

**Н.Н. Зими́на¹, С.А. Румянцев^{2,3}, О.А. Майорова²,
М.В. Яковлева³, М.А. Курцер¹**

¹ Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения г. Москвы

² Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

³ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы

Влияние острой и хронической внутриутробной гипоксии плода на формирование клеточного состава пуповинной крови доношенных новорожденных

Гипоксия – мощный стрессовый фактор; предположительно, она должна приводить не только к повышению количества эритроцитов с компенсаторной целью, но и к повышению количества других клеток крови как следствие цитокиновой мобилизации в ответ на стресс. В статье дана оценка влияния течения беременности и родов, острой и хронической гипоксии плода на показатели клеточного состава ПК доношенных новорожденных. Выявлено увеличение количества лейкоцитов при удлинении 2-го периода родов, наличии хронической внутриутробной гипоксии плода или острой гипоксии в родах. Показаны различия клеточного состава ПК в зависимости от пола и массы тела плода, которые заключаются в большем количестве лейкоцитов за счет всех субпопуляций, в том числе гемопоэтических стволовых клеток у мальчиков и при большой массе плода, причем различия по полу и массе плода независимы друг от друга. Показано, что мальчики хуже адаптируются к процессу родов, что выражается в большей концентрации мобилизационных цитокинов и большем количестве лейкоцитов и гемопоэтических клеток-предшественников в пуповинной крови. Показано, что концентрация мобилизационных цитокинов (IL-8, G-CSF, MMP-9) в сыворотке ПК доношенных новорожденных статистически значимо выше, чем в сыворотке крови здоровых доноров. При этом концентрация IL-8, G-CSF, MMP-9 выше у мальчиков по сравнению с девочками, при самопроизвольных родах по сравнению с родами путем планового кесарева сечения и при острой гипоксии плода.

Ключевые слова: пуповинная кровь, лейкоциты, CD34⁺ клетки, КОЕ, гипоксия плода, апоптоз.

Контактная информация: Румянцев Сергей Александрович; e-mail: s_rumyantsev@mail.ru

© Коллектив авторов, 2010

N.N. ZIMINA, S.A. RUMYANTSEV, O.A. MAYOROVA, M.V. YAKOVLEVA, M.A. KURTSEV

The effects of acute and chronic fetal hypoxia on cord blood cell composition of full-term newborns

Hypoxia is a powerful stress factor, and, presumably, should result not only in elevation in erythrocyte counts for the compensatory purpose, but also in increased number of other blood cells, as consequence of cytokine mobilization in response to stress. The paper evaluates the impact of pregnancy and delivery, acute and chronic fetal hypoxia on cord blood cell composition of full-term newborn infants. An increase is observed in leucocyte counts with prolonged second stage of labour as well as the presence of chronic prenatal or acute hypoxia in delivery. Differences in cord blood cell composition depending on newborn gender and body weight which consist in higher leucocytes count (all subpopulations including hematopoietic stem cells) in boys and with higher fetal weight are demonstrated. Differences in gender and fetal birth weight are independent of each other. It is ascertained that boys tend to show worse adaptation to delivery which is expressed in higher concentration of mobilization cytokines and higher leucocytes and hemopoietic progenitor cell count in cord blood. It is shown that mobilization cytokine concentration (IL-8, G-CSF, MMP-9) in cord blood of full-term newborns is statistically significantly higher than in peripheral blood of healthy donors with IL-8, G-CSF, MMP-9 concentration being higher in boys in comparison with girls during normal delivery versus planned cesarean delivery and during acute fetal hypoxia.

Key words: cord blood, leucocytes, CD34⁺ cells, CFU, fetal hypoxia, apoptosis.

Гипоксия – мощный стрессовый фактор, который предположительно должен приводить к повышению количества не только эритроцитов с компенсаторной целью, но количества других клеток крови – как следствие цитокиновой мобилизации в ответ на стресс.

В ряде работ было показано, что выраженная гипоксия (концентрация O_2 – 0,9–1%) *in vitro* способствует самообновлению мышечных и человеческих ГСК [1, 2], при этом она не ведет к их дифференцировке. Ответом на сильную гипоксию $CD34^+$ клеток пуповинной крови (концентрация O_2 , – 3%) *in vitro*, было деление [3]. Количество $CD34^+$ клеток, инкубированных в условиях гипоксии (концентрация O_2 – 1%), было значимо больше, чем в культурах, инкубированных без гипоксии [4]. Таким образом, баланс между дифференцировкой и самообновлением стволовых клеток сдвинут в сторону последнего. Показано, что концентрация кислорода регулирует дифференцированную экспрессию белков *cd34FL* и *cd34TFmRNA*, что может объяснить лучшую выживаемость примитивных гемопоэтических клеток при низкой концентрации кислорода [5].

При культивировании $CD34^+$ клеток хронического миелолейкоза в условиях гипоксии (концентрация O_2 – 0,9–1%) и нормоксии (концентрация O_2 – 20%) было выявлено, что гипоксия уменьшает фосфорилирование тирозинкиназ [6] – это может способствовать снижению влияния ростовых факторов непосредственно на ГСК.

