



Румянцев С.А.¹, Майорова О.А.¹, Зимина Н.Н.², Яковлева М.В.³, Курцер М.А.²

ВЛИЯНИЕ АНТЕ- И ИНТРАНАТАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравсоцразвития России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

²Центр Планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения г. Москвы
Россия, 117209, г. Москва, Севастопольский проспект, 24 «А»

³Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы
Россия, 115516, Москва, Бакинская ул., 31

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, 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 приведена оценка влияния течения беременности и родов, острой и хронической гипоксии плода на показатели клеточного состава ПК доношенных новорожденных, продемонстрировавшая увеличение количества лейкоцитов при удлинении второго 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.

Roumiantsev S.A.¹, Mayorova O.A.¹, Zimina N.N.², Yakovleva M.V.³, Kurtser M.A.²

INFLUENCE OF AN ANTE- AND INTRANATAL FACTORS ON CORD BLOOD CELL COMPOSITION OF FULLTERM NEWBORNS

¹Federal Research Center of pediatric hematology, oncology and immunology
117/2 Leninskiy pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

²Moscow Center of family planning and reproduction
24 «А» Sevastopolsky avenue, Moscow, 117209, Russia

³Moscow stem cell bank
31 Bakinskaya st., Moscow, 115516, Russia

The hypoxia is the powerful stressful factor, and, presumably, should result not only in rising of erythrocytes counts for the compensatory purpose, but also in rising of other blood cells number, as consequence of mobilization in the answer stress.

In article the influence assessment of pregnancy and delivery features, acute and chronic fetal hypoxia on cord blood cell composition of the full-term newborns is shown. Increase of leucocytes count at elongation of the second period of delivery, presence of chronic prenatal hypoxia or acute hypoxia in delivery is revealed. Differences of cord blood cell composition depending on newborn gender and body weight which consist in higher leucocytes count (all subpopulations including hematopoietic stem cells) at boys and at higher body weight are shown. Differences according to gender and to body weight are independent from each other. It is shown, that boys worse adapt for delivery that is expressed in higher concentration of mobilization cytokines and higher leucocytes and hemopoietic progenitors count in cord blood. It is shown, that mobilization cytokine concentration (IL-8, G-CSF, MMP-9) in cord blood of full-term newborns statistically significantly above, than in peripheral blood of healthy donors. Thus IL-8, G-CSF, MMP-9 concentration higher at boys in comparison with girls; at normal delivery in comparison with delivery by planned cesarean sections and at acute fetal hypoxia.

Keywords: Cord blood, leucocytes, CD34+cells, CFU, fetal hypoxia, apoptosis.



Введение

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, 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 ряде работ было показано, что выраженная гипоксия (концентрация O_2 – 0,9%-1%) *in vitro* способствует самообновлению мышиных 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 cd34TfмRNA, 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], что может способствовать снижению влияния ростовых факторов непосредственно на ГСК.

Многие исследователи демонстрируют, что гипоксия индуцирует клеточную смерть, активируя как апоптотический, так и некротический пути [7-8], в зависимости от типа клеток [9]. При исследовании влияния 24-х часовой аноксии на апоптоз CD34+клеток пуповинной крови, было показано, что клетки, инкубированные в условиях аноксии, менее подвержены апоптозу и некрозу, при сравнении 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.

Появившиеся в последнее время сообщения о различии клеточного состава пуповинной крови в зависимости от вида родоразрешения, от пола и массы тела новорожденного, а также от сроков, прошедших после родов и сбора пуповинной крови до начала процесса обработки [12-15], демонстрируют, что остаются неясными множество факторов, влияющих на клеточный состав пуповинной крови и, как следствие, на эффективность заготовки трансплантационного материала. Таким образом, целью настоящего исследования служило 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

Пуповинную кровь получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37–41 недель гестации (медиана – 40 недель)) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережатия и пересечения пуповины, проводили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA (GreenCross, Юж.Корея). Сбор крови осуществляли в течение 2–15 минут после родов (менее 5 минут – 847 случаев (84,4%), от 5 до 10 минут – 89 случаев (8,7%) и более 10 минут – 68 (6,9%)), до отделения плаценты (n=993 (98,5%)). В случае сбора крови после отделения плаценты (n=15 (1,5%)), плацента помещалась в специальную стерильную стойку и проводилась аналогичная процедура сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 часов после процедуры сбора ПК.

Течение беременности проанализировано у 1004 роженниц и представлено в табл. 1.

Таблица 1.

Особенности течения беременности (количество наблюдений)

№№	Состояние	Кол-во	1 половина беременности	2 половина беременности	1 и 2 половина 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 роженниц за счет наличия нескольких ситуаций одновременно.

