

Циркулирующие гемопоэтические и эндотелиальные предшественники в периферической крови пациентов с черепно-мозговой травмой

В.А. Черных², Н.В. Пронкина¹, В.В. Ступак², В.В. Фонин³, П.Е. Шишлов³, Е.Я. Шевела¹,
О.Ю. Леплина¹, Е.Р. Черных¹, А.А. Останин¹

¹ Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

² НИИ травматологии и ортопедии Росмедтехнологий, Новосибирск

³ Городская клиническая больница №1, Новосибирск

Circulated hematopoietic and endothelial progenitors in peripheral blood of patients with traumatic brain injury

V.A. Chernykh², N.V. Pronkina¹, V.V. Stupak², V.V. Fonin³, P.E. Shishlov³, E.Ya. Shevela¹, O.Yu. Leplina¹,
E.R. Chernykh¹, A.A. Ostanin¹

¹ Institute of clinical immunology SB RAMS, Novosibirsk

² Institute of traumatology and orthopedy, Novosibirsk

³ City clinical hospital №1, Novosibirsk

В настоящей работе исследована мобилизация гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток (ГСК) и эндотелиальных предшественников (ЭП) у больных с черепно-мозговой травмой (ЧМТ). В первые 24–48 ч после ЧМТ выявлено достоверное возрастание абсолютного количества циркулирующих CD34⁺CD45⁺ ГСК, а также относительного и абсолютного количества CD34⁺CD144⁺ ЭП. Эффективность мобилизации ГСК была достоверно выше в группе больных до 40 лет, и относительное содержание CD45⁺CD34⁺ клеток находилось в обратной зависимости от возраста пациентов ($r = -0,54$, $p = 0,039$). Возрастание CD45⁺CD34⁺ ГСК и CD34⁺CD144⁺ ЭП регистрировалось как у больных с легкой, так и среднетяжелой/тяжелой ЧМТ и не зависело от уровня сознания по шкале комы Глазго (ШКГ). Однако у больных с отсутствием возрастания CD45⁺CD34⁺ клеток частота неблагоприятных исходов (1–3 балла по шкале исходов Глазго; ШИГ) была достоверно выше, чем в подгруппе больных с повышенным количеством ГСК ($p = 0,047$). Выявлена также значимая взаимосвязь ранних ЭП, не экспрессирующих VE-кадгерин (CD3-CD34+CD144-ЭП), с тяжестью/исходом ЧМТ ($r = 0,6$; $p = 0,017$ и $r = 0,53$; $p = 0,035$, соответственно). Таким образом, интенсивность мобилизации ГСК и ЭП у больных ЧМТ может быть использована в качестве прогностического фактора, свидетельствующего о репаративном потенциале костномозговых предшественников.

Ключевые слова: CD34⁺CD45⁺ гемопоэтические предшественники, CD34⁺CD144⁺ эндотелиальные предшественники, мобилизация, черепно-мозговая травма.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является серьезной причиной инвалидизации и смертности во всем мире. Недавние исследования показали, что эффективная репарация связана с неоваскуляризацией поврежденной ткани, и что важную роль в этом процессе играют CD34⁺ костномозговые гемопоэтические предшественники, которые мобилизуются в периферическую кровь в ответ на стресс-индуцирующие повреждения [1–3].

Участие CD34⁺ клеток в неоваскуляризации обусловлено тем обстоятельством, что данная популяция клеток содержит эндотелиальные предшественники (ЭП), способные дифференцироваться в эндотелиальные клетки и участвовать в формировании новых

сосудов, а также способностью CD34⁺ костномозговых предшественников продуцировать различные ростовые факторы, стимулирующие ангио- и васкулогенез [4–6]. При этом важно отметить, что индукция неоваскуляризации в поврежденной нервной ткани, а также продукция CD34⁺ клетками ростовых факторов (VEGF, FGF2, IGF-1 и др.) неотъемлемо сопряжены с активацией эндогенного нейрогенеза [7–9], что также определяет репаративный потенциал гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток (ГСК) и ЭП.

Key words: CD34⁺CD45⁺ hematopoietic progenitors, CD34⁺CD144⁺ endothelial progenitors, mobilization, traumatic brain injury.

