

Инфицированность пуповинной крови и тканей эмбрионов ранних сроков гестации и гемопоэз в эмбриональной печени

Г.С. Лобынцева

Институт клеточной терапии,

Первый Криобанк стволовых клеток пуповинной крови в Украине, Киев

Infection of umbilical cord blood and embryos at early terms of gestation and embryonic hemopoiesis in the fetal liver

G.S. Lobyntseva

Institute of Cellular Therapy

First Cryo Bank of Umbilical Cord Blood Stem Cells in Ukraine

Методом полимеразной цепной реакции проведено обследование образцов плацент, материнской и пуповинной крови. Цитомегаловирус выявлен в тканях плаценты в 7,2% случаев; в пуповинной крови новорожденных вирус не определен. Вирус Эпштейна-Барр не обнаружен в пуповинной крови, однако он присутствовал в материнской крови и тканях плаценты в 3,6% образцов. РНК вируса гепатита С найдена в 3,6% пуповинной крови и в 5,4% – в материнской крови и плаценте. Общее количество инфицированных образцов пуповинной крови составило 5,4%, плацент – 20%. Значимо, что в анамнезе рожениц сведений о наличии данных инфекционных заболеваний не было.

Исследование abortивного материала показало, что 47% эмбрионов были поражены различными видами инфекций, которые определялись уже на 6–10 неделе развития. Наиболее распространенной инфекцией являлась микоплазма (17%). Данный возбудитель выявляется с 6 по 12 неделю внутриутробного развития в тканях печени, почек, сердца, головного мозга и в кроветворных клетках эмбрионов. 5% эмбрионов поражены хламидиями, 6% – уреоплазмой, 4% – гепатитом С, 2,5% – вирусом Эпштейна-Барр. Проведено изучение клеточного состава популяции гемопоэтических клеток, выделенных из эмбриональной печени плодов 7–12 недель гестации и установлено его изменение при появлении внутриутробных инфекций.

Ключевые слова: пуповинная кровь, эмбрионы, вирусные и урогенитальные инфекции.

Введение

Источниками стволовых клеток, применяемых в клеточной трансплантологии, являются костный мозг, пуповинная кровь, плацента и abortивные эмбрионы ранних сроков гестации и др. Чистота получаемых клеточных препаратов гарантирует качественное использование их в клинике. Однако уровень инфекционного поражения населения очень высок. Особенно распространены урогенитальные инфекции среди людей детородного возраста. В рекомендациях МОЗ Украины требуется обследовать донорскую кровь на наличие инфекционной флоры (гепатиты В и С, ВИЧ, трепонема) методом иммуноферментного анализа (ИФА). Мы сочли необходимым провести более широкие исследования пуповинной крови с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1, 2].

До недавнего времени считалось, что наиболее частыми возбудителями внутриутробных инфекции являются цитомегаловирусы, вирусы простого герпеса 1 и 2 типов, возбудители токсоплазмоза и краснухи. Однако результаты последних исследований во многом изменили представления, как об этиологической структуре внутриутробных инфекций, так и о частоте внутриутробного инфицирования в целом.

Целью нашей работы было определение инфекционного агента в образцах пуповинной крови и плаценте, поступивших

Polymerase Chain Reaction method was used to check 180 samples of placenta, maternal and umbilical cord blood. Cytomegalovirus was detected: in placenta – 7,2%, no virus was detected in umbilical cord blood of newborn. Also, no EBV was detected in umbilical cord blood, but was detected in maternal blood and placenta (3,6%). RNA of hepatitis C virus was detected in 3,6% of umbilical cord blood and 5,4% of maternal blood and placenta. Total amount of infected samples for umbilical cord blood was 5,4%, for placentas – 20%. In anamnesis of women in childbirth, there was no data on presence of such infectious diseases.

Research of abortive embryos revealed the following: the most extensive infection is mycoplasma (17%), the pathogen is detected on 6 to 12 week of intrauterine development in tissues of liver, kidneys, heart, brain, and haematopoietic cells of embryos. 5% of embryos are affected by chlamydia, 6% – by ureaplasma, 4% – by hepatitis C, 2,5% – by EBV, there's plenty of mixed infections. 47% of embryos were affected by various types of infections, which could be detected as early as 6–10 week of development. The study of cellular composition of populace of haematopoietic cages, abstracted from the embryonic liver of garden-stuffs 7–12 weeks of gestation and his change is set at appearance of infections is conducted. We studied haemopoiesis in the liver taken from embryos between the 6th and 12th weeks of gestation staggered the different types of infections.

