ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.34-002-08:602.9]-092.9-036.8
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177-185

Поступила в редакцию 11.01.2021
Received 11.01.2021

А. Ю. Адамович[1], Д. Б. Нижегородова[1], В. К. Шадрина[1], О. Г. Дыбов[1], А. М. Старостин[1], Т. Э. Владимирская[1], А. В. Воробей[1], М. М. Зафранская[2]

[1]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь
[2]Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

Аннотация. Дисрегуляция врожденного и адаптивного иммунитета является центральным механизмом патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Учитывая иммуномодулирующие свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), перспективным направлением представляется разработка новых патогенетических подходов к лечению ВЗК с использованием клеточной терапии.

Изучено влияние ММСК при их внутриартериальном и внутривенном введении на цитокин-продуцирующую функцию моноцитов/макрофагов *in vitro* и на пролиферативную активность спленоцитов лабораторных животных с экспериментальным ВЗК в условиях неспецифической и специфической (использование маннана – компонента клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) стимуляции.

Показано, что культуры ММСК оказывают иммуномодулирующее действие на фоне улучшения клинических, морфометрических показателей и патоморфологической картины повреждения при экспериментальном ВЗК. Внутриартериальное и внутривенное введение клеточных культур в разной степени снижало маннан-индуцированную продукцию ФНО-α CD68+-клетками и митоген/маннан-стимулированную пролиферацию спленоцитов, что подтверждает иммуносупрессивное действие культур ММСК на аутореактивные клоны спленоцитов при экспериментальном ВЗК. Полученные результаты свидетельствуют о противовоспалительном эффекте клеточной терапии при экспериментальном моделировании ВЗК и являются обоснованием для комбинированного введения культур ММСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, воспалительные заболевания кишечника, экспериментальная модель, иммуномодуляция

Для цитирования: Иммуномодулирующий эффект клеточной терапии на экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника / А. Ю. Адамович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 177–185. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177–185

Hanna Y. Adamovich[1], Darya B. Nizheharodava[1], Viktoriya K. Shadryna[1], Aleh G. Dybau[1], Andrei M. Starastsin[1], Tat'yana E. Vladimirskaya[1], Aliaksandr U. Varabei[1], Marina M. Zafranskaya[2]

[1]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus
[2]International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF CELL THERAPY ON THE EXPERIMENTAL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE MODEL

Abstract. Dysregulation of innate and adaptive immunity is a central mechanism in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD) that include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Given the immunomodulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), developing new pathogenetic approaches to the IBD treatment using cell therapy seems to be promising.

In this article, the effect of intra-arterial and intravenous MMSCs on *in vitro* monocytes/macrophages cytokine-producing function and splenocytes proliferative activity in laboratory animals with experimental IBD under the conditions of non-specific and specific stimulation (mannan – cell wall component of *Saccharomyces cerevisiae* yeast) was studied.

MMSC cultures have been shown to possess an immunomodulatory effect against the background of improved clinical, morphometric parameters, and the pathomorphological picture of experimental IBD damage. Intra-arterial and intravenous administration of cell cultures decreased the mannan-induced TNF-α production by CD68+ cells and mitogen/mannan-stimulated splenocyte proliferation that confirms the immunosuppressive effect of MMSC cultures on autoreactive splenocyte clones in experimental IBD. The obtained results testify to the anti-inflammatory effect of cell therapy in the experimental modeling of IBD and justified a combined administration of MMSC cultures.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, inflammatory bowel diseases, experimental model, immunomodulation

For citation: Adamovich H. Yu., Nizheharodava D. B., Shadryna V. K., Dybau A. G., Starastsin A. M., Vladimirskaya T. E., Varabei A. U., Zafranskaya M. M. Immunomodulatory effect of cell therapy on the experimental inflammatory bowel disease model. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 177–185 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177-185

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относят болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), представляют собой гетерогенную группу хронических аутоиммунных болезней, при которых в результате дисрегуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа на компоненты нормальной микрофлоры на фоне генетической предрасположенности и воздействия факторов окружающей среды поражается желудочно-кишечный тракт [1].

Показано, что нарушения имеются практически во всех звеньях иммунной системы кишечника, начиная от барьерных функций эпителия и распознавания антигена, передачи сигнала дендритными клетками и сигнальными молекулами, презентации антигена и заканчивая функциями моноцитов-макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [2].

