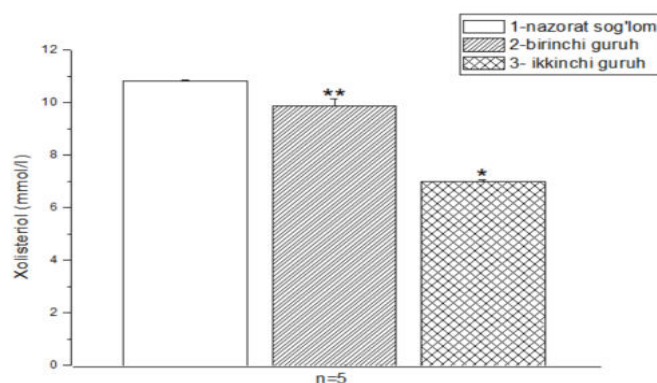




Cholesterol content determined in rat blood in an experimental model

Note: *- $P < 0.05$; **- $P < 0.01$; ***- $P < 0.001$

Summary. Crohn's disease is an inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation of any part of the gastrointestinal tract, has a progressive and fatal course, and the incidence rate is increasing worldwide. Multiple factors have been implicated in the causation of Crohn's disease, including a dysregulated immune system, altered microbiota, genetic predisposition, and environmental factors, but the cause of the disease remains unknown. The appearance of the disease at a young age in most cases requires prompt but long-term treatment to prevent the development of the disease with exacerbation of the disease and intestinal complications. Clinical symptoms usually manifest as abdominal pain, chronic diarrhea, weight loss, and fatigue.

In the experimental Crohn's model, due to changes in digestion and absorption, body weight was found to decrease by an average of 2.3 times.

The amount of protein in the blood of the first group of rats with Crohn's disease decreased by 3.4 times compared to the value of healthy rats, glucose decreased by 44 %, cholesterol by 13.5 %, carbohydrates by 26 % due to the corrective effect of dihydroquercetin and tissue peptides. It was found that the protein increased by 7 % and by 42.8 %.

REFERENCES

1. Ng S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies //The Lancet. – 2017. – T. 390. – №. 10114. – C. 2769-2778.
2. Torres J. et al. Crohn's disease //The Lancet. – 2017. – T. 389. – №. 10080. – C. 1741-1755.
3. Fiorino G. et al. Preventing collateral damage in Crohn's disease: the Lémann index //Journal of Crohn's and Colitis. – 2016. – T. 10. – №. 4. – C. 495-500.
4. Ananthakrishnan A. N. et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2018. – T. 15. – №. 1. – C. 39-49.
5. Levine A., Boneh R. S., Wine E. Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases //Gut. – 2018. – T. 67. – №. 9. – C. 1726-1738.
6. Khalili H. et al. Adherence to a Mediterranean diet is associated with a lower risk of later-onset Crohn's disease: results from two large prospective cohort studies //Gut. – 2020. – T. 69. – №. 9. – C. 1637-1644.
7. Ananthakrishnan A. N. Epidemiology and risk factors for IBD //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2015. – T. 12. – №. 4. – C. 205-217.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС IN VITRO

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS AND PLASMA ENRICHED WITH SOLUBLE PLATELET FACTORS ON THE SURVIVAL OF RAT SPLEEN LYMPHOCYTES IN VITRO

М. П. Потапнёв, Т. А. Давидовская, Я. В. Колесникович
M. P. Potapnev, T. A. Davidovskaya, J. V. Kolesnikovich

Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
 г. Минск, Республика Беларусь

tansandvd@gmail.com, yana.kolesnikovich.02@mail.ru

International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
 Minsk, Republic of Belarus

Изучена способность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) крыс или плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ) крыс влиять на жизнеспособность лимфоидных клеток (спленоцитов), культивированных *in vitro* с или без активатора (форбол миристат ацетата, ФМА). Установлено, что внесение в инкубационную среду к лимфоцитам крыс МСК костного мозга в концентрации 10 % и 20 % вызывало повышение жизнеспособности интактных и ФМА-активированных лимфоцитов, при этом снижало содержание клеток, находящихся в стадии некроза (в 7–14 раз) и позднего апоптоза (в 2–5 раз). Внесение в инкубационную среду к лимфоцитам ПОРФТ не оказывал существенного влияния на жизнеспособность неактивированных лимфоцитов крыс, но обеспечивал повышение жизнеспособности ФМА-активированных лимфоцитов в 1,6–2,2 раза, при этом значительно снизилось содержание клеток в стадии некроза (в 2 раза).

