

Чутливість гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-інфекції

Н. В. Іванська, Л. Л. Лукаш, А. Д. Швед, С. Л. Рибалко¹, О. М. Сухорада,
Е. М. Жеребцова, Т. О. Рубан, С. В. Подольська, О. П. Кухаренко,
Г. Ф. Грицак¹, О. В. Максименко¹

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
52143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

НДІ епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського МОЗ України
52038, Київ, узвіз Протасів Яр, 4

У роботі досліджено пермісивність та чутливість гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до інфікування ВІЛ-1. Показано, що інтактні клітини є високопермісивною системою для репродукції вірусу. У 23 зразках первинної популяції культивованих клітин рівень синтезу вірусних антигенів (p24) та титру інфекційного вірусу значно перевищував такі у стандартних клітинах Т4-лімфоми МТ-4. Проте у двох зразках ці показники виявилися значно нижчими. Отримані результати обговорюються з точки зору гіпотези про природну стійкість кров'яних клітин до ВІЛ-інфікування та можливості використання стовбурових клітин у дослідженнях ВІЛ-інфекції у медицині.

ступ. Світовий науковий та клінічний досвід боротьби із захворюванням на СНІД свідчить, що вакцинація, німіотерапія не рятує хворих від цього смертельного захворювання [1]. Лікувальніходи щодо хворих на СНІД загалом спрямовуваються на боротьбу з опортуністичними інфекціями. атомість вже кілька років існує думка про те, що трансплантація донорського кісткового мозку хворим на СНІД могла б сприяти реконституції їх уної системи за умови запобігання розповсюдження ВІЛ на донорські гемопоетичні клітини в організмі реципієнта. Як один із шляхів виконання даньної умови пропонували застосування потужних цитостатичних препаратів, що проводиться з тою передтрансплантаційного пригнічення власної імуногематопоетичної системи реципієнта, яка оловним резервуаром ВІЛ. Наступна трансплантація донорського кісткового мозку разом з антигровірусними засобами (АЗТ або інші) повинна в кому разі знизити кількість збудника в організмі зрого і в той же час забезпечити його донорською

системою імунного нагляду. І дійсно, при такому підході було досягнуто деякого прогресу при лікуванні ВІЛ-серопозитивного хворого з супутньою лімфомаю [2]. Однак тривалої ремісії не було досягнуто, оскільки донорські гемопоетичні клітини не мали захисту проти ВІЛ, залишки якого в організмі реципієнта призводили до рецидиву інфекції.

Сьогодні серед усіх можливих підходів до розробки стратегії контролю ВІЛ-інфекції найлогічнішим і перспективним вважається забезпечення стійкості клітини до вірусу шляхом створення внутрішньоклітинного імунітету [3]. Методологія створення останнього спирається на побудову молекулярних векторних конструкцій, здатних синтезувати в клітині антисенсові РНК (асРНК) та/або рибозими, спроможні блокувати експресію ВІЛ-специфічних РНК-мішеней [4, 5]. Моделльні експерименти *in vitro* в ряді провідних наукових центрів світу підтвердили можливість суттєвого пригнічення продуктивної ВІЛ-інфекції через антисенсові підходи [5—7].

В межах Національної програми профілактики СНІДу аналогічні дослідження проводяться також

Н. В. ІВАНСЬКА, Л. Л. ЛУКАШ, А. Д. ШВЕД,
С. Л. РИБАЛКО, О. М. СУХОРАДА, Е. М. ЖЕРЕБЦОВА,
Т. О. РУБАН, С. В. ПОДОЛЬСЬКА, О. П. КУХАРЕНКО,
Г. Ф. ГРИЦАК, О. В. МАКСИМЕНКО, 1997

спільними зусиллями Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та Київського НДІ епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського МОЗ України. З використанням вектора *dl52-91/neo* [8], створеного і люб'язно наданого нам проф. М. Музичкою (з Нью-Йоркського університету в Стоуні Брук), ми побудували молекулярну векторну конструкцію, здатну наводити внутріклітинний синтез антисенсових РНК, спрямованих проти ключових генів ВІЛ. У трансфікованих цією конструкцією гемопоетичних клітинах ембріональної печінки людини ми спостерігали пригнічення репродукції ВІЛ за тестами на антиген *p24*, титрами інфекційного вірусу і активності оберненої транскриптази [9].