Из 1004 новорожденных 585 родились в результате первых родов, 340 – вторых, 63 – третьих и 16 – роды чет-

вертые и более (12 человек – 4-е роды, 2 человека – 5-е и 2 человека – 6-е). Процент мальчиков и девочек среди



групп, составленных по паритету, не отличался. В каждой из групп девочек и мальчиков было приблизительно поровну. Медиана длительности безводного промежутка составила 5 часов (от 20 минут до 19 часов 20 минут). Медиана длительности II периода родов (от начала потуг до рождения ребенка) составила 30 минут (от 10 минут до 1 часа 35 минут).

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

Таблица 2

Распределение мальчиков и девочек по полу и способу родоразрешения

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

Средняя масса 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.) ($p < 0,0001$). Течение родов прослежено у 1004 новорожденных. Из 1004 новорожденных у 112 отмечалась хроническая внутриутробная гипоксия плода, а у 90 – острая гипоксия плода.

Подсчет клеток крови проводился двумя методами:

- все 1004 образца ПК были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови ABXPentra 60 C+ 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).

Подсчет клеток крови проводился двумя методами:

- все 1004 образца ПК были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови ABXPentra 60 C+ 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, Canada») с подсчетом количества КОЕ-mix, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

- Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на 1×10^5 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: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidiumiodid (PI), и определение 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 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 проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа. В качестве ферментных меток использовалась пероксидаза. В настоящем исследовании использовались следующие наборы реагентов: «HumanMMP-9 (total)», «Human/mouseMMP-2(total)», «HumanTIMP-2» («Quantikine» R&DSYSTEMS Inc., USA), «HumanTIMP-1» (Biosource International Inc., USA), «HumanIL-8 ELISAKitII» (BD OptEIA™ BDBiosciencesPharmingen, USA).

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

Учитывая тот факт, что состав клеток ПК в определенной степени является отражением 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 влиять на адаптацию плода к процессу родов. Результаты исследования морфологического состава ПК при помощи автоматического гематологического анализатора представлены в табл. 3.

Основными отличиями ПК от крови взрослого являются большее содержание лейкоцитов, наличие нормобластов и большая осмотическая резистентность эритроцитов (SolvesP., 2005; BradleyM.B., 2005). Количественное содержание нормобластов, определенное при помощи световой микроскопии оказалось $5,62 \pm 0,33/100$ лейкоцитов ($n=339$).

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 ($\times 10^9/\text{л}$)	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 ($\times 10^9/\text{л}$)	MPV (фл)	
105,81 $\pm$ 0,12	35,82 $\pm$ 0,04	338,6 $\pm$ 0,24	12,71 $\pm$ 0,02	307,54 $\pm$ 1,97	7,18 $\pm$ 0,02	

Количество CD34+клеток в ПК определялось с помощью проточной цитометрии и оценивалось как 2 параметра: процент от общего количества лейкоцитов и абсолютное количество CD34+клеток в 1 мл ПК (табл. 4).

Таблица 4.

Количество CD34⁺клеток в ПК доношенных новорожденных

Параметры	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

Степень спонтанного апоптоза и пролиферативный потенциал – это противоположные процессы, поддерживающие стабильность клеточного состава, и, как

следствие, нормальное функционирование любой биологической системы. Следовательно, эти 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 деления и созревания клеток, напротив, 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 во всей исследованной группе образцов ПК ($n=1004$), степень некроза лейкоцитов ПК 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 $5,59 \pm 0,72$ % и $6,12 \pm 0,65$ % соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 1). Степень спонтанного апоптоза лейкоцитов составила $9,18 \pm 1,19$ %, 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, составившей $15,35 \pm 2,02$ % и $28,22 \pm 2,51$ % соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 1) и не отличалась от показателей периферической крови здоровых доноров.

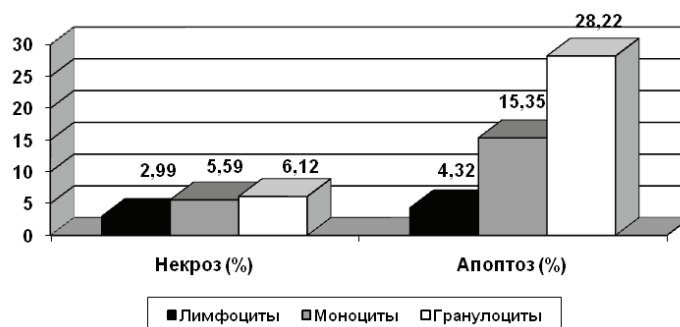


Рисунок 1. Степень некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК.

Такое соотношение показателей позволяет предположить большую жизнеспособность лимфоцитов, что представляется позитивным результатом, учитывая тот факт, что популяция гемопоэтических стволовых клеток нахо-

дится в пуле лимфоцитов. Это предположение подтверждается положительной корреляционной взаимосвязью количества лимфоцитов и колониеобразующей активности ПК (табл. 5).