Сделан вывод о выраженном витальном и антиапоптотическом действии МСК на жизнеспособность интактных и ФМА-активированных лимфоцитов крыс *in vitro*, а также способности ПОРФТ обеспечивать жизнеспособность и подавление апоптоза ФМА-активированных клеток.

The ability of rat mesenchymal stromal cells (MSCs) or plasma enriched with soluble platelet factors (PORFTS) of rats to influence the viability of lymphoid cells (splenocytes) cultured *in vitro* with or without an activator (forbol myristate acetate, FMA) was studied. It was found that the introduction of bone marrow MSCs in concentrations of 10% and 20% into the incubation medium for rat lymphocytes caused an increase in the viability of intact and PMA-activated lymphocytes, while reducing the content of cells in the stage of necrosis (by 7–14 times) and late apoptosis (by 2–5 times). The introduction of PORFT into the incubation medium to lymphocytes did not significantly affect the viability of inactive rat lymphocytes, but provided an increase in the viability of PMA-activated lymphocytes by 1.6–2.2 times, while the content of cells in the necrosis stage significantly decreased (by 2 times). The conclusion is made about the pronounced vital and anti-apoptotic effect of MSCs on the viability of intact and FMA-activated.

Ключевые слова: плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, мезенхимальные стромальные клетки, выживаемость, апоптоз лимфоцитов.

Keywords: plasma enriched with soluble platelet factors, mesenchymal stromal cells, survival, lymphocyte apoptosis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-169-173>

В последние годы регенеративная медицина обогатилась новыми терапевтическими методами с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК), внеклеточных везикул МСК (ВВ МСК) и плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ). Их биологическая и терапевтическая активность связана с доступными источниками и установленными противовоспалительными, иммуномодулирующими и регенеративными действиями. Среди свойств этих биопрепаратов недостаточно хорошо изучены их действия по снижению повреждения органов и тканей и ингибированию апоптоза клеток сердца, сосудов, легких, почек и поджелудочной железы. В экспериментах *in vitro* было показано, что МСК обладают антиапоптотическим действием и их кондиционированные среды (содержащие ВВ МСК) снижают апоптоз моноцитов и нейтрофилов, уменьшают гибель β -амилоида и нейронов, вызванную гипоксией. Кроме того, в экспериментах *in vitro* показана способность ПОРФТ повышать выживаемость ЛПС- и эрастин-активированных кардиомиоцитов, пролиферацию и выживаемость фибробластов различного происхождения. Считается, что способность этих биопродуктов вызывать повышение жизнеспособности органов и тканей быстро развивается и предшествует развитию других биологических свойств МСК, ВВ МСК и ПОРФТ.

В экспериментах были использованы самцы и самки крыс породы Wistar массой 250–300 грамм. Для осуществления забора органов и тканей крыс подвергали эвтаназии. Клетки селезенки и костного мозга забирали из бедренных костей обеих ног в стерильных условиях.

Для получения лимфоидных клеток селезенку переносили в пробирки, гомогенизировали и ресуспендировали в среде RPMI с 1% фетальной телячьей сывороткой (FCS), после чего мононуклеарные клетки (МНК) выделяли на градиенте плотности Гистопак-1077.

МСК костного мозга получали из бедренных костей крыс путем перфузии средой для питания DMEM/F12, дополненной 2% ЭТС.

ПОРФТ получали путём забора шприцем 5 мл крови из околосердечной сумки. Кровь переносили в пробирки с 3,8% цитратом натрия и центрифугировали. Затем отбирали концентрат тромбоцитов и замораживали на ночь при -70°C . Через 1–3 дня пробирку размораживали и центрифугировали. Супернатант использовали в экспериментальных исследованиях.

