Экспрессия рецепторов к Г-КСФ и IL8 на клетках крови в динамике терапии Г-КСФ*

Е.В. Райкина, С.А. Румянцев

Receptor expression to G-CSF and IL8 in blood cells while treating with G-CSF

E.V.Raikina, S.A. Rumyantsev

Многочисленными исследованиями показано, что рецептор к Г-КСФ имеется лишь у небольшого числа гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга и периферической крови [1, 2]. Его плотность на $CD34^+$ клетках очень низкая, увеличивается по мере созревания гранулоцитов, достигая максимума у зрелых нейтрофилов и моноцитов. Так, известно, что количество рецепторов у нормальных нейтрофилов возрастает соответственно с их степенью зрелости с 500 до 3000 на клетку [3].

Действительно, наибольший эффект Г-КСФ отмечается при уровне нейтрофилов более 2000 клеток в 1 мкл крови и времени более 30 суток от окончания химиотерапии (в этот временной промежуток происходит репопуляция стволовой клетки) [4]. В таком случае остается неясным мобилизирующий эффект Г-КСФ в условиях индуцированной гипоплазии кроветворения после химиотерапии, когда абсолютное число гранулоцитов в периферической крови менее 500 в 1 мкл.

Таким образом, вопрос о непосредственном влиянии Г-КСФ на гемопоэтические стволовые клетки остается дискутабельным, в свете чего становится актуальным исследование, направленное на поиск факторов, способствующих мобилизующему действию Г-КСФ.

Материал и методы исследования

Материалом исследования служила периферическая кровь 45 детей с онкогематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в ФГУ «ФНКЦ ДГОИ» Росздрава с 2000 по 2006 годы. Из них 26 пациентов получали препараты Г-КСФ с целью восстановления количества гранулоцитов при медикаментозной цитопении, остальные 19 – с целью мобилизации $CD34^+$ клеток в периферическую кровь для сбора и последующей аутологичной трансплантации. Кроме того, исследовали периферическую кровь и сыворотку 15 здоровых доноров ГСК, которые получали препараты Г-КСФ с целью мобилизации $CD34^+$ клеток в периферическую кровь для дальнейшего отбора и последующей аллогенной трансплантации.

Протоколы клинического применения препаратов Г-КСФ

В настоящем исследовании использовались препараты Г-КСФ – граноцит (леногастрим), нейпоген (филгастрим) и лейкостим (филгастрим) – в рамках трех протоколов клинического применения Г-КСФ:

1. Мобилизация $CD34^+$ клеток в периферическую кровь с целью их сбора для аллогенной трансплантации.
2. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь с целью их сбора для аутологичной трансплантации.
3. Лечение медикаментозной цитопении после курсов высокодозной цитотоксической полихимиотерапии у детей с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями.

Получение $CD34^+$ клеток периферической крови

Периферические $CD34^+$ клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе «Baxter CS-3000 Plus». Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Процедуры цитафереза после периода мобилизации проводили ежедневно до тех пор, пока суммарное количество $CD34^+$ клеток не достигало уровня, обеспечивающего наиболее быстрое приживление трансплантата.

Минимально допустимым количеством $CD34^+$ клеток для трансплантации считали их число более 2×10^6/кг массы тела реципиента. Оптимальным считали количество $CD34^+$ клеток более 5×10^6/кг массы тела реципиента. Для достижения такого уровня требовалось различное число процедур цитафереза (от 1 до 4). Ежедневное введение препаратов Г-КСФ продолжали и в дни проведения сеансов цитафереза.

Определение количества субпопуляций лейкоцитов и стволовых клеток, несущих рецептор к IL8 и Г-КСФ

Количество субпопуляций лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток, несущих рецепторы к Г-КСФ (CD114) и IL8 (CDw128), определяли по экспрессии мембранных маркеров (CD – clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, CD14, CD15, CD34, CD38, CD45, CD114, CDw128 «Becton Dickinson» (США) при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCalibur «Becton Dickinson» (США).

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с помощью однофакторного дисперсионного анализа и оценкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена-Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением с помощью критерия Крускалла-Уоллеса и критерия Манна-Уитни. Для оценки равенства долей использовали *Z*-тест. Корреляционный анализ проводили с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена для рядов с непараметрическим

* Материал представлен на международный симпозиум «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантации», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Результаты и обсуждение

Учитывая тот факт, что для реализации действия Г-КСФ на клетку необходимо наличие у нее рецепторов к Г-КСФ, можно предположить, что мобилизация $CD34^+$ клеток в периферическую кровь связана с наличием у них рецептора к Г-КСФ. Мы изучили уровень экспрессии рецептора к Г-КСФ (CD114) на поверхности $CD34^+$ клеток, гранулоцитов и моноцитов периферической крови. Количество $CD34^+$ клеток, несущих рецептор к Г-КСФ, составило у здоровых доноров 3,6±1,1 % от $CD34^+$ клеток, при медикаментозной цитопении – 4,2±1,3 % и при мобилизации аутологичных $CD34^+$ клеток – 3,9±1,1 % (табл. 1). Доля $CD34^+/114^+$ клеток из циркулирующих лейкоцитов показана в таблице 2. Количество гранулоцитов и моноцитов, несущих рецептор к Г-КСФ, показана в таблице 1, а доля $CD15^+$/ $CD114^+$ и $CD14^+$/ $CD114^+$ клеток продемонстрирована в таблице 2. При изучении динамики доли $CD114^+$ клеток среди циркулирующих лейкоцитов при использовании препаратов Г-КСФ оказалось, что доля $CD34^+/114^+$ клеток после использования Г-КСФ статистически не значимо снижается, как и количество $CD14^+/114^+$ клеток, тогда как количество гранулоцитов ($CD15^+/114^+$ клеток), несущих Г-КСФ рецептор в пуле циркулирующих лейкоцитов, в ответ на Г-КСФ статистически не значимо увеличивается (табл. 2).

