

Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения

Т.А. Астрелина¹, М.В. Яковлева¹, Н.К. Шахпазян¹, А.Е. Гомзяков¹, Е.В. Скоробогатова², Е.Э. Карпова¹, Е.В. Кобзева¹

¹ Банк стволовых клеток Департамента Здравоохранения г. Москвы, Москва

² Российская детская клиническая больница МЗ, Москва

Significance of human herpesvirus detection in multipotent mesenchymal stromal stem cells for clinical practice

T.A. Astrelina¹, M.V. Yakovleva¹, N.K. Shahpazyan¹, A.E. Gomzyakov¹, E.V. Skorobogatova², E. Karpova¹, E.V. Kobzeva¹

¹ Stem Cell Bank of the Moscow Department of Health, Moscow

² Russian Children's Clinical Hospital of the Ministry of Health, Moscow

Одним из важнейших требований к качеству клеточного материала для клинического применения, является обеспечение вирусного контроля с целью предотвращения инфицирования реципиента. Целью исследования являлось оценить персистенцию и размножение герпесвирусов человека в культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК-КМ) и плаценты (ММСК-П), а также распространенность вируса среди доноров ММСК. Было проведено культивирование ММСК от 6 доноров костного мозга и 25 доноров плаценты для дальнейшего клинического применения по стандартной методике. Исследовались уровни экспрессии поверхностных клеточных маркеров ММСК-КМ и ММСК-П методом проточной цитофлюориметрии. Количественное выявление ДНК вирусов HHV-1, HHV-2, EBV, CMV, HHV-6 проводилось методом ПЦР до культивирования и при достижении достаточного для клинического применения количества ММСК (2-5 пассаж). При анализе полученных данных у 2 доноров костного мозга была обнаружена ДНК герпесвирусов EBV и HHV-6. У этих доноров до трансплантации костного мозга были диагностированы лимфогистиоцитоз и билиарный цирроз, соответственно. У доноров плаценты была выявлена ДНК EBV и HHV-6 в 2 случаях. ДНК CMV, HHV-1 и HHV-2 не были обнаружены ни в одном из исследуемых образцов. Результаты исследования показали, что тщательный алгоритм подбора доноров снижает риск инфицирования ММСК: риск инфицирования образцов доноров костного мозга увеличивается, если донором костного мозга являются пациенты,отягощенные тяжелыми хроническими заболеваниями. EBV и HHV-6 обладают тропизмом к ММСК и способны размножаться в процессе культивирования. Проведение ПЦР-исследования на герпесвирусы человека до культивирования и при достижении достаточного для дальнейшего клинического применения количества клеток позволяет своевременно выявить вирусную контаминацию клеточного материала. Оценка качества клеточного материала для дальнейшего применения должна включать в себя обязательное ПЦР исследование на герпесвирусы человека.

Ключевые слова: герпесвирусы человека, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, костный мозг, плацента, ПЦР-исследование.

Активное применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в клинической практике повышает актуальность разработки мер, обеспечивающих безопасность их использования. Одним из важнейших требований к клеточному материалу, предназначенному для клинического применения, является обеспечение противовирусного контроля с целью предотвращения инфицирования реципиента.

e-mail: t_astrelina@mail.ru

The main requirement for the quality of cellular material for clinical use is to ensure that viral control in order to prevent infection of the recipient. The aim of the study was to evaluate the persistence and multiplication of human Herpesviridae in human bone marrow and placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs-BM and MMSCs-P), and their prevalence among donors MMSCs. Expansion MMSCs-BM was held from of 6 donors and expansion MMSCs-P was held from of 25 donors for further clinical application of the standard method. We investigated the expression levels of cell surface markers of MMSCs. The quantitative detection of DNA viruses HHV-1, HHV-2, EBV, CMV, HHV-6 was investigated by PCR to the expansion and achieving a sufficient number of MMSCs for clinical use (2-5 passage). In 2 the bone marrow donors was found DNA EBV and HHV-6. These donors were diagnosed lymphohistiocytosis and biliary cirrhosis. In the placenta donors and MMSCs-P were detected DNA EBV and HHV-6 in 2 cases. DNA CMV, HHV-1 HHV-2 and were not detected in any of the investigated samples. The results showed that careful selection of donors, the algorithm reduces the risk of infection of MMSC, the risk of infection with samples of bone marrow donors is increased if the donor bone marrow are patients with severe chronic diseases; EBV and HHV-6 have a tropism to the MMSCs and are able to multiply in the process of expansion; PCR-investigation on the human Herpesviridae before expansion of cells and when a sufficient number of cells MMSCs for further clinical application allows you to quickly identify infected cell material, evaluation of the quality of MMSCs for further clinical application must include the compulsory study of PCR for the human Herpesviridae.