Многие исследователи демонстрируют, что гипоксия индуцирует клеточную смерть, активируя как апоптотический, так и некротический путь [7–8], в зависимости от типа клеток [9]. При исследовании

влияния 24-часовой аноксии на апоптоз $CD34^+$ клеток пуповинной крови было показано, что клетки, инкубированные в условиях аноксии, менее подвержены апоптозу и некрозу по сравнению с теми же клетками, инкубированными в условиях нормоксии [10]. Объяснением этого может быть экспрессия на $CD34^+$ клетках пуповинной крови антиапоптотических *Bcl-2* и *Bcl-Xl* [11], гиперэкспрессия которых блокирует индуцированный гипоксией апоптоз [9]. Это показывает, что $CD34^+$ клетки пуповинной крови относительно устойчивы к действию гипоксии.

В последнее время появляются сообщения о различии клеточного состава пуповинной крови в зависимости от вида родоразрешения, пола и массы тела новорожденного, а также от сроков, прошедших после родов и сбора пуповинной крови до начала процесса обработки [12–15]. Но остается неясным множество факторов, влияющих на клеточный состав пуповинной крови и, как следствие, на эффективность заготовки трансплантационного материала.

Цель исследования: изучение влияния различных состояний острой и хронической гипоксии плода на количество и жизнеспособность лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови доношенных новорожденных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пуповинную кровь (ПВ) получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37–41 нед гестации, медиана – 40 нед) с учетом информированного согласия матери и

Таблица 1

Особенности течения беременности (количество наблюдений)

№	Состояние	Кол-во	1-я половина беременности	2-я половина беременности	1-я и 2-я половины беременности
1	Полностью здоровы	449			
2	Анемия	41	10	28	3
3	Инфекционные заболевания	205	72	121	12
4	Угроза прерывания беременности	260	176	41	43
5	Патология почек у матери	47			47
6	Хроническая внутриутробная гипоксия	112			112
7	Ожирение у матери	19			19
Общее количество наблюдений		1133*			

* Общее количество наблюдений больше числа рожениц за счет наличия нескольких ситуаций одновременно.

отсутствия стандартных противопоказаний. После пережата и пересечения пуповины проводили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA (*Green Cross*, Южная Корея). Сбор крови осуществляли в течение 2–15 мин после родов: менее 5 мин – 847 (84,4%) случаев; от 5 до 10 мин – 89 (8,7%); более 10 мин – 68 (6,9%) до отделения плаценты (n=993; 98,5%). В случае сбора крови после отделения плаценты (n=15; 1,5%) ее помещали в специальную стерильную стойку и проводили аналогичную процедуру сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 ч после процедуры сбора ПК.

Течение беременности проанализировано у 1004 рожениц и представлено в *таблице 1*. Из 1004 новорожденных 585 родились в результате первых родов, 340 – вторых, 63 – третьих, 16 – четвертых родов и более (12 человек – четвертые роды; двое – пятые; двое – шестые). Процент мальчиков и девочек в группах, составленных по паритету, не отличался; в каждой группе девочек и мальчиков было приблизительно поровну. Медиана длительности безводного промежутка составила 5 ч (от 20 мин до 19 ч 20 мин). Медиана длительности II периода родов (от начала потуг до рождения ребенка) – 30 мин (от 10 мин до 1 ч 35 мин).

Из 1004 новорожденных мальчиков и девочек было соответственно 524 (52,2%) и 480 (47,8%). Все новорожденные были разделены на группы согласно способу родоразрешения: самопроизвольные роды и роды путем кесарева сечения (*табл. 2*).

Средняя масса тела при рождении была несколько выше у мальчиков (3629,24±18,25 г; диапазон – 2270–5000 г), чем у девочек (3467,23±18,17 г; диапазон – 2300–4650 г) ($p < 0,0001$). Течение родов прослежено у 1004 новорожденных; у 112 из них отмечена хроническая внутриутробная гипоксия плода, у 90 – острая гипоксия плода.

Подсчет клеток крови проводили двумя методами.

- Все 1004 образца ПК были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови АВХ *Pentra 60 С+* в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров.

- Для точной морфологической характеристики клеток ПК использовали мазки ПК, окрашенные по методу Паппенгейма–Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая–Грюнвальда и краской Романовского).

Количество нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100 лейкоцитов).

Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции ПК определяли при помощи культивирования в течение 14 суток в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста «*MethoCult 4338*, *StemCell Technologies*, Канада) с подсчетом количества КОЕ-mix, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

- Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на $1 \cdot 10^5$ эксплантированных клеток.

- Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл ПК полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

- Исследование степени некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов ПК проводили при помощи проточной цитофлуориметрии двумя методами: определением количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании *Propidium iodid* (PI) и определением числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлуоресценции с использованием *Annexin V FITC* («*PharMingen*») согласно инструкциям производителей.