Врожденный иммунный ответ на кишечную микробиоту, опосредуемый двумя основными типами клеток – макрофагами и дендритными клетками, в настоящее время считается центральным звеном патогенеза ВЗК [3]. $CD68^+$-моноциты и макрофаги, рекрутируемые в *lamina propria* кишки в воспаленных тканях, снижают уровни экспрессии белков плотного соединения, что приводит к нарушению целостности и сокращению функции кишечного эпителиального клеточного барьера, вызывая прогрессирование заболевания [4]. Макрофаги и дендритные клетки слизистой оболочки при ВЗК повышенно экспрессируют TLR2 (toll-like receptor 2), TLR4, CD40 и хемокинового рецептора CCR7 (CC chemokine receptor 7), которые способствуют формированию воспаления, индуцируя выработку провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), интерлейкин-1b (ИЛ-1b), ИЛ-6 и ИЛ-18 [5].

Изучение Т-клеток слизистой оболочки, а именно $CD4^+$Th-лимфоцитов (T helper), позволило установить конкретные механизмы иммунорегуляторной и эффекторной функций, а также характер секреции цитокинов при каждом из видов ВЗК [6, 7]. Так, при БК $CD4^+$Th1- и $CD4^+$Th17-клетки способствуют формированию провоспалительных макрофагов и экспрессируют различные провоспалительные цитокины (ИЛ-6, ИЛ-17A/F, ИЛ-21, ИЛ-22, CXCL8 (C-X-C motif ligand 8), интерферон-γ (ИФН-γ) и ФНО-α), вызывая инфильтрацию кишечных эпителиальных клеток и, как следствие, острый или хронический энтерит, в то время как $CD4^+$Th2-клетки из *lamina propria* пациентов с ЯК характеризуются повышенной продукцией ИЛ-5, ИЛ-16, ИЛ-13 и ФНО-α [8].

Одним из наиболее активных цитокинов с провоспалительным действием является ФНО-α, который вырабатывается активированными макрофагами, моноцитами и Т-лимфоцитами. Увеличение уровня ФНО-α в слизистой оболочке кишечника и в образцах крови пациентов коррелирует с клинической активностью БК [8, 9]. ФНО-α вместе с ИФН-γ и ИЛ-1 опосредует реакцию замедленной гиперчувствительности и активацию макрофагов, что приводит к формированию гранулем при БК [2].

На сегодняшний день отсутствуют оптимальные протоколы лечения, направленные на селективное подавление специфических клонов лимфоцитов. Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии появилась возможность разрабатывать новые способы лечения ВЗК с использованием различных типов стволовых и прогениторных клеток.

Наиболее перспективным и современным направлением является клеточная терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Эти клетки могут мигрировать по принципу «хоуминга» в места повреждения, воспаления, секретируя большое количество растворимых трофических факторов, которые подавляют продукцию провоспалительных цитокинов и пролиферацию аутореактивных Т-клеток. Показано, что совместное культивирование ММСК с дендритными клетками приводит к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов (ИФН-γ, CD11c, CD80, CD86, ИЛ-6, ФНО-α) и к повышенной экспрессии противовоспалительных (CD11b, ИЛ-10, трансформирующий ростовой фактор-ß (ТРФ-β)) цитокинов. Таким образом, ММСК способны воздействовать на врожденный и адаптивный иммунный ответ, секре-

тируя иммуномодулирующие компоненты, которые контролируют развитие воспаления посредством воздействия на дендритные клетки, макрофаги, Т-, В- и НК-лимфоциты [4, 10].

Несмотря на широкое использование стволовых клеток в клинической практике, данных о механизмах эффективного влияния клеточной терапии и об обоснованности применения клеточных культур для лечения ВЗК в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* недостаточно. До конца не определен оптимальный источник получения ММСК, необходимая терапевтическая доза, а также способ и кратность введения.

Экспериментальная модель ВЗК воспроизводит основные механизмы развития колита, что позволяет оценить влияние клеточных культур и обоснованно подойти к патогенетической терапии БК и ЯК у человека.

Цель исследования – оценить иммуномодулирующий эффект клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника.

Материалы и методы исследования. *Экспериментальное моделирование ВЗК.* Экспериментальную модель ВЗК индуцировали на белых лабораторных крысах линии Wistar (n = 54) массой 320–380 г. С целью очистки толстой и тонкой кишки крысы голодали в течение 48 ч до начала эксперимента, а за сутки до введения повреждающего вещества ентерально вводили 7,4 % раствора «Фордрайв» из расчета 6 мл на 100 г массы лабораторного животного [11]. Затем крысы были частично наркотизированы путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия и разделены на две группы. Животным опытной группы (n = 39) ректально вводили 90 мг/кг динитробензолсульфоновой кислоты в 250 мкл 50 %-ного этанола, крысам группы сравнения (ГС, n = 15) – ректально 250 мкл 50 %-ного этанола. Валидность модели подтверждали клинически, морфологически, макро- и микроскопически [12].

