

Л. М. Лазаренко, З. М. Олевінська, Д. С. Шай,
Н. М. Жолобак, Л. Д. Кривохатська, В. О. Шевчук,
член-кореспондент НАН України М. Я. Співак

Вплив клітин кордової крові на перебіг експериментального герпетичного менингоенцефаліту

Досліджено вплив клітин кордової крові на перебіг експериментального герпетичного менингоенцефаліту. Встановлено, що ксеногенна трансплантація клітин кордової крові мишам з герпетичним менингоенцефалітом, індукованим вірусом простого герпесу I типу, сприяє збільшенню тривалості їх життя. Наведено дані, що свідчать про імунорегуляторну дію клітин кордової крові при експериментальному герпетичному менингоенцефаліті, пов'язану з їх впливом на продукцію імунорегуляторних цитокінів — інтерферонів та фактора некрозу пухлин- α .

Незважаючи на досягнення у вивченні патогенезу герпетичних інфекцій та успіхи в розробці нових науково обгрунтованих підходів до оптимізації медичних технологій лікування хворих на ці захворювання, частота останніх залишається високою і не має чіткої тенденції до зниження. Насамперед це пов'язано з тим, що їх перебіг супроводжується формуванням вторинних імунодефіцитних станів внаслідок супресивної дії герпесвірусів на функціональну активність імунокомпетентних клітин та продукцію цілої низки цитокінів, які залучаються в регуляцію природженого та адаптивного імунітету. На тлі вірусіндукованої імуносупресії створюються передумови як для реактивації геному герпесвірусів, які можуть викликати численні органи ураження, так і виникнення суперінфекцій бактеріальної, вірусної або грибкової природи [1]. Тому актуальним є пошук альтернативних способів лікування хворих цього контингенту із залученням ефективної імунотерапії, направленої, зокрема, на регуляцію продукції імунорегуляторних цитокінів.

Увагу привертають мезенхімні стовбурові клітини кордової крові (КК), для яких раніше встановлено високу терапевтичну ефективність у комплексному лікуванні хворих з вторинними імунодефіцитними станами, що формуються внаслідок розвитку інфекційних та онкологічних захворювань [2, 3]. Нами показано [4], що клітини КК людини спонтанно та у відповідь на адекватну індукцію продукували інтерферон- α (ІФН- α), а також цитокіни Th1-типу — ІФН- γ , інтерлейкін-2, фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α), а плазма КК, в якій виявлялись ці цитокіни, мала імуномодуляторний вплив на клітини фагоцитарної системи *in vitro*. Після ксеногенної трансплантації клітин КК інтактним мишам спостерігалась активація ендogenous інтерфероногенезу та підвищення функціональної активності клітин фагоцитарної системи [5]. У зв'язку з вищенаведеним нами було поставлено за мету визначити ефективність застосування клітин КК при герпетичній інфекції на моделі експериментального менингоенцефаліту у мишей шляхом дослідження їх впливу на перебіг патологічного процесу та продукцію імунорегуляторних цитокінів.

Експериментальні дослідження проведено на білих нелінійних мишах масою 10–12 г, отриманих з розплідника віварію Інституту молекулярної біології НАН України. Сформовано було три групи мишей: I — інфіковані вірусом простого герпесу (ВПГ) I типу (50

тварин); II — інфіковані ВПГ-I, які отримували клітини КК (50 тварин); III (контроль) — інтактні, яким вводили фізіологічний розчин (40 тварин). Усі дослідження виконані з урахуванням норм Європейської конвенції по захисту хребетних тварин та закону України № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [6].