Key words: umbilical cord blood, embryos, viral and urogenital infections.

на длительное хранение в криобанк согласно договору с пациентами [3] с помощью методов ПЦР и ИФА, а также влияние инфицирования на гемопоэз в печени эмбрионов.

Материал и методы

Проведен сравнительный анализ инфицированности пуповинной крови и abortивных эмбрионов и плодов 6–12 недель гестации, полученных с согласия женщин во время добровольного прерывания беременности и подготовленных для клинических испытаний клеточных препаратов. Образцы хранились в криобанке при температуре -196°C . Исследование клеточного состава популяции гемопоэтических клеток при наличии и отсутствии инфекций выполнено на мазках, окрашенных по Романовскому, под иммерсией при увеличении $\times 400$ на микроскопе CX41 Olympus.

Пероксидазную активность определяли бензидиновым методом [4].

Для ПЦР-анализа, включающего выделение РНК/ДНК, амплификацию и детекцию результатов, использованы тест-системы производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора (АмплиСенсиТМ, Россия). Для выделения РНК (гепатит С) был использован комплект «Рибозоль-А», для ДНК – комплекты «ДНК-Сорб-В» и «Цитолизин». Детекцию результатов

проводили методом гибридационно-ферментного анализа (ГИФА) (для гепатита С и ВИЧ), а также методом электрофореза.

Некоторые образцы были дополнительно подвергнуты иммуноферментному анализу. Контроль стерильности проводили по классическим микробиологическим методикам [1]. Оценку статистической значимости различий между вариантами производили с использованием критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Договор на длительное хранение в криобанке пуповинной крови мы заключаем с роженицами, у которых не обнаружено патогенной флоры. Однако даже в таких случаях, мы выявляем у женщин возбудителей. Из полученных нами данных, следует, что из 55 исследованных образцов цитомегаловирус определили в тканях плаценты в 7,2% случаев, в пуповинной крови вирус не выявлен. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) также не обнаружен в крови, но найден в плаценте (3,6%). РНК вируса гепатита С найдена в 3,6% пуповинной крови и 5,4% – в плаценте, причем во всех случаях в анамнезе рожениц не было сведений о наличии инфекционных заболеваний.

Если роды протекали с осложнениями: ранний отход вод, длительное нахождение плода в безводной среде, околоплодные воды с запахом и измененным цветом, при бактериологическом контроле пуповинной крови и плаценты отмечено присутствие бактериальной флоры, т.е. пуповинная кровь (6,6%) и плацента (25,5%) были нестерильными.

Многие авторы считают, что урогенитальные и вирусные инфекции попадают в презервируемые ткани гематогенным путем, а бактериальная флора – восходящим (контаминация) при родах. Существует также мнение, что для будущего ребенка опасны инфекции, с которыми женщина встретилась во время беременности, а инфицирование до беременности, кроме хронических очагов в мочеполовой сфере, не опасно. Дальнейшие наши исследования показали возможность попадания вирусов в эмбрион до формирования полноценной плаценты.

Мы провели исследование abortивных эмбрионов и установили следующее: наиболее распространенной инфекцией является микоплазма (*Mycoplasma hominis*) (17%), возбудитель выявляется с 6 по 12 недели внутриутробного развития в тканях печени, почек, сердца, головного мозга и в кроветворных клетках. 5% эмбрионов были поражены хламидиями, 6% – уреоплазмой, 4% – гепатитом С, 2,5% – ВЭБ, выявилось большое количество смешанных инфекций. В целом, 47% исследованных нами эмбрионов и плодов были заражены различными видами микроорганизмов, которые определялись уже на 6–10-й неделях развития.

Изменения в клетках, вызванные возбудителями, не могут быть безразличными для будущего ребенка. При поражении вирусом гепатита С вирус локализуется в печени, оказывая на гепатоциты цитопатическое действие, следствием которого может быть появление в них большого количества вакуолей и многоядерности. При заражении хламидиозом увеличивается количество моноцитов и макрофагов. Следует особо отметить, что при исследовании тканей ИФА-методом в 10 и 11 недельных эмбрионах, инфицированных ВИЧ и вирусом гепатита С, были обнаружены антитела к данным возбудителям. В образцах, содержащих хламидии, уреоплазму, микоплазму, антитела выявлены лишь единично на 11–12-й неделе.