Феномен мобилизации CD34⁺ клеток из костного мозга в кровеносное русло и его значение наиболее активно исследованы при инфаркте миокарда и

ишемическом инсульте [10–12]. В частности, показано, что количество ЭП в крови больных инсультом прямо коррелирует с благоприятным исходом заболевания [13, 14] и находится в обратной взаимосвязи с количеством эпизодов острого нарушения мозгового кровообращения [15]. Обратная сопряженность между количеством циркулирующих ЭП и размерами первичного очага продемонстрирована также в модели ишемических повреждений головного мозга на животных [16]. Таким образом, содержание CD34⁺ клеток в периферической крови может отражать интенсивность репаративных процессов. Способность CD34⁺ предшественников усиливать процессы репарации нервной ткани подтверждается также данными о том, что трансплантация CD34⁺ клеток улучшает неврологические исходы в моделях ишемического и геморрагического инсультов [17–19].

Несмотря на интенсивные исследования ЭП при ишемических повреждениях головного мозга, их роль при травме головного мозга остается мало изученной, и, в основном, ограничена экспериментальными исследованиями на животных. Поскольку ЧМТ подвержены люди молодого возраста, не имеющие сосудистой патологии, изменения ЭП и значимость этого феномена в развитии репаративных процессов при травматическом поражении головного мозга может отличаться от таковой при повреждениях сосудистого генеза. Кроме того, в литературе имеются данные о том, что системный воспалительный ответ, не связанный с повреждением сосудов, может проходить в отсутствие мобилизации ЭП [20].

С другой стороны, имеются данные, что образование новых сосудов является критическим фактором для репарации нервной ткани после травматических повреждений [21], и что CD34⁺ предшественники могут принимать участие в неоваскуляризации посттравматических повреждений головного мозга [22].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования стало выявление закономерностей содержания костномозговых предшественников в периферической крови больных в остром периоде ЧМТ.

Материал и методы

Характеристика пациентов

В исследование были включены 18 пациентов (15 мужчин и 3 женщины) с закрытой ЧМТ в возрасте от 22 до 73 (42 ± 3,6) лет. Девять пациентов имели легкую (бал тяжести по Шкале Комы Глазго (ШКГ) от 13 до 15), три – среднетяжелую (9–12 баллов) и 6 – тяжелую (≤ 8 балла) ЧМТ. У всех пациентов, по данным компьютерной томографии (КТ), диагностировались ушибы головного мозга различной степени тяжести. Группу ЧМТ легкой степени тяжести составили пациенты с ушибом головного мозга в сочетании с переломом костей черепа у 4 из 9 больных. Больные со средней и тяжелой степенью ЧМТ имели ушибы головного мозга со сдавлением острой субдуральной (n = 6) и эпидуральной (n = 2) гематомами; субарахноидальным кровоизлиянием (n = 3) и переломами костей черепа (n = 4). Обследование больных включало оценку уровня сознания по ШКГ, КТ головного мозга с оценкой категории повреждений в соответствии с 6-балльной классификацией J.C. Marshall (1991), неврологическое обследование, анализ крови. При поступлении у всех пациентов регистрировалось наличие и выраженность системного воспалительного ответа (СВО). Состояние больных

на момент выписки оценивали по 5-балльной шкале исходов Глазго (ШИГ). Контрольную группу составили 13 сопоставимых по полу и возрасту здоровых доноров.

Оценка костно-мозговых предшественников

ГСК и ЭП оценивали соответственно в цельной крови и в лейкоцывеси, которую получали путем отстаивания гепаринизированной крови при 37°C в течение 40 мин. Количество ГСК и ЭП определяли методом 2- и 3-цветной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuestPro. ГСК идентифицировали по количеству CD45⁺CD34⁺ клеток в соответствии с рекомендациями международного общества гемотерапии (ISHAGE, 1996). При подсчете клеток в каждой пробе оценивали 1 × 10⁵ событий. С помощью PE-меченных анти-CD34 и FITC-меченных анти-CD45 моноклональных антител (BD Pharmingen, США) определяли относительное количество CD45⁺CD34⁺ клеток среди всех лейкоцитов после гейтирования жизнеспособных клеток. ЭП оценивали по числу клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических предшественников (CD34) и эндотелиальных клеток (VE-кадгерин/CD144) среди не-T-лимфоцитов (CD3⁻CD34⁺CD144⁺ клетки) с использованием PE-меченных анти-CD3, FITC-меченных анти-CD34 и APC-меченных анти-CD144 моноклональных антител (BD Pharmingen, США) в соответствии с рекомендациями Redondo S. (2008) [23]. Путем последовательного гейтирования определяли процентное содержание CD3⁻CD34⁺CD144⁺ клеток в лимфоцитарном гейте среди CD3⁻негативных клеток. Одновременно оценивали содержание лимфоидных предшественников, не экспрессирующих VE-кадгерин (CD3⁻CD34⁺CD144⁻). Оценку количества костномозговых предшественников проводили на 1–2 сут. с момента травмы (но не ранее, чем через 8 ч посттравматического периода) после получения письменного информированного согласия пациента или его родственников.