Key words: human Herpesviridae, multipotent mesenchymal stromal cells, bone marrow, placenta, PCR-investigation.

Особого внимания заслуживает возможное инфицирование ММСК герпесвирусами человека (вирусы семейства Herpesviridae). Герпесвирусы человека включают ряд патогенных форм: вирус простого герпеса 1 и 2 типов (HHV-1, HHV-2), вирус варицелла-зостер (VZV), вирус Эпштейн-Барр (EBV), цитомегаловирус человека (CMV), вирус герпеса 6, 7, 8 типов (HHV-6, HHV-7, HHV-8). Особенностью герпесви-

русов человека является латентное нахождение в клетках с возможностью персистировать бесконечно длительное время, реактивируясь в случае понижения противовирусной резистентности организма.

Особенностью культивирования ММСК *in vitro* является отсутствие иммунного контроля, что может привести к размножению в культуре вирусов донора в случае, если ММСК обладают к ним тропизмом. По данным М. Sundin и соавт. (2006), HHV-1 и 2 обладают тропизмом к ММСК, успешно реплицируются в культуре, оказывая цитопатическое действие [1]. Кроме того, такой источник для выделения и культивирования ММСК, как плацента, при прохождении родовых путей непосредственно контактирует со слизистыми половыми органов — типичным местом проявления HHV-2 (herpes genitalis) инфекции. В литературе также есть данные, позволяющие предположить способность VZV инфицировать ММСК [1, 2]. Инфицирование EBV предполагает наличие на клеточной поверхности рецептора CD21 [3]. Сведений об экспрессии ММСК рецептора CD21 не найдено, однако есть данные о попытке инфицирования этим вирусом культуры ММСК [1], кроме того, данные литературы показывают возможность восприимчивости ММСК к вирусам — инфицирование культуры при минимальной экспрессии специфических рецепторов [4]. Что касается CMV, то для него характерна тропность к большому числу видов клеток, в том числе к клеткам соединительной ткани [5, 6]. Известно, что HHV6 взаимодействует с клетками, экспрессирующими CD46. Группа исследователей во главе с А. Pessina (2009) сообщили о безрезультатной попытке инфицировать HHV-6 культуру ММСК, экспрессирующих CD46 [7].

В связи с приведенными данными, **целью настоящего исследования** являлось оценить возможность персистирования и размножения герпес-вирусов человека в культурах ММСК костного мозга (ММСК-КМ) и плаценты (ММСК-П), а также распространенность их среди доноров клеток.

Материал и методы

Доноры ММСК

Сбор образцов костного мозга проводился в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ РДКБ Минздравсоцразвития. Образцы костного мозга доставлялись в ГБУЗ «БСК ДЗМ». Было проведено культивирование ММСК-КМ от 6 доноров (4 мужчины и 2 женщины в возрасте от 7 мес. до 20 лет) для дальнейшей родственной трансплантации. До сбора костного мозга у трех доноров были диагностированы врожденная обструкция желчевыводящих путей, вторичный билиарный цирроз печени; у одного — лимфогистиоцитоз; и только 2 донора были условно-здоровы.