Таблица 5

Взаимосвязь количества лимфоцитов и колониеобразующей 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

В работе 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 ($17,74 \pm 0,24 \times 10^9/\text{л}$; $M \pm m$), чем у девочек ($16,8 \pm 0,23 \times 10^9/\text{л}$; $p=0,005$), преимущественно за счет нейтрофилов, которых у мальчиков больше, а лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов меньше (табл. 6).

Таблица 6

Количество лейкоцитов в зависимости от пола новорожденного

Пол		WBC ($\times 10^9/\text{л}$)	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
Пол		WBC ($\times 10^9/\text{л}$)	Лейкоцитарная формула ($\times 10^9/\text{л}$)				
			NEU	LYM	MON	EOS	BAS
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

Количество эритроцитов ($4,33 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$) и содержание гемоглобина ($155,1 \pm 0,7 \text{ г/л}$) у девочек меньше, чем у мальчиков ($4,46 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$; $159,5 \pm 0,6 \text{ г/л}$; $p < 0,0001$). Гематокрит у девочек ($31,79 \pm 0,2 \%$) также меньше, 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 ($314,87 \pm 2,98 \times 10^9/\text{л}$) больше, чем у мальчиков ($300,72 \pm 2,62 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,0001$). Средний размер тромбоцитов не имеет различий. Из 611 новорожденных, для которых были получены данные относительно количества CD34+клеток в ПК, мальчиков было 314 (51,39%), девочек – 297 (48,61%). При сравнении полученных результатов выявлено, что у мальчиков CD34+клеток больше 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 105MNC) 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 ($3629,24 \pm 18,25 \text{ г}$; диапазон 2270–5000 г), чем у девочек ($3467,23 \pm 18,17 \text{ г}$; 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 причины усиления или ослабления родового стресса. Известно, что прохождение плода по естественным родовым путям является более сильным стрессовым фактором 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 ($14,29 \pm 0,57 \times 10^9/\text{л}$ против $17,38 \pm 0,17 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,0001$), за счет меньшего количества нейтрофилов ($p < 0,0001$), лимфоцитов ($p = 0,02$), моноцитов ($p = 0,003$) и эозинофилов ($p = 0,002$). Также при оперативных родах отмечается меньшее количество эритроцитов ($4,3 \pm 0,05 \times 10^{12}/\text{л}$ против $4,4 \pm 0,01 \times 10^{12}/\text{л}$; $p = 0,04$) и тромбоцитов ($284,88 \pm 9,55 \times 10^9/\text{л}$ против $308,59 \pm 2,01 \times 10^9/\text{л}$; $p = 0,015$). MPV при этом имеет статистически значимо большее значение ($p = 0,039$). Доля мальчиков и девочек в группах оперативных и физиологических родов не отличалась (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 уве-

личении паритета уменьшается количество лейкоцитов в ПК ($18,14 \pm 0,22 \times 10^9/\text{л}$ – первые роды; $16,22 \pm 0,25 \times 10^9/\text{л}$ – 2-е; $15,44 \pm 0,61 \times 10^9/\text{л}$ – 3-и и $15,1 \pm 1,37 \times 10^9/\text{л}$ – 4-е и более; $p < 0,0001$). Также уменьшается абсолютное количество нейтрофилов ($с 8,91 \pm 0,13 \times 10^9/\text{л}$ при первых родах до $6,86 \pm 0,65 \times 10^9/\text{л}$ при 4-х; $p < 0,0001$); абсолютное количество лимфоцитов ($с 5,8 \pm 0,09 \times 10^9/\text{л}$ при первых родах до $5,17 \pm 0,58 \times 10^9/\text{л}$ при 4-х; $p < 0,0001$); абсолютное количество моноцитов ($с 2,54 \pm 0,04 \times 10^9/\text{л}$ при первых родах до $2,1 \pm 0,09 \times 10^9/\text{л}$ при 3-х; $p < 0,0001$) и абсолютное количество базофилов ($с 0,24 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$ при первых родах до $0,16 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$ при 3-х; $p = 0,017$), что 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 более родах (рис. 2).

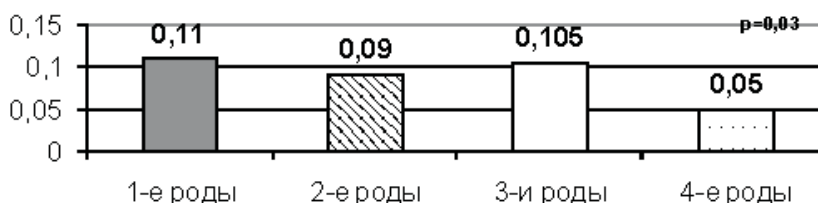


Рисунок 2. Количество CD34+ клеток ПК в зависимости от паритета.