Для клинической оценки токсического повреждения использовали следующие параметры: активное время животного и количество актов дефекации за отведенное время, масса тела, загрязнение вокруг анального отверстия и консистенция стула. Кроме того, оценивали динамику потери массы тела лабораторных животных, используя следующую формулу:

$$\text{Потеря массы тела} = \frac{m_{\text{исх}} - m_{n\ \text{сут}}}{m_{\text{исх}}} \cdot 100\ \%,$$

где $m_{\text{исх}}$ – масса тела лабораторного животного до начала испытания, г; $m_{n\ \text{сут}}$ – масса тела лабораторного животного на *n-е* сутки эксперимента, г.

После выведения из эксперимента оценивали массу селезенки лабораторного животного и отношение массы селезенки к массе тела (в %). У каждого животного удаляли дистальный сегмент толстой кишки размером 7 см, взвешивали и выражали в виде соотношения веса сегмента (г) к длине толстой кишки (см), оценивая таким образом соотношение массы толстой кишки к ее длине.

Получение и культивирование ММСК костного мозга (КМ). ММСК КМ выделяли из мононуклеарной фракции клеток КМ бедренных костей крыс (n = 8), полученной путем центрифугирования на градиенте плотности ROTI®Sep 1077 (Carl Roth, Германия). Суспензию мононуклеарных клеток после двукратного отмывания в фосфатном буферном растворе (ФБР) (Gibco, США) с добавлением 5 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco, Великобритания) культивировали в чашках Петри в среде DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % ЭТС, 1 % L-глутамина (Gibco, Великобритания) и 1 % антибиотика-антимикотика (Gibco, США), при 37 °С и атмосфере с 5 % CO_2. Полную смену питательной среды осуществляли через сутки после посева, далее – каждые 3-и–4-е сутки.

При достижении первичной культурой субконфлюэнтности (75–90 %) клетки переводили в первый пассаж с использованием 0,025 %-ного раствора трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, США). После отделения клеток от чашки фермент инактивировали путем добавления 5 %-ной ЭТС в ФБР, а затем двукратно отмывали (при 1500 об/мин в течение 10 мин). Далее клетки высевали в концентрации 10^5/чашку в полную питательную среду. Культивирование в первом и последующих пассажах проводили так же, как в первичной культуре.

Инфузия ММСК КМ лабораторным животным с экспериментальным ВЗК. Предварительно подготовленные ММСК КМ вводили на 4-е сутки экспериментального моделирования. Использовали следующие способы введения: внутривенно (в/в, в хвостовую вену) – $1 \cdot 10^6$ кл/кг в 0,3 мл физиологического раствора; внутриартериально (в/а, брюшной отдел аорты, на 1 см ниже отхождения печеночных артерий) – $0{,}3 \cdot 10^6$ кл/кг в 0,1 мл физиологического раствора.

Морфологический метод исследования тонкой и толстой кишки экспериментальных животных. Отобранный образец кишки фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине в течение 48 ч. Затем промывали в проточной воде и в течение 24 ч обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96 %, абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для изучения препаратов и изготовления микрофотографий использовали световой микроскоп Motic BA410E (Китай).

Метод проточной цитометрии. Предварительно выделенные на градиенте плотности спленоциты лабораторных крыс культивировали в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/лунку 96-луночного круглодонного планшета в среде DMEM, содержащей 1,0 мкг/мл конканавалина А (ConA) (Sigma, США) или 2 мкг/мл маннана (mannan) (Sigma, Германия) в течение 3 и 5 сут при 37 °С в атмосфере с 5 %-ным содержанием CO_2. Спонтанную и стимулированную продукцию ФНО-α $CD68^+$-клетками оценивали в 3-дневных культурах спленоцитов. Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции ФНО-α за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cayman Chemicals, США) и 10 мкг/мл брефелдина А (Cayman Chemicals, США), затем производили окрашивание моноклональными антителами к поверхностным маркерам моноцитов CD68-Alexa Fluor 647 (Bio-Rad, США) и дальнейшую фиксацию клеток в течение 10 мин 4 %-ным раствором параформальдегида в физиологическом растворе. После отмывания клеток путем центрифугирования в течение 5 мин при 1500 об/мин к суспензии добавляли моноклональные антитела ФНОα-PE (Beckman Coulter, США). Учет результатов производили с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter,).

