

© Коллектив авторов, 2007

Т.В. Казюкова<sup>1</sup>, А.А. Левина<sup>2</sup>, А.И. Сергеева<sup>3</sup>, Г.А. Самсыгина<sup>1</sup>,  
А.Г. Коноплянников<sup>1</sup>, Ю.И. Мамукова<sup>2</sup>, А.С. Фадеев<sup>3</sup>, М.А. Сергеева<sup>3</sup>

## ФЕРРОКИНЕТИКА И ЦИТОКИНЫ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава»,

<sup>2</sup> ГУ «Гематологический научный центр РАМН», Москва;

<sup>3</sup> ГОУ ВПО «Чувашская медицинская академия Росздрава», г. Чебоксары, РФ

В статье представлены данные по определению параметров метаболизма железа и цитокинов (ИЛ6 и ФНО $\alpha$ ) в раннем онтогенезе человека. Материалом для исследования явились ткани плодов 5–15 нед гестации (полученные в результате медицинских аборт); ткани печени и селезенки плодов 16–23 нед гестации (самопроизвольные выкидыши); кровь развивающихся плодов 22–35 нед гестации (полученная посредством метода кордоцентеза); пуповинная кровь новорожденных детей, рожденных в сроки 35–37 нед гестации и 38–41 нед гестации. Впервые показана динамика изменений основных показателей обмена железа в раннем онтогенезе человека – ферритина, железа, трансферринового рецептора, эритропоэтина и гепсидина. Впервые изучены динамика и взаимосвязь провоспалительных цитокинов (ИЛ6 и ФНО $\alpha$ ), прослеженные на протяжении внутриутробного периода вплоть до рождения.

Article presents the results of iron metabolism parameters and cytokines level (IL6 and TNF $\alpha$ ) determination in early ontogenesis. Materials of study included tissues of aborted fetuses (5–15 weeks of gestation), liver and spleen tissue of miscarried fetuses (16–23 weeks of gestation), blood of developing fetuses obtained by cordocentesis on 23–35 weeks of gestation and cord blood of neonates born on 35–37 and 38–41 weeks of gestation. Authors was the first who showed dynamic of main iron metabolism parameters changes in early human ontogenesis, including such parameters as ferritin, iron, transferring receptor, erythropoietin and hepsidin. Dynamic and relations of pro-inflammatory cytokines (IL6 and TNF $\alpha$ ) were monitored during intrauterine period up to the birth also in first time.

В настоящее время хорошо изучены изменения в показателях обмена железа у новорожденных при физиологическом и патологическом течении беременности, у детей раннего возраста. Описаны также физиологические нормативы и различные нарушения гемопоэза, которые могут встречаться у детей более старшего возраста и в пубертатный период. Поэтому, на наш взгляд, логичен интерес к вопросу о том, как происходит становление параметров феррокинетики у плодов, в раннем онтогенезе человека.

В работе Bradley и др. [1] исследовано состояние обмена железа у плодов в III триместре беременности и показано, каким образом в зависимости от гестационного возраста (ГВ) плода изменяется активность белков-транспортеров железа – ферропортина и трансферринового рецептора (ТфР) – и белков-регуляторов феррокинетики – железорегуляторных белков (IRP's) и железорегуляторных элементов (IRE's). Авторы пришли к заключению, что к концу III триместра беременности плацента аккумулирует ферритин, и в регуляции его экспрессии основная роль принадлежит IRP-1, при этом уровень ферропортина и ТфР остается

стабильным. Однако не меньший интерес представляет также изучение феррокинетики у плодов, начиная с первых недель гестации, на протяжении эмбрионального и фетального периодов онтогенеза человека.

Известно, что в регуляции обмена железа принимает участие целый ряд интерлейкинов (ИЛ), и в целом обмен железа тесно связан с иммунной системой организма [2–6]. Несомненно, это обусловлено тем, что железо является одним из важнейших факторов гемопоэза, а контроль за гемопоэзом осуществляется цитокиновой сетью, куда входят колониестимулирующие факторы (КОЕ), интерфероны (ИФН), цитокины семейства фактора некроза опухолей (ФНО) и др. Действие цитокинов в гемопоэзе в основном синергическое: к примеру, такие цитокины, как ИЛ2, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ11, проявляют свою активность только в комбинации с КОЕ. Ряд цитокинов обладает стимулирующим действием. Так, ИЛ2, ИЛ6, ИЛ8 и др. усиливают дифференцировочную и пролиферативную активность клеток-предшественников, некоторые из них способны стимулировать активацию гранулоцитов и цитотоксическую активность [7].

В то время как семейство ФНО, ИФН и другие подавляют дифференцировку и необходимы для поддержания апоптоза на физиологическом уровне [8]. Однако молекулярные механизмы гемопоэза хорошо изучены на модели взрослого организма, а о становлении этого процесса в период раннего онтогенетического развития человека известно немного. Считается, что становление кроветворения в онтогенезе проходит ряд этапов, отличающихся как параметрами, так и локализацией: мезобластический, гепатолиенальный, медуллярный [9]. Самый ранний период кроветворения проходит, видимо, в мезенхиме желточного мешка: у эмбриона человека желточный мешок наибольшее развитие получает на 3–6-й нед гестации, затем гемопоэтические функции начинает осуществлять печень. И в желточном мешке, и в печени гемопоэз имеет преимущественно эритроидный характер, но помимо эритропоэза существует также моноцитопоэз, гранулоцитопоэз, мегакариоцитопоэз. Причем особенно большое количество моноцитов-макрофагов отмечено в течение «печеночного» периода кроветворения [9, 10]. Затем основным местом кроветворения становится костный мозг плода. Селезенка плода выполняет вначале функцию депонирования крови, но по мере развития в ней лимфоидной ткани она становится одним из основных мест лимфоцитопоэза с преобладанием выработки В-лимфоцитов. В селезенке также происходит гемолиз стареющих эритроцитов, поэтому она является одним из важнейших органов как кроветворной, так и иммунной системы.

Сказанное выше объясняет интерес к показателям феррокинетики и уровню цитокинов у плодов на протяжении внутриутробного периода развития.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение уровня основных составляющих обмена железа и цитокинов, принимающих участие в его регуляции. В соответствии с поставленной целью мы определяли у плодов следующие показатели: ферритин (щелочную и кислую изоформы), железо, общую железосвязывающую способность сыворотки (ОЖСС), насыщение трансферрина железом (НТЖ), трансферрин (Тф), эритропоэтин (ЭПО), ТфР, витамин В<sub>12</sub>, фолаты, гепсидин, а также цитокины ИЛ6 и ФНО $\alpha$ .

Щелочной ферритин (ЩФ) является одним из основных белков обмена железа, поскольку функционально предназначен для его депонирования и передачи по мере надобности для синтеза железосодержащих белков и ферментов. Филогенетически ЩФ является одним из очень древних белков – он определяется у растений, бактерий, грибов [11].

Кислый ферритин (КФ) является регуляторным белком, влияющим на уровень пролиферативных процессов [11, 12]. Соотношение между ЩФ и КФ в норме у здоровых взрослых людей равно приблизительно 10.

ЭПО – гликопротеид, производимый в ответ на тканевую гипоксию в печени плода и почках взрослых людей, стимулирует превращение стволовой клетки в зрелый эритроцит. Транскрипция гена ЭПО в почечных перитубулярных эндотелиальных клетках и гепатоцитах регулируется кислород-чувствительными факторами транскрипции, которые усиливают экспрессию гена при сокращении доставки кислорода [13].

ТфР, принимая участие в транспортировке железа к местам синтеза белков, является индикатором активности пролиферативных процессов [14].