Для створення експериментальної моделі герпетичного менінгоенцефаліту був використаний ліофілізований ВПГ-I антигенного типу (ВПГ-I, штам VC, отриманий з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН). Інфекційний титр вірусу становив $5,0-5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1$ мл, а тканинна ТЦД — $4,0-4,5 \text{ЛД}_{50}/0,03$ мл. Вірусну суспензію вводили епідурально в об’ємі 0,03 мл. На 5–6-ту добу після інфікування відмічали прояв специфічних клінічних симптомів захворювання. Інфекційну активність ВПГ-I оцінювали за летальністю тварин. Наявність вірусу в тканинах мозку підтверджували його титруванням за допомогою методу за Кербером [7]. У роботі використовували КК людини. Фракцію ядровмісних клітин КК виділяли шляхом прискороного “спонтанного” осадження еритроцитів у плазмозамінному розчині “Телофузин” як описано раніше [8]. Концентрацію клітин КК доводили до $1 \cdot 10^7$ кл./мл. Клітини КК вводили мишам у хвостову вену через 24 год після інфікування ВПГ-I. Визначали вміст ІФН та ФНП α у плазмі крові, а також спонтанну та індуквану продукцію ІФН- γ та ІФН- α клітинами периферичної крові на 1-шу, 3-тю, 6-ту та 12-ту добу після введення клітин КК. ІФН титрували у перевивній культурі клітин лінії L-929. Активність ІФН оцінювали за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу (вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана). У дослідженнях використовували референс-препарати ІФН- γ та ІФН- α . За титр ІФН в одиницях дії (Од) приймали те розведення зразка, при якому спостерігався захист 50,0% клітин від цитопатичної дії 100 ТЦД $_{50}/0,1$ мл тест-вірусу. Концентрацію ФНП α досліджували загальноприйнятим методом за цитотоксичною дією на перевивну культуру фібробластів мишей L-929. Кількість ФНП α у зразках визначали за індексом цитотоксичності (ІЦ, %) [9].

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп’ютерної програми Ері Інфо (версія 6.0) методом варіаційної статистики. Числові дані виражали у вигляді середнього арифметичного значення та стандартної похибки ($M \pm m$). Нульову гіпотезу для контрольної та дослідних груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричних критеріїв Вілкоксона–Манна–Уїтні (U) та Колмогорова–Смірнова. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

У результаті проведених досліджень встановлено, що трансплантація клітин КК мишам з герпетичним менінгоенцефалітом сприяла збільшенню тривалості їх життя. Як свідчать отримані дані (рис. 1), на 1-шу та 3-тю добу загибель інфікованих мишей, яким не вводили клітини КК, мала місце відповідно у $(36,0 \pm 3,0)$ та $(38,0 \pm 5,0)\%$ випадків, на 5-ту, 7-му та 10-ту добу — відповідно у $(64,0 \pm 4,0)$; $(62,0 \pm 5,0)$; $(64,0 \pm 3,0)\%$, а на 12-ту добу — у $(68,0 \pm 6,0)\%$. Після трансплантації інфікованим мишам клітин КК на 1-шу та 3-тю добу загибель тварин зафіксовано відповідно у $(28,0 \pm 3,0)$ та $(30,0 \pm 4,0)\%$ випадків ($P < 0,05$). Однак на 5-ту та 7-ту добу кількість загиблих тварин виявилась майже удвічі меншою, ніж серед мишей з герпетичним менінгоенцефалітом, які не отримували клітини КК, — відповідно $(34,0 \pm 4,0)$ та $(34,0 \pm 3,0)\%$. На 10-ту добу виявлено $(50,0 \pm 7,0)\%$ випадків загибелі мишей, але на 12-ту добу кількість загиблих тварин була такою ж, як і серед інфікованих мишей, яким клітини КК не вводили, — $(68,0 \pm 5,0)\%$. Результати титрування ВПГ-I у зразках суспензії мозку показали, що на 7-му добу після введення інфікованим тваринам клітин КК титри вірусу зменшувались до $10^{-1} \log \text{ТЦД}_{50}$ проти $10^{-2} \log \text{ТЦД}_{50}$ в інфікованих тварин, яким не трансплантували клітини КК.