- Результаты реакции анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («*Becton Dickinson*», США). Степень спонтанного апоптоза

Таблица 2

Распределение новорожденных по полу и способу родоразрешения

Количество пациентов	Мальчики	Девочки	Всего
Кесарево сечение	26	17	43
Самопроизвольные роды	498	463	961
Всего	524	480	1004

Таблица 3

Клеточный состав ПК ($M \pm m$), $n=1004$

WBC $\times 10^9/\text{л}$	NEU %	NEU $\times 10^9/\text{л}$	LYM %	LYM $\times 10^9/\text{л}$	MON %	MON $\times 10^9/\text{л}$
17,24 \pm 0,16	48,48 \pm 0,25	8,41 \pm 0,10	32,45 \pm 0,22	5,54 \pm 0,06	14,02 \pm 0,11	2,42 \pm 0,03
EOS %	EOS $\times 10^9/\text{л}$	BAS %	BAS $\times 10^9/\text{л}$	RBC $\times 10^{12}/\text{л}$	HGB г/л	HCT %
3,83 \pm 0,06	0,64 \pm 0,01	1,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	4,40 \pm 0,01	157,4 \pm 0,46	32,29 \pm 0,14
MCV фл	MCH пг	MCHC г/л	RDW %	PLT $10^9/\text{л}$	MPV фл	
17,24 \pm 0,16	48,48 \pm 0,25	8,41 \pm 0,10	32,45 \pm 0,22	5,54 \pm 0,06	14,02 \pm 0,11	2,42 \pm 0,03

лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов клеток ПК определяли как сумму PI+/Annexin V+ и PI-/Annexin V+ клеток, а уровень некроза – как количество PI+/Annexin V-клеток.

Для количественного определения концентрации G-CSF, IL-8, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови проводили реакцию ИФА типа «сэндвич». В качестве ферментных меток использовали пероксидазу. В данном исследовании применяли следующие наборы реагентов: «Human MMP-9 (total)», «Human/mouse MMP-2 (total)», «Human TIMP-2» («Quantikine®» R&D Systems Inc., США), «Human TIMP-1» (Biosource International Inc., США), «Human IL-8 ELISA Kit II» (BD OptEIA™ BD Biosciences Pharmingen, США).

Статистическую обработку данных проводили 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 критериев Крускала-Уоллеса и 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 распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая тот факт, что состав клеток ПК – в определенной степени отражение процессов, протекающих во время беременности и родов, в настоящем исследовании предпринята попытка охарактеризовать состав ПК у доношенных новорожденных при различных состояниях и особенностях течения беременности и родов, которые могут

Таблица 4

Количество CD34+ клеток в пуповинной крови доношенных новорожденных

Параметр	CD34+, %	CD34+, $10^3/\text{мм}^3$
Количество наблюдений	618	618
Среднее значение	0,827	0,100
Медиана	0,700	0,078
Стандартное отклонение	0,562	0,079
Стандартная ошибка среднего	0,023	0,003
Минимальное значение	0,120	0,009
Максимальное значение	4,520	0,714

График 1

Степень некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК, %

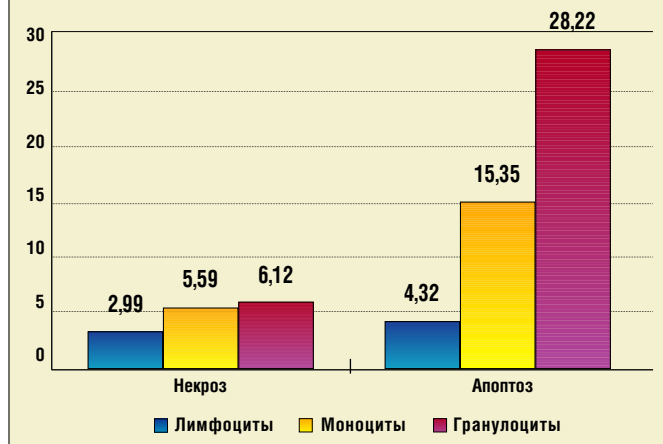


Таблица 5
Взаимосвязь количества лимфоцитов и колониобразующей активности ПК

Параметр	Количество лимфоцитов	
	r	p
КОЕ-ГЕММ	0,399	0,0001
КОЕ-ГМ	0,4993	0,0001
КОЕ-Г	0,4467	0,0001
КОЕ-М	0,4995	0,0001
КОЕ-Э	0,2068	0,0018
Суммарное количество КОЕ	0,5634	0,0001

влиять на адаптацию плода к процессу родов. Результаты исследования морфологического состава ПК при помощи автоматического гематологического анализатора представлены в *таблице 3*.

Основные отличия ПК от крови взрослого – большее содержание лейкоцитов, наличие нормобластов и большая осмотическая резистентность эритроцитов (*Solves P.*, 2005; *Bradley M.B.*, 2005). Количественное содержание нормобластов, определенное при помощи световой микроскопии, оказалось равным $5,62 \pm 0,33 / 100$ лейкоцитов ($n=339$). Количество $CD34^+$ клеток в ПК определяли с помощью проточной цитометрии и оценивали как два параметра: процент от общего количества лейкоцитов и абсолютное количество $CD34^+$ клеток в 1 мл ПК (*табл. 4*).