Витамин В<sub>12</sub> и фолаты – витамины, принимающие самое деятельное участие в синтезе ДНК, и их недостаток приводит в мегалобластическому кроветворению [15].

Гепсидин – недавно открытый пептид, которому отводится роль отрицательного регулятора обмена железа [8, 16]. Его содержание при истинном дефиците железа снижается, но резко возрастает при воспалении, что позволяет отличать железodefицитную анемию от анемии хронических воспалительных заболеваний (АХВЗ), проводить дифференциальную диагностику анемического синдрома при различных патологических состояниях [16].

ИЛ6 – один из основных цитокинов провоспалительного ответа, он стимулирует развитие иммунного ответа, что ставит его в ряд важнейших факторов противоинфекционной защиты. ИЛ6 осуществляет взаимосвязь между цитокинами и клетками, как в норме, так и во время воспаления. Продуцируется ИЛ6 в основном Т-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами, и его синтез резко повышается в ответ на попадание в организм патогенных агентов. В метаболизме железа он выполняет регуляторные функции. Молекулярная масса ИЛ6 равна 23,7 КД, в норме его уровень должен быть не больше 15 пг/мл, но он резко повышается при воспалительных процессах любой локализации [8, 17].

ФНО $\alpha$  – один из основных цитокинов, синтезируемый в ответ на бактериальный стимул, обладающий выраженным противоопухолевым эффектом [8, 17]. При наличии антигенного стимула ФНО $\alpha$  синтезируется одним из первых и служит пусковым механизмом для продукции каскада противовоспалительных цитокинов. ФНО $\alpha$  также как и ИЛ6 участвует в регуляции пролиферативных процессов и опосредованно воздействует на метаболизм железа. Молекулярная масса ФНО $\alpha$  составляет 17 КД, он секретируется в основном мононуклеарными клетками и макрофагами.

#### Материалы и методы исследования

Для изучения характера становления метаболизма железа и цитокинов в раннем онтогенезе человека на базе родильного дома №27 г. Москвы (главный врач – З.М. Стригалева) и Центра планирования семьи и репродукции МЗ РФ (главный врач – д.м.н.,

проф. М.А. Курцер), двойным слепым рандомизированным методом проведено исследование 50 условно здоровых плодов и 18 практически здоровых новорожденных детей.

У плодов 5–15 нед гестации (абортусы, полученные сразу после медицинских абортосов) подвергали изучению гомогенаты всех тканей в совокупности; у плодов 16–23 нед гестации без признаков инфекционно-воспалительных заболеваний (самопроизвольные выкидыши вследствие «привычного невынашивания», гестозов) – отдельно гомогенаты тканей печени и селезенки. У развивающихся плодов 22–35 нед гестации и у новорожденных детей материалом для изучения служили образцы пуповинной крови. Забор пуповинной крови у развивающихся плодов осуществлялся акушером-гинекологом к.м.н. А.Г. Коноплянниковым посредством операции кордоцентеза (чрезматочная пункция вены пуповины плода под контролем УЗИ), показаниями к проведению которой являлись подозрения на генетическую патологию плода и/или внутриутробную инфекцию. Плоды, у которых диагноз хромосомной патологии и внутриутробной инфекции не подтверждался, считались условно здоровыми.

Плоды были разделены на группы в зависимости от ГВ: 1-я группа – 4 абортуса 5–6 нед гестации (период эмбриогенеза); 2-я группа – 9 абортосов 7–10 нед гестации (период до формирования плаценты), 3-я группа – 6 абортосов 11–15 нед гестации (период плацентации), 4-я группа – 15 плодов 16–23 нед гестации (период раннего фетогенеза), 5-я группа – 16 развивающихся плодов 22–35 нед гестации от условно здоровых женщин. В 6-ю группу включены 5 недоношенных детей (I степень недоношенности), в 7-ю группу – 13 доношенных новорожденных (табл. 1).

Гомогенаты тканей (либо в совокупности, либо отдельно печени и селезенки) получали следующим образом: ткани плодов гомогенизировали вначале в ручном, а затем в ультразвуковом гомогенизаторе («MSE», USD) при 15 000 об/мин на холоде в 0,01M фосфатно-со-

левом буфере при pH=7,2. Раствор центрифугировали и получали прозрачный гомогенат, который использовали для анализа. Расчет всех показателей в гомогенатах проводили на 1 г белка. Белок определяли в реакции по Лоури и спектрофотометрически при 280 нм, считая коэффициент экстинкции равным 13,6 [17].

ЩФ определяли радиоиммунным методом с использованием стандартных наборов («ImmunoTech», Чехия). КФ определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с моноспецифической антисывороткой против ферритина сердца, поскольку в сердце содержится в основном КФ. Антисыворотка получена в ГНЦ РАМН [18]. Конъюгат анти-КФ с пероксидазой хрена (ПХ) получали, соединяя антитела с ПХ по методу Nasone [19]. ИЛ6, ФНО $\alpha$  и ЭПО определяли методом ИФА, используя стандартизированные наборы («Протеиновый контур», СПб.). ТфР определяли методом ИФА с моноклональными антителами, полученными в МГУ им. Ломоносова [20]. Для определения эритроцитарного ферритина (ЭФ) применяли радиометрический метод, предварительно удалив из эритроцитов гемоглобин [21]. Железо (Fe) и ОЖСС определяли колориметрическим методом с батафенантролином («La Chema», Чехия). Для определения витамина B $_12$  и фолатов использовали конкурентный вариант ИФА [22].

Статистическая обработка результатов проведена с применением ПО Microsoft Office Excel и Statistica. Для параметрических показателей вычисляли средние значения (M), величину стандартных отклонений (m), медиану (Me). Корреляционный анализ взаимосвязей между спарринговыми показателями выполнен по методу Пирсона. Достоверность различий показателей между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Фишера и  $\chi^2$ ; различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Для создания интервального образа модели и прогноза событийной вероятности применяли полиномиальную регрессию. Коэффициент полинома определяли по методу наименьших квадратов с целью точности и надежности приближения (аппроксимации), достоверность аппроксимации ( $R^2$ ) считается

Таблица 1

Распределение плодов и детей по группам и исследованные ткани

Группы обследованных	Кол-во	Исследованный материал			Всего
		все ткани в совокупности	печень + селезенка	кровь пуповины	
1-я группа: 5–6 нед гестации	4	4	–	–	19
2-я группа: 7–10 нед гестации	9	9	–	–	
3-я группа: 11–15 нед гестации	6	6	–	–	
4-я группа: 16–23 нед гестации	15	–	15 (30)	–	15 (30)
5-я группа: 22–35 нед гестации	16	–	–	16	34
6-я группа: 35–37 нед гестации	5	–	–	5	
7-я группа: 38–41 нед гестации	13	–	–	13	
Итого					68 (83)

высокой при значениях  $\geq 0,85$  и изображается на графиках линиями трендов [23].

### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты исследования показателей феррокинетики и цитокинов у плодов различного ГВ и у доношенных, и недоношенных новорожденных детей представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, уровень ЩФ довольно высок особенно на ранних этапах эмбрионального развития и в период формирования плаценты (у плодов 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно), а его максимальные значения – более 2000 мкг/г белка, – приходится на возраст с 7-й по 10-ю нед геста-

ции. Следует отметить, что ни у одного плода этого ГВ не было значений ЩФ ниже 1000 мкг/г белка, что, вероятно, обусловлено особой ролью ЩФ для данного периода развития человеческого зародыша. Эта роль заключается в передаче железа для синтеза железосодержащих белков и ферментов, которые жизненно необходимы для поддержания высокой интенсивности энергообеспечения, характерной для этого периода пренатального развития (второй «критический» период жизни плода). По мере развития плода происходит постепенное снижение уровня ЩФ. Однако у доношенных новорожденных по сравнению с недоношенными содержание ЩФ при рождении несколько

Таблица 2

Показатели феррокинетики и цитокинов у плодов различного ГВ и новорожденных детей

Показатели	Плоды					Новорожденные дети	
	1-я группа 5–6 нед (n=4)	2-я группа 7–10 нед (n=9)	3-я группа 11–15 нед (n=6)	4-я группа 16–23 нед (n=15)	5-я группа 22–35 нед (n=16)	Недоношенные 35–37 нед (n=5)	Доношенные 38–41 нед (n=13)
ЩФ, мкг	1295,5± 173,2 (1297,8)	2305,3± 178,7 *** (2265,0)	1594± 152,7 *** (1511,0)	664,2± 89,3 *** (557,8)	608,7±46,4 (602,3)	656,8±119,4 (598,0)	434,3±69,4 ** (427,0)
КФ, мкг	300,1±70,7 (300,0)	39,4±4,97 *** (40,0)	25,0±5,0 *(22,5)	нп	38,5±2,1 *(39,3)	49,0±8,5 (49,5)	39,9±14,3 (40,0)
ЩФ/КФ	4,55±1,3 (3,98)	59,0±5,7 *** (59,0)	65,7±10,5 (63,2)	нп	15,9±1,2 *** (15,9)	24,1±4,2 (22,7)	12,5±5,2 ** (11,1)
Железо, мкг (мкмоль)	17,3±2,5 (16,3)	9,1±2,3 ** (8,1)	7,2±0,7 (7,2)	4,6±1,0 *(4,6)	18,9±1,6 *** (19,2)	29,0±3,0 ** (29,0)	35,9±6,1 (35,9)
ОЖСС, мкмоль/л	нп	нп	нп	нп	37,7±2,6 (47)	37,5±1,7 (37,5)	43,3±6,7 (43,0)
НТЖ, %	нп	нп	нп	нп	72,3±8,8 (80,2)	77,3±5,9 (76,8)	82,8±10,2 (84,0)
Тф, г/л	нп	нп	нп	1,1±0,4 (1,0)	1,2±0,2 (1,2)	2,1±0,3 * (2,0)	2,2±0,3 (2,2)
V <sub>12</sub> , пг	767,5±93,1 (743,8)	780,7±98,0 (760,0)	743,3±51,9 (726,7)	765,5±68,9 (731,5)	688,3±58,7 (669,2)	861,2±183,7 (795,6)	735,4±180,1 (735,4)
Фол, нг	5,7±0,4 (5,6)	5,3±0,36 (5,3)	5,4±0,65 (5,3)	5,5±0,3 (5,4)	5,4±0,3 (5,3)	5,1±0,6 (4,9)	7,0±2,1 (7,0)
ЭПО, мкЕд	330,0±28,4 (321,5)	3,6±0,8 *** (3,3)	5,3±0,65 (5,3)	0,2±0 *** (0,2)	49,3±19,7 *** (45,7)	653,3±99,3 *** (650,0)	452,3±217,8 * (400,0)
ЭФ, мкг/г Hb	нп	нп	нп	нп	58,9±12,9 (60,6)	116,8±37,7 ** (120,4)	91,4±19,2 * (86,0)
ТфР, мг	11,3±2,6 (10,6)	15,7±3,9 (15,7)	11,7±2,9 (10,9)	11,4±2,5 (12,0)	4,8±0,7 ** (4,9)	6,2±1,1 (5,8)	3,5±1,6 * (3,5)
Гепсидин, пг	22,4±4,7 (24,7)			27,6±4,1 (29,8)	24,3±5,6 (27,3)	23,3±4,2 (26,9)	25,6±2,2 (27,4)
ИЛ6, пг	371,8±55,8 (375,9)	18,4±4,1 *** (16,0)	17,1±3,0 (17,5)	21,8±6,1 (19,9)	нд	32,2±3,7 * (30,0)	51,7±8,9 * (40,0)
ФНО $\alpha$ , пг	5,8±0,3 (5,8)	27,3±5,6 *** (27,3)	6,3±0,8 *** (6,1)	8,2±1,9 (7,4)	нд	2,4±0,2 ** (2,2)	3,5±1,5 (3,0)

В 1-й, 2-й, 3-й и 4-й группах значения показателей приведены в расчете на 1 г белка, в 5-й группе плодов и у новорожденных детей – в расчете на 1 л и/или 1 мл; в скобках значения медианы; нп – не применимо; нд – нет данных; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  при сравнении показателей с предыдущей группой.

ниже ( $p < 0,05$ ), что, вероятно, связано с переключением процесса кроветворения в костный мозг. Значения КФ очень высокие только на 5–6-й нед гестации (300 мкг/г белка), как раз в то время, когда идут интенсивные процессы формирования и дифференцировки сердечной трубки. По мере развития плода уровень КФ невелик и остается примерно на одном и том же уровне вплоть до рождения. Поскольку КФ является регуляторным белком и синтезируется в основном макрофагами, можно предположить, что его уровень (за исключением первых недель гестации) отражает степень развития макрофагальной системы, и его главной ролью в раннем онтогенезе является поддержание стабильности синтетических процессов.

Таким образом, динамика изменений изоформ ферритина на каждом этапе раннего онтогенеза человека подчинена решению конкретных задач. Так, чрезвычайно высокие значения ЩФ и КФ характерны для периода эмбриогенеза, когда идут наиболее интенсивные процессы дифференцировки тканей, формирования органов и систем плода. Затем их уровень снижается, и хотя этот процесс идет неравномерно, скорее всего, он зависит от потребностей развивающегося организма в железе, которые диктуются высочайшей степенью активности синтетических реакций и пролиферации. Развитие подобных событий вполне вероятно, особенно в отношении ЩФ ( $R^2 = 0,8804$ ), причем уровень ЩФ находится в обратной зависимости от ГВ ( $r = -0,9285$ ;  $p < 0,001$ ), в то время как уро-

вень КФ не коррелирует ни с ГВ ( $r = -0,3237$ ), ни с ЩФ ( $r = 0,1309$ ) (рис. 1). Преобладание у плодов щелочной изоформы ферритина связано, видимо, с его основной функцией – аккумулировать и хранить железо для синтеза различных железосодержащих белков и ферментов. За исключением периода позднего эмбриогенеза (5–6-я нед гестации), у плодов очень высокое соотношение между ЩФ и КФ, которое снижается к моменту появления ребенка на свет. Показательно, что у доношенных детей соотношение ЩФ/КФ такое же, как и у грудных детей и взрослых (11,1), в то время как у недоношенных новорожденных оно вдвое выше 24,1 ( $p < 0,05$ ).