Перевага ембріональних гемопоетичних клітин перед кісткомозковими полягає у тому, що вони на ранніх стадіях ембріогенезу ще не мають антигенів, які імунна система хазяїна розпізнає як чужі, що дозволяє їх застосування без суворого контролю на гістосумісність. Слід зауважити, однак, що в зарубіжній практиці за релігійними, етичними та іншими мотивами використання ембріональних клітин людини суворо регламентоване законодавчими актами. В нашій країні ембріональні гемопоетичні клітини вже протягом кількох років використовуються в клініці при різних патологічних станах відповідно до існуючих методичних рекомендацій [10].

В процесі опанування і удосконалення клітинно-вірусної моделі нами було здійснено серію експериментів з метою з'ясування чутливості клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-1. У представленому повідомленні наведено результати цих досліджень та деякі міркування, що виникли при їх аналізі та обговоренні.

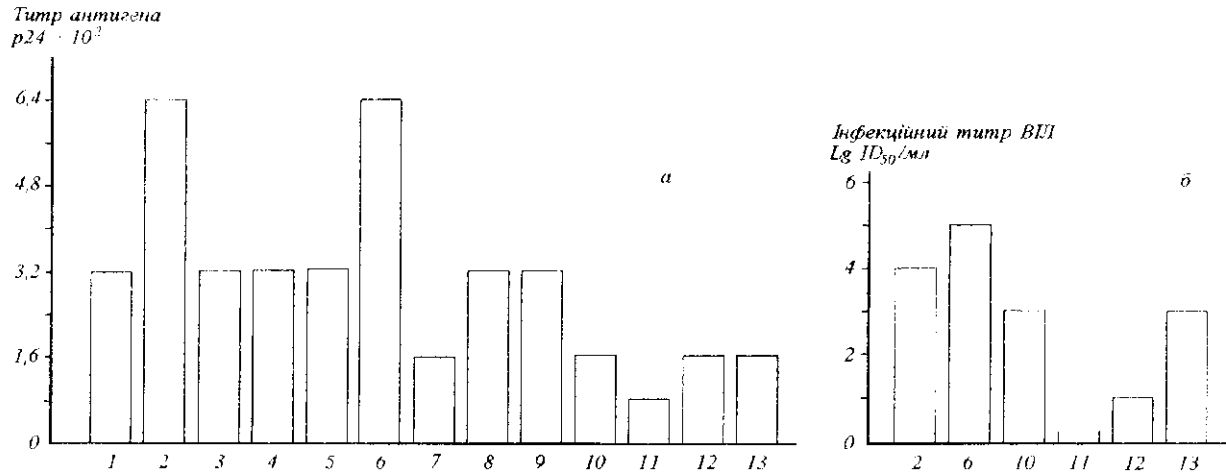
Матеріали та методи. Клітини ембріональної печінки людини одержували та культивували за методами, розробленими в Інституті кріобіології та кріомедицини НАН України (Харків) [10, 11], та методом, модифікованим у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України [12]. Інфекційним матеріалом слугувало вірусутримуюче культуральне середовище хронічно інфікованих ВІЛ-1 клітин МТ-4 ВІІ, інфекційні титри якого звичайно складали 4–5 lg ID₅₀/мл. Інфекційні титри ВІЛ-1 в усіх клітинних моделях визначали методом серійних розведень та у реакції нейтралізації. Як контрольну ВІЛ-1-пермісивну культуру використовували клітинну лінію МТ-4, не інфіковану ВІЛ. Реакцію нейтралізації ВІЛ-1 здійснювали, користуючись тест-системою нейтралізації виробництва фірми «Ebbott» (Англія) відповідно до інструкції.

Рівень біосинтезу ВІЛ-специфічного антигена *p24* в клітинних культурах оцінювали за допомогою імуноферментної тест-системи фірми «Ebbott» відповідно до прикладеної інструкції; при цьому використано мічені пероксидазою антитіла проти імуноглобулінів людини. Рівень репродукції ВІЛ-1 в усіх клітинних варіантах оцінювали також шляхом визначення оберненої транскриптази активності з використанням ³H-міченого тимідину.

Результати та обговорення. Проведені дослідження виявили високу чутливість гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-інфекції (малюнок, *а*). З 25 досліджених зразків клітин з різних ембріонів лише у двох (зразки 7 та 10) синтез антигена *p24* (малюнок, *а*) та титри інфекційного вірусу (малюнок, *б*) були порівнянними з цими показниками вірусної репродукції стандартній культурі клітин МТ-4, що використано в експериментах з виділення та титрування ВІЛ. Інфекційні показники, отримані на клітинах інших двох зразків (*11* та *12*), вказують на підвищену стійкість до репродукції ВІЛ. У культурах клітин з решти ембріональних зразків інфекційні показники були досить високими, перевищуючи інколи на 2 lg ID₅₀ титр ВІЛ у клітинах МТ-4 (малюнок, *б*, зразки 2 та 6). Отже з 2 досліджених ембріонів у наших дослідах абсолютної стійкості до ВІЛ культур ембріональних гемопоетичних клітин не виявлено, але в клітинах від двох ембріонів інфекційні показники ВІЛ-1 були суттєво нижчими.

