

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.11|092.9

*Климова Р.Р.<sup>1</sup>, Момотюк Е.Д.<sup>1,2</sup>, Демидова Н.А.<sup>1,2</sup>, Ярыгина Е.И.<sup>2</sup>, Куц А.А.<sup>1</sup>***МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: УСИЛЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ЗАЩИТА МЫШЕЙ ОТ ЛЕТАЛЬНОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» Минсельхоза России, 109473, г. Москва

Цель настоящей работы состояла в оценке иммунорегуляторных и протективных свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на экспериментальной модели летальной ВПГ-1-инфекции (вирус простого герпеса 1-го типа) мышей.

МСК получали из костного мозга мышей линии DBA и высаживали в культуральные флаконы в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, инсулин, трансферрин, селенит, фактор роста фибробластов, глутамин и гентамицин. Прикрепившиеся клетки пассировали, на каждом пассаже отбирали культуральную жидкость (к/ж) и изучали противовирусную активность на клетках Vero, заражённых ВПГ-1. В опытах *in vivo* использовали 5 групп по 10 мышей DBA: 1-я группа – интактные (naïve); 2-я – внутривенное (в/в) введение МСК; 3-я – заражение 20 полумлетальными дозами (LD<sub>50</sub>) ВПГ-1 внутривенно с последующим в/в введением МСК; 4-я – заражение ВПГ-1 с последующим введением ацикловира (АЦВ); 5-я – заражение ВПГ-1 и в/в введение физиологического раствора.

Показано, что выделенные клетки по морфологии, адгезивной способности и поверхностным рецепторам соответствовали общепринятым характеристикам МСК. Установлено, что к/ж от МСК на 4–5-м пассажах подавляла ВПГ-1-инфекцию *in vitro* на 64–70%, и в то же время в к/ж были обнаружены ИЛ-6 и ФНО-α, концентрация которых на 3–4-м пассажах в 5 и 20 раз соответственно превышала контрольный уровень. При введении заражённым ВПГ-1 мышам 3-й группы МСК выживаемость составила 70%, ацикловира – 60%, что значительно превышало число выживших животных (10%) в контрольной 5-й группе. У выживших животных 3-й группы обнаружена высокая активность вируснейтрализующих антител к ВПГ-1, а также активация пролиферации Т-клеток. У выживших мышей 3-й группы уровни ИЛ-6 и ФНО-α оказались ниже, а ИФН-γ – значительно выше по сравнению с таковыми у агонизирующих животных этой группы (*p* < 0,05). Таким образом впервые показано, что клеточная терапия МСК является перспективным подходом к разработке новых эффективных методов лечения генерализованной ВПГ-1-инфекции.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК); летальная ВПГ-1-инфекция; клеточная терапия; активация иммунного ответа; защитный эффект МСК.

**Для цитирования:** Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Ярыгина Е.И., Куц А.А. Мезенхимальные стволовые клетки: усиление иммунного ответа и защита мышей от летальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6):261-267.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-261-267>*Klimova R.R.<sup>1</sup>, Momotyuk E.D.<sup>1,2</sup>, Demidova N.A.<sup>1,2</sup>, Yarigina E.I.<sup>2</sup>, Kushch A.A.<sup>1</sup>***MESENCHYMAL STEM CELLS ENHANCE IMMUNE RESPONSE AND PROTECT MICE AGAINST LETHAL HERPES VIRAL INFECTION**<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology « National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya », Moscow, 123098, Russian Federation;<sup>2</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after, The Ministry of Agriculture of the Russian Federation; Moscow, 109473, Russian Federation

The objective of this study was to evaluate immunoregulatory and protective potential of mesenchymal stem cells (MSC) in a mouse model of lethal HSV1 infection. MSC were isolated from bone marrow of DBA mice and cultured in flasks with DMEM containing 10% FBS, insulin, transferrin, selenite, fibroblast growth factor, glutamine and gentamicin. Antiviral activity was tested on HSV1-infected Vero cells. *In vivo* experiments were performed on DBA mice divided into 5 groups (10 animals each): group 1, intact (naïve) mice; group 2, intravenous (iv) MSC injection; group 3, intraperitoneal infection with 20 LD<sub>50</sub> HSV1 followed by MSC injection; group 4, HSV1 infection followed by acyclovir (ACV) injection; group 5, HSV1 infection and iv injection of saline. Isolated cells were consistent with MSC morphologically, by adhesive ability and surface receptors. Conditioned

**Для корреспонденции:** Климова Регина Рафаиловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [regi.k@mail.ru](mailto:regi.k@mail.ru)

media from MSC collected after 4-5 passages inhibited HSV1 infection in vitro by 64-70% and contained IL-6 and TNF- $\alpha$ , whose concentrations were 5- and 20-fold higher, respectively, than in the control. MSC and ACV injections protected 70% and 60% of DBA mice, respectively, compared with the control (group 5, 10% survival). High activity of virus neutralizing anti-HSV1 antibodies and activation of T cell proliferation were observed in survived mice from group 3. Serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in these mice were lower and that of INF- $\gamma$  much higher than in agonizing animals of this group ( $P < 0.05$ ).

These findings indicate that MSC therapy is a prospective approach to the development of new effective management of generalized HSV1 infection.