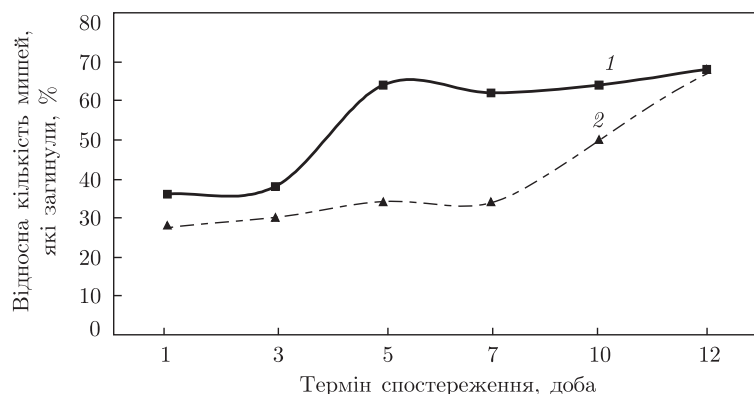


Рис. 1. Кількість мишей з експериментальним герпетичним менінгоенцефалітом, які загинули: 1 — інфіковані ВПГ-I; 2 — інфіковані ВПГ-I, яким вводили клітини КК

Збільшення тривалості життя мишей з герпетичним менінгоенцефалітом, яким трансплантували клітини КК, супроводжувалось активацією ендogenous інтерферогенезу. При герпетичному менінгоенцефаліті у мишей, які вижили, але не отримували клітини КК, спостерігалось незначне підвищення вмісту ІФН у сироватці крові протягом усього терміну спостереження (до 12 діб), однак різниця порівняно з показниками контролю не була вірогідною (табл. 1). Разом з тим після ксеногенної трансплантації клітин КК мишам з герпетичним менінгоенцефалітом вміст сироваткового ІФН на 1-шу та 3-тю добу зростав істотно, однак зменшувався до рівня контролю на 6-ту та 12-ту добу. У випадку, коли клітини КК вводили інфікованим мишам двократно з інтервалом в одну добу, титри ІФН у сироватці крові зростали максимально на 6-ту добу — $(6,70 \pm 0,80) \log_2$ Од/мл; $P < 0,05$. З отриманих даних (див. табл. 1) випливає, що клітини периферичної крові мишей з герпетичним менінгоенцефалітом, які не отримували клітини КК, продукували ІФН спонтанно та у відповідь на індукцію ридостином або ФГА на рівні контролю. Спонтанна продукція ІФН клітинами периферичної крові не змінювалась також у інфікованих ВПГ-I мишей, яким трансплантували клітини КК. У цих мишей на 3-тю та 6-ту добу спостерігалось незначне підвищення здатності клітин периферичної крові до продукції ІФН- α та ІФН - γ у відповідь на адекватну індукцію, але різниця порівняно з контролем виявилась невірогідною.

Таблиця 1. Показники інтерференового статусу у мишей з герпетичним менінгоенцефалітом, яким вводили клітини кордової крові

Група мишей	Термін спостереження, доба	Титр інтерферону, \log_2 Од/мл			
		Сироватковий	Спонтанний	ІФН- γ	ІФН- α
Контроль		$4,00 \pm 0,09$	$4,10 \pm 0,06$	$2,70 \pm 0,03$	$3,60 \pm 0,07$
Інфіковані ВПГ-I	1	$5,00 \pm 0,10$	$4,50 \pm 0,04$	$3,50 \pm 0,07$	$2,50 \pm 0,14$
	3	$5,50 \pm 0,09$	$4,00 \pm 0,10$	$3,50 \pm 0,11$	$3,50 \pm 0,09$
	6	$5,50 \pm 0,18$	$3,50 \pm 0,09$	$3,51 \pm 0,09$	$4,30 \pm 0,06$
	12	$5,00 \pm 0,11$	$2,90 \pm 0,17$	$2,00 \pm 0,15$	$4,01 \pm 0,10$
Інфіковані ВПГ-I, яким вводили клітини КК	1	$6,50 \pm 0,04^*$	$4,00 \pm 0,10$	$2,30 \pm 0,13$	$3,00 \pm 0,05$
	3	$6,50 \pm 0,10^*$	$4,00 \pm 0,09$	$4,00 \pm 0,09$	$4,50 \pm 0,19$
	6	$5,50 \pm 0,06$	$3,5 \pm 0,10$	$4,40 \pm 0,10$	$4,52 \pm 0,10$
	12	$5,00 \pm 0,09$	$2,60 \pm 0,17$	$2,00 \pm 0,07$	$4,00 \pm 0,08$

* $P < 0,05$ відносно показників контролю.