Для оценки количества пролиферирующих спленоцитов клетки в концентрации $1 \cdot 10^7$ кл/мл перед культивированием окрашивали CFSE-препаратом (Sigma, Германия) в концентрации 7 мМ в 1 мл неполной культуральной среды RPMI-1640 (Sigma, Германия) в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливали отмыванием клеток в холодной полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 с 10 % ЭТС, 1 % L-глутамина и 1 % антибиотика-антимикотика. Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих спленоцитов осуществляли на 5-е сутки культивирования методом проточной цитофлуорометрии FC500 (Beckman Coulter, США).

Для определения степени ингибирующего влияния ММСК КМ на пролиферацию спленоцитов использовали следующую формулу расчета коэффициента супрессии (**к**) [13, 14]:

$$\mathbf{к} = (100 - n_{\text{ВЗК + ММСК}} - n_{\text{ВЗК}}) \cdot 100,$$

где $n_{\text{ВЗК + ММСК}}$ – ConA-индуцированная пролиферация спленоцитов у животного с инфузией ММСК, %; $n_{\text{ВЗК}}$ – ConA-индуцированная пролиферация спленоцитов у животного с моделью ВЗК, %.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Statistica 8.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0{,}05$. Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (Q = 0,25–0,75). Сравнение групп и определение статистически значимых различий осуществляли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с расчетом коэффициентов ранговой корреляции (R).

Результаты и их обсуждение. *Влияние клеточной терапии на морфологическую картину экспериментального ВЗК лабораторных животных.* В первые 48 ч у животных опытной группы отмечались клинические проявления патологического процесса: статистически значимая потеря

массы тела, сопровождаемая диареей, кровью в кале, загрязнением кожи вокруг анального отверстия и снижением двигательной активности [12].

На 4-е сутки после моделирования повреждения у животных опытной группы наблюдался илеоколит с поверхностными гнойными изъязвлениями до 1,5 см, покрытыми фибрином, гиперемия слизистой оболочки и утолщенных складок слизистой оболочки по типу «булыжная мостовая». Кроме того, у крыс опытной группы отмечался токсический мегаколон, о чем свидетельствует значительное увеличение отношения массы толстой кишки к ее длине (0,07 (0,06–0,12)) по сравнению с данным показателем в ГС (0,04 (0,04–0,05)), $p = 0,005$.

При патоморфологическом исследовании тонкой и толстой кишки у лабораторных крыс опытной группы выявлялись характерные признаки ВЗК. В тонкой кишке наблюдалась диффузно-очаговая атрофия ворсин, гиперплазия крипт, умеренная и выраженная инфильтрация межэпителиальными лимфоцитами, а также венозно-капиллярное полнокровие в слизистой оболочке. В слизистой оболочке толстой кишки выявлен тотальный фибриноидный некроз с полосовидными кровоизлияниями в подслизистой основе. Кроме того, наблюдалась густая трансмуральная инфильтрация и проникающая щелевидная язва (рис. 1).

После введения ММСК КМ лабораторным крысам с экспериментальным ВЗК воспалительная инфильтрация в тонкой кишке не выявлялась, клеточные и волокнистые элементы подслизистого и межмышечного нервных сплетений не имели патологических изменений. В толстой кишке наблюдалась слабая или умеренная межэпителиальная лимфоцитарная инфильтрация поверхностного эпителия и эпителия крипт, определялись очаговая гипертрофия подслизистого и мышечного слоев и небольшие локусы склероза в *lamina propria* (рис. 1). Кроме того, инфузия ММСК приводила к снижению отношения массы толстой кишки к ее длине до нормального значения (0,04 (0,04–0,05), $p = 0,50$).

Влияние культур ММСК на внутриклеточную продукцию ФНО-α макрофагами лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК. Учитывая роль провоспалительных цитокинов в патогенезе ВЗК, проведена оценка влияния культур ММСК КМ на внутриклеточную продукцию ФНО-α макрофагами лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК.