Степень спонтанного апоптоза и пролиферативный потенциал – это противоположные процессы, поддерживающие стабильность клеточного состава и как следствие – нормальное функционирование любой биологической системы. Следовательно, эти

Таблица 6
Количество лейкоцитов в зависимости от пола новорожденного

Пол		WBC $\times 10^9 / л$	Лейкоцитарная формула, %				
			NEU	LYM	MON	EOS	BAS
Мальчики	n	524	524	524	524	524	524
	M \pm m	17,74 \pm 0,24	49,97 \pm 0,35	31,57 \pm 0,31	13,75 \pm 0,15	3,48 \pm 0,07	1,26 \pm 0,03
Девочки	n	480	480	480	480	480	480
	M \pm m	16,80 \pm 0,23	47,10 \pm 0,34	33,23 \pm 0,30	14,29 \pm 0,17	4,16 \pm 0,09	1,18 \pm 0,03
	p	0,005	< 0,001	< 0,001	0,018	< 0,001	0,06
Мальчики	n	524	524	524	524	524	524
	M \pm m	17,74 \pm 0,24	8,93 \pm 0,14	5,53 \pm 0,09	2,44 \pm 0,04	0,60 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
Девочки	n	480	480	480	480	480	480
	M \pm m	16,80 \pm 0,23	7,94 \pm 0,12	5,54 \pm 0,09	2,40 \pm 0,05	0,68 \pm 0,02	0,22 \pm 0,01
	p	0,005	< 0,001	0,938	0,537	< 0,001	0,158

процессы при адекватной способности организма реагировать на внешние и внутренние раздражители предположительно должны быть однонаправленными: чтобы обеспечить компенсацию повышения гибели клеток, биологическая система должна усилить процессы их деления и созревания, и наоборот, при повышенной пролиферации клеток необходимо обеспечить их адекватное «умирание», чтобы клеточная масса не вышла из-под контроля (Абдуллаев Р.Т., 2006; Румянцев С.А., 2006).

В работе определена степень некроза и спонтанного апоптоза клеток ПК. Показано, что в исследованной группе образцов ПК ($n=1004$) степень некроза лейкоцитов составила $3,49 \pm 0,28\%$, при этом степень некроза лимфоцитов была ниже значений всех лейкоцитов ($2,99 \pm 0,34\%$) и статистически значимо отличалась от степени некроза моноцитов и гранулоцитов, составлявшей соответственно $5,59 \pm 0,72$ и $6,12 \pm 0,65\%$ ($p < 0,0001$) (график 1). Степень спонтанного апоптоза лейкоцитов – $9,18 \pm 1,19\%$, при этом степень спонтанного апоптоза лимфоцитов была также ниже значений в общей группе ($4,32 \pm 0,7\%$) и также статистически значимо отличалась от степени спонтанного апоптоза моноцитов и гранулоцитов (соответственно $15,35 \pm 2,02$ и $28,22 \pm 2,51\%$; $p < 0,0001$) (график 1) и не отличалась от показателей периферической крови здоровых доноров.

Такое соотношение показателей позволяет предположить большую жизнеспособность лимфоцитов, что представляется позитивным результатом, учитывая тот факт, что популяция гемопоэтических стволовых клеток находится в пуле лимфоцитов. Это предположение подтверждается положительной корреляционной взаимосвязью количества лимфоцитов и колониеобразующей активности ПК (табл. 5).

Обнаружены различия клеточного состава ПК в зависимости от пола и массы тела новорожденного, совпадающие с данными литературы (Cairo M.S., 2005; Aravita S., 2005). Результаты исследования количества клеток и их основных параметров при помощи автоматического гематологического анализатора проанализированы в ПК 1004 доношенных новорожденных. При анализе половых различий отмечено, что у мальчиков уровень лейкоцитов выше ($17,74 \pm 0,24 \cdot 10^9/\text{л}$; $M \pm m$), чем у девочек ($16,8 \pm 0,23 \cdot 10^9/\text{л}$; $p = 0,005$), преимущественно за счет нейтрофилов, которых у мальчиков больше, а лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов меньше (табл. 6).

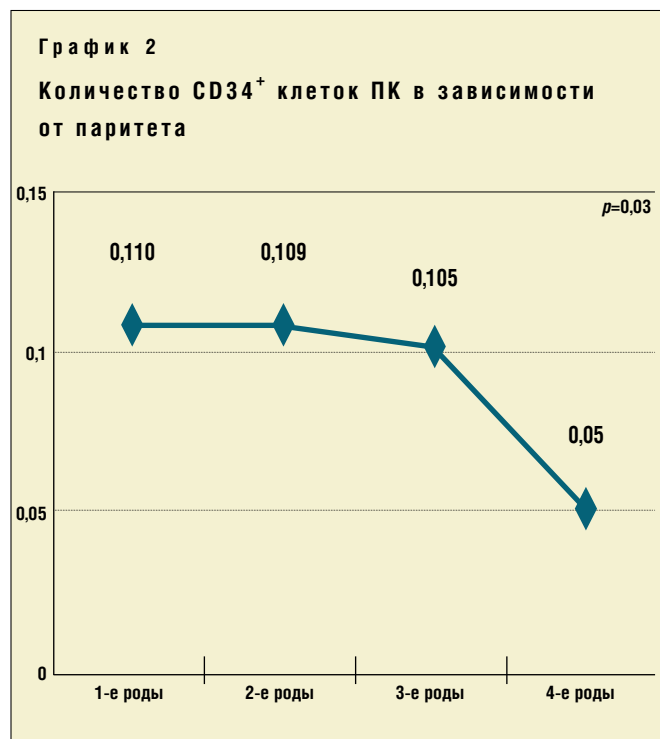
Количество эритроцитов ($4,33 \pm 0,02 \cdot 10^{12}/\text{л}$) и содержание гемоглобина ($155,1 \pm 0,7$ г/л) у девочек меньше, чем у мальчиков ($4,46 \pm 0,02 \cdot 10^{12}/\text{л}$; $159,5 \pm 0,6$ г/л; $p < 0,0001$). Гематокрит у девочек ($31,79 \pm 0,2\%$) также ниже, чем у мальчиков ($32,76 \pm 0,19\%$; $p = 0$). Различий в эритроцитарных индексах (MCV, MCH, MCHC, RDW) в зависимости от