Сбор образцов плаценты проводился в родильном доме № 8 г. Москвы с добровольным письменным информированным согласием роженицы. Выполнялся более тщательный отбор доноров с целью выявления противопоказаний к сбору плаценты. Критериями не включения являлись:

- 1) отказ матери;
- 2) наличие носительства и установленных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекция, гепатиты, сифилис и заболевания, передающиеся половым и гемотрансмиссивным путем;

- 3) генетические заболевания;
- 4) наследственные и врожденные патологии, в том числе патологии кроветворной и иммунной систем;
- 5) психические заболевания;
- 6) онкологические заболевания, в том числе в стадии ремиссии;
- 7) применение цитостатических и тератогенных средств во время беременности;
- 8) наркомания и токсикомания;
- 9) переливание крови и ее компонентов в течение последних 12 мес;
- 10) лечение иглоукалыванием, выполнение пирсинга и татуировок в последние 12 мес. перед родами;
- 11) постоянное отстранение от донорства.

Образцы плаценты доставлялись в ГБУЗ «БСК ДЗМ». Доноры были разделены на 2 группы в зависимости от дальнейшего клинического применения ММСК:

- доноры плаценты для персонифицированного хранения ММСК-П (10 женщин, средний возраст 29 лет, средний срок гестации 39,4 нед.), в семье которых есть больной ребенок с тяжелым заболеванием, для дальнейшей родственной трансплантации;
- доноры плаценты для неперсонифицированного хранения ММСК-П (15 женщин, средний возраст 27,8 лет, средний срок гестации 39,5 нед.) для дальнейшей аллогенной трансплантации.

Все доноры костного мозга и плаценты прошли бактериологический и вирусологический контроль (серологическое исследование, в том числе и на герпесвирусы человека). При выявлении положительных результатов образцы были «отбракованы» и в настоящее исследование включены не были. Иными словами, все доноры плаценты были «серонегативны».

Культивирование ММСК

Для получения первичной культуры из костного мозга выделялась мононуклеарная фракция лейкоцитов на градиенте плотности фиколла 1,077 г/мл. Для получения первичной культуры из плаценты проводилась гомогенизация биологического материала и обработка 0,1% раствором коллагеназы.

Культивирование ММСК-КМ и ММСК-П проводилось по стандартной методике до достижения достаточного для клинического применения количества клеток (2–5 пассаж).

Имунофенотипирование ММСК

Проводилась оценка уровня экспрессии поверхностных кластеров дифференцировки на 3-5 пассаже культивирования ММСК: CD3, CD13, CD14, CD19, CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD133, CD166, HLA-DR — методом проточной цитофлюориметрии с помощью станции FACSCalibur Becton Dickinson (США), меченных флюорохромами FITC и PE антител (BD Biosciences и Beckman Coulter, США).

Выявление ДНК вирусов методом ПЦР

Проводилось исследование количественного выявления ДНК вирусов HHV-1, HHV-2, EBV, CMV, HHV-6:

– до культивирования в мононуклеарной фракции костного мозга (6 образцов) и в гомогенизате плаценты (24 образца);

– на 2–5 пассажах культивирования ММСК-КМ (5 образцов), ММСК-П (19 образцов);

Применяли ПЦР метод с регистрацией результата в режиме реального времени на термоциклере Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) наборами для выделения и амплификации ДНК «АмплиСенс» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия), согласно прилагаемым инструкциям производителей. Обработка полученных результатов осуществлялась на программном обеспечении Rotor-Gene v.6.0. (CorbettResearch, Австралия), согласно методическим рекомендациям к наборам для амплификации ДНК вирусов. Количественная оценка уровня вирусной нагрузки клеточного материала оценивалась в копиях вирусной ДНК на 10^5 клеток (по количеству копий гена β -глобина человека).

Результаты и обсуждение

Проведённое исследование показало, что ММСК-КМ и ММСК-П, полученные на 3–5 пассаже, экспрессировали на своей поверхности антигены, характерные для ММСК – CD73, CD90, CD105 – и не экспрессировали CD14, CD19, CD34, HLA-DR. Значимых отличий уровня экспрессии CD3, CD13, CD14, CD19, CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD133, CD166, HLA-DR между ММСК-КМ и ММСК-П выявлено не было.

Результаты выявления ДНК герпесвирусов человека в мононуклеарной фракции костного мозга, гомогенизате плаценты, культурах ММСК-КМ и ММСК-П представлены в табл. 1.