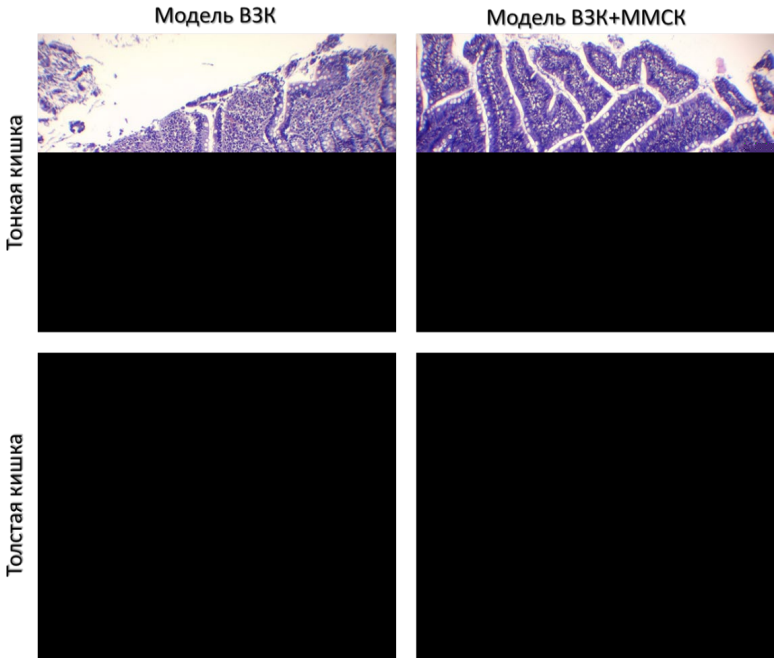

Рис. 1. Морфологическая характеристика тонкой и толстой кишки лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК до и после введения ММСК

Fig. 1. Morphology of the small intestine and colon of laboratory rats with experimental IBD before and after MMSC administration

Количество CD68^{+}-продуцирующих ФНО-α макрофагов в нестимулированных культурах лабораторных крыс с ВЗК составило 26,18 (25,41–26,86) %, что превышало аналогичный показатель в ГС (19,11 (17,83–19,90) %), p = 0,021.

Люминальные антигены играют важную роль в развитии ВЗК. Особый интерес представляет дрожжевой антиген маннан – компонент клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, участвующий в патогенетической индукции воспалительного процесса в кишечнике. Фосфопептидоманнаны дрожжей не являются типичными Т-клеточными антигенами, но в последнее время все больше доказательств того, что маннан *Saccharomyces cerevisiae* не только влияет на врожденный иммунный ответ, но и может взаимодействовать с Т-клетками [15].

На рис. 2 представлены результаты влияния ММСК на продукцию ФНО-α CD68^{+}-клетками при стимуляции *in vitro* спленоцитов маннаном. Установлено, что у лабораторных животных с экспериментальным ВЗК количество ФНО-α-продуцирующих макрофагов отличалось от их количества в ГС и составило 25,52 (23,76–27,43) и 18,47 (18,05–19,37) % соответственно, p = 0,0008 (рис. 2).

Внутриартериальное введение ММСК не приводило к снижению экспрессии провоспалительного цитокина макрофагами животных с экспериментальным ВЗК (количество ФНО-α-позитивных клеток составило 28,92 (27,25–31,50) %, $p > 0,05$). В то же время у животных с ВЗК при внутривенном введении клеточных культур установлено снижение маннан-индуцированной продукции ФНО-α (22,70 (22,49–23,57) %, p = 0,016) при сохранении статистически значимых различий по сравнению с данным показателем у животных ГС (рис. 2).

Влияние культур ММСК на пролиферацию спленоцитов лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК. На рис. 3 представлены оригинальные гистограммы, характеризующие количество пролиферирующих спленоцитов в нестимулированной культуре и при стимуляции ConA у крысы с экспериментальным ВЗК до и после клеточной терапии по сравнению с аналогичными показателями у крысы из ГС.

Статистическая обработка результатов стимулированной пролиферации спленоцитов исследуемых групп представлена в таблице.

Количество спонтанно пролиферирующих спленоцитов в исследуемых группах не отличалось ($p > 0,05$). При культивировании с ConA в равной степени усиливалась неспецифическая пролиферация спленоцитов как в ГС, так и в группе животных с ВЗК. Внутриартериальное и внутривенное введение ММСК супрессировали ConA-стимулированную пролиферацию спленоцитов по сравнению с таковой у животных с экспериментальной моделью без клеточной терапии (p = 0,03 и p = 0,05 соответственно).

При этом значимых различий в ConA-индуцированной пролиферации спленоцитов животных с ВЗК при внутриартериальном и внутривенном введении ММСК не выявлено, что под-

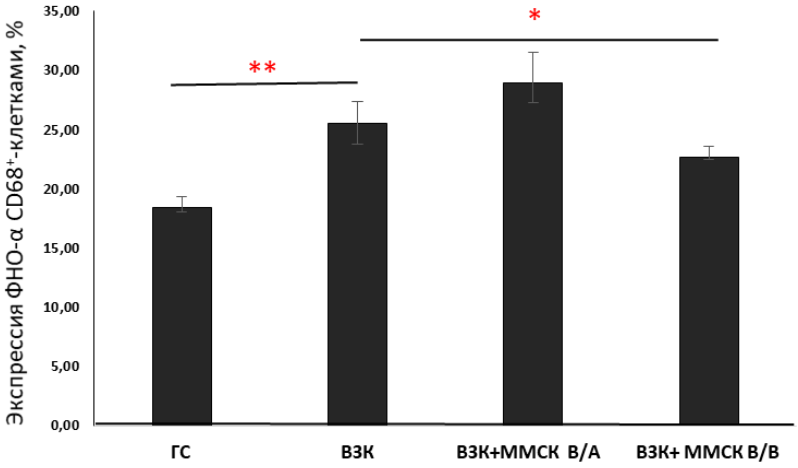

Рис. 2. Маннан-индуцированная продукция ФНО-α CD68^{+}-макрофагами у животных исследуемых групп