Содержание железа в тканях плодов первых недель гестации колеблется в пределах 10–20 мкг/г белка, а затем постепенно снижается к периоду формирования плаценты (11–15-я нед), когда его уровень становится вдвое меньше ( $p < 0,01$ ). В печени плодов 16–23 нед гестации (4-я группа) уровень Fe составляет 4,6 мкг/г белка, что соответствует показателю в этих же органах у взрослых [21] и, вероятнее всего, свидетельствует о переключении эритропоэза в костный мозг. В дальнейшем у плодов содержание железа нарастает, и к моменту рождения его уровень достаточно высок, особенно у доношенных новорожденных (35,9 мкмоль/л). Можно констатировать, что в раннем онтогенезе повторяется, как и в случае ферритина, неравномерное изменение значений Fe, но событийная вероятность подобных изменений очень

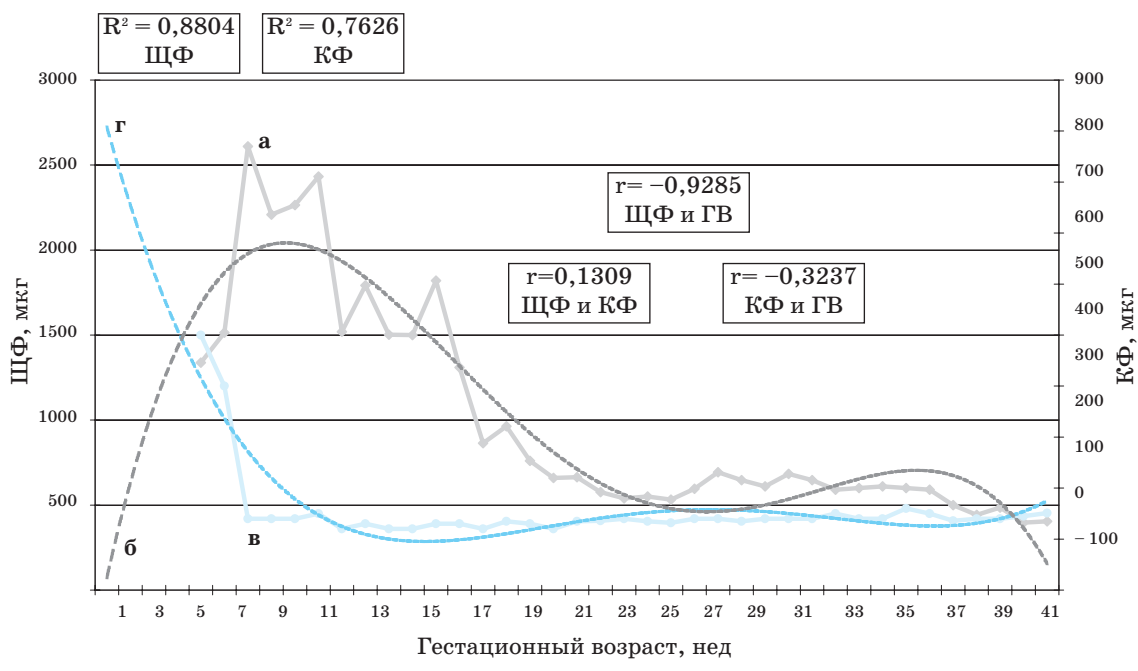


Рис. 1. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней ЩФ и КФ в раннем онтогенезе человека в зависимости от гестационного возраста.

Здесь и на рис. 2, 3, 5 и 6: линии трендов полиномиальной регрессии указывают направление аппроксимации,  $R^2$  – достоверность аппроксимации для каждого показателя; а – значения ЩФ, б – линия тренда полиномиальной регрессии для ЩФ, в – значения КФ, г – линия тренда полиномиальной регрессии для КФ.

высока ( $R^2=0,9101$ ) (рис. 2). Начиная с 19–21-й нед гестации (поздний фетальный период) и до рождения, между содержанием Fe и ферритина существует достоверная обратная корреляция ( $r=-0,8940$ ;  $p<0,01$ ).

Уровни  $V_{12}$  и фолатов на протяжении развития плода колеблются незначительно, что, вероятно, связано с необходимостью поддержания постоянства их состава при синтезе ДНК. Тем не менее корреляционный анализ обнаружил достоверную прямую зависимость уровня фолатов от ГВ ( $r=0,7753$ ;  $p<0,05$ ).

Тф у плодов отсутствует до 19–21-й нед гестации, равно как и связанная с ним ОЖСС. Даже при рождении уровень Тф все еще достаточно низок (2,0–2,2 мг/л) по сравнению с детьми в возрасте 2–3 мес (2,6 мг/л) но значения НТЖ при этом очень высоки (расчитанные, как через ОЖСС, так и через Тф). У доношенных детей уровень Тф несколько выше, чем у недоношенных новорожденных, но его полноценный синтез начинается, видимо, в конце 1-го месяца жизни. Выявлена достоверная прямая корреляционная взаимосвязь между уровнем Тф и содержанием железа в раннем онтогенезе человека ( $r=0,8595$ ;  $p<0,001$ ).

Интересной оказалась динамика изменений уровня ТфР. Так, у плодов 5–6-й нед гестации этот показатель очень высок (11,3 мкг/г белка), но максимальных значений он достигает к 7–10-й нед гестации (перед началом плацентации). После 22-й нед гестации уровень ТфР снижается почти в 2,5 раза, оставаясь до рождения почти на одном и том же уровне. Однако у недоношенных новорожден-

ных его содержание в 1,5 раза выше, чем у доношенных ( $p<0,05$ ). Видимо, содержание ТфР действительно может служить индикатором активности процессов пролиферации, скорость которых наиболее высока в период эмбриогенеза и формирования плаценты, на что указывает корреляция между ферритином и ТфР в конгруэнтные периоды ( $r=0,8824$ ;  $p<0,001$ ), а также высокая событийная вероятность подобной динамики этих показателей (рис. 3). У доношенных новорожденных значения ТфР практически не отличаются от показателей здоровых грудных детей и взрослых [20].

Значения ЭФ в пуповинной крови плодов 22–35-й нед гестации (5-я группа) достаточно высоки (60,6 мкг/г Hb) и еще более значительно они повышаются к моменту рождения. Причем содержание ЭФ у недоношенных детей достоверно выше, чем у доношенных ( $p<0,05$ ). Доказано, что у взрослых ЭФ является показателем эффективности гемопозеза, и его уровень повышается при неэффективном эритропозе [14]. Вероятно, что и у новорожденных детей он выполняет ту же функцию. Однако также возможно, что в раннем онтогенезе человека ЭФ может выполнять и другие физиологические функции, например, передавать железо на митохондрии для обеспечения синтетических процессов, интенсивность которых в это время необычайно высока. Можно предположить, что именно благодаря такому воздействию в крови у новорожденных детей повышено процентное содержание незрелых эритроидных клеток (в которых, собственно, и содержится основная часть ЭФ), не прошедших нормальную (полную) диффе-

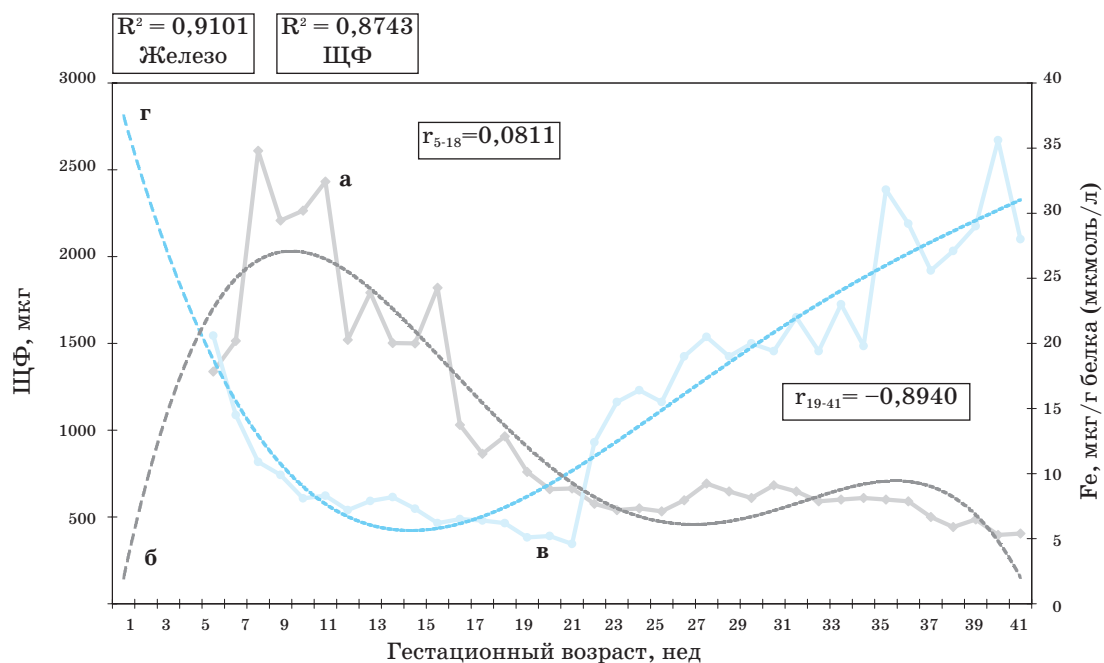


Рис. 2. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней ЩФ и железа в раннем онтогенезе человека.