Исследования последних лет, в основном на моделях с животными, показали, что Г-КСФ не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические клетки-предшественники [5], а мобилизация ГСК является результатом действия «периферических» хемокинов, таких как интерлейкин 8 (IL-8 или CXCL8), и ремоделирования матрикса и базальной мембраны энзимами матрикса, такими как желатиназа-В (MMP-9) [6]. Нами было изучено изменение количества рецепторов к IL-8 на стволовых клетках, гранулоцитах и моноцитах на фоне мобилизации Г-КСФ. Показано, что количество $CD128b^+CD34^+$ клеток минимально перед началом курса Г-КСФ и практически не определяется после его окончания (табл. 3). Количество гранулоцитов ($CD128b^+CD15^+$ клеток) и моноцитов ($CD128b^+CD14^+$ клеток), несущих Г-КСФ рецептор, в результате применения Г-КСФ не меняется (табл. 3).

Таблица 1. **Доля CD114+клеток среди CD34+клеток, гранулоцитов и моноцитов периферической крови (%, M±m)**

Доля CD114+клеток из числа	Медикаментозная цитопения (n=10)	Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток (n=5)	Доноры аллогенных $CD34^+$ клеток (n=5)
$CD34^+$клеток	4,2±1,3	3,9±1,1	3,6±1,1
$CD14^+$клеток	18,2±9,3	17,6±6,9	15,4±3,3
$CD15^+$клеток	38,6±12,3	45,1±7,2	42,3±5,7

Таблица 2. **Доля CD114+клеток среди лейкоцитов периферической крови (%, M±m)**

Параметр	Медикаментозная цитопения (n=10)		Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток (n=5)		Доноры аллогенных $CD34^+$ клеток (n=5)	
	до Г-КСФ	после Г-КСФ	до Г-КСФ	после Г-КСФ	до Г-КСФ	после Г-КСФ
$CD114^+/34^+$	0,07±0,03	0,01±0,01	0,08±0,06	0,02±0,02	0,038±0,02	0,02±0,02
$CD114^+/14^+$	5,12±3,9	2,57±0,65	16,3±15,3	7,8±3,3	18,7±6,8	5,1±3,2
$CD114^+/15^+$	15,2±5,4	22,9±8,7	5,5±0,8	15,4±7,4	34,2±8,7	47,2±13,4

Таблица 3. **Изменение доли клеток, несущих рецептор к IL-8, среди различных дифференцированных элементов периферической крови в динамике использования Г-КСФ (%, M±m)**

Параметр	Медикаментозная цитопения (n=12)		Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток (n=5)		Доноры аллогенных $CD34^+$ клеток (n=5)	
	до Г-КСФ	после Г-КСФ	до Г-КСФ	после Г-КСФ	до Г-КСФ	после Г-КСФ
$CD128b^+/34^+$	0,2±0,07	0,04±0,03	0,07±0,034	0,01±0,01	0,06±0,017	0,01±0,01
$CD128b^+/14^+$	16±6,3	11,9±2,2	26,9±16,5	36,2±18,9	18,2±3,9	18,4±3,7
$CD128b^+/15^+$	44,2±9,8	73,4±6,7	40,8±22,6	46,5±16,7	53,8±18,2	50,9±19,7

Таким образом, показано, что количество CD34$^+$ клеток, несущих рецепторы к Г-КСФ и IL8, минимально и в результате применения препаратов Г-КСФ не увеличивается. Количество клеток, несущих рецепторы к Г-КСФ и IL8, максимально на поверхности зрелых гранулоцитов и моноцитов, однако также не изменяется в результате применения препаратов Г-КСФ, что позволяет предположить отсутствие прямого влияния Г-КСФ и IL8 на CD34$^+$ клетки, несмотря на то, что оба цитокина приводят к значительному повышению количества CD34$^+$ клеток в периферической крови [7-9], наличие других механизмов мобилизации CD34$^+$ клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Shimoda K., Okamura S., Harada N. et al. High-frequency granuloid colony-forming ability of G-CSF receptor possessing CD 34 antigen positive human umbilical cord blood hematopoietic progenitors. Exp. Hematol. 1992; 23: 226-28.
2. Shinjo K., Takeshita A., Ohnishi K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at a various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. Leuk. Lymph. 1997; 25: 37-6.
3. Hamblin A.S. Cytokines and Cytokine Receptors. Oxford, New York: IRL; 1993.
4. Румянцев С.А. Влияние Г-КСФ на клеточный состав крови и костного мозга человека. Автореф. ...дисс. доктора мед. наук. Москва, 2002.
5. Liu F, Poursine-Laurent J, Link D.C. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. Blood 2000; 95: 3025-31.
6. Starckx S, Van den Steen PE, Wuyts A. et al. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. Leuk. Lymph. 2002; 43(2): 233-41.
7. Pruijt JF, Fibbe W.E, Opdenakker G. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: 10863-68.
8. Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. J. Immunol. 2005; 175: 2647-54.
9. Jilma B., Hergovich N., Homoncik M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD 114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. Br. J. Haematol. 2000; 111: 314-20.

В первом номере нашего журнала за 2007 год было опубликовано письмо Г.М. Михайлова (стр. 74-75). Вместо «полигликолиды» следует читать «полиглюколиды».