Для характеристики ВІЛ-1, репродукованого первинній культурі клітин ембріональної печінки людини, використовували реакцію нейтралізації. За результатами цієї реакції, вірус, синтезований в випробовуваній культурі, остаточно нейтралізується антисироваткою до ВІЛ-1, і після нейтралізації не виявляється вірусспецифічний антиген *p24*. Звідси є очевидним, що нові покоління вірусу отримані в означених культурах, характеризуються нормальною антигенною структурою, а серезрілих ембріональних гемопоетичних клітин такі, що мають повноцінні ВІЛ-специфічні рецептори. Отже первинну культуру клітин ембріональної печінки можна застосовувати у дослідженні з інфікування ВІЛ-1, для яких є небажаним використання іморталізованих трансформованих ліфодних клітин типу МТ-4.

Відмічена нами слабка репродукція ВІЛ у клітинах з двох ембріонів потребує окремого обговорення. Найпростішим поясненням пригнічення продукції може бути припущення про деякі ушкодження клітин у процесі транспортування ембріонів їх препарування впродовж тривалішого часу п



Репродукція ВІЛ-1 в гемопоетичних клітинах ембріональної печінки людини: а — 1—12 — номери культур з різних ембріонів; 13 — контрольна культура клітин МТ-4; б — інфекційний титр культур клітин ембріональної печінки людини (вибірково)

живильним середовищем і т. ін. Однак всі препаративні роботи з клітинами виконувалися досвідченим персоналом в стандартизованих умовах, отже вади процедурного плану маловірогідні. Натомість резистентність до ВІЛ-інфекції відмічено і на рівні макроорганізму [13—15]: біля 5 % інфікованих людей стають носіями збудника без зменшення кількості T4⁺ лімфоцитів, тобто не хворіють на СНІД.

Було показано [16], що у безсимптомних носіїв ВІЛ вірусна реплікація відбувається, однак плазмсна віремія і реплікація у периферійних мононуклеарних клітинах і лімфатичних вузлах мали значно менші рівні (в 4—20 разів) у осіб з прогресуючим перебігом захворювання. У безсимптомних ВІЛ-інфікованих осіб було виявлено також високі титри нейтралізуючих антитіл разом з високими показниками ВІЛ-специфічної цитотоксичності, що вказувало на збереження у цього контингенту як гуморального, так і клітинного імунного захисту. Ще кілька років тому було відзначено [17], що після гемотрансфузії шести пацієнтам крові від донора — безсимптомного носія ВІЛ у жодного з них не виникло розгорнутої картини СНІДу, тобто і донор, і реципієнти були інфіковані атенуюваним варіантом ВІЛ. В іншій роботі було показано [18], що з 10 серопозитивних осіб у двох виявлено великі титри ВІЛ, ізолят якого за інфекційністю та здатністю до реплікації в чутливих

клітинах *in vitro* не відрізнявся від дикого типу ВІЛ. Ізоляти від двох інших пацієнтів виявили значно меншу здатність до реплікації *in vitro*, а у декількох осіб взагалі ВІЛ виділити не вдалося, що призвело авторів до думки про різні ступені атенуації збудника у різних носіїв.

Відмічалася парадоксальна ситуація, коли при наявності в організмі пацієнта інфекційного ВІЛ зберігалася спроможність його імунної системи протистояти збудникам опортуністичних інфекцій [19].

В світлі накопичених даних виникла гіпотеза [20] стосовно того, що у безсимптомних ВІЛ-носіїв існують деякі імунологічні фактори — антитіла та кілерні клітини, які ефективно нейтралізують вірус та звільняють організм від інфікованих клітин. Зараз почали з'являтися перші повідомлення про генетичні засади природної стійкості лімфоцитів проти ВІЛ-1 у популяціях людей. Визначено ген, мутантний алель якого знижує пермісивність клітин до інфекції ВІЛ-1 [21]. Цей ген кодує рецептор хемокіну CCR5, який є другим (після CD4) основним рецептором, що опосередковує зв'язування з мембраною та інтерналізацію часток ВІЛ-1 усередину моноцит/макрофагів. Мутантний алель CCR5 надає їм часткової резистентності до інфекції вірусом, якщо він знаходиться у гетерозиготному стані. Якщо ж лімфоцити мієлоїдної лінії є гомозиготними по CCR5, тобто обидва алеля є мутантними,

клітини повністю стійкі до інфікування ВІЛ-1 *in vivo* та *in vitro* [21].

