КМП.

Известно, что угнетение клеточного иммунитета при ЧМТ связано с избыточной выраженностью системной воспалительной реакции. Так, провоспалительные цитокины могут вызывать апоптоз иммунных клеток, индуцировать запуск синдрома противовоспалительного ответа и активировать симпатoadреналовую систему, что сопровождается выбросом катехоламинов, обладающих иммуносупрессорным эффектом [6, 23]. С этой точки зрения более сохраненные параметры иммунитета у пациентов с ранней мобилизацией КМП, по нашему мнению, обусловлены их противовоспалительным эффектом и меньшей выраженностью воспалительной реакции в этой группе.

Важно отметить, что наряду с меньшим уровнем провоспалительных цитокинов и хемокинов пациенты с ранней мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток отличались более высоким (в виде тренда) уровнем IL-7 и значимо более высокой концентрацией VEGF. Известно, что IL-7 является фактором роста Т-лимфоцитов и защищает эти клетки от апоптоза, улучшая их выживаемость в неблагоприятных условиях [12]. Поэтому более высокий уровень IL-7 в группе с мобилизацией КМП может отчасти объяснять более высокое абсолютное содержание лимфоцитов у этих пациентов. VEGF обладает иммуносупрессивной активностью, наиболее хорошо исследованной при опухолевом росте [10, 21]. Учитывая способность VEGF индуцировать регуляторные Т-клетки, повышенный уровень данного фактора у пациентов с мобилизацией CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток может также обуславливать противовоспалительный эффект КМП. Кроме того, противовоспалительный эффект КМП может быть связан со способностью стволовых клеток индуцировать апоптоз активированных лимфоцитов, а также генерировать регуляторные Т-клетки [3, 29].

## Список литературы / References

1. Черных В.А., Пронкина Н.В., Шевела Е.Я., Ступак В.В., Фонин В.В., Парлюк О.В., Рабинович С.С., Черных Е.Р., Останин А.А. Циркулирующие костно-мозговые предшественники у пациентов с различными исходами черепно-мозговой травмы // Политравма, 2012. № 2. С. 10-15. [Chernykh V.A., Pronkina N.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Fonin V.V., Parluk O.V., Rabinovich S.S., Chernykh E.R., Ostanin A.A. Circulating bone marrow precursors in patients with different outcomes of traumatic brain injury. *Politravma = Polytrauma*, 2012, no. 2, pp. 10-15. (In Russ.)]
2. Черных В.А., Ступак В.В., Фонин В.В., Шишлов П.Е., Пронкина Н.В., Шевела Е.Я., Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. Мобилизация костномозговых CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> гемопоэтических предшественников у больных с черепно-мозговой травмой // Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова, 2012. Т. IV, № 1. С. 54-61. [Chernykh V.A., Stupak V.V., Fonin V.V., Shishlov P.E., Pronkina N.V., Shevela E.Ya., Leplina O.Yu., Chernykh E.R., Ostanin A.A. Mobilization of bone-marrow-derived CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> hematopoietic progenitors in patients with traumatic brain injury. *Rossiyskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal im. prof. A.L. Polenova. = Russian Neurosurgical Journal*, 2012, Vol. 4, no. 1, pp. 54-61. (In Russ.)]