а – значения ЩФ, б – линия тренда полиномиальной регрессии для ЩФ, в – значения Fe, г – линия тренда полиномиальной регрессии для Fe.

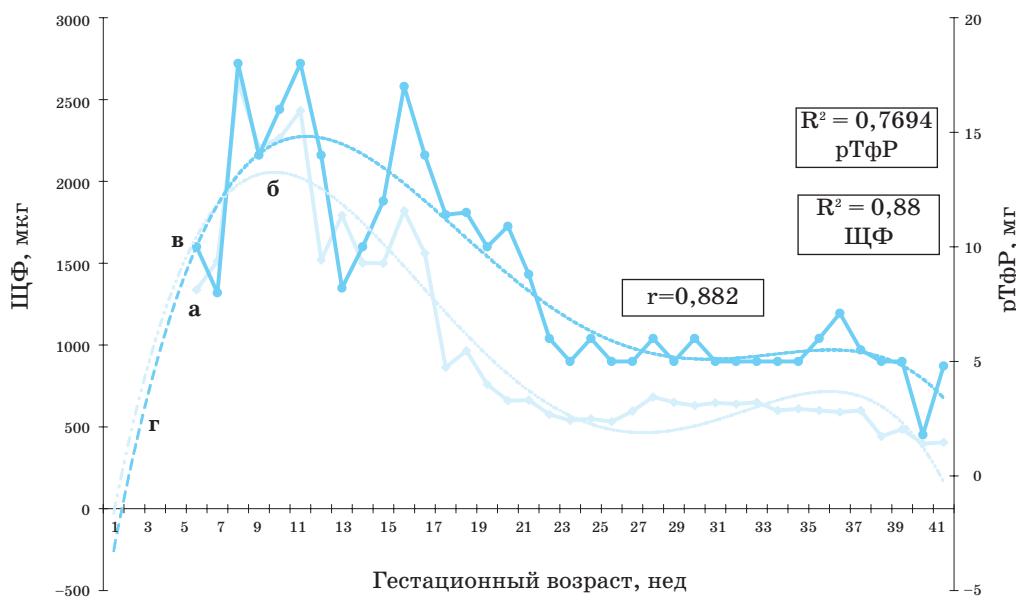


Рис. 3. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней ЩФ и рТФР в раннем онтогенезе человека.

а – значения ЩФ, б – линия тренда полиномиальной регрессии для ЩФ, в – значения рТФР, г – линия тренда полиномиальной регрессии для рТФР.

ренцировку. Вероятно, потребуются дальнейшие исследования для объяснения повышенного содержания ЭФ в крови у новорожденных детей (как недоношенных, так и доношенных), поскольку на сегодня достаточно сложно объяснить данный факт только неэффективным эритропоэзом. К примеру, нами было отмечено, что у развивающихся (но еще не рожденных) плодов в возрасте 35–36 нед гестации уровень ЭФ составляет 68–75 мкг/г Нв, в то время как у рожденных недоношенных детей этого же ГВ значения ЭФ почти вдвое выше – 124–135 мкг/г Нв. Это позволяет предположить, что повышение уровня ЭФ может также являться следствием стрессовых ситуаций, каковой в том числе являются процесс родов и период адаптации к переходу от внутриутробной жизни к внеутробной.

Значения ЭПО на самых ранних стадиях эмбриогенеза очень высоки (321,5 мкЕд/г белка), но уже к 7–10-й нед гестации они резко снижаются (до 3,3 мкЕд/г белка,  $p < 0,001$ ), оставаясь на одном уровне вплоть до завершения периода формирования плаценты. У 16–23-й недельных плодов уровень ЭПО, напротив, очень низок (0,2 мкЕд/мл), что можно, вероятно, объяснить тем фактом, что у плодов данного ГВ мы измеряли уровень ЭПО не в крови, а в тканях печени и селезенки, в которой значения ЭПО также оказались крайне низкими (0,3 мкЕд/г белка). В дальнейшем, начиная с 22-й нед гестации, уровень ЭПО начинает повышаться, достигая к моменту родов достаточно высоких значений, особенно у недоношенных детей, что соответствует данным I. Stolze

и соавт. [14]. Однако в других работах указывается, что уровень ЭПО у новорожденных детей в крови пуповины достаточно низок [1, 24]. Вероятно, последующие исследования, включая определение уровня HIF (гипоксией индуцированного фактора), смогут пролить истинный свет на данную проблему. На наш взгляд, в интранатальный период высокие значения ЭПО обусловлены прежде всего гиперкапнией и как следствие гипоксией, которые в родовой период испытывает каждый ребенок, что и должно проявляться соответствующей повышенной продукцией ЭПО [13].

Поскольку, по нашим данным, у недоношенных детей уровень ЭПО при рождении почти в 1,5 раза выше, чем у доношенных, можно думать, что недоношенный ребенок всегда испытывает более тяжелую и выраженную тканевую гипоксию вследствие недостаточной зрелости коры надпочечников и других адаптационных систем. Возможно даже, что этот механизм (повышение продукции ЭПО в ответ на гипоксию) является релевантом (виновником) и/или триггером (пусковым фактором) выхода в кровеносное русло большого числа клеток-предшественников эритроцитов (не прошедших нормальную дифференцировку), что проявляется высоким уровнем ЭФ в интранатальный период и может являться признаком стимуляции эритропоэза [24]. Об этом же красноречиво свидетельствует высокая прямая корреляционная взаимосвязь между ЭПО и ЭФ, прослеженная нами на протяжении внутриутробного периода ( $r = 0,9691$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 4). По всей вероятности, более интенсивный рост недоношенных детей требует и бо-

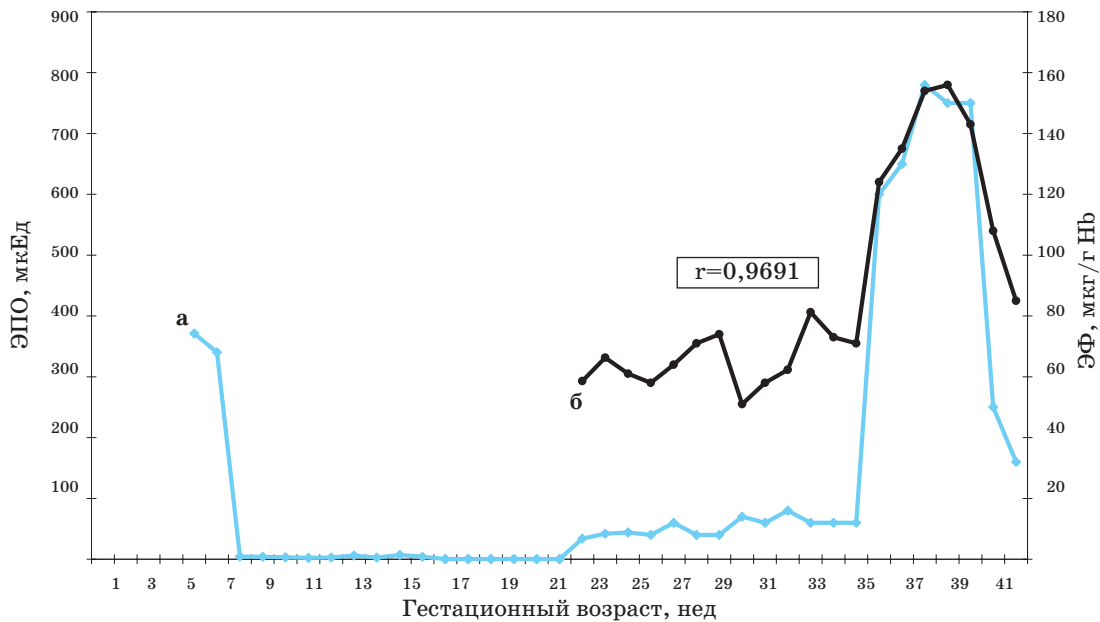


Рис. 4. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней ЭПО и ЭФ в раннем онтогенезе человека.