Математическую обработку данных проводили при помощи параметрических и непараметрических методов с использованием программных пакетов для статистической обработки Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между подгруппами больных использовали точный метод Фишера для дискретных переменных и критерий Вилкоксона – Манна – Уитни – для непрерывных переменных. Для исследования корреляционных взаимосвязей между признаками в группах больных использовали коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Оценка костномозговых предшественников в периферической крови 13 здоровых доноров показала (табл. 1), что относительное содержание CD45⁺CD34⁺ клеток среди лейкоцитов составляет минорную фракцию (медиана 0,025%), а абсолютное количество этих клеток варьирует от 600 до 2900 кл/мл. Доля CD3⁻CD34⁺CD144⁺ клеток среди лимфоцитов была также низкой (медиана 0,009%), а численность ЭП варьировала от 0 до 67 кл/мл.

Оценку костномозговых предшественников у больных проводили в первые двое суток после ЧМТ. Продолжительность времени с момента травмы до иммунологического обследования варьировала от

9 до 48 ч, составляя в среднем $14,5 \pm 2,1$ ч. Оценка ГСК и ЭП в периферической крови больных ЧМТ выявила значимое возрастание абсолютного количе-

ства $CD45^+CD34^+$ клеток, а также относительного и абсолютного количества $CD3^-CD34^+CD144^+$ клеток (табл. 1, рис. 1 и 2).

Таблица 1. Содержание гемопозитических и эндотелиальных предшественников в крови здоровых доноров и больных ЧМТ

Показатель	Здоровые доноры (n = 13)	Больные ЧМТ (n = 18)	P _U
CD45 ⁺ CD34 ⁺ (%)	0,03±0,006 (0,025)	0,056±0,01 (0,02)	0,73
CD45 ⁺ CD34 ⁺ (кл/мл)	1400±240 (1100)	5600±1200 (3100)	0,006
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁺ (%)	0,006±0,002 (0,009)	0,075±0,01 (0,045)	0,0002
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁺ (кл/мл)	30±8,3 (36)	559±160 (280)	0,0001
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁻ (%)	0,19±0,04 (0,13)	0,18±0,03 (0,15)	1,0
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁻ (кл/мл)	797±164 (742)	1094±294 (796)	0,09

Примечание: Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, в скобках – медиана; P_U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

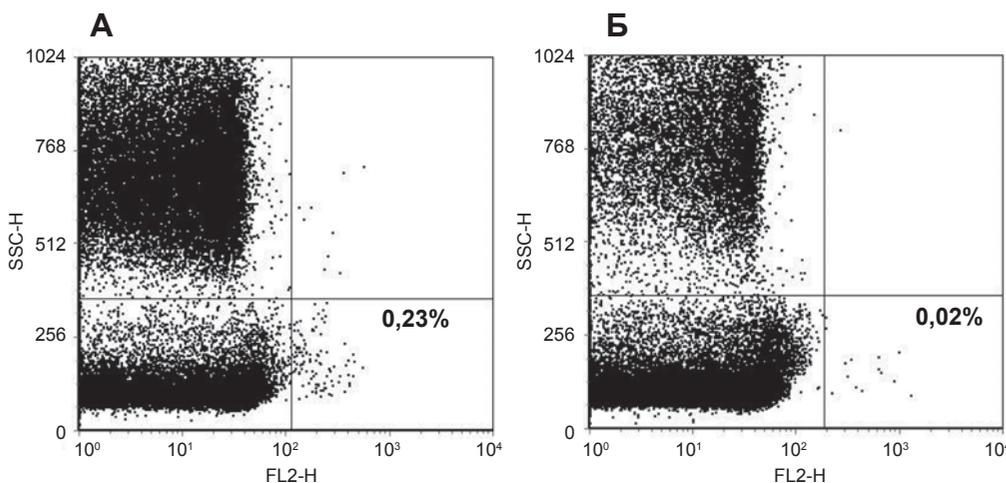


Рис. 1. Распределение $CD34^+$ ГСК (FL2-H канал) среди $CD45^+$ клеток крови. Представлены индивидуальные гистограммы распределения циркулирующих $CD34^+CD45^+$ клеток у больного ЧМТ (А) и здорового донора (Б). Относительное содержание $CD34^+CD45^+$ ГСК у здорового донора составило 0,02%, у больного ЧМТ – 0,23%