Fig. 2. Mannan-induced production of TNF-α by CD68^{+}-macrophages in the study groups

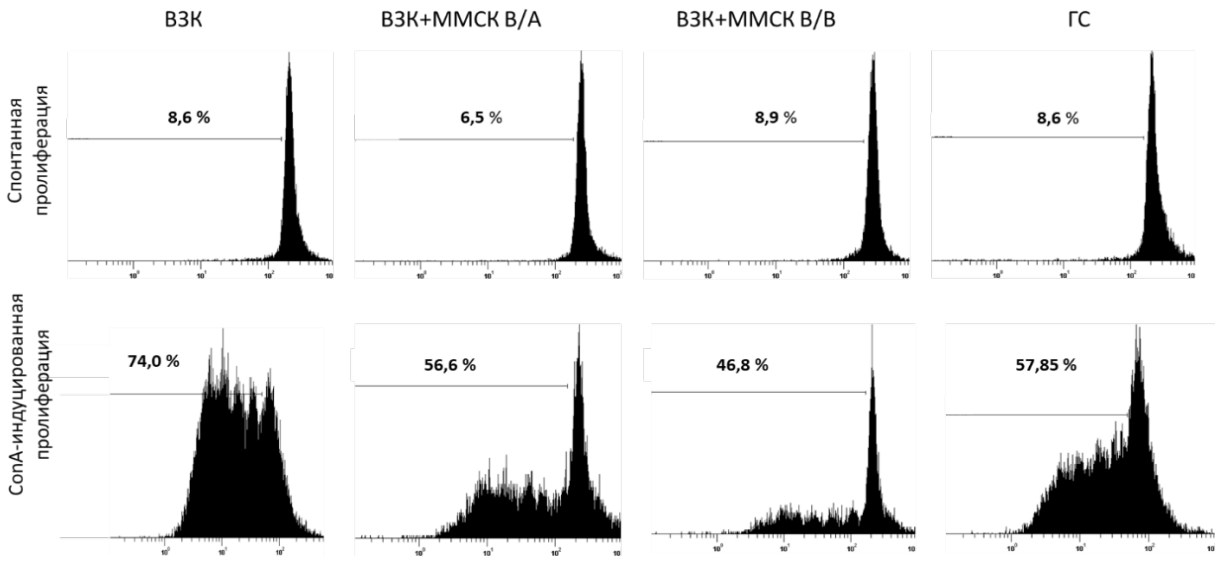

Рис. 3. Количество спонтанно пролиферирующих (верхняя панель) и ConA-стимулированных (нижняя панель) спленоцитов у животных исследуемых групп

Fig. 3. The number of spontaneously proliferating (top panel) and ConA-stimulated (bottom panel) splenocytes in the study groups

тверждено рассчитанными коэффициентами супрессии (**к**), которые составили 31,2 (12,2–53,8) и 36,5 (30,9–37,8) % соответственно. Полученные значения **к** обратно коррелировали с массой селезенки (R = –0,59; p = 0,004) и коэффициентом соотношения массы селезенки к массе тела животного (R = –0,67; p = 0,01).

Содержание пролиферирующих спленоцитов при различных условиях их культивирования у животных исследуемых групп, % (Me (Q = 0,25–0,75))

The level of proliferating splenocytes of study groups animals under different cultivation conditions, % (Me (Q = 0.25–0.75))

Условия культивирования	Исследуемая группа				p
	ГС	ВЗК	ВЗК + ММСК		
			в/а	в/в	
	1	2	3	4	
Medium	10,75 (6,58–13,25)	10,85 (9,90–13,08)	8,85 (8,05–12,71)	11,80 (8,98–14,70)	*n/s*
ConA	57,85 (49,7–69,84)	67,05 (56,3–78,9)	50,15 (30,2–63,2)	50,63 (44,2–62,3)	p_{2-3} = 0,03 p_{2-4} = 0,05 p_{3-4} = 0,56
Mannan	9,90 (6,8–11,8)	10,85 (9,80–16,6)	7,90 (7,30–15,2)	11,80 (9,68–15,1)	p_{1-2} = 0,08 p_{2-3} = 0,06

