

РАЗДЕЛ VIII СОВРЕМЕННЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

¹Антоневич Н. Г., ¹Гончаров А. Е., ²Квачева З. Б., ³Чекан В. Л.

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

¹ *Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь;*

² *Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск;*

³ *Белорусская государственная медицинская академия последипломного
образования, г. Минск*

В связи с активной разработкой методов терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) все большее значение приобретает отбор критериев оценки безопасности биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). Важным этапом контроля качества клеточного материала, является изучение вирусологической безопасности, необходимое для предотвращения инфицирования реципиента при проведении трансплантации. На данный момент известны случаи развития вирусных инфекций у реципиентов гемопоэтических и МСК [1, 2]. Первоисточники вирусных инфекций не всегда возможно установить. Осложнения могут быть связаны как с привнесением с трансплантируемым материалом патогеном, так и с активацией собственных латентных вирусов в стрессовых для организма условиях. Не следует также исключать возможность заражения реципиента *de novo* на фоне снижения иммунитета после проведения трансплантации.

Относительно новым и перспективным с терапевтической точки зрения материалом для применения в клеточной терапии являются МСК обонятельной выстилки (ОВ) человека [3]. В настоящее время активно изучаются функциональные свойства МСК ОВ, доклинические испытания свидетельствуют об эффективности их использования при терапии ряда заболеваний. Тем не менее, сведения о возможности контаминации данного типа МСК вирусами отсутствуют. Недостаточная изученность риска инфицирования реципиента при трансплантации МСК ОВ требует проведения диагностики тканевого источника и получаемых культур на наличие вирусоспецифических маркеров.

Особенностью слизистой средних носовых ходов как источника МСК по сравнению с другими тканями (костный мозг, плацента, пуповинная кровь, жировая ткань) является значительная гетерогенность клеточного состава. Ткань ОВ содержит обонятельные рецепторные нейроны, глиальные, различные типы эпителиальных клеток, эндотелий кровеносных сосудов и клетки крови, фибробласты, стволовые клетки эпителиального и мезенхимального происхождения и др. [3]. Разнообразие клеточных типов и расположение на границе с внешней средой способствует тому, что клетки ткани ОВ могут инфицироваться широким

спектром вирусов из различных систематических групп. Верхние отделы воздухоносных путей являются входными воротами для многих патогенов, но перво-степенный интерес для анализа представляют ДНК-содержащие вирусы сем. *Adenoviridae*, сем. *Herpesviridae*, сем. *Papillomaviridae*, которые могут вызывать латентные и персистентные формы инфекции на клеточном уровне.

Современные методы лабораторной диагностики позволяют определять наличие вирусоспецифических генетических маркеров и гарантировать безопасность биопрепаратов на основе МСК. Тем не менее, отбор критериев оценки и разработка алгоритма тестирования безопасности в отношении ряда вирусных патогенов остается актуальной задачей, особенно при разработке новых протоколов клеточной терапии на основе малоизученных типов МСК.

В связи с этим, цель настоящей работы – изучение уровня контаминации ОВ и культур МСК ОВ генетическим материалом возбудителей сем. *Adenoviridae*, сем. *Herpesviridae*, сем. *Papillomaviridae* для оценки вирусологической безопасности БМКП.

Образцы ткани ОВ были получены из биопсийного материала области среднего носового хода, отправляемого на гистологическое исследование при проведении плановых хирургических вмешательств (БелМАПО) у пациентов с патологиями носа и околоносовых пазух. В исследование было включено 34 пациента разного возраста (17-67 лет) и пола, у которых на момент оперативных вмешательств отсутствовали острые респираторные инфекции и обострения хронических заболеваний верхних дыхательных путей. Получение первичных культур МСК ОВ и накопление их биомассы проводили по ранее описанной методике [4]. Исследовали 30 образцов МСК ОВ 3–5-го пассажей.

ДНК выделяли из образцов культур клеток с использованием набора РИБО-ПРЕП (ООО «ИнтерЛабСервис», РФ), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Использовали коммерческие тест-системы для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time») для выявления генетического материала вирусов папилломы человека 6, 11 генотипов (ВПЧ 6/11), вирусов простого герпеса 1, 2 типов (ВПГ 1, 2) (ООО «ИнтерЛабСервис», РФ), вируса Варицелла-зостер (ВВЗ), вируса Эпштейн-Бара (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) («ДНК-Технология», РФ); тест-систему для ПЦР-амплификации ДНК с последующей детекцией методом гель-электрофореза для выявления генетического материала аденовирусов (АдВ) (ООО «ИнтерЛабСервис», РФ).