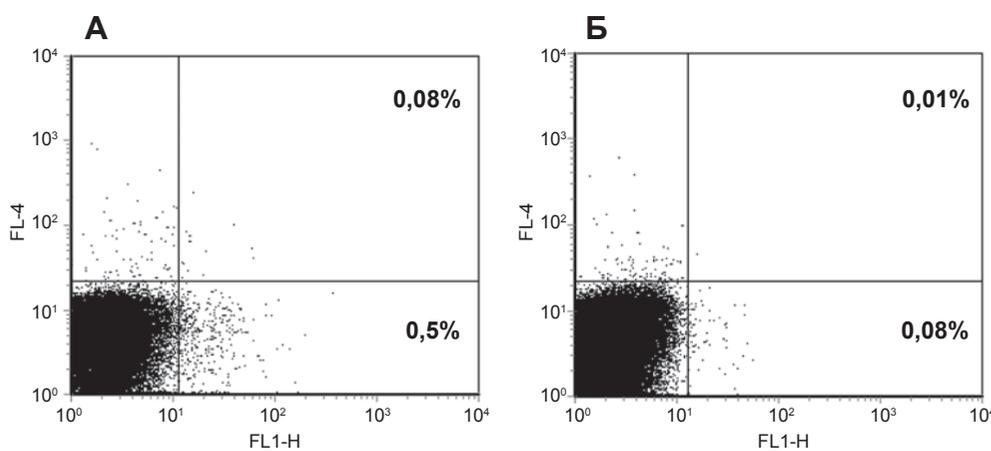


Рис. 2. Распределение среди $CD3^-$ лимфоцитов циркулирующих ЭП по флуоресценции APC-меченных анти- $CD144^-$ антител (FL4-H канал) и FITC-меченных анти- $CD34^-$ антител (FL1-H канал). Представлены индивидуальные гистограммы распределения эндотелиальных предшественников у больного ЧМТ (А) и здорового донора (Б). Относительное содержание $CD34^+CD144^-$ ЭП (правый верхний квадрант) и $CD34^-CD144^-$ ЭП (правый нижний квадрант) у здорового донора составило 0,01 и 0,08%, у больного ЧМТ – 0,08 и 0,5%

Анализ индивидуальных значений показал, что, несмотря на возрастание численности костномозговых предшественников в целом по группе, повышенный уровень ГСК, выходящий за верхнюю границу физиологической нормы (более 2900 кл/мл), регистрировался только у 9 из 18 пациентов (50%). Возрастание ЭП (более 70 кл/мл) отмечалось у 13 больных (72%). Таким образом, эффективная мобилизация костномозговых предшественников в первые 24–48 ч после травмы регистрировалась у большей части, но не у всех пациентов.

В литературе имеются данные, свидетельствующие, что количество костномозговых предшественников и эффективность их мобилизации обратно коррелируют с возрастом пациентов [24]. Чтобы выяснить, насколько количественные различия костномозговых предшественников у отдельных больных связаны с возрастным фактором, было проведено сравнительное исследование содержания CD45⁺CD34⁺ клеток в группах пациентов до 40 и ≥ 40 лет. В анализ были включены все больные за исключением 3 пациентов с тяжестью комы 3–4 балла, которые умерли в течение первых 3–4 сут. Как следует из данных табл. 2, пациенты в возрасте до 40 лет характеризовались более высоким относительным и абсолютным содержанием CD45⁺CD34⁺ клеток, большей частотой встречаемости больных с повышенным содержанием ГСК и тенденцией к более высокому уровню ЭП, по сравнению с пациентами возрастной группы ≥ 40 лет.

Важно отметить, что сформированные подгруппы больных не различались по средним показателям уровня сознания (балл по ШКГ), доле больных со среднетяжелой и тяжелой ЧМТ и частоте развития СВО, что указывало на однородность групп по тяжести состояния. Поэтому выявленные различия в количестве костномозговых предшественников в данном случае отражали возрастные закономерности. На это также указывала обнаруженная нами обратная взаимосвязь между возрастом и численностью ГСК, которая проявлялась в виде достоверной зависимости в отношении относительного количества CD45⁺CD34⁺ клеток ($r = -0,54$, $p = 0,039$) и выраженной тенденции в отношении абсолютного содержания этих клеток ($r = -0,43$; $p = 0,1$). Значимой взаимосвязи между возрастом и численностью CD3⁻CD34⁺CD144⁺ЭП выявлено не было ($r = -0,26$; $p = 0,37$, соответственно).