пола новорожденного не обнаружено. Количество тромбоцитов у девочек ($314,87 \pm 2,98 \cdot 10^9/\text{л}$) больше, чем у мальчиков ($300,72 \pm 2,62 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,0001$), а средний размер тромбоцитов не отличается.

Из 611 новорожденных, относительно которых были получены данные о количестве $CD34^+$ клеток в ПК, мальчиков было 314 (51,39%), девочек – 297 (48,61%). При сравнении полученных результатов выявлено, что у мальчиков $CD34^+$ клеток больше и в процентном ($0,88 \pm 0,03$ – мальчики; $0,77 \pm 0,03$ – девочки; $p = 0,01$), и в абсолютном количестве ($0,106 \pm 0,005$ – мальчики; $0,095 \pm 0,005$ – девочки; $p = 0,002$).

При анализе данных колониеобразующей активности ПК выявлено, что у мальчиков статистически значимо больше количество КОЕ-ГМ в 1 мл ПК ($745,71 \pm 65,11$ – девочки; $1216,7 \pm 185,45$ – мальчики; $p = 0,022$) и имеется тенденция к увеличению (статистически незначимо) количества КОЕ-М ($691,64 \pm 78,6$ – девочки; $1052,1 \pm 252,09$ – мальчики; $p = 0,19$) и общего количества колоний ($4883,13 \pm 455$ – девочки; $6070,8 \pm 691$ – мальчики; $p = 0,16$) в 1 мл образца ПК. При анализе эффективности клонирования (на 105 MNC) у мальчиков также больше КОЕ-Г ($18,44 \pm 1,31$ – девочки; $22,42 \pm 1,6$ – мальчики; $p = 0,058$). В процентном соотношении имеется тенденция к увеличению количества КОЕ-ГЕММ ($p = 0,11$) у девочек и уменьшению у них КОЕ-ГМ ($p = 0,13$) и КОЕ-Э ($p = 0,14$).

Можно предположить, что выявленные различия клеточного состава ПК в зависимости от пола новорожденного связаны с тем, что новорожденные мальчики крупнее новорожденных девочек.



Действительно, средняя масса тела при рождении была несколько выше у мальчиков ($3629,24 \pm 18,25$ г; диапазон – 2270–5000 г), чем у девочек ($3467,23 \pm 18,17$ г; диапазон – 2300–4650 г; $p < 0,0001$). При разделении на группы по массе тела при рождении мальчиков было больше в группе с массой тела > 4000 г ($p = 0,001$), а девочек – в группе 2500–3000 г ($p = 0,008$). Однако при исследовании групп, сходных по массе тела при рождении, различия в параметрах крови между мальчиками и девочками сохранялись. Таким образом, различия в клеточном составе ПК в зависимости от пола не могут быть объяснены различной массой тела мальчиков и девочек при рождении.

Различия клеточного состава ПК и крови новорожденного первых суток, у которого отмечается снижение количества многих клеточных элементов, позволяют предположить, что повышенное содержание многих клеточных элементов в ПК может быть следствием мобилизации, сходной с мобилизацией периферической крови взрослых, вызванной адаптацией к процессу родов, а различия количества клеток ПК в зависимости от пола новорожденного – различной способностью девочек и мальчиков адаптироваться к процессу родов. Исходя из этого предположения могут быть оценены многие особенности течения беременности и родов как усиления или ослабления родового стресса. Известно, что прохождение плода по естественным родовым путям – более сильный стрессовый фактор по сравнению с оперативными родами путем кесарева сечения. При сравнении показателей ПК в зависимости от способа родоразрешения показано, что при оперативных родах путем кесарева сечения наблюдается меньшее количество лейкоцитов ($14,29 \pm 0,57 \cdot 10^9$ /л против $17,38 \pm 0,17 \cdot 10^9$ /л; $p < 0,0001$) за счет меньшего количества нейтрофилов ($p < 0,0001$), лимфоцитов ($p = 0,02$), моноцитов ($p = 0,003$) и эозинофилов ($p = 0,002$). При оперативных родах отмечается также меньшее количество эритроцитов ($4,3 \pm 0,05 \cdot 10^{12}$ /л против $4,4 \pm 0,01 \cdot 10^{12}$ /л;

$p = 0,04$) и тромбоцитов ($284,88 \pm 9,55 \cdot 10^9$ /л против $308,59 \pm 2,01 \cdot 10^9$ /л; $p = 0,015$). MPV при этом имеет статистически значимо большее значение ($p = 0,039$). Доля мальчиков и девочек в группах оперативных и физиологических родов не отличалась (см. табл. 2). При исследовании групп мальчиков и девочек по отдельности все вышеописанные различия для способов родоразрешения сохранялись.