При изучении морфофункциональной характеристики популяции гемопоэтических клеток эмбриональной печени различных сроков развития (от 5 до 12 недели) и различной стерильности, мы выделили три группы:

- 1) не определяя инфекционного загрязнения в пробах;
- 2) в чистых препаратах;
- 3) в образце, пораженном вирусом гепатита С;

Морфологический и цитохимический анализ клеточной популяции в первой группе, показал большое разнообразие клеток от недифференцируемых бластов, лимфоцитоподобных клеток до зрелых макрофагов и нейтрофилов.

В отпечатках и мазках печени 5–6-недельных эмбрионов обнаружена довольно высокая доля недифференцируемых бластных клеток ($17,0 \pm 1,5\%$), они были представлены крупными клетками округлой формы с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Лимфоцитоподобные клетки составляли $4,0 \pm 0,6\%$, на 7–8-й неделях разное количество клеток этой группы статистически достоверно не изменялось, а с 9 по 12-ю недели число недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток снижалось до $6,0 \pm 0,6\%$ и $2,0 \pm 0,2\%$, соответственно ($P < 0,05$). Это снижение, по-видимому, связано с увеличением массы органа и количества гемопоэтических клеток, происходит «разведение» популяции более дифференцированными клетками-предшественниками гемопоэза. Лимфоциты встречались единично только на 11–12 неделях развития ($1,2 \pm 0,4\%$).

Примитивные эритробластические элементы при выявлении пероксидазной активности давали в зависимости от типа клеток различные оттенки желтого окрашивания (от ярко-желтого в эритроблестах I типа, до желто-коричневого в эритроблестах III типа). Эти клетки представляли почти половину клеточной популяции на 5–6 неделях развития, затем к 7–8 неделям количество их снижалось. Различие было статистически достоверным на 8–12 неделях. Данная генерация эритроидных клеток заменялась клетками дефинитивного эритропоэза, которые на 5–6 неделях составляли $14,0 \pm 1,3\%$, а к концу 12-й – $52,0 \pm 5,0\%$ ($P < 0,05$).

На 5–8 неделях развития около 20% клеток были представлены клетками моноцитарно-макрофагального роста, затем число их достоверно снижалось. Количество моноцитов на 11–12 неделях составляло $2,6 \pm 0,4\%$, а макрофагов – $6,0 \pm 1,7\%$. В мазках также встречались единичные мегакариоциты и миелобластные элементы.

Таким образом, если не принимать во внимание наличие инфекционной флоры в образцах, усредненная популяция гемопоэтических клеток эмбриональной печени 5–12-недельного возраста представлена клетками эритроидного ряда, находящимися на разной стадии развития, моноцитарно-макрофагальными и в меньшей степени миелоидно-гранулоцитарными клетками.

При анализе препаратов, изготовленных из образцов, в которых методом ПЦР не обнаружено наличие вирусов и урогенитальных инфекций, мы не выявили того разнообразия клеток, который присутствовал в первой группе. В мазках встречались клетки эритроидного и моноцитарно-макрофагального роста. Небольшая доля недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток. Клетки миелоидного роста найдены в единичных количествах в 11–12-недельных плодах.

Отсутствие раннего грануло-цито-поэза в этой группе может быть обусловлено тем, что у эмбриона/плода в отсутствие инфекционного агента снижается необходимость в этом типе клеток. Однако гемопоэтические клетки-предшественники эмбриональной печени могут дифференцироваться в различные клеточные линии и этот запрет, как мы увидим далее, может быть снят при появлении внутриутробной инфекции.

В третьей группе (образцы инфицированные вирусом гепатита С) клеточный состав резко изменен: увеличивалось количество клеток моноцитарно-макрофагального роста, появлялись миелоидные предшественники, зрелые

гранулоциты и эозинофилы. Аналогичные результаты получены при анализе мазков из образцов, пораженных другими видами инфекций.