Чтобы оценить возможную ассоциацию между интенсивностью мобилизации клеток-предшественниц и тяжестью травмы, провели сравнительный анализ количества ГСК и ЭП в подгруппах пациентов с легкой (13–15 баллов по ШКГ, $n = 9$) и среднетяжелой/тяжелой ЧМТ (≤ 12 баллов по ШКГ, $n = 9$). Средний возраст больных в этих подгруппах составил $44 \pm 4,4$ и $41 \pm 5,2$ лет и достоверно не различался, свидетельствуя о возрастной однородности групп. Абсолютное количество ГСК было повышено как у больных с легкой, так и среднетяжелой/тяжелой ЧМТ (6056 ± 2013 и 5067 ± 1497 кл/мл, соответственно).

Таблица 2. Содержание гемопозитических и эндотелиальных предшественников в подгруппах пациентов с ЧМТ в зависимости от возраста

Показатель	< 40 лет (n = 7)	≥ 40 лет (n = 8)	P
Возраст (лет)	31 \pm 2,3 (29)	55,6 \pm 3,4 (54)	$p_U = 0,0003$
Балл по ШКГ	11 \pm 1,9 (13)	12 \pm 1,7 (14,5)	$p_U = 0,56$
Количество больных со среднетяжелой/тяжелой ЧМТ (≤ 12 баллов по ШКГ)	42,8%	37,5%	$p_{\text{ТМФ}} = 1,0$
Количество больных с 2 и более признаками СВО	57%	62,5%	$p_{\text{ТМФ}} = 1,0$
CD45 ⁺ CD34 ⁺ ГСК (%)	0,078 \pm 0,027 (0,04)	0,049 \pm 0,034 (0,018)	$p_U = 0,024$
CD45 ⁺ CD34 ⁺ (кл/мл)	8700 \pm 1894 (8400)	4225 \pm 1798 (1750)	$p_U = 0,037$
Количество больных с повышенным уровнем ГСК (> 2900 кл/мл)	100%	25%	$p_{\text{ТМФ}} = 0,007$
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁺ ЭП (%)	0,108 \pm 0,035 (0,15)	0,053 \pm 0,028 (0,03)	$p_U = 0,56$
CD3 ⁻ CD34 ⁺ CD144 ⁺ (кл/мл)	855 \pm 326 (559)	309 \pm 109 (280)	$p_U = 0,39$
Количество больных с повышенным уровнем ЭП (> 70 кл/мл)	71%	62,5%	$p_{\text{ТМФ}} = 1,0$

Примечание: Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, в скобках – медиана; p_U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни, $p_{\text{ТМФ}}$ – точный метод Фишера.

и не коррелировало с уровнем сознания по ШКГ ($r = 0,01$, $p = 0,99$). Аналогичным образом, в обеих анализируемых подгруппах регистрировалось повышенное количество ЭП (623 ± 250 и 557 ± 198 кл/мл, соответственно), которое также не коррелировало с баллом ШКГ ($r = 0,09$, $p = 0,74$). При индивидуальном анализе обращало внимание то, что, если у больных с легкой ЧМТ отсутствие возрастания предшественников выявлялось исключительно у пациентов старше 40 лет, то у пациентов с тяжелой ЧМТ — отмечалось также и у молодых пациентов. Поэтому обратная взаимосвязь между относительным содержанием ГСК и возрастом пациентов, выявляемая в целом по группе больных ЧМТ, полностью исчезала в подгруппе пациентов с тяжелой травмой ($r = 0,14$, $p = 0,78$; $n = 6$). Это позволило предположить, что при среднетяжелой/тяжелой ЧМТ мобилизация костномозговых предшественников детерминирована не только возрастным, но и другими факторами, и что в этом случае количество ранних предшественников может быть сопряжено с репаративным потенциалом и, соответственно, с исходом заболевания.

Чтобы проверить это предположение, мы сравнили исходы стационарного лечения в подгруппах пациентов со среднетяжелой/тяжелой ЧМТ с наличием (подгруппа I, ГСК $> 2,9 \times 10^3$ /мл, $n = 4$) и отсутствием (подгруппа II, ГСК $< 2,9 \times 10^3$ /мл, $n = 5$) эффективной мобилизации CD45⁺CD34⁺ клеток (табл. 3).