**Key words:** *mesenchymal stem cells; lethal HSV1 infection; cellular therapy; activation of immune response; protective effect of MSC.*

**For citation:** Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Yarygina E.I., Kushch A.A. Mesenchymal stem cells enhance immune response and protect mice against lethal herpes viral infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6):261-267. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-261-267>

**For correspondence:** Regina R. Klimova, PhD, lead researcher of the department of Ivanovsky Institute of Virology «N.F. Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology», 123098, Moscow. E-mail: [regi.k@mail.ru](mailto:regi.k@mail.ru)

#### Information about authors:

Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

Momotyuk E.D., <http://orcid.org/0000-0002-6217-5311>

Demidova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Yarygina E.I., <http://orcid.org/0000-0002-4165-5017>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

**Acknowledgment.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 17-04-00812).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 02 April 2018

Accepted 26 April 2018

## Введение

Вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) при первичном заражении у взрослых иммунокомпетентных лиц чаще всего вызывает бессимптомную инфекцию. Однако у лиц с ослабленным иммунитетом ВПГ-1 может вызывать заболевания нервной системы и внутренних органов, в том числе в генерализованной форме с тяжёлыми последствиями и смертельным исходом [1, 2]. Большую опасность представляет неонатальный герпес, а также тяжёлые рекуррентные формы ВПГ-1-инфекции [3, 4].

В настоящее время для лечения герпетической инфекции используется ряд патентованных лекарственных препаратов, однако многие из них имеют высокую гемо- и гепатотоксичность. Кроме того, увеличивается количество изолятов, резистентных к действию патентованных препаратов. В связи с этим во всём мире интенсивно идет поиск новых путей борьбы с ВПГ-1-инфекцией.

Новые перспективы открывает развитие клеточной терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК способны модулировать дифференцировку, пролиферацию и иммунорегуляцию, показано, что они способствуют восстановлению тканей и поддержанию иммунного гомеостаза [5]. Сообщается об успешном использовании МСК при регенерации повреждённых тканей, а также в опытах по противоопухолевой и противовоспалительной терапии [6, 7]. Однако работы, посвящённые изучению роли МСК при вирусных инфекциях, единичны, а результаты этих работ противоречивы [8, 9]. Действие МСК при инфекциях, вызванных герпесвирусами человека, пока не изучено.

Цель настоящей работы состояла в оценке иммунорегуляторных и протективных свойств МСК на экспериментальной модели летальной ВПГ-1-инфекции мышей.

## Материал и методы

**Заявление об этике.** Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с Межгосудар-

ственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными Евразийского совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ГОСТ 33216-2014).

**Животные.** В опытах использовали самок мышей линии DBA(H2<sup>d</sup>) массой 18–20 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область.

**Вирус.** Использовали ВПГ-1, референс-штамм F, полученный из Государственной коллекции вирусов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Вирус поддерживали путём пассирования на перевиваемой культуре клеток Vero, полученной из коллекции клеточных линий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

**Культуры клеток.** Культуральные среды, сыворотки и компоненты для культивирования клеточных культур, если не указано другое, приобретали в НПП «ПанЭко», Россия. Клетки Vero культивировали в среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Biogenie», Франция), 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина.

**Получение первичной культуры МСК.** Клетки красного костного мозга получали из бедренных и больших берцовых костей мышей. Полученную суспензию клеток гомогенизировали и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Осадок клеток осторожно ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС («Invitrogen», США), инсулин, трансферрин, селенит, 10 нг/мл фактора роста фибробластов, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки высаживали в культуральные флаконы («Costar», США) в концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл. Через сутки, а также каждые последующие 3–4 дня проводили замену культуральной среды. Полученную адгезивную популяцию клеток пересевали, используя 0,25% раствор Версена с химопсином. МСК культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Характеристика МСК.** Морфологию клеток и состояние клеточного монослоя оценивали микроскопически,

используя инвертированный люминесцентный микроскоп AX10 («Zeiss», Германия). Иммунофенотипический анализ МСК проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. Для анализа поверхностных CD-маркеров клетки в концентрации  $1 \times 10^5$  кл/мл вносили в 48-луночные планшеты («Costar», США) и по достижении монослоя в лунки вносили первичные антитела: anti-CD105, anti-CD90, anti-CD45 и anti-CD34 («Abcam», Великобритания) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C в темноте. После отмывки наносили вторичные антителовые антитела, меченные FITC («Abcam», Великобритания) и инкубировали 30 мин при 4°C. Проводили количественный анализ окрашенных клеток.

*Изучение противовирусной активности in vitro.* Клетки Vero высаживали в 96-луночные планшеты («Costar», США). По достижении монослоя клетки заражали ВПГ-1 с инфекционной множественностью (ИМ) 0,01 БОЕ/кл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>, затем дважды промывали и наносили кондиционированные культуральные жидкости, отобранные на 1, 3, 4, 5, 6 и 13-м пассажах МСК. Для сравнения использовали ростовую среду, содержащую 10% ЭТС (K2). В качестве положительного контроля использовали ацикловир (АЦВ, Зовиракс®, «ГлаксосмитКляйнВэлком», Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля – необработанные зараженные клетки Vero (K1). Оценку противовирусной активности проводили по ингибированию вирус-специфического бляшкообразования путём подсчёта количества инфицированных клеток (бляшек) в опыте и в контроле, как описано ранее [10].