Для определения принадлежности выделенной популяции к мезенхимальным стромальным клеткам оценивали степень экспрессии CD90 и CD45, идентифицирующих молекулы МСК, на поверхности мембраны. Данные регистрировали и анализировали с помощью проточного цитометра FACSCantoII и программного обеспечения FACSDiva 7.0. На первом этапе клетки разделяли с помощью прямого и бокового светорассеяния, а затем бокового светорассеяния и флуоресценции антител против CD90 и CD45.

Для изучения уровней спонтанного и ФМА-индуцированного апоптоза лимфоциты селезенки крыс высеивали в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением 5 % ФБС в лунки 12-луночного планшета и инкубировали в присутствии 10 или 20 % МСК, или крысиной ПОРФТ в конечной концентрации 1,25 и 2,5%.

Клетки культивировали в течение 3 суток. По истечении времени 3-суточного культивирования клеточную взвесь отмывали и проводили подсчет и оценку жизнеспособности (ЖСП) клеток. Для определения показателей жизнеспособности клеток использовали набор “FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I” с последующим анализом при помощи проточной цитофлуориметрии, оценивая интенсивность зеленой флуоресценции FITC-аннексина V и красной 7-AAD. В качестве «негативного контроля» использовали неокрашенные клетки. Степень апоптоза оценивали по включению 7-AAD и экспозиции на внешней мембране фосфатидилсерина (рисунок 1).



Рисунок 1 – Гистограмма распределения окрашенных клеток, при окрашивании аннексином-V-FITC и 7-аминоактиномицином D

Проведено 6 повторных эксперимента, результаты которых обработаны статистически и представлены в исследовании. Для определения достоверности различий уровней спонтанного и индуцированного апоптоза (раннего, позднего и некротических клеток) при культивировании спленоцитов в разных условиях применяли t-критерия Стьюдента. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 12.0. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

В экспериментах использовали МСК КМ крыс 2 пассажа. Количество CD90+/CD45– клеток в культуре составляло от 94,1 до 99,9% (рис.1). Данные экспрессии антител подтверждают принадлежность и чистоту полученной популяции к МСК крыс.

По истечении времени культивирования количество лимфоцитов селезенки крыс во всех пробах было примерно одинаковым (от 640 тыс. клеток/мл до 700 тыс. клеток/мл), ЖСП клеток составляло 55-85%. МСК к концу 3 суток культивирования не выживали. При внесении 10% интактных МСК жизнеспособность клеток выросла от 57,2 % до 81,4 %, то есть увеличилась в 1,4 раза. А при внесении 20% МСК жизнеспособность возросла от 57,2% до 77% и увеличилась в 1,3 раза (рисунок 2).

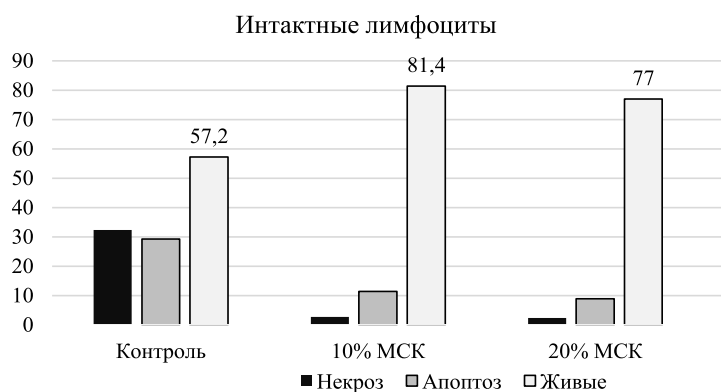


Рисунок 2 – Влияние МСК на жизнеспособность интактных крысиных лимфоцитов селезенки, культивированных *in vitro*

Исходя из этих данных можно сделать вывод, что добавление МСК крыс в культуральную среду в концентрациях 10 % и 20 % повысило жизнеспособность интактных лимфоцитов селезенки крыс. Количество некротических лимфоцитов при культивировании с 10% и 20% МСК крыс сократилось с 32,4 % до 2,7 % и 2,4 % соответственно ($p < 0,001$). Из этого следует, что относительное содержание лимфоцитов селезенки крыс, находящихся в стадии некроза в образцах при сокультивировании с МСК в концентрации 10 % и 20 % снизилось в 12-14 раз, по сравнению с контрольными образцами.