Как видно, пациенты указанных групп имели сопоставимые показатели тяжести по ШКГ, характеризовались сходным уровнем повреждений по данным КТ. У всех пациентов обеих групп отмечалось наличие внутричерепной гипертензии, дислокационного синдрома, практически у всех имелась артериальная гипотензия. За исключением одного пациента первой группы, все больные были прооперированы. Продолжительность комы в группах также не различалась ($5,8 \pm 2,3$ и $5,6 \pm 2,4$ суток, $p = 0,62$). Таким образом, пациенты сравниваемых подгрупп действительно были схожи по тяжести ЧМТ. Исходы ЧМТ оценивали при выписке из стационара по 5-бальной шкале исходов Глазго. Летальность, а также вегетативный статус или грубая инвалидизация, приводящая к невозможности самообслуживания (1–3 балла), расценивались как неблагоприятный исход, умеренное или полное восстановление (4–5 баллов) — как благоприятный исход. В группе с повышенным количеством ГСК неблагоприятный исход был зарегистрирован только у 1 из 4 больных. Во второй группе с низкой эффективностью мобилизации CD45⁺CD34⁺ клеток все пациенты имели неблагоприятные исходы. Четверо больных умерли, один больной был выписан с грубыми неврологическими расстройствами. Таким образом, у больных с отсутствием возрастания CD45⁺CD34⁺ клеток частота неблагоприятных исходов была достоверно выше, чем в подгруппе больных с повышенным количеством ГСК (100 против 25%; $p = 0,047$).

Таблица 3. Тяжесть и исходы ЧМТ в подгруппах больных, различающихся по эффективности мобилизации CD45⁺CD34⁺ГСК

Пациенты	ГСК $\times 10^3$ кл/мл	Балл по ШКГ	Хирургическое лечение	Категория тяжести по КТ	Факторы вторичного повреждения			Исход, балл по ШИГ
					Внутричерепная гипертензия	Дислокационный синдром	Артериальная гипотензия	
Подгруппа I, ГСК $> 2,9 \times 10^3$/мл								
1	8,4	5	+	5	+	+	+	4
2	3,2	8	+	5	+	+	-	5
3	12,5	3	-	6	+	+	+	1
4	11,6	5	+	5	+	+	+	4
Подгруппа II, ГСК $< 2,9 \times 10^3$/мл								
1	1,6	4	+	5	+	+	+	1
2	1,6	4	+	5	+	+	+	1
3	1,6	3	+	5	+	+	+	1
4	2,9	3	+	5	+	+	+	1
5	2,2	12	+	5	+	+	-	3

Примечание: Внутричерепную гипертензию и дислокационный синдром оценивали по данным КТ. Артериальную гипотензию диагностировали при снижении систолического АД ниже 90 мм рт. ст. Оценка тяжести повреждения по данным КТ проводили в соответствии с классификацией J.C. Marshall (1991).

В завершении исследовали взаимосвязь уровня сознания (балл ШКГ) и исходов (балл ШИГ) со всеми анализируемыми субпопуляциями циркулирующих предшественников в общей группе пациентов, включая больных, умерших в течение первых дней стационарного лечения. Относительное и аб-

солютное содержание $CD45^+CD34^+GSK$ и $CD3^+CD34^+CD144^+ЭП$ не было сопряжено с тяжестью/исходом ЧМТ. В то же время уровень сознания по ШКГ и исход стационарного лечения по шкале Глазго прямо коррелировали с абсолютным содержанием $CD3^+CD34^+CD144^-$ клеток (рис. 3).