Трансплантація клітин КК мишам з герпетичним менінгоенцефалітом спричиняла зміну продукції прозапального цитокіну — ФНП α . Так, перебіг патологічного процесу супроводжувався підвищенням вмісту ФНП α у сироватці крові протягом усього терміну спостереження. Встановлено, що на 1-шу, 3-тю, 6-ту та 12-ту добу ІЦ зростав відповідно до $(46,0 \pm 4,4)$; $(41,4 \pm 4,7)$; $(32,8 \pm 5,0)$ та $(35,9 \pm 4,1)\%$ проти $(9,1 \pm 2,5)\%$ у контролі ($P < 0,05$). Після введення клітин КК мишам з герпетичним менінгоенцефалітом на 1-шу та 3-тю добу ІЦ зменшувався відповідно до $(26,5 \pm 2,3)\%$ ($P < 0,05$) та $(25,0 \pm 3,4)\%$ ($P < 0,05$), але зберігався на вищому рівні, ніж у контролі, тоді як на 6-ту та 12-ту добу спостерігалось зниження цього показника до контрольного рівня — відповідно до $(14,8 \pm 3,4)\%$ ($P > 0,05$) та $(13,8 \pm 2,6)\%$ ($P > 0,05$).

Таким чином, після трансплантації клітин КК мишам з герпетичним менінгоенцефалітом тривалість їх життя збільшувалась на тлі активації ендogenousного інтерфероногенезу, про що свідчило зростання концентрації сироваткового ІФН та тенденція до підвищення продукції ІФН- α та ІФН- γ активованими клітинами периферичної крові *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію. Раніше нами було показано, що концентрація ІФН у сироватці крові підвищувалась також після трансплантації клітин КК інтактним мишам впродовж 1–6 діб (максимально на 6-ту добу) [4]. Дані літературних джерел дають можливість припустити, що підвищення продукції ІФН під впливом клітин КК пов'язане з тим, що вони здатні безпосередньо продукувати ці цитокіни *in vivo* та/або стимулювати їх продукцію клітинами реципієнта [10, 11]. Зауважимо, що підвищення титрів сироваткового ІФН у мишей з герпетичним менінгоенцефалітом після трансплантації клітин КК встановлено на 1-шу та 3-тю добу, тоді як їх захисна дія виявлялась впродовж наступних 5–7 діб. На 7-му добу в зразках суспензії клітин мозку цих мишей спостерігалось зменшення титру вірусу. Отже, не виключено, що під впливом ІФН, який може продукуватись як у відповідь на вірусну інфекцію, так і трансплантацію клітин КК, активуються фактори неспецифічної резистентності та специфічної імунної відповіді, що спричиняє посилення імунного захисту організму проти ВПГ. На 12-ту добу після трансплантації клітин КК мишам з менінгоенцефалітом, коли титри сироваткового ІФН зменшувались, кількість загиблих тварин була такою ж, як серед інфікованих мишей, яким клітини КК не вводили. Це можна пояснити тим, що клітини КК після ксеногенної трансплантації можуть поступово елімінуватись із організму реципієнта, наприклад внаслідок дії специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, як показано раніше [12]. Разом з тим у мишей з герпетичним менінгоенцефалітом після трансплантації клітин КК у сироватці крові зменшувалась концентрація такого важливого прозапального цитокіну, як ФНП α . На моделі герпетичного менінгоенцефаліту у мишей було показано [13, 14], що ФНП α може відігравати водночас як захисну, так і патогенетичну роль. Зауважимо, що продукція цього цитокіну зменшувалась також після успішного лікування мишей з герпетичним менінгоенцефалітом препаратом адикловір [15]. Оскільки відомо [13], що рівень прозапальних цитокінів прямо корелює зі ступенем тяжкості перебігу герпетичної інфекції, то можна припустити, що зменшення вмісту ФНП α у сироватці крові при герпетичному менінгоенцефаліті під впливом клітин КК буде сприяти покращенню перебігу патологічного процесу.