Проблема довгострокового безсимптомного носійства ВІЛ далека від вирішення, тому випадки виявленої природної стійкості до ВІЛ-1 на будь-якій клітинній моделі варті всебічного дослідження з кількох причин. По-перше, клітини з підвищеною стійкістю до ВІЛ можуть бути джерелом матеріалу для молекулярно-генетичних пошуків клітинних факторів, здатних гальмувати репродукцію вірусу. Клінічний шлях виявлення безсимптомних людсьносіїв довгий і його успіх залежить від випадкового збігу обставин. Крім того, клітинний матеріал від таких осіб вже потенційно інфікований, тобто непридатний для вірусологічних дослідів в динаміці розвитку інфекційного процесу *in vitro*. По-друге, гемопоетичні клітини, які певною мірою є стійкими до інфікування та репродукції ВІЛ, являють собою цінний матеріал для генотерапії СНІДу, оскільки на їх основі з залученням засобів внутрішньоклітинної імунізації проти ВІЛ можна отримати абсолютно стійкий до вірусу трансплантат гемопоетичних клітин, які дають реципієнтові більше шансів на тривале виживання та покращання стану.

Отже з викладених міркувань очевидно є необхідність досліджень генетичних основ природної стійкості до ВІЛ саме на клітинних моделях, подібним означеній первинній культурі ембріональних клітин, оскільки виявлення стійких до ВІЛ, але вже ВІЛ-позитивних індивідів у практичному плані виглядає досить складною для таких дослідів. Більш корисним та досяжним було б виявлення осіб або гемопоетичного клітинного матеріалу з ознаками генетичної стійкості до цього збудника. Реалізацію такої ідеї можливо досягти двома шляхами — через скринінг абортівних ембріонів, що в обмеженому масштабі вже здійснювалося в нашій роботі, та тестуванням пуповинної, або кордової, крові. Останній шлях, на нашу думку, більш сприятливий, масовий і продуктивніший, тому що один зразок кордової крові містить стовбурових гемопоетичних клітин в кількості, достатній як для широкого експериментального дослідження, так і для реконституції гемопоезу у дорослої людини [22].

Оскільки ембріональні гемопоетичні клітини виявилися придатними до трансдукції ААВ та векторними конструкціями на його основі, можна передбачити можливість застосування цього вектора в різних галузях науки і біотехнології, а інтегративний характер внутрішньоклітинного існування ААВ надає додаткові привабливі можливості в цих напрямках. В галузі біотехнологічної промисловості стовбурові гемопоетичні клітини людини

можуть застосовуватися для виробництва препаратів біологічно активних речовин з використанням генноінженерних векторних конструкцій, що несуть в собі клоновані гени для їх синтезу. Отримані в такий спосіб гормони, ферменти або цитокіни матимуть переваги перед звичайними рекомбінантними білками, оскільки одержуватимуться на нетрансформованих клітинах людини.

Н. В. Иванская, Л. Л. Лукаш, А. Д. Швед, С. Л. Рыбалко, Е. М. Сухорада, Э. Н. Жеребцова, Т. А. Рубан, С. В. Подольская, А. П. Кухаренко, Т. Ф. Грицак, О. В. Максименко

Чувствительность гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека к ВИЧ-инфекции

Резюме

В работе изучали чувствительность гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека к ВИЧ-1. Показано, что интактные клетки являются высокопермиссивной системой для репродукции ретровируса. Почти во всех образцах эмбриональных клеток уровень синтеза антигена p24 и титры инфекционного вируса превышали таковые в стандартных лимфоидных культурах MT-4, однако в двух из 25 исследованных образцов эти показатели имели существенно меньшие значения. Полученные данные обсуждаются с точки зрения гипотезы о природной устойчивости к ВИЧ и явления бессимптомных ВИЧ-инфекций. Рассматривается также применение эмбриональных и кордовых клеток для изучения ВИЧ-инфекции в медицине и биотехнологии.