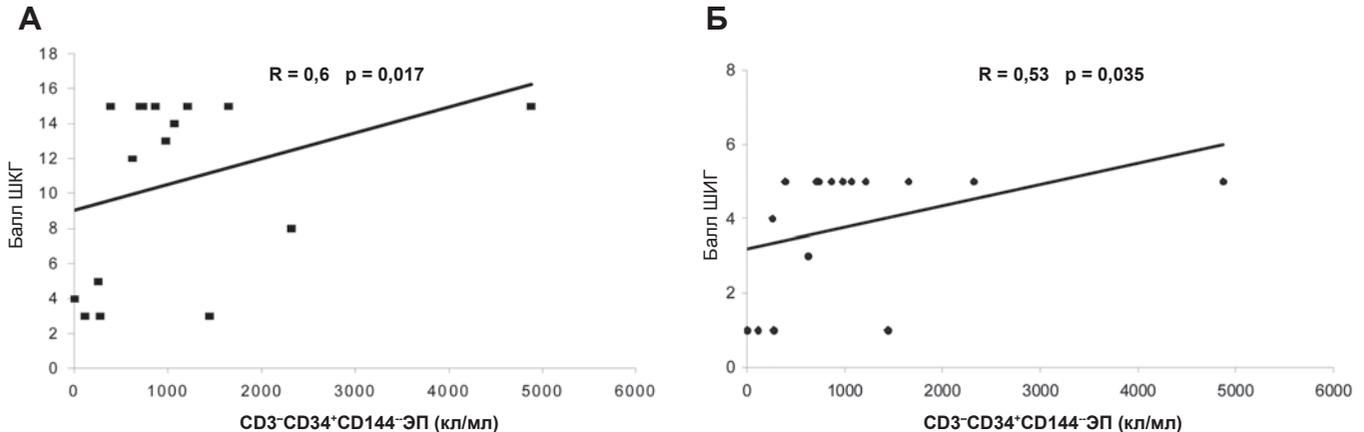


Рис. 3. Взаимосвязь абсолютного количества ранних $CD3^+CD34^+CD144^-$ эндотелиальных предшественников с тяжестью (балл ШКГ; А) и исходом ЧМТ (балл ШИГ; Б)

При этом выявленные взаимосвязи не были обусловлены изменениями общего лимфоцитоза, поскольку баллы по ШКГ и ШИГ не коррелировали с абсолютным содержанием лимфоцитов ($r = 0,16$; $p = 0,54$ и $r = 0,22$; $p = 0,4$). Субпопуляция $CD3^+CD34^+CD144^-$ клеток, локализованных среди лимфоидных клеток и лишенных специфического маркера эндотелиоцитов VE-кадгерина ($CD144$), представляет более ранние ЭП. Их количество в первые 24–48 ч после ЧМТ в целом по группе достоверно не отличалось от донорских значений (см. табл. 1). Тем не менее, у пациентов с благоприятными исходами численность $CD3^+CD34^+CD144^-$ клеток составляла 1370 ± 391 кл/мл (против 797 ± 164 кл/мл у доноров, $p > 0,05$), тогда как у больных с неблагоприятными исходами была достоверно ниже (489 ± 259 кл/мл, $p = 0,04$).

Обсуждение

Полученные нами данные впервые продемонстрировали, что пациенты с закрытой, изолированной ЧМТ в первые 24–48 ч характеризуются достоверным возрастанием в периферической крови численности $CD34^+CD45^+$ ГСК и $CD3^+CD34^+CD144^+$ ЭП, что свидетельствует о мобилизации костномозговых клеток в остром посттравматическом периоде. Анализируя данные литературы, мы нашли единственное сообщение, в котором авторы исследовали в динамике ЭП и показали, что количество $CD34^+CD133^+ЭП$ в первые сутки после ЧМТ снижалось, а затем постепенно возрастало с выходом на плато к 7-м сут. [25]. В нашем исследовании мы оценивали более зрелые ЭП, которые экспрессировали $CD34$ и VE-кадгерин ($CD144$) и на этой стадии уже не несли маркер ранних ЭП ($CD133$). Выявленное L. Liu с соавт. (2007) снижение $CD133^+ЭП$ в раннем посттравматическом периоде могло быть связано с их дифференцировкой в более зрелые формы ($CD144^+$ клетки), увеличение которых и было зарегистрировано в нашем исследовании. Кроме того, нами впервые показано

возрастание $CD34^+CD45^+GSK$ в периферической крови больных ЧМТ. Аналогичное увеличение циркулирующих $CD34^+$ костномозговых предшественников отмечается также у больных с ишемическим инсультом в первые 1–3 сут. после «сосудистой катастрофы» [12]. Согласно нашим данным, эффективность мобилизации ГСК и ЭП обратно коррелировала с возрастом пациентов, что согласуется с данными L. Liu с соавт. о более эффективной мобилизации ЭП у лиц до 50 лет [25]. В то же время данная зависимость исчезала у больных с тяжелой ЧМТ. Это позволило предположить, что при нарастании тяжести ЧМТ изменения количества ГСК в циркулирующей крови отражают не возрастные особенности, а индивидуальную реакцию пациента на травму, которая может предопределять выживаемость и эффективность неврологического восстановления при ЧМТ. Действительно, анализ больных со среднетяжелой/тяжелой ЧМТ показал, что неблагоприятные исходы (1–3 балла по ШИГ) у лиц с отсутствием эффективной мобилизации $CD34^+CD45^+$ предшественников наблюдались достоверно чаще, чем у больных с повышенным содержанием ГСК. Кроме того, анализ ЭП среди $CD34^+$ лимфоидных клеток, еще не экспрессирующих VE-кадгерин, показал, что численность этих клеток прямо коррелировала с баллом по ШИГ ($r = 0,53$; $p = 0,035$). При этом содержание $CD3^+CD34^+CD144^-$ клеток было повышенным у больных с легкой ЧМТ и сниженным у пациентов с тяжелой травмой.