а – значения ЭПО, б – значения ЭФ.

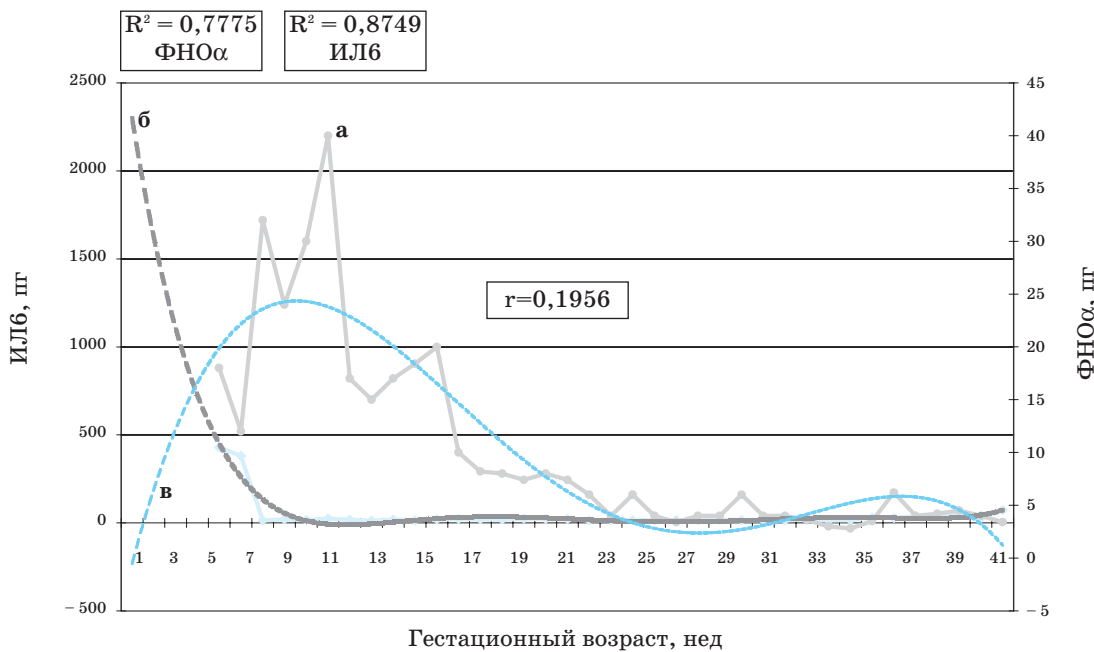


Рис. 5. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи между уровнями ИЛ6 и ФНОα в раннем онтогенезе человека.

а – значения ФНОα, б – линия тренда полиномиальной регрессии для ФНОα, в – значения ИЛ6, г – линия тренда полиномиальной регрессии для ИЛ6.

лее интенсивного эритропоэза по сравнению с доношенными [25, 26], что может приводить вскоре после рождения к снижению продукции ЭПО, играющего важную роль в развитии ранней анемии недоношенных детей [9, 27]. Так, при обследовании в возрасте 2 месяцев уровень ЭПО у доношенных детей ( $n=7$ ) составлял  $18,4 \pm 4,3$  мкЕд/мл, в то время как у недоношенных ( $n=5$ ) – только  $2,1 \pm 0,2$  мкЕд/мл ( $p < 0,001$ ).

Определение уровня гепсидина показало, что уже на самых ранних этапах онтогенеза существует тонкая регуляция метаболизма железа. Причем, по нашим данным, уровень гепсидина на всем протяжении от 5-й нед гестации до рождения остается примерно на одном и том же уровне: от 24,7 до 27,4 пг/л, что вдвое ниже значений этого показателя у детей в возрасте 5–6 месяцев (35–50 пг/л). Интересно, что у плода и новорожденного прирост же-



леза происходит исключительно за счет функционального железа, а потребность во всасывании многократно превышает потребности взрослого [27, 28]. Поэтому у плодов должен существовать механизм, направленный на сохранение высокого уровня абсорбции железа: таким регуляторным механизмом служит низкая продукция гепсидина. А поскольку именно гепсидин является основным

регулятором как возвращения железа в рециркуляцию, так и его повышенной абсорбции, все это свидетельствует, что у плода на всех этапах раннего онтогенеза существует реальная возможность активного эритропоэза и синтеза Hb [16].

Измерение уровня ИЛ6 показало, что в период эмбриогенеза (5–6-я нед гестации) его значения превышают показатели при рождении в 10–15 раз

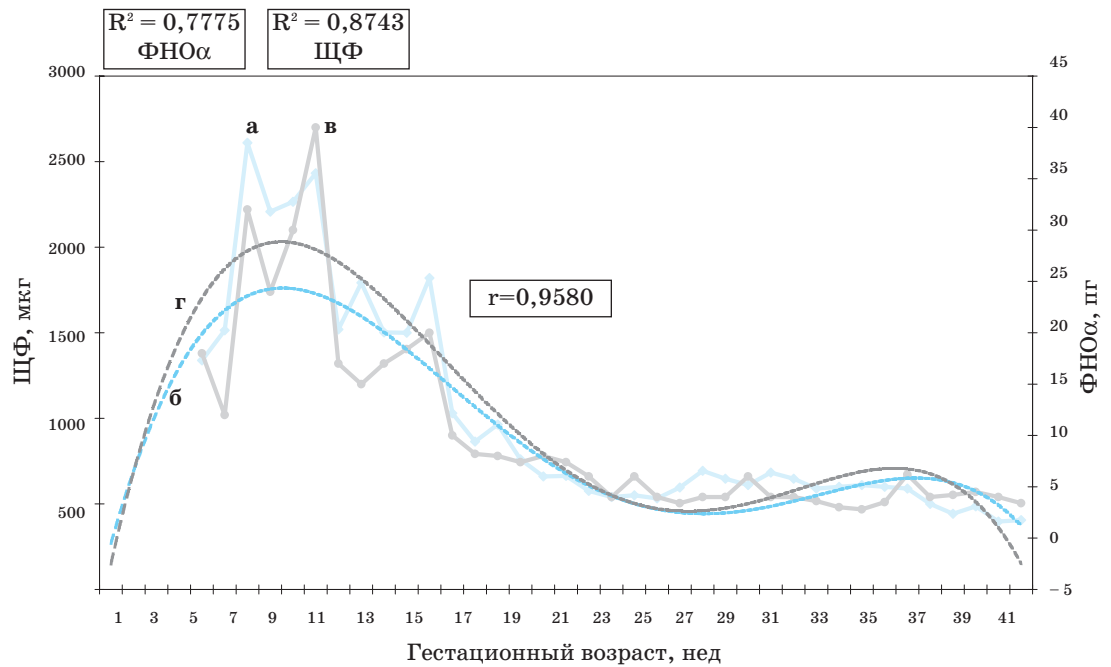


Рис. 6. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней ЩФ и ФНОα в раннем онтогенезе человека.