3. Clerici M., Cassinotti A., Onida F., Trabattoni D., Annaloro C., Volpe A.D., Rainone V., Lissoni F., Duca P., Sampietro G., Fociani P., Vago G., Foschi D., Ardizzone S., Delilieri G.L., Porro G.B. Immunomodulatory effects of unselected haematopoietic stem cells autotransplantation in refractory Crohns disease. *Dig. Liver Dis.*, 2011, Vol. 43, no. 12, pp. 946-952.
4. Das M., Mohapatra S., Mohapatra S.S. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation.*, 2012, Vol. 9, p. 236. doi:10.1186/1742-2094-9-236
5. Lee S.T., Chu K., Jung K.H., Kim S.J., Kim D.H., Kang K.M., Hong N.H., Kim J.H., Ban J.J., Park H.K. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain.*, 2008, Vol. 131, pp. 616-629.
6. Meisel C., Schwab J.M., Prass K., Meisel A., Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, Vol. 6, no. 10, pp. 775-786.
7. Miller F.D., Kaplan D.R. Mobilizing endogenous stem cells for repair and regeneration: are we there yet? *Cell Stem Cell.*, 2012, Vol. 10, no. 6, pp. 650-652.
8. Nervi B., Link D.C., Di Persio J.F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J. Cell Biochem.*, 2006, Vol. 99, no. 3, pp. 690-705.
9. Nguyen H.X., O'Barr T.J., Anderson A.J. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. *J. Neurochem.*, 2007, Vol. 102, no. 3, pp. 900-912.
10. Ohm J.E., Carbone D.P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol. Res.*, 2001, Vol. 23, no. 2-3, pp. 263-272.
11. Pancer G., Engelman E., Hoque F., Alam M., Rucinski J., Bernstein L.H. C-reactive protein for the enhanced evaluation of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *The Open Clinical Chemistry Journal*, 2011, Vol. 4, pp. 1-9.
12. Rathmell J.C., Farkash E.A., Gao W., Thompson C.B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 12, pp. 6869-6876.
13. Roberts A.W. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 2005, Vol. 23, no. 1, pp. 33-41.
14. Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bahr M., Weise J., Neumann H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke.*, 2008, Vol. 39, no. 10, pp. 2867-2875.
15. Scott B.N., Roberts D.J., Robertson H.L., Kramer A.H., Laupland K.B., Ousman S.S., Kubes P., Zygun D.A. Incidence, prevalence, and occurrence rate of infection among adults hospitalized after traumatic brain injury: study protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.*, 2013, Vol. 2, no. 1, p. 68. doi: 10.1186/2046-4053-2-68
16. Shah S., Ulm J., Sifri Z.C., Mohr A.M., Livingston D.H. Mobilization of bone marrow cells to the site of injury is necessary for wound healing. *J. Trauma.*, 2009, Vol. 67, no. 2, pp. 315-321.
17. Skirecki T., Zielińska-Borkowska U., Złotorowicz M., Kawiak J., Hoser G. Mobilization of hematopoietic and nonhematopoietic stem cell subpopulations in sepsis: a preliminary report. *Crit. Care.*, 2012, Vol. 16, suppl. 1, p. 8.
18. Smrcka M., Mrljan A., Karlsson-Valik J., Klabusay M. The effect of head injury upon the immune system. *Bratisl. Lek. Listy.*, 2007, Vol. 108, no. 3, pp. 144-148.
19. Sobrino T., Hurtado O., Moro M.A., Rodríguez-Yanez M., Castellanos M., Brea D., Moldes O., Blanco M., Arenillas J.F., Leira R., Davalos A., Lizasoain I., Castillo J. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke.*, 2007, Vol. 38, no 10, pp. 2759-2764.
20. Tate C.C., Case C.C. Mesenchymal stromal cells to treat brain injury. Advanced topics in neurological disorders. Chapter in «Neurological Disorders». *InTech*, 2012, pp. 45-78.
21. Wada J., Suzuki H., Fuchino R., Yamasaki A., Nagai S., Yanai K., Koga K., Nakamura M., Tanaka M., Morisaki T., Katano M. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer. Res.*, 2009, Vol. 29, no. 3, pp. 881-888.
22. Walker P.A., Letourneau P.A., Bedi S., Shah S.K., Jimenes F., Cox C.S. Progenitor cells as remote "bioreactors": Neuroprotection via modulation of the systemic inflammatory response. *World J. Stem. Cells.*, 2011, Vol. 3, no. 2, pp. 9-18.
23. Ward N.S., Casserly B., Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin. Chest Med.*, 2008, Vol. 29, no. 4, pp. 617-625.
24. Wojakowski W., Tendera M., Zebzda A., Michalowska A., Majka M., Kucia M., Maslankiewicz K., Wyderka R., Król M., Ochala A., Kozakiewicz K., Ratajczak M.Z. Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart. J.*, 2006, Vol. 27, no. 3, pp. 283-289.
25. Woodcock T., Morganti-Kossmann M.C. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front. Neurol.*, 2013, Vol. 4, p. 18. doi:10.3389/fneur.2013.00018
26. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 298-308.

27. Yamada M., Kubo H., Ishizawa K., Kobayashi S., Shinkawa M., Sasaki H. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax.*, 2005, Vol. 60, no. 5, pp. 410-413.
28. Zhang Z.G., Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol.*, 2009, Vol. 8, no. 5, pp. 491-500.
29. Zhao Y., Wang L., Jin Y., Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J. Dent Res.*, 2012, Vol. 91, no. 10, pp. 948-954.
30. Ziebell J.M., Morganti-Kossmann M.C. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.*, 2010, Vol. 7, no. 1, pp. 22-30.

---

**Авторы:**

**Черных В.А.** — аспирант 3-го года обучения, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

**Пронкина Н.В.** — к.б.н., заведующая лабораторией, ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Шевела Е.Я.** — д.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Ступак В.В.** — д.м.н., профессор, заведующий отделением нейрохирургии, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

**Рабинович С.С.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией, ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Chernykh V.A.** — Graduate Student of the Third Year of Study, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics MH RF, Novosibirsk, Russian Federation

**Pronkina N.V.** — PhD (Biology), Head of the Laboratory, Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

**Shevela E.Ya.** — PhD, MD (Medicine), Senior Researcher Fellow, Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

**Stupak V.V.** — PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Neurosurgery Department, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics MH RF, Novosibirsk, Russian Federation

**Rabinovich S.S.** — PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics MH RF, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.** — PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences, Deputy Director for Science, Head of the Laboratory, Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.** — PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 16.06.2014  
Принята к печати 22.06.2014

Received 16.06.2014  
Accepted 22.06.2014