Отримані нами дані свідчать про те, що захисна дія клітин КК при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті пов'язана з їх імуномодуляторними властивостями. Це відкриває перспективи для подальшого дослідження ефективності клітин КК при інфекційних захворюваннях як вірусної, так і бактеріальної етіології, перебіг яких супроводжується формуванням вторинних імунодефіцитних станів.

1. Казмирчук В. Е., Мальцев Д. В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. – Киев: Фенікс, 2009. – 248 с.
2. Кухарчук А. Л., Радченко В. В., Сирман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. – Киев: КРС-Медицинские Технологии, 2004. – 505 с.
3. Гулевський О. К., Грищенко В. І., Нікольченко А. М. та ін. Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2005. – № 5. – С. 5–14.
4. Лазаренко Л. М., Рачкова Л. Т., Демченко О. М. та ін. Продукція цитокінів клітинами кордової крові та імуномодульовальні властивості плазми кордової крові // Доп. НАН України. – 2008. – № 11. – С. 182–186.
5. Lazarenko L. M., Demchenko O. M., Rachkova L. T. et al. Effect of cord blood cells on interferonogenesis and effector cells of immune system // Фізіол. журн. – 2008. – **54**, No 4. – С. 47–54.
6. Резніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісн. НАН України. – 2001. – № 1. – С. 5–7.
7. Вивчення антивірусної дії потенційно лікарських засобів (методичні рекомендації) / А. М. Щербинська, Н. С. Дяченко, С. В. Рибалко, Л. М. Носач, С. Г. Дядюн, Н. О. Врингад. – Київ: ВПК “Політехніка”, 2000. – 30 с.
8. Декл. пат. UA62221U. Спосіб виділення “стовбурових” та клітин-попередників гемопоєзу пуповинної крові людини / Ю. В. Гладких, Г. С. Любимцева, Т. О. Калиниченко. – Опубл. 15.04.2005, Бюл. винаходів № 4.
9. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (методические рекомендации) / Под. ред. А. Ф. Модзольского, Н. С. Дяченко, Н. Я. Спивака. – Киев, 1994. – 18 с.
10. Kang H. S., Habib M., Chan J. et al. A paradoxical role for IFN-gamma in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge // Exp. Hematol. – 2005. – **33**, No 7. – P. 796–803.
11. Krampere M., Cosmi L., Angeli R. et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2006. – **24**, No 2. – P. 386–398.
12. Wang Y., Chen X., Armstrong M. A. et al. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in xenotransplantation model // J. Orthop. Res. – 2007. – **25**, No 7. – P. 926–932.
13. Imanishi J. Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects // J. Biochem. – 2000. – **127**, No 4. – P. 525–530.
14. Lundberg P., Welander P. V., Edwards C. K. 3rd et al. Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2 // J. Virol. – 2007. – **81**, No 3. – P. 1451–1460.
15. Wei G., Zhang M., Mei Y. et al. Expression of cytokines IL-2, IL-10 and TNF-alpha in mice with herpes simplex viral encephalitis // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. – 2006. – **26**, No 3. – P. 308–310.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 21.05.2010

**L. N. Lazarenko, Z. M. Olevinska, D. S. Shay,
N. M. Zholobak, L. D. Krivochatska, V. O. Shevchyk,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. Ya. Spivak**

Influence of cord blood cells on the course of experimental herpetic meningoencephalitis

After xenogeneic transplantation of cord blood cells into mice with herpes simplex type 1 viral meningoencephalitis, an increase in the duration of their lifetimes was observed. These data indicate that cord blood cells have immunoregulatory effects at experimental herpetic meningoencephalitis, due to their influence on the production of immunoregulatory cytokines – interferon’s and tumor necrosis factor- α .