Известно, что повторные роды проходят с меньшей нагрузкой для плода, поскольку родовые пути более приспособлены для его прохождения. Установлено, что при увеличении паритета уменьшается количество лейкоцитов в ПК ($18,14 \pm 0,22 \cdot 10^9$ /л – первые роды; $16,22 \pm 0,25 \cdot 10^9$ /л – вторые; $15,44 \pm 0,61 \cdot 10^9$ /л – третьи; $15,1 \pm 1,37 \cdot 10^9$ /л – четвертые и последующие; $p < 0,0001$). Уменьшается также абсолютное количество нейтрофилов (с $8,91 \pm 0,13 \cdot 10^9$ /л при первых родах до $6,86 \pm 0,65 \cdot 10^9$ /л при четвертых; $p < 0,0001$); абсолютное количество лимфоцитов (с $5,8 \pm 0,09 \cdot 10^9$ /л при первых родах до $5,17 \pm 0,58 \cdot 10^9$ /л при четвертых; $p < 0,0001$); абсолютное количество моноцитов (с $2,54 \pm 0,04 \cdot 10^9$ /л при первых родах до $2,1 \pm 0,09 \cdot 10^9$ /л при третьих; $p < 0,0001$) и абсолютное количество базофилов (с $0,24 \pm 0,01 \cdot 10^9$ /л при первых родах до $0,16 \pm 0,01 \cdot 10^9$ /л при третьих; $p = 0,017$). Это подтверждает гипотезу о снижении стрессового воздействия при последующих родах. Параметры красной крови и тромбоцитов в зависимости от паритета не изменялись. Процент мальчиков и девочек среди групп, составленных по паритету, не отличался. При исследовании групп, составленных только из девочек и мальчиков, различия сохранялись, что исключает влияние пола новорожденного на различия клеточного состава ПК в зависимости от паритета.

Количество CD34⁺ клеток повторяет закономерности, обнаруженные для лейкоцитов ПК. Обнаружена тенденция к уменьшению процентного содержания и статистически значимое уменьшение абсолютного количества CD34⁺ клеток при четвертых и последующих родах (график 2).

Таблица 7

Концентрация цитокинов в сыворотке ПК и крови здоровых доноров, пг/мл

Исследуемый цитокин	Концентрация цитокина в сыворотке крови		p
	ПК (n=45)	доноры (n=25)	
IL-8	19,83±4,93	6,07±0,39	0,022
MMP-9	182,4±23,7	225,4±33,6	0,521
MMP-2	114,6±36,4	96,3±27,8	0,622
G-CSF	44,8±12,2	21,7±8,6	0,042

Таблица 8

Концентрация цитокинов в сыворотке ПК при некоторых особенностях течения беременности и родов, пг/мл

Фактор	Цитокин	Пуповинная кровь (n=45)		p
		Наличие фактора гипоксия (n=6)	Отсутствие фактора без гипоксии (n=31)	
Внутриутробная гипоксия плода	IL-8	21,87±16,44	17,62±5,73	0,761
	MMP-9	192,4±48,2	166,4±24,8	0,598
	G-CSF	49,1±27,3	39,8±14,1	0,740
Острая гипоксия плода		Гипоксия (n=8)	Без гипоксии (n=31)	
	IL-8	56,21±14,17	17,62±5,73	0,006
	MMP-9	232,4±39,4	116,4±24,8	0,035
Пол новорожденного		Мальчики (n=16)	Девочки (n=15)	
	IL-8	26,32±6,81	16,43±4,89	0,253
	MMP-9	194,1±28,7	176,4±24,8	0,646
Способ родоразрешения		Самопроизвольные роды (n=22)	Плановое кесарево сечение (n=9)	
	IL-8	20,62±6,82	12,14±3,88	0,449
	MMP-9	201,8±32,3	93,2±44,2	0,071
	G-CSF	48,2±16,2	32,6±18,8	0,584

При сравнении количества CD34⁺ клеток в ПК при физиологических и оперативных родах статистически значимых различий не получено. Тенденция к уменьшению абсолютного количества CD34⁺ клеток в ПК при родах путем кесарева сечения, вероятно, связана с уменьшением общего количества лейкоцитов в данной группе.