Проведенные исследования позволили установить, что ряд возбудителей проникает в эмбрион на ранних сроках гестации, до полного формирования плаценты. Как осуществляется на данном этапе эмбрионального развития механизм защиты эмбриона от инфекции? У здорового человека попадающие в организм вирусы и микроорганизмы не всегда могут быть причиной болезни. Они распознаются и разрушаются в течение нескольких часов благодаря механизмам врожденного иммунитета, которые не являются антигенспецифическими и не требуют длительного времени для их активации. Эта ранняя фаза ответа на инфекцию помогает сохранять ее под контролем до активации антигенспецифических лимфоцитов [5].

Пиогенные микроорганизмы (пневмококки, стафилококки, стрептококки и др.) элиминируются благодаря нейтрофилам, иммуноглобулинам и комплементу. Внутриклеточные возбудители разрушаются Т-лимфоцитами, NK-клетками и макрофагами, причем все эти 3 группы клеток обладают способностью синтезировать цитокины (интерферон, ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО- α и др.), резко усиливающие их функциональные свойства. Т-лимфоциты появляются у плода на 12-й неделе внутриутробного периода, после этого срока плод способен проявлять слабые реакции гиперчувствительности замедленного типа и отторжения трансплантата.

При изучении влияния инфекционных агентов на репродуктивную систему женщин было установлено, что уреоплазмы, микоплазмы, вирус простого герпеса, обнаруженные в эндометрии, вызывают морфофункциональные изменения в его клетках, задержку формирования маточно-плацентарного кровотока, что свидетельствует о восходящем пути инфицирования, т.е. из полости матки, и приводит к «замершей» беременности [6].

Если происходит имплантация бластоцисты в пораженный инфекцией эндометрий, в инфицированных эмбрионах запускается механизм врожденного иммунитета, который запускает пролиферацию клеток-предшественниц грануломоноцитопоэза, увеличивается количество моноцитов, макрофагов, а также стимулируется миелопоэз, отсутствующий в норме на данном этапе развития эмбриона.

Следовательно, в эмбриональной печени среди недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток присутствуют ранние предшественники гемопоэза, способные пролиферировать и дифференцироваться в необходимый организму кроветворный росток. Они образуют в 30 раз больше колоний, чем клетки пуповинной крови и в 90 раз больше, чем гемопоэтические клетки костного мозга [7]. Кроме того, эмбриональные гемопоэтические клетки обладают высоким потенциалом самовоспроизводства, что имеет большое значение при их клиническом применении [8].

Таким образом, мы установили, что инфекционные агенты могут проникать в эмбрион на ранних стадиях гестации. Присутствие патогенов вызывает изменения в клетках эмбриональной печени, которая в 1 триместре беременности является основным кроветворным органом. Изменяется направленность дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественниц, поэтому, при исследовании эмбрионального кроветворения, чтобы избежать разногласий в приводимых данных, необходимо тщательно подбирать исходный материал, предварительно тестируя его на различную патогенную флору современными методами.

Кроме того, крайне важно проводить тщательное микробиологическое обследование молодых пар, планирующих рождение ребенка, чтобы, в случае выявления возбудителя провести адекватное лечение до наступления беременности, а не в 1 триместре, когда уже может иметься внутриутробное инфицирование плода.

Литература:

1. Наказ МОЗ України «Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів» № 385 від 11.09.2005.
2. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань людини. Методичні вказівки МВ 9.9.5.101-2003: Видання офіційне; 2003.
3. Ліцензія Міністерства Охорони здоров'я України №118962, 2004.
4. Пирс Э. Гистохимия. М.: Инстранный литература; 1962.
5. Лобынцева Г.С., Гладких Ю.В., Лобынцев Д.В., Гладких В.Ю. Стволовые эмбриональные гемопоэтические клетки человека. Киев: Наукова Думка; 2004.

6. Краснопольский В.И., Серова В.А., Туманова Н.В. и др. Влияния инфекционных агентов на репродуктивную систему женщин. Российский вестник акушера-гинеколога. 2005; 5.

7. Nicolini F.E., Holyoake T.L., Cashman J.D. et al. Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice. Blood 1999; 94: 2686-95.

8. Кухарчук А.П., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Киев: ООО «КРС-Медицинские технологии»; 2004.

Поступила 19.04.2008