*Группы животных.* Мыши линии DBA были разделены на 5 групп: 1-я группа ( $n = 5$ ) – интактные («naïve») мыши; 2-я группа, МСК ( $n = 5$ ) – мыши, которым вводили МСК в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мышь внутривенно, дважды, с интервалом 24 ч; 3-я группа, ВПГ-1 + МСК ( $n = 10$ ) – мыши, которых заражали ВПГ-1 (20 ЛД<sub>50</sub>, внутривенно) и через 4 и 24 ч после заражения внутривенно вводили МСК в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мышь. В качестве положительного контроля использовали 4-ю группу, ВПГ-1 + АЦВ ( $n = 10$ ) – мыши, которым после заражения ВПГ-1 вводили ацикловир (АЦВ) 2 раза в день, внутривенно, в течение 4-х дней. В качестве отрицательного контроля использовали 5-ю группу, ВПГ-1 + ФР ( $n = 10$ ) – мыши, которых заражали ВПГ-1 и через 4 и 24 ч вводили внутривенно физиологический раствор (ФР). Наблюдение за животными вели ежедневно в течение 14 дн. Выживаемость животных представляли в %. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе определяли по формуле:  $(\sum Nd)/Nt$ , где N – количество животных, проживших d дней, Nt – общее количество животных в группе.

Для анализа противовирусных и вируснейтрализующих антител (АТ), а также для количественного определения уровней провоспалительных цитокинов у инфицированных мышей 3-й и 4-й групп отбирали кровь из хвостовой вены через 7 дн после заражения ВПГ-1, в эти же сроки отбирали кровь у неинфицированных мышей 1-й и 2-й групп. У мышей контрольной 5-й группы кровь отбирали при появлении неврологических признаков ВПГ-1-инфекции.

*Активность антител к ВПГ-1* (анти-ВПГ-1 АТ) изучали в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). 96-луночные панели сорбировали антигеном ВПГ-1 (50 мкг/мл) и инкубировали в течение 18

ч при 37°C. После инкубации панели промывали и наносили сыворотки мышей в различных разведениях, инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем панели промывали и наносили антимышинные антитела, меченные пероксидазой хрена («Сорбент», Россия). Оптическую плотность оценивали с использованием анализатора Multiskan («Tekan», Швейцария) при длине волны 450 нм. Об активности АТ судили по максимальному разведению (титру) сывороток, при котором значения ОП в опытных группах в 2 раза превышали средние значения ОП для контрольных мышей 1-й группы.

*Реакцию биологической нейтрализации (РБН)* проводили на культуре клеток Vero. Сыворотки крови мышей в различных разведениях инкубировали с ВПГ-1, ИМ 0,01 БОЕ/кл в течение 2 ч при 37°C. Затем инкубационную смесь вносили на монослой клеток Vero. Результаты учитывали через 48 ч, когда в инфицированной культуре, не обработанной сыворотками, развивалось максимальное цитопатогенное действие (ЦПД). За активность вируснейтрализующих антител (ВНА) принимали обратные величины максимальных разведений сывороток, при которых наблюдали 50%-ное подавление вирус-специфического ЦПД.

*Реакция бласттрансформации (РБТ).* О стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов судили по изменению морфологии клеток в РБТ *in vitro* – образованию бластов. Спленоциты мышей каждой группы пулировали и помещали в 24-луночные планшеты по  $10^5$  кл/мл. Культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС («Invitrogen», США), 4,5 мг/мл глюкозы, 2 мМ глутамин, 0,2 ед/мл инсулина, 50 мкг/мл гентамицина. В лунки вносили 50 мкл инактивированного при 56°C ВПГ-1 и инкубировали 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин («ПанЭко», Россия) в концентрации 25 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля – необработанные клетки.

*Количественный анализ цитокинов.* ИЛ-6, ИНФ-γ и ФНО-α анализировали методом ИФА в к/ж от МСК на разных пассажах, а также в сыворотках крови мышей через 7 сут после заражения ВПГ-1. Использовали тест-системы Mouse IL-6 ELISA development kit (HRP), Mouse INF-γ ELISA development kit (HRP) и Mouse TNF-α ELISA development kit (HRP) («Mabtech», Швеция). Чувствительность определения составляла для ИЛ-6 – 20 пкг/мл, для ИНФ-γ – 4 пкг/мл и для ФНО-α – 6 пкг/мл. Уровни цитокинов установлены по сравнению со стандартной кривой в соответствии с инструкциями производителя.

*Статистическая обработка результатов.* Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 7.01. Для сравнения параметрических количественных данных использовали *t*-критерий Стьюдента, непараметрических – *U*-критерий Манна–Уитни. Межгрупповые различия относительных показателей анализировали с помощью критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат). Различия показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### *Морфо- и иммунофенотипическая характеристика выделенных МСК*

МСК, выделенные из костного мозга мышей, характеризовали по адгезивной способности и по морфологии. Метод световой микроскопии показал, что МСК

прикреплялись к поверхности культуральных флаконов и представляли собой полиморфные клетки преимущественно веретенновидной фибробластоподобной формы, с множественными, хорошо развитыми разветвленными цитоплазматическими отростками. Клетки активно пролиферировали *in vitro* и образовывали монослой.

На 4-м пассаже анализировали поверхностные рецепторы выделенных клеток. Определяли количество клеток, содержащих «положительные» маркеры МСК – CD105 и CD90, а также «отрицательные» маркеры – CD34 и CD45. Установлено, что 97,3% выделенных клеток экспрессируют CD105, 96,8% – CD90. CD45 обнаружен только в 0,3% клеток, поверхностный маркер CD34 не обнаружен ни в одной клетке. Таким образом, выделенные и размноженные клетки соответствовали общепринятым характеристикам МСК [11].