а – значения ЩФ, б – линия тренда полиномиальной регрессии для ЩФ, в – значения ФНОα, г – линия тренда полиномиальной регрессии для ФНОα.

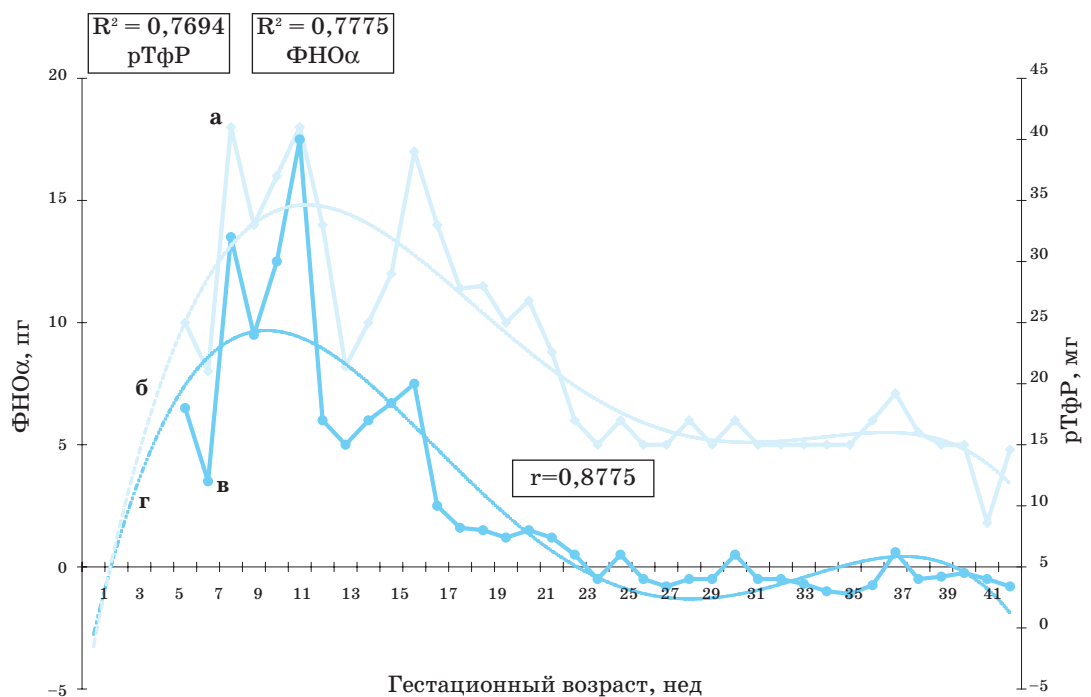


Рис. 7. Динамика и степень корреляционной взаимосвязи уровней рТфР и ФНОα в раннем онтогенезе человека.

а – значения рТфР, б – линия тренда полиномиальной регрессии для рТфР, в – значения ФНОα, г – линия тренда полиномиальной регрессии для ФНОα.

( $p < 0,0001$ ). Это связано с огромной антигенной нагрузкой, которую испытывает зародыш в этот период, и обусловлено тем, что плод всегда экспрессирует отцовские антигены, распознаваемые организмом матери как «чужеродные» с выработкой специфического иммунного ответа по Th1-типу, направленного на отторжение плода [29]. По всей видимости, наиболее вероятным способом выживания плода на этом отрезке онтогенеза (когда плод лишен барьерной защиты плаценты) является высочайшая экспрессия провоспалительных цитокинов (в том числе и ИЛ6), гарантирующих зародышу протективный эффект и дальнейшее развитие. Это согласуется с работами других авторов, выявивших подобный эффект со стороны провоспалительных цитокинов у мышинных плодов [30]. В дальнейшем, когда на авансцену вступает плацента, а со стороны матери – Th2-цитокинный паттерн, которые совместно обеспечивают плоду дальнейшее вынашивание [29–34], необходимость в высокой экспрессии провоспалительных цитокинов у плода отпадает. Поэтому примерно к 10–12-й нед гестации уровень ИЛ6 значительно снижается ( $p < 0,001$ ). К моменту рождения у доношенных новорожденных его значения практически не отличаются от показателей здоровых грудных детей и взрослых (40–60 пг/л), в то время как у недоношенных – достоверно ниже показателей доношенных новорожденных (30,0 пг/л;  $p < 0,01$ ). Вероятно, именно с низкой продукцией ИЛ6 можно связать также факт недостаточной системной воспалительной реакции у недоношенных детей при введении патогенов [32, 34, 35].

Синтез ФНО $\alpha$ , в отличие от ИЛ6, в периоде позднего эмбриогенеза (5–6-я нед гестации), видимо, достаточно низкий (6,5 пг/г белка). Однако его продукция увеличивается в 4–5 раз к 7–10-й нед

гестации. Вероятнее всего, это связано с предстоящей плацентацией [36], а также с развитием лимфоидной системы плода, поскольку ФНО $\alpha$  секретируется в основном клетками макрофагальной системы. Затем уровень ФНО $\alpha$  снижается и остается примерно на одном уровне вплоть до рождения, когда его значения как у доношенных, так и у недоношенных новорожденных приходят к показателям, характерным для здоровых грудных детей. Между уровнями ФНО $\alpha$  и ИЛ6 нет достоверной корреляции ( $r = 0,1956$ ), однако событийная вероятность подобной динамики этих цитокинов на протяжении раннего онтогенеза достаточно высока (рис. 5).

Нами выявлена высокая корреляционная зависимость между значениями ФНО $\alpha$  и ЩФ ( $r = 0,9579$ ;  $p < 0,0001$ ), между ФНО $\alpha$  и ТфР ( $r = 0,8775$ ;  $p < 0,001$ ), а также высокая событийная вероятность именно подобной динамики данных показателей (рис. 6, 7). Возможно, что обнаруженный синергизм взаимодействия между белками – регуляторами обмена железа и ФНО $\alpha$  уравнивает процессы пролиферации и апоптоза на протяжении раннего онтогенетического развития.