Особенности реакции ПК доношенных новорожденных при различных состояниях острой и хронической гипоксии плода. В работе проанализирован ряд состояний острой и хронической гипоксии плода. Установлено, что при острой гипоксии повышается количество эритроцитов – $4,55 \pm 0,05 \cdot 10^{12} / \text{л}$ против $4,35 \pm 0,02 \cdot 10^{12} / \text{л}$

($p < 0,0001$), концентрация гемоглобина $162,2 \pm 1,7$ против $156,1 \pm 0,9$ г/л ($p = 0,001$), уровень гематокрита – $32,98 \pm 0,46$ против $31,86 \pm 0,24\%$ ($p = 0,027$). Количество CD34⁺ клеток статистически значимо выше при острой и ниже – при хронической внутриутробной гипоксии плода. При внутриутробной гипоксии повышается как эффективность клонирования, так и уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК. При острой гипоксии плода жизнеспособность лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток ПК не изменяется. При повышении степени зрелости плаценты эффективность клонирования имеет тенденцию к снижению, а степень спонтанного апоптоза – к повышению.

Внутриутробная гипоксия приводит к увеличению количества нормобластов в ПК – $11,94 \pm 3,11/100$ против $5,42 \pm 0,53/100$ лейкоцитов ($p < 0,0001$). Увеличения количества нормобластов в ПК при острой гипоксии в родах не выявлено: $6,21 \pm 0,66/100$ против $5,32 \pm 1,25/100$ лейкоцитов ($p = 0,55$). На количество нормобластов влияет только состояние хронической гипоксии плода. Состояние острой гипоксии плода не способствует повышению количества нормобластов в ПК, поскольку система кроветворения не успевает ответить пролиферацией эритроидных предшественников.

В 206 образцах ПК было подсчитано количество нормобластов и определено количество $CD34^+$ клеток. Образцы были поделены на две группы: менее 15 нормобластов и более 15 нормобластов на 100 лейкоцитов. При сравнении получены статистически значимые различия в абсолютном количестве $CD34^+$ клеток в ПК ($0,11 \pm 0,007$ – при менее 15 нормобластов; $0,17 \pm 0,032$ – при более 15 нормобластов; $p = 0,034$). При проведении регрессионного анализа получена достоверная положительная корреляционная взаимосвязь абсолютного количества $CD34^+$ клеток в ПК и количества нормобластов в ПК ($r = 0,3352$; $p = 0,001$). Кроме того, выявлена статистически значимая положительная корреляционная взаимосвязь между количеством нормобластов в ПК и количеством предшественников миелоидного ростка кроветворения – КОЕ-ГМ ($r = 0,6778$; $p = 0,0004$), КОЕ-Г ($r = 0,7833$; $p = 0,00001$) и КОЕ-М ($r = 0,7811$; $p = 0,00001$), а также суммарным количеством КОЕ ($r = 0,6367$; $p = 0,0011$).

Таким образом, обнаруженное рядом авторов (Rubinstein P., et al., 2005) влияние количества нормобластов в ПК на скорость приживания миелоидного ростка кроветворения после трансплантации стволовых гемопоэтических клеток ПК нашло биологическое подтверждение в нашей работе.

Механизм формирования клеточного состава пуповинной крови. Известно, что ПК не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенности клеточного состава ПК – быстропроходящее последствие процесса родов, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью (Bailie K.E., et al., 1994). Если рассматривать ПК с точки зрения идентичного механизма мобилизации при помощи того же набора цитокинов, что и при мобилизации периферической крови в постнатальном периоде, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль о том, что особенности течения беременности и родов, усиливающие родовой стресс, должны сопровождаться более высокими концентрациями мобилизующих цитокинов.

При сравнении концентрации Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК концентрация Г-КСФ составляет $44,8 \pm 12,2$ пг/мл ($n = 45$) – это превышает нормальную концентрацию сывороточного Г-КСФ в периферической крови. Таким образом, концентрация Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных, которая отличается от нормальной концентрации Г-КСФ в сыворотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении количества лейкоцитов и $CD34^+$ клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой процесс, позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ индуцированной мобилизации лейкоцитов и $CD34^+$ клеток. При изучении уровня IL-8 в сыворотке ПК было показано, что концентрация IL-8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров, тогда как концентрация MMP-9 и MMP-2 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров (табл. 7).

Несмотря на отсутствие различий в концентрации основных мобилизующих цитокинов между ПК и кровью здоровых доноров, при ряде состояний, усиливающих родовой стресс, обнаружено повышение концентрации IL-8, MMP-9 и G-CSF (табл. 8).

Такое соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством $CD34^+$ клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя адаптация плода к процессу родов и помогает объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

ВЫВОДЫ

1. Клеточный состав пуповинной крови доношенных новорожденных отличается от периферической крови за счет большего количества лейкоцитов и составляет: лейкоциты: $17,24 \pm 5,24 \cdot 10^9/л$, нейтрофилы: $8,41,02 \cdot 10^9/л$, лимфоциты: $5,54 \pm 1,99 \cdot 10^9/л$, моноциты: $2,42 \pm 1,01 \cdot 10^9/л$, эозинофилы: $0,64 \pm 0,34 \cdot 10^9/л$, базофилы: $0,23 \pm 0,18 \cdot 10^9/л$.

2. В отличие от периферической крови, пуповинная кровь содержит большее количество $CD34^+$ клеток – $0,83 \pm 0,023$ % от общего числа ядросодержащих клеток или 100 клеток в мкл ПК, и имеет более высокую эффективность клонирования, составляющую $5490,2 \pm 419,3$ КОЕ в 1 мл ПК, преимущественно за счет более ранних клеток-предшественников.