В ходе работы была исследована контаминация образцов ткани ОВ и полученных из них культур МСК генетическим материалом вирусов сем. *Herpesviridae* (ВПГ 1 и 2 типов, ВЗВ, ВГЧ-6, ЦМВ, ВЭБ) и сем. *Adenoviridae* (без определения отдельных серотипов), сем. *Papillomaviridae* (ВПЧ 6/11) как наиболее актуальных причин инфекционных осложнений у реципиента после трансплантации. В культурах МСК ОВ содержание ДНК вирусных патогенов оценивали на этапе накопления биомассы, достаточной для клинического применения (3×10^6 – 10×10^6 клеток), что соответствовало 3–5 пассажу. При визуальной оценке архитектоники монослоя всех культур МСК ОВ не было выявлено морфологических признаков инфицирования клеток цитопатическими агентами.

В результате ПЦР-анализа установлено, что образцы ткани ОВ, из которых получали культуры МСК, были контаминированы ДНК следующих возбудителей: ВГЧ-6, ВЭБ, ЦМВ. Причем, в некоторых биоптатах выявлено совместное присутствие геномов ВГЧ-6 и ВЭБ, 1 образец ткани был положителен на наличие ДНК трех вирусов: ВГЧ-6, ЦМВ и ВЭБ. При ПЦР-исследовании культур МСК ОВ, ни в одном из 30-ти образцов не выявлено вирусоспецифической ДНК детектируемых патогенов. Числовые значения, отражающие результаты вирусологического исследования представлены на круговой гистограмме (рис.).

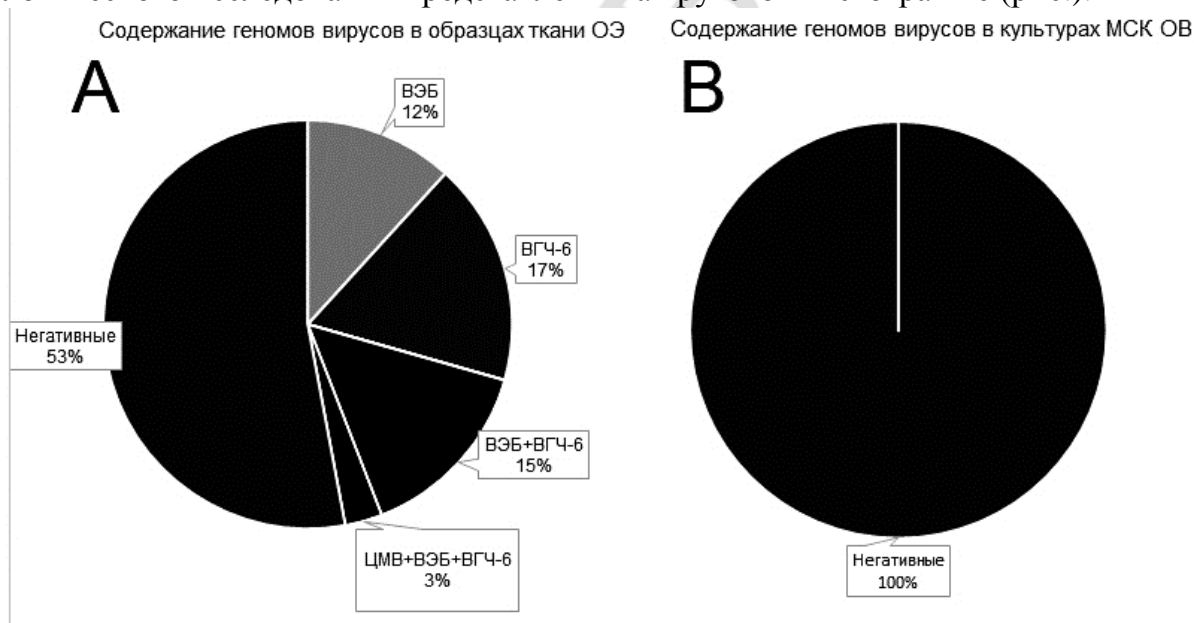


Рис. Уровень контаминации образцов ткани обонятельной выстилки (А) и полученных из них культур МСК (Б) генетическим материалом вирусов

Полученные результаты свидетельствуют о высокой вероятности контаминации ткани ОВ средних носовых ходов генетическим материалом 2 возбудителей: ВГЧ 6 (33%) и ВЭБ (27%).