ДНК EBV была идентифицирована в мононуклеарной фракции костного мозга (образец № 6) до культивирования в количестве 50 копий/ 10^5 клеток. При инкубировании этого образца костного мозга на 2 пассаже было получено достаточное для клинического применения количество ММСК-КМ без визуальных и морфологических признаков инфицирования. При ПЦР-исследовании ММСК-КМ было выявлено ДНК EBV в количестве 35263 копии/ 10^5 клеток.

ДНК EBV была обнаружена в гомогенизате плаценты (образец № 1) до культивирования в количестве 26 копий/ 10^5 клеток. При инкубировании этого образца плаценты на 3 пассаже было получено достаточное для клинического применения количество ММСК-П без визуальных и морфологических признаков инфицирования. При ПЦР-исследовании клеток культуры ДНК EBV не была выявлена.

ДНК HHV-6 была выявлена в двух образцах: в образце № 3 мононуклеарной фракции костного мозга в количестве 13 копий/ 10^5 клеток (при дальнейшем культивировании этот образец был «отбракован» из-за отсутствия роста в культуре); в образце № 25 ММСК-П (на 5 пассаже) в количестве 28561 копия/ 10^5 клеток (исследование гомогенизата плаценты до культивирования ММСК-П не проводилось по техническим причинам).

ПЦР-исследование не проводилось 5 отбракованным образцам ММСК-П по причинам: контаминации грибами – образцы № 10, № 15; контаминации бактериальной флорой – образец № 4; отсутствия роста в культуре – образцы № 2, № 6. В этих образцах ДНК

вирусов HHV-1, HHV-2, EBV, CMV, HHV-6 до культивирования в мононуклеарной фракции костного мозга и гомогенизате плаценты выявлено не было.

ДНК CMV, HHV-1 и HHV-2 ни в одном образце мононуклеарной фракции костного мозга, гомогенизате плаценты, ММСК-КМ, ММСК-П не была обнаружена.

У двух доноров костного мозга (из 6) была обнаружена ДНК герпесвирусов (донор №6 – EBV, донор №3 – HHV-6). У этих доноров (возраст 2 и 3 года) до эксплантации костного мозга были диагностированы лимфогистиоцитоз и билиарный цирроз, соответственно.

Из 10 доноров плаценты в группе персонифицированного хранения в 2 случаях полученные ММСК-П были инфицированы (донор №1 – EBV, донор №25 – HHV-6).

У всех 15 доноров плаценты в группе неперсонифицированного хранения в культурах ММСК-П ДНК вирусов HHV-1, HHV-2, EBV, CMV, HHV-6 не были обнаружены.

Несмотря на небольшую выборку, можно предположить, что риск получения инфицированной культуры ММСК увеличивается, если донором костного мозга являются пациенты,отягощенные тяжелыми хроническими заболеваниями. Поэтому таким пациентам, возможно, показан поиск условно-здоровых доноров ММСК.

Обнаружение и количественный анализ динамики размножения EBV в культуре ММСК-КМ (образец № 6) показал, что для культивирования EBV-инфицированного образца костного мозга было выделено 702 млн. мононуклеаров с вирусной нагрузкой 50 копий/ 10^5 , из которых было получено в процессе культивирования на 2 пассаже 381 млн. ММСК с вирусной нагрузкой 35 263 копии/ 10^5 клеток, то есть количество копий вируса увеличилось в культуре в 383 раза.

В случае с гомогенизатом плаценты образца № 1, инфицированного EBV, размножения вируса в культуре не наблюдалось, несмотря на то, что иммунофенотип ММСК-КМ и ММСК-П позволял предположить их идентичность. Одной из возможных причин отсутствия EBV в культуре ММСК-П является низкая вирусная нагрузка (26 копий/ 10^5 клеток) и низкое абсолютное количество вируса в гомогенизате плаценты, в пересчете на количество клеток – 4082 копий вируса против 351000 копий вируса в мононуклеарной фракции костного мозга образца № 6.