#### **Противовирусная активность МСК *in vitro***

Опыты по заражению ВПГ-1 клеток Vero показали (рис. 1, а), что количество ВПГ-1-специфических бляшек при обработке ростовой средой, содержащей 10% ЭТС (K2), составило  $20,75 \pm 1,8$  и статистически значимо не отличалось от такового в контрольных культурах K1 ( $26,75 \pm 1,75$ ;  $p > 0,05$ ). АЦВ практически полностью подавлял инфекционную активность ВПГ-1 в условиях наших опытов, количество инфицированных клеток (бляшек) составило  $0,75 \pm 0,47$ ;  $p < 0,05$ . При добавлении к/ж от МСК на 4-м и 5-м пассажах обнаружено  $7,5 \pm 0,6$  и  $6,25 \pm 0,9$  бляшек соответственно, что указывает на значительное подавление ВПГ-1-инфекции, различия по сравнению с ростовой средой высокосигнальные ( $p = 0,001$  и  $0,0002$  соответственно). Ингибирование ВПГ-1-инфекции после добавления к/ж от 1, 3, 6 и 13-го пассажей МСК не наблюдалось (рис. 1, б).

#### **Индукция цитокинов в динамике культивирования МСК *in vitro***

В к/ж от МСК изучены уровни 3 провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ . Установлено, что МСК на 1-м, 3-м и 4-м пассажах продуцируют статистически значимо более высокие уровни ИЛ-6 по сравнению с уровнем цитокина в контроле ( $383,3$  пкг/мл против  $120,8$  пкг/мл и  $460$  пкг/мл против  $120,8$  пкг/мл на 1-м и 3-м пассажах соответственно,  $p < 0,05$ ), максимальное количество выявлено на 4-м пассаже ( $680$  пкг/мл) (рис. 1, в). ФНО- $\alpha$  выявлен на 3-м и 4-м пассажах в концентрациях  $37,5$  пкг/мл и  $25$  пкг/мл соответственно, что оказалось статистически значимо выше по сравнению с уровнем цитокина в ростовой среде ( $1,25$  пкг/мл;  $p < 0,05$ ) (рис. 1, з).

#### **Подавление генерализованной ВПГ-1-инфекции под действием МСК *in vivo***

Для оценки влияния МСК на течение ВПГ-1-инфекции у мышей клетки 4-го пассажа вводили животным 3-й группы после заражения ВПГ-1, как указано выше. Установлено, что в контрольной 5-й группе без введения МСК (ВПГ-1 + ФР) гибель животных отмечалась с 3-х суток после заражения, далее у мышей появлялись тяжёлые неврологические симптомы, и к 7-м суткам 90% животных погибли (см. рис. 1, б). СПЖ в контрольной группе равнялась  $6,0 \pm 3,2$  дня. У животных 3-й группы (ВПГ-1 + МСК), которым МСК вводили дважды после заражения ВПГ-1, на 2-е сутки у 3-х животных появились первые симптомы ВПГ-1-инфекции (взъерошенная шерсть и неровная походка), далее они усиливались, и к 8-м суткам после инфицирования эти животные погибли. У выживших 7 из 10 (70%) мышей этой группы

клинические признаки герпетической инфекции отсутствовали во время всего срока наблюдения, СПЖ составила  $11,3 \pm 1,3$  дня. В 4-й группе (ВПГ-1 + АЦВ) выживаемость составила 60%, различие с 3-й группой статистически незначимо ( $p > 0,05$ ). Статистический анализ показал, что у животных 3-й и 4-й группы показатели СПЖ и выживаемости были статистически значимо выше по сравнению с таковыми в контрольной 5-й группе. Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК, введённые после заражения, способны защищать мышей от гибели при летальной ВПГ-1-инфекции.

**Гуморальный ответ** мышей 1-й и 2-й групп анализировали через 7 дн после последней инъекции МСК, мышей 3–5-й групп – через 7 дн после заражения ВПГ-1. Анализ вирус-специфических АТ класса IgG1 в сыворотках крови показал, что через 7 дн после заражения наибольшую активность АТ наблюдали у мышей 3-й группы (ВПГ-1 + МСК). Титр анти-ВПГ-1 у этих животных в среднем был статистически значимо выше ( $1:11200$ ) как по сравнению с таковым у контрольных зараженных животных 5-й группы ( $1:4267$ ), так и животных 4-й группы ( $1:6533$ ), которых лечили АЦВ;  $p < 0,05$  (рис. 2, а). Изучение вируснейтрализующей активности анти-ВПГ-1 АТ показало (рис. 2, б), что титры АТ, подавляющих ЦПД вируса на 50%, были максимальными также в сыворотках мышей 3-й группы, которым вводили МСК после заражения, по сравнению с таковыми у животных других групп ( $1:625$  против  $1:50$ ;  $p < 0,05$ ).