3. К анте- и интранатальным факторам риска, усиливающим мобилизацию можно отнести увеличение длительности второго периода родов, большую массу плода, наличие внутриутробной гипоксии плода или острой гипоксии в родах.

4. Показана различная способность адаптироваться к процессу родов и плодов женского и мужского пола. Так у мальчиков, которые хуже адаптированы к стрессу, количество лейкоцитов ПК выше – $17,74 \pm 0,24 \cdot 10^9/\text{л}$, чем у девочек – $16,8 \pm 0,23 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p=0,005$). При этом, у мальчиков в процентном соотношении больше нейтрофилов, а лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов меньше.

5. Концентрация мобилизационных цитокинов (IL-8, G-CSF, MMP-9) в сыворотке ПК доношенных новорожденных статистически значимо выше, чем в сыворотке крови здоровых доноров. При этом концентрация IL-8, G-CSF, MMP-9 выше у мальчиков по сравнению с девочками; выше при самопроизвольных родах, по сравнению с родами путем кесарева сечения и при острой гипоксии плода, тогда как при хронической внутриутробной гипоксии плода концентрации цитокинов и ферментов не изменяются.

6. Хроническая внутриутробная гипоксия приводит к снижению количества CO34^+ клеток, эффективности клонирования и повышению уровня спонтанного апоптоза лейкоцитов. При острой гипоксии количество CO34^+ клеток, эритроцитов, концентрация гемоглобина статистически значимо выше, жизнеспособность лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток ПК не изменяется.

7. Хроническая внутриутробная гипоксия приводит к увеличению количества нормобластов – $11,94 \pm 3,11:100$ лейкоцитов против $5,42 \pm 0,53:100$ лейкоцитов ($p < 0,0001$). Увеличения количества нормобластов при острой гипоксии не выявлено $6,21 \pm 0,66:100$ лейкоцитов против $5,32 \pm 1,25:100$ лейкоцитов ($p=0,55$).

8. Концентрация мобилизационных цитокинов (IL-8, G-CSF, MMP-9) в сыворотке ПК при хронической внутриутробной гипоксии плода не изменяется, а при острой интранатальной гипоксии плода повышается.

9. Острая и хроническая внутриутробная гипоксия не является противопоказанием для сбора пуповинной крови с целью неродственной трансплантации.

Литература

1. *Ivanovic Z., Belloc F., Faucher J.L., et al.* Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34⁺ murine bone marrow cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 67–73.
2. *Ivanovic Z., Dello Sbarba P.D., Trimoreau F., et al.* Primitive

human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 2000; 40: 1482–8.

3. *Ivanovic Z., Hermitte F., de la Grange P.B., Dazey B., Belloc F., Lacombe F., Vezon G., Praloran V.* Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* 2004; 22 (5): 716–24.
4. *Sun B, Bai CX, Feng K, Li L, Zhao P, Pei XT.* Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells and their response to cytokines. *Sheng Li Xue Bao* 2000 Apr; 52 (2): 143–6.
5. *Brunet De La Grange P., Barthe C., Lippert E., Hermitte F., Belloc F., Lacombe F., Ivanovic Z., Praloran V.* Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the cd34 gene. *J Cell Biochem* 2006 Jan 1; 97 (1): 135–44.
6. *Desplat V., Faucher J.L., Mahon F.X., Dello Sbarba P., Praloran V., Ivanovic Z.* Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells. *Stem Cells* 2002; 20 (4): 347–54.
7. *Tsujimoto Y., Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Matsuda H.* Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia* 1997; 11 (Suppl. 3): 380–2.
8. *Ura H., Hirata K., Katsuramaki T.* [Mechanisms of cell death in hypoxic stress]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1999; 100: 656–62.
9. *Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., et al.* Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996; 56: 2161–6.
10. *Saxonhouse M.A., Rimsza L.M., Christensen R.D., Hutson A.D., Stegner J., Koenig J.M., Sola M.C.* Effects of anoxia on megakaryocyte progenitors derived from cord blood CD34pos cells. *Eur J Haematol* 2003 Nov; 71 (5): 359–65.
11. *Mang Xiao, Douglas C. Dooley:* Assessment of Cell Viability and Apoptosis in Human Umbilical Cord Blood Following Storage. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* Feb 2003; 12 (1): 115–22.
12. *Aroviita P., Teramo K., Hiilesmaa V., Kekomaki R.* Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion* 2005; Apr; 45 (4): 613–21.
13. *Maconi M., Rolfo A., Cardaropolo S., Brini M., Danise P.* Haematologic values in healthy and small for gestational age newborns. *Lab hematol* 2005; 11 (2): 152–6.
14. *McCarthy J.M., Capullari T., Thompson Z., Zhu Y., Spellacy W.N.* Umbilical cord nucleated red blood cell counts: normal values and the effect of labor. *J Perinatol* 2006 Feb; 26 (2): 89–92.
15. *Perri T., Ferber A., Digli A., Rabizadeh E., Weissmann-Brenner A., Divon MY.* Nucleated Red Blood Cells in Uncomplicated Prolonged Pregnancy. *Obstetrics Gynecology* 2004; 104: 372–6.