При внесении 10 % и 20 % МСК в культуру ФМА-индуцированных лимфоцитов крыс жизнеспособность клеток, также как и в случае с интактными клетками, выросла от 57,2 % до 81,4 % и 77% соответственно, то есть увеличилась в 1,4 и 1,3 раза (рисунок 3). Следовательно, добавление МСК в концентрациях 10 % и 20 % в культуральную среду ФМА-индуцированных лимфоцитов крыс значительно повысило их жизнеспособность.

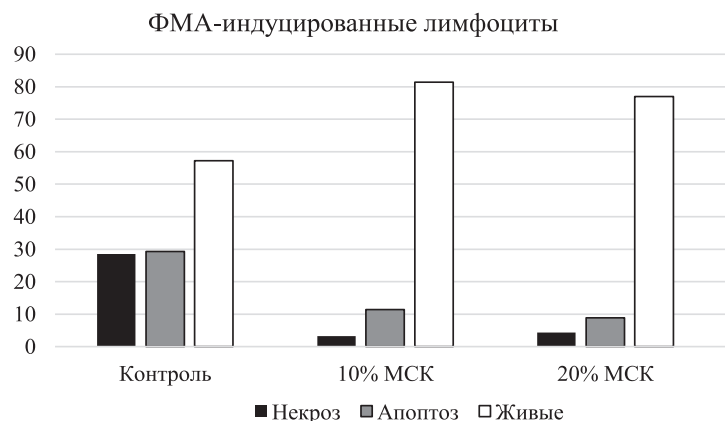


Рисунок 3 – Влияние МСК на жизнеспособность ФМА-индуцированных крысиных лимфоцитов селезенки, культивированных *in vitro*

При этом количество некротических лимфоцитов при культивировании с 10 % МСК крыс сократилось с 28,5 % до 3,2 %, то есть уменьшилось в 9 раз. А при внесении 20 % МСК количество некротических лимфоцитов уменьшилось с 28,5 % до 4,3% и уменьшилось в 7 раз по сравнению с контрольными образцами.

Антиапоптотическое действие ПОРФТ в культуре лимфоцитов селезенки крыс определяли по аналогичной методике. На рисунках 4 и 5 представлены результаты проведенных экспериментов.

Как видно из рисунка 4, ПОРФТ не оказывал существенного влияния на содержание (%) живых неактивированных лимфоцитов селезенки ($p < 0,05$), в то же время в 2–3 раза снижалось количество некротических клеток ($p < 0,05$).



Рисунок 4 – Жизнеспособность интактных лимфоцитов селезенки крыс, культивированных *in vitro*, в присутствии ПОРФТ

В то же время, как представлено на рисунке 5, внесение в культуру клеток крыс ПОРФТ обеспечивало повышение жизнеспособности (% клеток) ФМА-активированных лимфоцитов в 1,6–2,2 раза ($p < 0,05$), при этом значительно снизилось содержание клеток в стадии некроза (в 2 раза), ($p < 0,05$).

По результатам проведенных экспериментов существенного влияния ПОРФТ на процесс апоптоза лимфоцитов селезенки крыс мы не наблюдали.

В ходе проведенного исследования было показано, что внесение в инкубационную среду к лимфоцитам крыс МСК костного мозга крыс в концентрации 10% и 20% вызывало повышение жизнеспособности лимфоцитов, при этом снижалось содержание клеток, находящихся в стадии позднего апоптоза (в 2-5 раз) и некроза (в 7-14 раз). Внесение в инкубационную среду к лимфоцитам ПОРФТ не оказывал существенного влияния на жизнеспособность неактивированных лимфоцитов крыс, но обеспечивал повышение жизнеспособности ФМА-активированных лимфоцитов в 1,6-2,2 раза, при этом значительно снизилось содержание клеток в стадии некроза (в 2 раза).