N. V. Ivanskaya, L. L. Lukash, A. D. Shved, S. L. Rybalko, O. M. Sukhorada, E. M. Zhrebtsova, T. O. Ruban, S. V. Podolskaya, O. P. Kukhareenko, T. F. Grytsak, O. V. Maksimenok

Permissivness of human embryo liver cells for HIV infection

Summary

We have studied permissivness of embryonic liver cells to HIV-1 infection. The data obtained on primary cultivated cell populations from 25 aborted embryos have shown those liver stem cells could be regarded as a highly permissive for HIV-1 infection and reproduction. The titers of infectious virus and its p24 antigen produced in native cells were substantially higher than that in standard culture of T4-lymphoma cells MT-4. We have not found HIV-resistant samples of embryonic liver cells, nevertheless two isolations of cell samples revealed by low permissivness contrary to the majority of cases. We suggest that these primary cells could be used as alternative to established ones, when the use of immortalized transformed cell lines (MT-4 or any other) is not desirable. The hypothesis of blood cell's native resistance to HIV infection is also discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Riddell S. R., Greenberg P. D., Owerell R. K. et al. Phase-I study of cellular adoptive immunotherapy using genetically modified CD8⁺ HIV-specific T-cells for HIV seropositive patients undergoing allogenic bone marrow transplantation // Human Gene Therapy.—1992.—3.—P. 319—338.
2. Appelbaum F. R., Sullivan K., Buckner C. D. et al. Treatment of malignant lymphoma in 100 patients with chemotherapy.

- total body irradiation and marrow transplantation // *J. Clin. Oncol.*—1987.—5.—P. 1340—1347.
3. *Baltimore D.* Intracellular immunization // *Nature.*—1988.—335.—P. 395—396.
 4. *Colman A.* Antisense strategies in cell and developmental biology // *J. Cell Sci.*—1990.—97.—P. 399—409.
 5. *Yu M., Poeschla E., Wong-Staal F.* Progress towards gene therapy for HIV infection // *Gene Ther.*—1994.—1.—P. 13—26.
 6. *Szczakiel G., Oelze I., Rittner K.* Microinjections: a technique to study inhibition of HIV-1 replication mediated by antisense RNA and parvovirus genes // *Biotechnology applications of microinjection, microscopic imaging, and fluorescence* / Eds P. H. Bach et al.—New York: Plenum press.—1993.—P. 1—10.
 7. *Yu M., Ojwang J., Yamada O. et al.* A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90.—P. 6340—6344.
 8. *Hermonat P. L., Muzyczka N.* Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells // *Ibid.*—1984.—81, N 20.—P. 6466—6470.
 9. *Кухаренко О., Лукаш Л., Іванська Н. та ін.* Конструювання еукаріотичного вектора на основі ААВ, який здійснює синтез у клітині антисенсових РНК проти ВІЛ // Перша нац. наук.-практ. конф. з проблем ВІЛ/СНІД: збірн. тез. (Київ, 24—26 січня 1995 р.)—Київ, 1995.—С. 61—62.
 10. *Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А. и др.* Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека // *Метод, рекомендации Министерства здравоохранения УССР.*—Київ: РЦНІІ, 1991.—9 с.
 11. *Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова А. И., Шерешков С. И.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).—Киев: Наук. думка, 1988.—190 с.
 12. *Сухорада Е. М., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. и др.* Способ получения и культивирования эмбриональных гепатоцитов человека // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 1.—С. 92—94.
 13. *Levy J. A.* HIV pathogenesis and long-term survival // *AIDS.*—1993.—7.—P. 1401—1410.
 14. *Easterbrook P. J.* Non-progression in HIV infection // *Ibid.*—1994.—8.—P. 1179—1182.
 15. *Buchbinder S. P., Katz M. H., Hessel N. A. et al.* Long-term HIV-1 infection without immunologic progression // *Ibid.*—P. 1123—1128.
 16. *Pantaleo G., Menzo S., Vaccarezza M. et al.* Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection // *N. Engl. J. Med.*—1995.—332, N 4.—P. 209—216.
 17. *Learmont J., Tindall B., Evans L. et al.* Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from single donor // *Lancet.*—1992.—340.—P. 863—867.
 18. *Cao Y., Qin L., Zhang L. et al.* Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection // *N. Engl. J. Med.*—1995.—332, N 4.—P. 201—208.
 19. *Baltimore D.* Lessons from people with nonprogressive HIV infection // *Ibid.*—P. 259—260.
 20. *Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection* // *Ibid.*—1995.—332, N 4.—P. 228—232.
 21. *Samson M., Libert F., Doranz B. J. et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR-5 chemokine receptor gene // *Nature.*—1996.—388.—P. 722—725.
 22. *Кухаренко А. П., Козут Г. И., Швед А. Д.* Научно-практическое использование гемопоэтических клеток cordовой крови // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 2.—С. 5—14.

УДК 578.242-578.828-616
Надійшла до редакції 26.09.96