При развитии инфекций, вызванных ВГЧ-6, ВЭБ, а также выявленного в одном случае ЦМВ, или при их латентном носительстве в организме человека, ДНК-маркеры с высокой частотой выявляются в биологических жидкостях (крови, слюне). Подавляющее большинство пациентов, у которых проводили забор ткани ОВ для данного исследования, страдали хроническим полипоидным риносинуситом. Слизистая носовых ходов содержала отечную ткань с густоразветвленной сетью сосудов и инфильтрованными в ткань клетками крови. При заборе исходного биоматериала в большинстве случаев не было возможности получить ткань ОВ без фрагментов кровеносных сосудов, это может объяснить высокую частоту выявления в образцах вирусов, тропных к лимфоцитам: ВГЧ-6, ВЭБ и ЦМВ. Тем не менее, из образцов, контаминированных вирусной ДНК, были получены культуры МСК ОВ, отрицательные на маркеры ВГЧ-6, ВЭБ, ЦМВ.

В то же время, имеются опубликованные подтверждения того, что присутствие ВЭБ и ВГЧ-6 в первоисточнике является фактором риска инфицирования клеток при последующем росте в культуре. Показано, что указанные патогены способны размножаться в процессе культивирования в клетках МСК, получен-

ных из контаминированных образцов костного мозга и плаценты [5]. Также, при моделировании вирусной инфекции *in vitro* показана чувствительность МСК плаценты к герпесвирусам [6]. Не вызывает сомнения, что культуры МСК ОВ должны обязательно исследоваться на маркеры герпесвирусов.

Среди исследованных образцов ткани ОВ и культур МСК не было выявлено случаев инфицирования клеток ВПГ 1 и 2 типов, ВВЗ, АдВ и ВПЧ 6/11. Очевидно, вклад указанных патогенов в риск инфицирования культур МСК ОВ относительно низкий.

Выводы. У пациентов с патологиями носа и околоносовых пазух в образцах слизистой средних носовых ходов выявляются генетические маркеры ВГЧ-6, ВЭБ, ЦМВ. Риск контаминации биоптатов ВПГ 1 и 2 типов, ВВЗ, АдВ и ВПЧ 6/11 незначительный.

Фактором риска контаминации культур МСК ОВ вирусными патогенами является наличие у донора слизистой хронических заболеваний носовой полости. Тем не менее, наличие вирусной ДНК не является абсолютным противопоказанием к получению культур МСК из образцов, содержащих вирусные геномы. Оптимизированный ранее метод получения культур МСК ОВ позволяет получать вирусологически чистые культуры. В то же время для предтрансплантационной подготовки клеточного материала обязательно проведение контроля за наличием вирусспецифических маркеров представителей сем. *Herpesviridae*.

После проведенного анализа биомасса вирусологически безопасных культур МСК ОВ была криоконсервирована и депонирована в банке культур клеток РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. В дальнейшем полученные культуры могут быть использованы в исследовательских целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Infectious Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation* [Electronic resource] / S. Kedia [et al.] // *J. Stem. Cell Res. Ther.* 2013. S3. Mode of access: <http://www.omicsonline.org/infectious-complications-of-hematopoietic-stem-cell-transplantation-2157-7633.S3-002.pdf>. Date of access: 24.08.2016.

2. *Thanunchai, M. Mesenchymal Stromal Cells and Viral Infection* [Electronic resource] / M. Thanunchai, S. Hongeng, A. Thitithanyanont // *Stem Cells Int.* 2015. Vol. 2015. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4532961/>. Date of access: 24.08.2016.

3. *Mackay-Sim, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa* / A. Mackay-Sim // *Arch. Italien. Biol.* 2010. Vol. 148. P. 47-58.

4. *Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека: условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная и фенотипическая характеристика* / Н. Г. Антонец [и др.] // *Клеточные культуры: информ. бюлл. СПб: Изд-во Политехн. ун-та.* 2012. Вып. 28. С. 27-36

5. *Susceptibility of human placenta derived mesenchymal stromal/stem cells to human herpesviruses infection* [Electronic resource] / S. Avanzi Kedia [et al.] // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 5. Mode of access : <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0071412>. Date of access : 24.08.2016.

6. *Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения* / Т. А. Астрелина [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 7, № 4. С. 68-72.