**Клеточный ответ** у неинфицированных мышей 1-й и 2-й групп анализировали через 7 дн после последней инъекции МСК, у мышей 3–5-й групп – через 7 дн после заражения ВПГ-1 в реакции бласттрансформации спленоцитов *in vitro*, результаты представляли как индекс стимуляции пролиферации (ИСП). Максимальное количество бластов, индуцированных ВПГ1 *in vitro*, выявлено у животных 3-й группы (ВПГ-1 + МСК):  $264 \pm 60$  (ИСП =  $28,3$ ; рис. 2, в, з). В остальных группах количество бластов было статистически значимо меньше ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что у неинфицированных животных 2-й группы, которым МСК вводили дважды с интервалом 24 ч, количество бластов статистически значимо превышало количество бластов в селезёнках мышей контрольной 5-й группы ( $62 \pm 15$  против  $19,5 \pm 7,6$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

**Анализ уровней провоспалительных цитокинов** в сыворотках мышей исследуемых групп показал (см. таблицу), что у больных и агонизирующих мышей контрольной 5-й группы (ВПГ-1 + ФР) и 3-й группы (ВПГ-1 + МСК) наблюдали максимальные значения ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ . В остальных группах у выживших животных уровни данных цитокинов были статистически значимо ниже или цитокины не определялись ( $p < 0,05$ ). Напротив, уровень ИФН- $\gamma$  был статистически значимо выше у выживших мышей в 3-й группе (ВПГ-1 + МСК), получавших инъекции МСК после заражения ВПГ-1. Важно отметить, что уровни всех изученных цитокинов у выживших мышей 3-й группы (ВПГ-1 + МСК) статистически значимо отличались от таковых у умирающих (агонизирующих) мышей, заражённых ВПГ-1 в этой же группе: уровни ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  были ниже, а ИФН- $\gamma$  – выше ( $p < 0,05$ ). У неинфицированных животных 2-й группы, которым вводили МСК дважды с интервалом 24 ч, наблюдали статистически значимое увеличение уровня ИФН- $\gamma$  по сравнению с ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ .

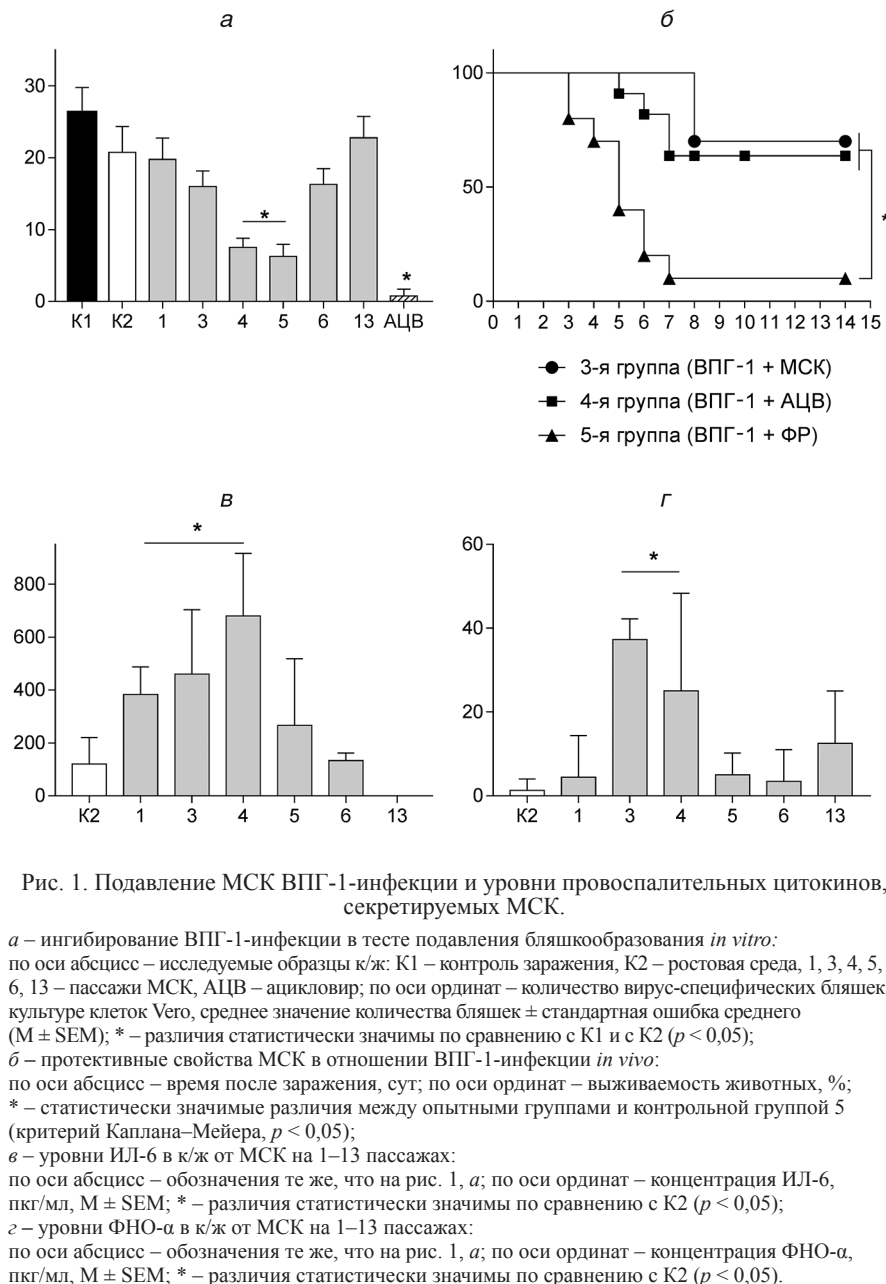


Рис. 1. Подавление МСК ВПП-1-инфекции и уровни провоспалительных цитокинов, секретируемых МСК.