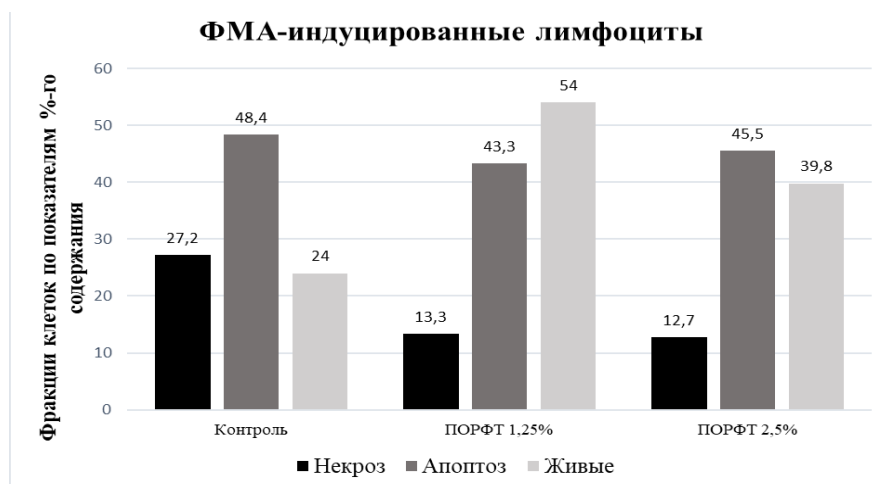


Рисунок 5 – Жизнеспособность ФМА-индуцированных лимфоцитов селезенки крыс, культивированных *in vitro*, в присутствии ПОРФТ

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee JY Extracellular Vesicles in Regenerative Medicine: Potentials and Challenges / Lee JY, Kim HS. // Tissue Eng Regen Med, 2021. – Aug 18(4) – 479-484.
2. Kita S. Extracellular Vesicles as an Endocrine Mechanism Connecting Distant Cells / Kita S, Shimomura I. // Mol Cells, 2022. – Nov 30, 45(11) – 771-780.
3. Nemati M. Plant-derived extracellular vesicles: a novel nanomedicine approach with advantages and challenges / Nemati M, Singh B, Mir RA, Nemati M, Babaei A, Ahmadi M, Rasmi Y, Golezani AG, Rezaie J. // Cell Commun Signal, 2022 – May 23, 20(1) – 69.

ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ КОНЕЧНОСТЕЙ У ДЕТЕЙ ГОРОДА МИНСКА CONGENITAL MALFORMATIONS OF LIMBS IN THE POPULATION OF THE CITY OF MINSK

А. О. Бадылевич¹, Н. В. Кокорина¹, Е. К. Хрусталева²
A. O. Badylevich¹, N. V. Kokorina¹, E. K. Khrustaleva²

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, БелМАПО
annabadylevich166@gmail.com

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, BelMAPE
Minsk, Republic of Belarus

Врожденные пороки развития (ВПР) в мире лидируют среди причин мертворождаемости, младенческой и ранней детской заболеваемости и смертности, детской инвалидности, что приводит к существенным медицинским и социальным проблемам. По данным Всемирной организации здравоохранения, 5–7% новорожденных имеют различную наследственную и врожденную патологию [1].

На протяжении своего существования человечество сталкивается с врожденными аномалиями развития конечностей. Однако именно в последние десятилетия понимание причин и механизмов появления врожденных пороков значительно продвинулось, за счет успехов в развитии генетики и эмбриологии [2].

Congenital malformations (CVD) are the world's leading causes of stillbirth, infant and early childhood morbidity and mortality, and childhood disability, which leads to significant medical and social problems. According to the World Health Organization, 5-7% of newborns have various hereditary and congenital pathologies [1].