Полученные нами данные представляют интерес в нескольких аспектах. Как показали недавние исследования на животных, функциональное восстановление после травматического повреждения головного мозга сопряжено с активацией ангиогенеза и ассоциированного с неоваскуляризацией нейрогенеза [26, 27], и мобилизация $CD34^+$ костномозговых предшественников может играть важную роль в этих процессах [28, 22]. До настоящего времени позитивная роль костномозговых предшественников

в репарации поврежденной нервной ткани у человека продемонстрирована только при ишемическом инсульте [13–15]. Поэтому выявленные нами факты являются, по сути, первыми, хотя и предварительными данными, свидетельствующими о важной роли мобилизации ГСК и ЭП в процессах репарации при травматическом повреждении головного мозга у человека. Кроме того, наши результаты свидетельствуют о том, что определение ГСК и ЭП может иметь прогностическую значимость для определения ис-

ходов ЧМТ. Учитывая возможную роль костномозговых предшественников в стимуляции репаративных процессов, можно также полагать, что направленная регуляция их численности станет одной из новых терапевтических стратегий при лечении ЧМТ. Действительно, данные доклинических исследований на животных показали, что усиление мобилизации ЭП под действием эритропоэтина и статинов улучшало неврологическое восстановление в модели ЧМТ [29].

ЛИТЕРАТУРА:

- Masuda H., Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc. Res.* 2003; 58: 390–8.
- Schatteman G.C., Dunnwald M., Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2007; 292: 1–18.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 1999; 85: 221–8.
- Rookmaaker M.B., Verhaar M.C., Loomans C.J. et al. CD34⁺ cells home, proliferate, and participate in capillary formation, and in combination with CD34-cells enhance tube formation in a 3-dimensional matrix. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1–8.
- Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q. et al Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ. Res.* 2002; 90: 284–8.
- Fujita Y., Ihara M., Ushiki T. et al. Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke* 2010; 41: 2938–43.
- Taguchi A., Soma T., Tanaka H. et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 330–8.
- Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J. et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001; 97: 3075–85.
- Ohab J.J., Fleming S., Blesch A. et al. Neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 2006; 26: 13007–16.
- Paczkowska E., Larysz B., Rzeuski R. et al. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34⁺ cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur. J. Haematol.* 2005; 75: 461–7.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776–9.
- Machalinski B., Paczkowska E., Koziarska D. et al. Mobilization of human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34⁺ cells into peripheral blood during stress related to ischemic stroke. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2006; 44: 97–101.
- Sobrino T., Hurtado O., Moro M. A. et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007; 38: 2759–64.
- Dunac A., Frelin C., Popolo-Blondeau M. et al. Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34⁺ cell mobilization. *Neurology* 2007; 254: 327–32.
- Taguchi A., Matsuyama T., Moriwaki H. et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; 109: 2972–5.
- Bogoslovsky T., Chaudhry A., Latour L. et al. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology* 2010; 75: 2059–62.
- Nan Z., Grande A., Sanberg C.D. et al. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005; 1049: 84–96.
- Taguchi A., Soma T., Tanaka H. et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 330–8.
- Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; 32: 2682–8.
- Padfield G.J., Tura O., Haeck M.L. et al. Circulating endothelial progenitor cells are not affected by acute systemic inflammation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298: 2054–61.
- Thau-Zuchman O., Shohami E., Alexandrovich A.G. et al. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 2010; 30: 1008–16.
- Guo X., Liu L., Zhang M. et al. Correlation of CD34⁺ cells with tissue angiogenesis after traumatic brain injury in a rat model. *Neurotrauma* 2009; 26: 1337–44.
- Redondo S., Hristov M., Gordillo-Moscoso A.A. et al. High-reproducible flow cytometric endothelial progenitor cell determination in human peripheral blood as CD34⁺/CD144⁺/CD3⁻ lymphocyte subpopulation. *J. Immunol. Methods.* 2008; 335: 21–7.
- Scheubel R.J., Zorn H., Silber R-E. et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells inpatients undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 2073–80.
- Liu L., Liu H., Jiao J. et al. Changes in circulating human endothelial progenitor cells after brain injury. *Neurotrauma* 2007; 24(6): 936–43.
- Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2010; 11: 298–308.
- Morgan R., Krejpek C.W., Roberts G. et al. Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurol. Res.* 2007; 29: 375–81.
- Richardson R.M., Sun D., Bullock M.R. Neurogenesis after traumatic brain injury. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2007; 18: 169–81.
- Xiong Y., Lu D., Qu C. et al. Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J. Neurosurg.* 2008; 109: 510–21.

Поступила 26.01.2011