Таким образом, каждый из описанных выше показателей феррокинетики и цитокинов вносит свой вклад в поддержание гомеостаза железа, участвуя либо в регуляторных, либо синтетических процессах на уровне отдельных клеток и органов, оказывая тем самым непосредственное влияние на ход механизмов феррокинетики и становления иммунной системы плода. Причем каждый из участников этой сложной системы выполняет совершенно конкретные задачи, направленные на дифференцировку, пролиферацию и рост тканей и органов в зависимости от потребностей организма на каждом определенном временном отрезке раннего онтогенеза человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Bradley J., Leibold E.A., Harris Z. et al. Influence of gestational age and fetal iron status on IRP activity and iron transporter protein expression in third-trimester human placenta. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004; 56 (4): 894–901.
- Finch C. Regulators of iron balance in human. *Blood.* 1994; 84: 1697–1702.
- Кетлинский С.А. Современные аспекты изучения цитокинов. *Russ. J. Immun.* 1999; 4: 46–52.
- Фрейдлин И.С., Назаров П.Г. Регуляторные функции провоспалительных цитокинов и острофазных белков. *Вест. РАМН.* 1999; 5: 28–32.
- Шуматова Т.А., Шуматов В.Б., Маркелова Е.В. и др. Роль оксида азота и цитокинов в развитии синдрома острого повреждения легких. [http://www.farosplus.ru/mtmi/mt\\_29/rol\\_oxida.htm](http://www.farosplus.ru/mtmi/mt_29/rol_oxida.htm), 2007.
- Mogattash S., Lutton J.D. Leukemia cells and cytokine network: therapeutic prospects. *J. Exp. Biol. and Med.* 2004; 229: 121–137.
- Прямкова Ю.В., Самсыгина Г.А. Фетальный иммунный ответ на протяжении 22–40 недель гестации. *Педиатрия.* 2007, 86 (1): 7–14.
- Nemeth E., Rivera S., Gabayan V. et al. IL-6 mediates hypoferrremia inflammation inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Inv.* 2004; 113: 1271–1276.
- Румянцев А.Г. Возрастная регуляция эритропоэза. *Патогенез.* 2005, 3: 34–39.
- Рябчиков О.П., Хайруллин Р.М. и др. Становление кроветворения. В кн.: «Внутриутробное развитие человека»\*. Под ред. А.П. Милованова, В.С. Савельева. М.: МДВ, 2006 (гл. 17–18): 266–290.
- Broxmeyer H.E. Iron binding protein and regulation of hematopoietic cell proliferation/ differentiation. In M. De Sosa and J.H. Brock. *Iron in Immunity, Cancer and Inflammation.* Chichester, UK, Wiley, 1989: 199–215.
- Kuhn L.C. Iron and gene expression: molecular mechanisms regulating cellular iron homeostasis. *Nutr. Rev.* 1998; 56: 11–19.
- Шиффман Ф.Дж. Патофизиология крови. Пер. с англ. М. – СПб.: Бином – Невский диалект, 2000: 37–40.
- Wickramasinghe S.N. Megaloblastic anaemia. *Baillieres. Clin. Haematol.* 1995; 8 (41): 703–706.
- Ganz T. Heparin, a key of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2005; 102 (3): 783–788.
- Kemma E., Pikkers P., Nemeth E. et al. Time-course analysis of hepcidin, serum iron and plasma cytokine levels in human injected with LPS. *Blood.* 2005; 206 (5): 1864–1866.
- Lowry T.U. The determination level protein with Folline reactive. *J. Biol. Chem.* 1963; 81: 283–285.
- Романова Е.А., Левина А.А., Цибульская М.М. и др. По-

казатели метаболизма железа в гомогенатах печени и лейкоцитов. Клини. и лаб. диагн. 2000; 4: 33–34.

19. *Nacone N.A.* The peroxidase conjugates for immunoenzyme method. J. Biol. Chem. 1965; 85: 585–587.

20. *Цветашева Н.В., Левина А.А., Мамукова Ю.И. и др.* Определение растворимых трансферриновых рецепторов для дифференциальной диагностики анемий. Клини. и лаб. диагн. 2001; 4: 29–31.

21. *Цветашева Н.В., Левина А.А., Виноградова О.Ю. и др.* Клиническое значение определения ферритина эритроцитов. Клини. и лаб. диагн. 1997; 5: 38–40.

22. *Цветашева Н.В., Левина А.А., Мамукова Ю.И. и др.* Определение витамина В<sub>12</sub> и фолиевой кислоты иммуноэнзимным методом. Клини. и лаб. диагн. 2001; 10: 45–48.

23. *Подружко А.А., Подружко А.С.* Интервальное представление полиномиальных регрессий. Труды Института системного анализа РАН. М., 2003: 48.

24. *Georgieff M.K., Landon M.B., Mills M.M. et al.* Abnormal iron distribution in infants of diabetic mothers: spectrum and maternal antecedents. J. Pediatr. 1990; 117: 455–461.

25. *Reynolds P.* Newborns have unique confounding factors regarding the TfR-F ratio. Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed. 2001; 85: F145.

26. *Lott D.G., Zimmerman M.B., Labbe R.F. et al.* Erythrocytes Zinc Protoporphyrin Is Elevated With Prematurity and Fetal Hypoxemia. Pediatrics. 2005; 116 (2): 414–422.

27. *Румянцев А.Г.* Роль дефицита железа в структуре расстройств здоровья у детей. В кн.: Дефицит железа и железодефицитная анемия у детей. Под ред. Н.С. Кисляк. М.: Славянский диалог, 2001: 25–35.

28. *Dallman P.R., Yip R.* Iron. In *Ziegel E.E., Filer L.J.* (eds). Present knowledge in nutrition, 7th ed. ILSI Press, Washington, DC; 1996: 277–292.

29. *Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R.* Bidirectional cytokine in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol. Today. 1993, 14 (7): 353–356.

30. *Szeheres-Bartho J., Wegmann T.G.* A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the TH1/Th2 balance. Reprod. Immunol. 1996, 31(1–2): 81–95.

31. *Bessler H., Sirota L., Notti I. et al.* IL-2 receptor gene expression and IL-2 production by human preterm newborns cells. Clin. Exp. Immunol. 1993; 94(1): 189–194.

32. *Bessler H., Merrdel C., Straussberg R. et al.* Effects of dexamethasone on IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$  production by mononuclear cells of newborns and adults. Biol. Neonate. 1999; 75 (4): 225–233.

33. *Bessler H., Kagazanov S., Punskey I., Sirota L.* Effect of dexamethasone on IL10, IL12 p40 production in newborns and adults. Biol. Neonate. 2001; 80: 262–266.

34. *Bessler H., Komios L., Punskey I. et al.* CD14 receptor expression and lipopolysaccharide-induced cytokine production in preterm and term newborns. Biol. Neonate. 2001; 80: 239–247.

35. *Nadya S., Kazzi J., Romero R., McLaughlin K.* Surfactant therapy modulates levels of interleukin 6 (IL6) and interleukin-1B (IL-1B) in tracheal aspirates of premature infants with respiratory distress syndrome (RDS). Pediatric Research. 1999; 45 (4): Part 2 of 2: 204A.

36. *Piccinni M.P., Maggi E., Romagnani S.* Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. Biochem. Soc. Trans. 2000, 28: 212–215.

© Коллектив авторов, 2007

М.А. Бессонова<sup>1</sup>, Г.Н. Буслаева<sup>1</sup>, Е.В. Никушкин<sup>2</sup>, Т.Е. Цимбалова<sup>2</sup>,  
А.Г. Коноплянников<sup>1</sup>

## ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА У ПЛОДОВ С ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава,

<sup>2</sup>Центральная клиническая больница с поликлиникой УД Президента РФ, Москва

В статье представлены результаты исследования показателей системы гемостаза у 24 плодов с гемолитической болезнью плода (ГБП) на сроке гестации 24–33 недели в сравнении со здоровыми плодами. Пуповинная кровь была получена методом кордоцентеза. Оценивали показатели антикоагулянтной системы (антитромбин III и протеин С) и системы фибринолиза (плазминоген,  $\alpha_2$ -антиплазмин, ингибитор активатора плазминогена и Д-димер). При ГБП выявлена активация свертывания крови и напряженный фибринолиз. Снижение количества тромбоцитов, уровня протеина С и повышение содержания Д-димера в пуповинной крови плодов с ГБП можно рассматривать как лабораторные признаки ДВС-синдрома.

Article presents the results of study of clotting system parameters in 24 fetuses with hemolytic disease of fetus (HDF) on 24–33 weeks of gestation in comparison with healthy fetuses. Cord blood samples were obtained by cordocentesis. Next parameters were determined: anticoagulant system parameters (antithrombin III and protein C); fibrinolysis system parameters (plasminogen,  $\alpha_2$ -antiplasmin, inhibitor of plasminogen activator and D-dimer). The study showed that patients with HDF had activated clotting system, tensed fibrinolysis. Decreased platelet count and increased D-dimer level in cord blood of fetuses with HDF can be as laboratory signs of disseminated intravascular coagulation.

Гемолитическая болезнь (ГБ) плода (ГБП) и новорожденного (ГБН) в настоящее время занимает одно из ведущих мест в структуре перинатальной

заболеваемости и смертности, несмотря на успехи, достигнутые в профилактике, тактике ведения и лечения беременных с изосенсибилизацией, а так-