При оценке специфической пролиферации спленоцитов выявлена тенденция к увеличению количества пролиферирующих маннан-индуцированных клеток у крыс с экспериментальным ВЗК (см. таблицу). Тенденция к снижению пролиферативной активности спленоцитов установлена только при внутриартериальном введении ММСК. Рассчитанные коэффициенты супрессии в маннан-стимулированных культурах при внутриартериальном и внутривенном введении ММСК составили 32,26 (28,57–33,18) и 14,29 (10,71–20,28) % соответственно, p = 0,245.

Заключение. Клеточная терапия ММСК оказывает иммуномодулирующее действие и приводит к снижению маннан-индуцированной продукции ФНО-α $CD68^+$-клетками лабораторных животных с экспериментальным ВЗК при внутривенном введении клеточных культур. Внутриартериальная и внутривенная инфузия ММСК КМ вызывает супрессию митоген-стимулированной пролиферации спленоцитов на фоне улучшения патоморфологической картины и корреляции

иммунологических показателей с клиническими признаками повреждения. При этом различий в антипролиферативном действии ММСК в зависимости от способа введения не выявлено. Внутриартериальная клеточная терапия также способствует снижению маннан-индуцированной пролиферации спленоцитов *in vitro*, что подтверждает иммуносупрессивное действие культур ММСК на аутореактивные клоны спленоцитов при экспериментальном ВЗК.

Учитывая патогенетические механизмы развития воспаления в кишке, полученные результаты свидетельствуют о противовоспалительном эффекте клеточной терапии при экспериментальном моделировании ВЗК, что является обоснованием для комбинированного введения культур ММСК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Фенотипический профиль лимфоидных клеток периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника / М. М. Зафранская [и др.] // Мед. иммунология. – 2020. – Т. 22, № 6. – С. 1131–1140.

2. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем / А. В. Ткачев [и др.] // Практ. медицина. – 2012. – Т. 3, № 58. – С. 17–22.

3. Danese, S. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases / S. Danese, C. Fiocchi // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, N 30. – P. 4807–4812. https://doi.org/10.3748/wjg.12.4807

4. The achievements and challenges of mesenchymal stem cell-based therapy in inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer / D. K. W. Ocansey [et al.] // Stem Cells Int. – 2020. – Vol. 2020, art. ID 7819824. https://doi.org/10.1155/2020/7819824

5. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies / B. Ahluwalia [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2018. – Vol. 53, N 4. – P. 379–389. https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597

6. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases / C. Grégoire [et al.] // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2017. – Vol. 45, N 2. – P. 205–221. https://doi.org/10.1111/apt.13864

7. Systematic exposition of mesenchymal stem cell for inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer / J. Kang [et al.] // BioMed Res. Int. – 2018. – Vol. 2018, art. ID 9652817. https://doi.org/10.1155/2018/9652817

8. Kim, D. H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies / D. H. Kim, J. H. Cheon // Immune Network. – 2017. – Vol. 17, N 4. – P. 25–40. https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25

9. Guan, Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease / Q. A Guan // J. Immunol. Res. – 2019. – Vol. 2019, art. ID 7247238. https://doi.org/10.1155/2019/7247238

10. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect / D. K. W. Ocansey [et al.] // Clin. Transl. Med. – 2019. – Vol. 8, N 31. – P. 1–17. https://doi.org/10.1186/s40169-019-0251-8

11. Экспериментальное моделирование ВЗК *in vivo* / А. Ю. Адамович [и др.] // Колопроктология. – 2019. – Т. 18, № 3 (прил.). – С. 78.

12. Экспериментальное моделирование воспалительных заболеваний кишечника / А. Ю. Адамович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / РНПЦ ЭиМ. – Минск, 2019. – № 12. – С. 206–207.

13. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 3. – С. 24–31.

14. Влияние мононуклеаров костного мозга и мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию спленоцитов крыс *in vitro* / М. М. Зафранская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 4. – С. 30–37.

15. Association of deficiency for mannan-binding lectin with antimannan antibodies in Crohn's disease: a family study / F. Seibold [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2007. – Vol. 13, N 9. – P. 1077–1082. https://doi.org/10.1002/ibd.20156

References

1. Zafranskaya M. M., Adamovich A. Yu., Vorobei A. V., Starostin A. M., Nizhegorodova D. B. Phenotypic peripheral blood lymphoid cells profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical immunology], 2020, vol. 22, no. 6, pp. 1131–1140 (in Russian).