Обнаружение ДНК HHV-6 в культуре ММСК-П (образец № 25) позволяет сделать вывод, что инфицирование плаценты способствует возможному размножению вируса HHV-6 в культуре ММСК-П. К сожалению, проследить динамику размножения HHV-6 в культуре плаценты в данном случае не удалось по техническим причинам – отсутствие данных ПЦР анализа гомогенизата плаценты до ее культивирования.

Обнаружение в образце № 3 мононуклеарной фракции костного мозга ДНК HHV-6 позволяет сделать вывод о возможности его инфицирования. Клеточный материал этой мононуклеарной фракции был «отбракован» в процессе культивирования, поэтому провести ПЦР-анализ ММСК-КМ данного образца не удалось. Однако, учитывая высокое иммунофенотипическое сходство ММСК-П и ММСК-КМ, можно сделать предположение о высокой вероятности заражения и ММСК-КМ.

Выявление ДНК герпесвирусов человека в биологическом материале

Номер образца донора	HHV1		HHV2		EBV		CMV		HHV-6	
	До культивирования	Культура ММСК	До культивирования	Культура ММСК	До культивирования	Культура ММСК	До культивирования	Культура ММСК	До культивирования	Культура ММСК
<i>Костный мозг</i>										
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-	+	-	+	13 копий/10 ⁵	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	50 копий/10 ⁵	35 263 копий/10 ⁵	-	-	-	-
<i>Плацента</i>										
1	-	-	-	-	26 копий/10 ⁵	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	-	+	-	+	-	+	-	+	28 561 копий/10 ⁵

Примечание: «-» – отсутствие ДНК вируса; «+» – не исследовали

Таким образом, инфицирование культур ММСК герпесвирусами человека нередко встречается в практике работы культуральной лаборатории. Учитывая, что в последние годы ММСК все активнее применяются в клинической практике (комплексная терапия аутоиммунных и других тяжелых заболеваний, для лечения реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) у пациентов с выраженной иммуносупрессией и т.д.) требуется тщательный противовирусный контроль как на этапе подбора донора, так и на этапе культивирования клеток.

Хотя настоящее исследование не позволяет сделать основные выводы о распространенности инфицирования герпесвирусами человека среди доноров клеточного материала до культивирования и при достижении достаточного для клинического применения количества клеток ММСК, можно заключить следующее:

1) тщательный алгоритм подбора доноров снижает риск получения инфицированной культуры ММСК: риск увеличивается, если донором костного мозга являются пациенты,отягощенные тяжелыми хроническими заболеваниями.

2) EBV и HHV-6 обладают тропизмом к ММСК и способны размножаться в процессе культивирования;

3) проведение ПЦР-исследования на вирусы герпеса человека мононуклеарной фракции костного мозга и гомогенизата плаценты до культивирования ММСК, а также полученных клеточных культур позволяет своевременно выявить инфицирование биологического материала;

4) оценка качества клеточного материала для дальнейшего клинического применения должна включать в себя обязательное ПЦР-исследование на герпесвирусы человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sundin M., Orvell C., Rasmusson I. et al. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37 (11): 1051–9.
2. Rollin R., Alvarez-Lafuente R., Marco F. et al. Human parvovirus B19, varicella zoster virus, and human herpesvirus-6 in mesenchymal stem cells of patients with osteoarthritis: analysis with quantitative real-time polymerase chain reaction. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15 (4): 475–8.
3. Birkenbach M., Tong X., Bradbury L.E. et al. Characterization of an Epstein-Barr virus receptor on human epithelial cells. *J. Exp. Med.* 1992; 176 (5): 1405–14.

4. Gibellini D., Alviano F., Miseroocchi A. et al. HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Retrovirology* 2011; 8: 40.

5. Sinzger C., Digel M., Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 63–83.

6. Maidji E., Genbacev O., Chang H.T. et al. Developmental regulation of human cytomegalovirus receptors in cytotrophoblasts correlates with distinct replication sites in the placenta. *J. Virol.* 2007; 81 (9): 4701–12.

7. Pessina A., Bonomi A., Coccè V. et al. Assessment of human herpesvirus-6 infection in mesenchymal stromal cells ex vivo expanded for clinical use. *Transpl. Infect. Dis.* 2009; 11(6): 491–6.

Поступила 28.06.2012