*а* – ингибирование ВПП-1-инфекции в тесте подавления бляшкообразования *in vitro*: по оси абсцисс – исследуемые образцы к/ж: K1 – контроль заражения, K2 – ростовая среда, 1, 3, 4, 5, 6, 13 – пассажи МСК, АЦВ – ацикловир; по оси ординат – количество вирус-специфических бляшек в культуре клеток Vero, среднее значение количества бляшек ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ); \* – различия статистически значимы по сравнению с K1 и с K2 ( $p < 0,05$ );  
*б* – протективные свойства МСК в отношении ВПП-1-инфекции *in vivo*: по оси абсцисс – время после заражения, сут; по оси ординат – выживаемость животных, %; \* – статистически значимые различия между опытными группами и контрольной группой 5 (критерий Каплана–Мейера,  $p < 0,05$ );  
*в* – уровни ИЛ-6 в к/ж от МСК на 1–13 пассажах: по оси абсцисс – обозначения те же, что на рис. 1, *а*; по оси ординат – концентрация ИЛ-6, пкг/мл,  $M \pm SEM$ ; \* – различия статистически значимы по сравнению с K2 ( $p < 0,05$ );  
*г* – уровни ФНО-α в к/ж от МСК на 1–13 пассажах: по оси абсцисс – обозначения те же, что на рис. 1, *а*; по оси ординат – концентрация ФНО-α, пкг/мл,  $M \pm SEM$ ; \* – различия статистически значимы по сравнению с K2 ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Заражение ВПП-1 индуцирует реакции врождённого иммунитета, и в то же время вирус воздействует на молекулярные и клеточные пути, подавляющие иммунные реакции [12]. Исход вирусной инфекции определяется балансом между этими процессами, и его нарушение может приводить либо к латенции и персистенции, либо к генерализованной инфекции с летальным исходом. В условиях наших опытов внутрибрюшинное заражение мышей вызывало серьёзные неврологические симптомы и гибель 90% животных. Высокий уровень летальности (около 75%) наблюдается и при острых заболеваниях ВПП-этиологии у людей [13]. Стратегии лечения, направленные на подавление функций вирусных генов, имеют ряд известных ограничений [14]. В связи с этим в данной работе использован новый подход, основанный на клеточной терапии с применением МСК. Представляло интерес

выяснить, способны ли МСК повлиять на развитие ВПП-1-инфекции. Результат априори был неясен, так как во многих работах показано ингибирующее влияние МСК на пролиферацию и функции иммунных клеток [15]. Опыты показали, что на 4-м и 5-м пассажах *in vitro* МСК продуцируют биологически активные соединения, подавляющие инфекционную активность ВПП-1 *in vitro* на 64–70%. Отметим, что при дальнейшем культивировании МСК ингибирующий эффект не был обнаружен, что указывает на транзитный характер спонтанной экспрессии ингибиторов ВПП-1-инфекции. Для оценки противовирусного действия цитокинов, продуцируемых МСК, изучена динамика экспрессии цитокинов, участвующих в защите от вирусных инфекций – ИЛ-6, ФНО-α и ИФН-γ. Оказалось, что в к/ж от МСК ИФН-γ не был обнаружен, в то же время концентрации ИЛ-6 и ФНО-α на 3-м и 4-м пассажах значительно превышали контрольный уровень «чистой» ростовой среды. При продолжении культивирования МСК (на 6–13-м пассажах) продукция цитокинов либо не определялась, либо снижалась до контрольного уровня. Спонтанная продукция МСК цитокинов и хемокинов обнаружена также другими авторами [16], однако выяснение причины снижения продукции на более поздних пассажах МСК требует дальнейших исследований. Совпадение максимальных концентраций ИЛ-6 и ФНО-α в к/ж от МСК с максимальным эффектом подавления ВПП-1 этой же к/ж указывает на участие продуцируемых МСК цитокинов в противовирусном действии.

Наибольший интерес представлял вопрос о действии МСК на ВПП-1-инфекцию *in vivo*. Животных заражали в условиях, которые вызывали генерализованную инфекцию с неврологическими симптомами и гибель 90% животных. Введение МСК дважды после заражения привело к выживанию 70% мышей, что соответствовало действию АЦВ, введенного 7-кратно (выживание 60% мышей). Введение МСК после заражения ВПП-1 более чем в 3 раза усиливало антительный ответ, при этом активность антител, нейтрализующих ВПП-1-активность (ВНА), возрастала в 12,5 раза. Кроме того, ВНА определялись уже через 7 дней, раньше, чем это обычно происходит при заражении ВПП-1 [17].

Следует отметить, что МСК значительно усиливали клеточный ответ, пролиферация Т-клеток возрастала почти в 7 раз по сравнению с контрольными необработанными животными и в 3 раза по сравнению с мышами, заражёнными ВПП-1. Наибольший эффект МСК оказывали при введении после заражения ВПП-1: пролиферация Т-клеток увеличивалась ещё в 4 раза по сравнению с животными, которым вводили только МСК.