2. Tkachev A. V., Mkrtchyan L. S., Nikitina K. E., Volynskaya E. I. Inflammatory bowel disease: crossing of the problems. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine], 2012, vol. 3, no. 58, pp. 17–22 (in Russian).

3. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, vol. 12, no. 30, pp. 4807–4812. https://doi.org/10.3748/wjg.12.4807

4. Ocansey D. K. W., Qiu W., Wang J., Yan Y., Qian H., Zhang X., Xu W., Mao F. The achievements and challenges of mesenchymal stem cell-based therapy in inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer. *Stem Cells International*, 2020, vol. 2020, art. ID 7819824. https://doi.org/10.1155/2020/7819824

5. Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M. K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2018, vol. 53, no. 4, pp. 379–389. https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597

6. Grégoire C., Lechanteur C., Briquet A., Baudoux É., Baron F., Louis E., Beguin Y. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2017, vol. 45, no. 2, pp. 205–221. https://doi.org/10.1111/apt.13864

7. Kang J., Zhang L., Luo X., Ma X., Wang G., Yang Y. [et al.]. Systematic exposition of mesenchymal stem cell for inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer. *BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, art. ID 9652817. https://doi.org/10.1155/2018/9652817

8. Kim D. H., Cheon J. H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Network*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 25–40. https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25

9. Guan Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, vol. 2019, art. ID 7247238. https://doi.org/10.1155/2019/7247238

10. Ocansey D. K. W., Wang L., Wang J., Yan Y., Qian H., Zhang X., Xu W., Mao F. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect. *Clinical and Translational Medicine*, 2019, vol. 8, no. 31, pp. 1–17. https://doi.org/10.1186/s40169-019-0251-8

11. Adamovich A. Yu., Dybov O. G., Starostin A. M., Vanslav M. I., Ignatovich T. V., Nizhegorodova D. B. Experimental modeling IBD *in vivo*. *Koloproktologiya* [*Koloproctology*], 2019, vol. 18, no. 3 (suppl.), p. 78 (in Russian).

12. Adamovich A. Yu., Dybov O. G., Starostin A. M., Ignatovich T. V. Experimental model of inflammatory bowel disease. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka: sbornik nauchnykh trudov* [Modern problems of infectious human pathology: collection of scientific papers]. Minsk, 2019, no. 12, pp. 206–207 (in Russian).

13. Zafranskaya M. M., Fedulov A. S., Nizhegorodova D. B., Motuzova Ya. M., Kolobova M. Yu., Bagatka S. S., Milanovich N. F., Ivanchik G. I. Influence of mesenchymal stem cells on the memory T-cells proliferation in patients with multiple sclerosis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series,* 2010, no. 3, pp. 24–31 (in Russian).

14. Zafranskaya M. M., Nizhegorodova D. B., Kondratovich T. V., Yurkevich M. Yu., Komissarov K. S., Ivanchik G. I., Kulinich S. S., Pilotovich V. S. Influence of bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells on the splenocyte proliferation of rats *in vitro*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2015, no. 4, pp. 30–37 (in Russian).

15. Seibold F., Boldt A. B. W., Seibold-Schmid B., Schoepfer A. M., Flogerzi B., Müller S., Kun J. F. J. Association of deficiency for mannan-binding lectin with antimannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007, vol. 13, no. 9, pp. 1077–1082. https://doi.org/10.1002/ibd.20156

Информация об авторах

Адамович Анна Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anik_adamovich@mail.ru

Нижегородова Дарья Борисовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, заведующий отделом. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nzh@tut.by

Шадрина Виктория Кирилловна – мл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nika.shadrina@bk.ru

Дыбов Олег Геннадьевич – аспирант. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: AlehDybau@protonmail.com

Старостин Андрей Михайлович – аспирант. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio_star@mail.ru

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, заведующий отделом. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

Воробей Александр Владимирович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dept-surg@hotmail.com

Зафранская Марина Михайловна – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Международный экологический институт им. А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zafranskaya@gmail.com

Information about the authors

Hanna Yu. Adamovich – Junior Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anik_adamovich@mail.ru

Darya B. Nizheharodava – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nzh@tut.by

Viktoriya K. Shadrina – Junior Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nika.shadrina@bk.ru

Aleh G. Dybau – Postgraduate student. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: AlehDybau@protonmail.com

Andrei M. Starastin – Postgraduate student. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio_star@mail.ru

Tat'yana E. Vladimirskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

Aliaksandr U. Varabei – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dept-surg@hotmail.com

Marina M. Zafranskaya – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zafranskaya@gmail.com