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

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, 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 работе были проанализированы ряд состояний острой и хронической гипоксии плода. Установлено, что при острой гипоксии повышается количество эритроцитов $4,55 \pm 0,05 \times 10^{12}/\text{л}$ против $4,35 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$ ($p < 0,0001$) концентрация гемоглобина – $162,2 \pm 1,7$ г/л 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 – $11,94 \pm 3,11/100$ лейкоцитов против $5,42 \pm 0,53/100$ лейкоцитов ($p < 0,0001$). Увеличения количества нормобластов в ПК при острой гипоксии в родах не выявлено $6,21 \pm 0,66/100$ лейкоцитов 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 отражается повышением 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 2 группы: менее 15 нормобластов на 100 лейкоцитов 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, получена 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 приживления 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 являются быстропроходящими последствиями 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, как при мобилизации периферической крови в постнатальном периоде, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль, 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 ($n=45$), что превышает нормальную концентрацию сывороточного Г-КСФ в периферической крови. Таким образом, концентрация Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных, отличающаяся 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).

Таблица 7.

Концентрация цитокинов в сыворотке ПК и здоровых доноров (пг/мл)

Исследуемый цитокин	Исследуемые группы		p
	ПК (n=45)	Доноры (n=25)	
IL-8	$19,83 \pm 4,93$	$6,07 \pm 0,39$	0,022
MMP-9	$182,4 \pm 23,7$	$225,4 \pm 33,6$	0,521
MMP-2	$114,6 \pm 36,4$	$96,3 \pm 27,8$	0,622
G-CSF	$44,8 \pm 12,2$	$21,7 \pm 8,6$	0,042

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).

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	Отсутствие фактора	
		Гипоксия (n=6)	Без гипоксии (n=31)	
Внутриутробная гипоксия плода	IL-8	$21,87 \pm 16,44$	$17,62 \pm 5,73$	0,761
	MMP-9	$192,4 \pm 48,2$	$166,4 \pm 24,8$	0,598
	G-CSF	$49,1 \pm 27,3$	$39,8 \pm 14,1$	0,740
Острая гипоксия плода		Гипоксия (n=8)	Без гипоксии (n=31)	
	IL-8	$56,21 \pm 14,17$	$17,62 \pm 5,73$	0,006
	MMP-9	$232,4 \pm 39,4$	$116,4 \pm 24,8$	0,035
	G-CSF	$97,3 \pm 18,7$	$39,8 \pm 14,1$	0,026
Пол новорожденного		Мальчики (n=16)	Девочки (n=15)	
	IL-8	$26,32 \pm 6,81$	$16,43 \pm 4,89$	0,253
	MMP-9	$194,1 \pm 28,7$	$176,4 \pm 24,8$	0,646
	G-CSF	$59,8 \pm 16,1$	$39,8 \pm 12,3$	0,336
Способ родоразрешения		Самопроизвольные роды (n=22)	Плановое кесарево сечение (n=9)	
	IL-8	$20,62 \pm 6,82$	$12,14 \pm 3,88$	0,449
	MMP-9	$201,8 \pm 32,3$	$93,2 \pm 44,2$	0,071
	G-CSF	$48,2 \pm 16,2$	$32,6 \pm 18,8$	0,584



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 позволяет

объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

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 //ExpHematol. - 2002. - №30. - P.67-73.
2. Ivanovic Z, DelloSbarba PD, 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. - P.1482-1488.
3. Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, 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). - P.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 XueBao. - 2000 Apr. - №52(2). - P.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). - P.135-44.
6. Desplat V, Faucher JL, Mahon FX, DelloSbarba P, Praloran V, Ivanovic Z. Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells //Stem Cells. - 2002. - №20(4). - P.347-54.
7. Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, KamiikeW, 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). - P.380-382.
8. Ura H, Hirata K, Katsuramaki T. Mechanisms of cell death in hypoxic stress //Nippon GekaGakkaiZasshi. - 1999. - №100. - P.656-662.
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. - P.2161-2166.
10. Saxonhouse MA, Rimsza LM, Christensen RD, Hutson AD, Stegner J, Koenig JM, Sola MC. Effects of anoxia on megakaryocyte progenitors derived from cord blood CD34pos cells //Eur J Haematol. - 2003 Nov. - №71(5). - P.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. - Vol. 12, No. 1. - P.115-122.
12. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomaki R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex //Transfusion. - 2005 Apr. - №45(4). - P.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). - P.152-6.
14. McCarthy JM, Capullari T, Thompson Z, Zhu Y, Spellacy WN. Umbilical cord nucleated red blood cell counts: normal values and the effect of labor //J Perinatol. - 2006 Feb. - №26(2). - P.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. - P.372-376.

ПОСТУПИЛА: 18.10.2010