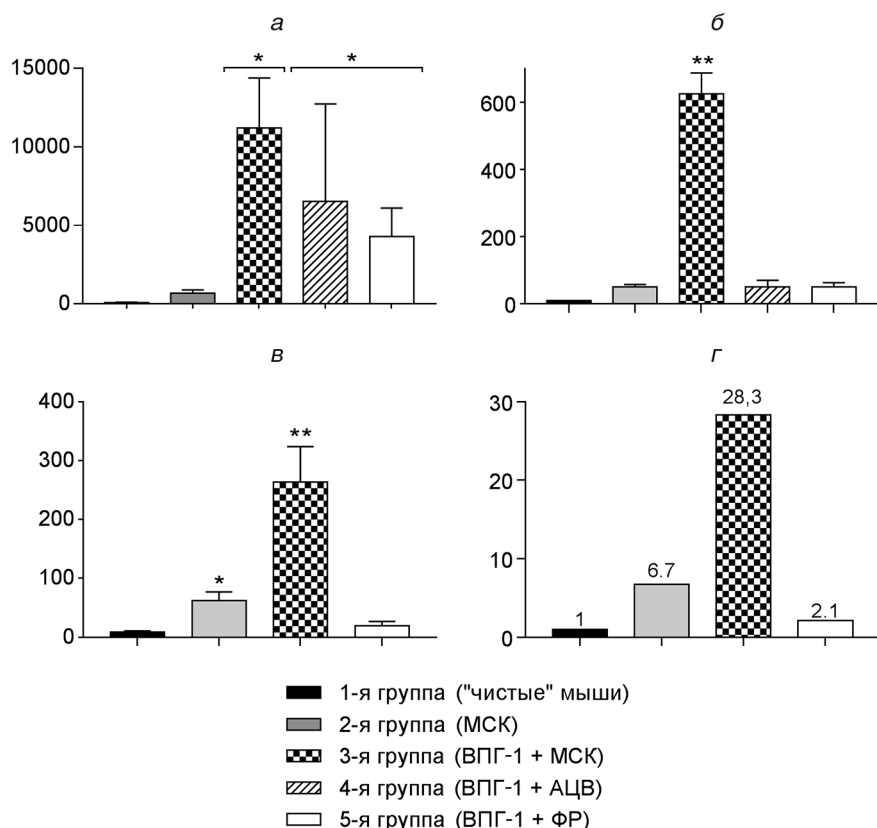


Рис. 2. Иммуномоделирующее действие МСК при генерализованной ВПГ-1-инфекции у мышей.

а, б – усиление активности противовирусных антител в сыворотках крови:

а – по оси абсцисс: группы мышей; по оси ординат: обратные разведения анти-ВПГ-1 IgG1 антител в ИФА, среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD); \* – статистически значимые различия (p < 0,05);

б – по оси абсцисс: группы мышей (как на рис. 2, а); по оси ординат: обратные разведения вируснейтрализующих антител, M ± SD; \*\* – статистически значимые различия по сравнению со всеми группами (p < 0,05);

в, г – стимуляция пролиферации Т-клеток:

в – по оси абсцисс: группы мышей; по оси ординат: количество бластов, индуцированных в реакции бласттрансформации *in vitro*, M ± SD; \* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной 5-й группой (p < 0,05); \*\* – статистически значимые различия по сравнению со всеми группами (p < 0,05);

г – по оси абсцисс: группы мышей (как на рис. 2, в); по оси ординат – индекс стимуляции пролиферации (ИСП).

Интересные данные получены при анализе цитокинов в сыворотках мышей. У зараженных ВПГ-1 агонизирующих мышей перед гибелью обнаружены все 3 изученных цитокина: ИЛ-6, ИФН-γ и ФНО-α, но в небольших

количествах. Приблизительно такие же количества данных цитокинов были определены у 3-х агонизирующих мышей, которым после заражения вводили МСК (3-я группа). У 7 выживших мышей этой же группы была в 15 раз повышена концентрация ИФН-γ и статистически значимо снижены концентрации ИЛ-6 и ФНО-α. Повышенная концентрация ИФН-γ зафиксирована также у мышей, которым вводили только МСК (2-я группа).

Таким образом, защитные свойства МСК коррелировали с высокой концентрацией ИФН-γ, тогда как повышенные концентрации ИЛ-6 и ФНО-α в крови ассоциировались с гибелью животных.

Данные настоящей работы не подтверждают выводы многих авторов, полученные на других моделях, о том, что МСК подавляют пролиферацию и функции как Т-клеток [18], так и В-клеток [19]. Разнонаправленные иммуномодулирующие эффекты МСК можно объяснить их пластичностью, которая позволяет индуцировать различные сигнальные пути в зависимости от локальных условий и факторов микроокружения в организме. Супрессорные функции МСК проявляются при подавлении опухолевого роста и аутоиммунных процессов, при восстановлении поврежденных тканей, при пересадках органов. При низких уровнях иммунного ответа, наблюдавшихся нами при заражении мышей ВПГ-1, введение МСК индуцировало пролиферацию иммунных клеток и активацию защитной системы с участием системы интерферона. Разнонаправленное действие МСК может объясняться поляризацией МСК на МСК-1 и МСК-2 с разными молекулярными и клеточными механизмами действия: при высоких уровнях ИФН-γ и ФНО-α – противовоспалительными, при низких уровнях этих цитокинов – провоспалительными [20].

В последнее время появились работы о действии

**Влияние МСК на уровни провоспалительных цитокинов в сыворотках мышей, зараженных ВПГ-1**

Группы животных	Концентрация цитокинов, медиана [мин; макс], пкг/мл		
	ИЛ-6	ИФН-γ	ФНО-α
1 «Чистые» мыши (n = 5)	н/о	н/о	н/о
2 МСК (n = 5)	0 [0;880]	250 [133;467]	20 [0;133]
3 ВПГ-1 + МСК, выжившие мыши (n = 7) агонизирующие мыши (n = 3)	0 [0;43] P = 0,03 50 [0;670]	<b>1387</b> [578;42188] P = 0,045 97 [25;4968]	5 [0;159] P = 0,02 <b>247</b> [0;9245]
4 ВПГ-1 + АЦВ, выжившие мыши (n = 6)	0 [0;279]	90 [0;570]	0 [0;89]
5 Контроль, ВПГ-1 + ФР, агонизирующие мыши (n = 9)	<b>85</b> [0;309]	45 [0;834]	73 [32;240]

Примечание. Полужирным шрифтом выделены значения, статистически значимо превышающие другие значения в каждом столбце (U-test; P < 0,05); н/о – не определено; < 20 пкг/мл для ИЛ-6, < 4 пкг/мл для ИФН-γ, < 6 пкг/мл для ФНО-α.

МСК на вирусные инфекции. При заражении мышей вирусом японского энцефалита наблюдали уменьшение воспалительных процессов в мозге и снижение гибели нейронов [21]. Положительное действие МСК показано у мышей, заражённых вирусами гриппа птиц H9N2 и H5N1 [9, 22]. Однако другие авторы, введившие МСК мышам, заражённым вирусами гриппа H1N1, не обнаружили уменьшения воспаления и повреждения в лёгких, а также улучшения выживаемости [8]. Обнадёживающие данные получены при трансфузии

МСК из пуповины трудноизлечимым больным ВИЧ-инфекцией, у которых в результате антиретровирусной терапии был полностью подавлен вирус, но не улучшились иммунные показатели. После клеточной терапии у этих пациентов увеличивалось количество CD4+ Т-клеток, восстанавливалась продукция ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 и уменьшалась системная иммунная активация и воспалительные процессы [23].

### Выводы

1. МСК, выделенные из костного мозга мышей, на 4–5-м пассажах культивирования *in vitro* продуцируют провоспалительные цитокины ИЛ-6, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  и подавляют развитие ВПГ-1-инфекции в клеточной культуре.

2. Внутривенная инъекция МСК после заражения мышей летальной дозой ВПГ-1 статистически значимо снижает клинические проявления генерализованной ВПГ-1-инфекции и защищает от гибели 70% мышей, что по крайней мере не меньше, чем ацикловир (60% выживших животных).

3. Протективный эффект МСК ассоциируется с индукцией В-клеточного ответа – выработкой вируснейтрализующих антител, и с активацией клеточного ответа – усилением пролиферации Т-клеток и повышением концентрации ИФН- $\gamma$  в сыворотках крови заражённых животных.

4. Впервые показано, что при генерализованной ВПГ-1-инфекции клеточная терапия МСК оказывает иммуностимулирующее действие и защищает мышей от летальных доз ВПГ-1.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований, грант № 17-04-00812.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-9, 11-23 см. REFERENCES)

10. Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Чернорыж Я.Ю., Коваль В.С., Иванов А.А. и др. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 162-8.

### REFERENCES

1. Arduino P.G., Porter S.R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinic-pathological features. *J. Oral. Pathol. Med.* 2008; 37(2): 107-21.
2. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765.
3. James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection.

4. Ruffner M.A., Sullivan K.E., Henrickson S.E. Recurrent and Sustained Viral Infections in Primary Immunodeficiencies. *Front. Immunol.* 2017; 8: 665.
5. Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014; 21(2): 216-25.
6. Rohban R., Pieber T.R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 5173732.
7. Rivera-Cruz C.M., Shearer J.J., Figueiredo Neto M., Figueiredo M.L. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: e4015039.
8. Darwish I., Banner D., Mubareka S., Kim H., Besla R., Kelvin D.J., et al. Mesenchymal stromal (stem) cell therapy fails to improve outcomes in experimental severe influenza. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71761.
9. Li Y., Xu J., Shi W., Chen C., Shao Y., Zhu L., et al. Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7(1): 159.
10. Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Chernoryzh Ya.Yu., Koval' V.S., Ivanov A.A., et al. Dimeric bisbenzimidazoles suppress the herpes simplex virus and human cytomegalovirus infections in the cells in vitro. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(4): 162-8. (in Russian)
11. Dominici M., LeBlanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
12. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology*. 2005; 2: 59.
13. Riediger C., Sauer P., Matevossian E., Müller M.W., Büchler P., Friess H. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure. *Clin. Transpl.* 2009; 23(Suppl. 21): 37-41.
14. Rozenberg F., Deback C., Agut H. Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2011; 11(3): 235-50.
15. Cagliani J., Grande D., Molmenti E.P., Miller E.J., Rilo H.L.R. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *J. Stem Cell Regen. Biol.* 2017; 3(2).
16. Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., Mourdjeva M., Oreshkova T., Belemezova K., et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014; 6(5): 552-70.
17. Whitley R. J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology. Volume 2*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001: 2461-509.
18. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99(10): 3838-43.
19. Rosado M.M., Bernardo M.E., Scarsella M., Conforti A., Giorda E., Biagini S., et al. Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* 2015; 24(1): 93-103.
20. Rivera-Cruz C.M., Shearer J.J., Neto M.F., Figueiredo M.L. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 4015039.
21. Bian P., Ye C., Zheng X., Yang J., Ye W., Wang Y., et al. Mesenchymal stem cells alleviate Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and mortality. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 38.
22. Chan M.C., Kuok D.I., Leung C.Y., Hui K.P., Valkenburg S.A., Lau E.H., et al. Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016; 113(13): 3621-6.
23. Zhang Z., Fu J., Xu X., Wang S., Xu R., Zhao M., et al. Safety and immunological responses to human mesenchymal stem cell therapy in difficult-to-treat HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2013; 27(8): 1283-93.

Поступила 02.04.18

Принята к печати 26.04.18