

ДИНАМИКА IL-18 В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА ПОСЛЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Д. Б. Нижегородова^{1), 2)}, Д. П. Степук¹⁾, А. Ю. Адамович²⁾, Г. И. Иванчик²⁾,
Е. М. Назаренко^{1), 2)}, М. М. Зафранская^{1), 2)}

¹⁾ Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Беларусь, bsmu@bsmu.by

Болезнь Крона характеризуется хроническим воспалением кишечника и нарушением регенерации тканей. У многих пациентов наблюдается резистентность к традиционному методу лечения. Данный факт свидетельствует о том, что требуется разработка новых терапевтических подходов. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, обладая иммуномодулирующими свойствами, могут способствовать снижению воспалительных процессов и улучшению состояния пациентов. В данной статье исследуется динамика уровня интерлейкина-18 в супернатантах клеточных культур, полученных от пациентов с болезнью Крона до и после терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками. Результаты показали значительное снижение интерлейкина-18 в супернатантах после терапии, что свидетельствует о положительном влиянии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на модуляцию воспалительного ответа.

Ключевые слова: болезнь Крона; мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; интерлейкин-18.

DYNAMICS OF IL-18 IN CELL CULTURE SUPERNATANTS OF CROHN'S DISEASE PATIENTS AFTER CELL THERAPY WITH MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

D. B. Nizheharodava^{1), 2)}, D. P. Stepuk¹⁾, H. Yu. Adamovich²⁾, H. I. Ivanchyk²⁾,
E. M. Nazaranka^{1), 2)}, M. M. Zafranskaya^{1), 2)}

¹⁾ International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Dolgobrodskaya str., 23/1, 220070, Minsk, Belarus, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky Ave., 83, 220083, Minsk, Belarus, bsmu@bsmu.by

Crohn's disease is characterized by chronic intestinal inflammation and impaired tissue regeneration. Many patients are resistant to conventional therapies. This fact indicates that the development of new therapeutic approaches is required. Multipotent mesenchymal stromal cells, possessing immunomodulatory properties, can help to reduce inflammatory processes and improve the condition of patients. In this article the dynamics of interleukin-18 level in cell culture supernatants obtained from Crohn's disease patients before and after therapy with multipotent mesenchymal stromal cells is studied. The results showed a significant decrease of interleukin-18 in the supernatants after therapy, which indicates a positive effect of multipotent mesenchymal stromal cells on the modulation of the inflammatory response.

Keywords: Crohn's disease; multipotent mesenchymal stem cells; interleukin-18.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-217-221>

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) представляют собой серьезную проблему в области здравоохранения, характеризующуюся стабильным ростом заболеваемости. ВЗК включают две основные формы: болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). БК – рецидивирующее системное воспалительное заболевание, поражающее преимущественно желудочно-кишечный тракт с внекишечными проявлениями и связанными с ними иммунными нарушениями. Лечение БК является серьезной проблемой. Известно, что биологические агенты, в том числе низкомолекулярные препараты, отдельно или в комбинации с иммуномодулирующими препаратами, в настоящее время являются рекомендуемым лечением в случаях умеренного или тяжелого течения болезни [1].

Интерлейкин-18 (IL-18) играет ключевую роль в патогенезе БК. В гомеостатических условиях IL-18 является защитным фактором. Активация инфламмасом NLRP6 и NLRP3 в эпителиальных клетках может индуцировать продукцию IL-18, что, в свою очередь, стимулирует созревание бокаловидных клеток, слизи и выработку антимикробных пептидов, которые поддерживают как неповрежденный кишечный барьер, так и нормальную микробиоту в просвете кишки [3].

В случае хронического воспаления, сопровождающегося повреждением анатомического барьера и дисбактериозом, наоборот, IL-18 деструктивен. Показано, что IL-18 способствует разрушению слизистого барьера, провоцируя воспаление и усиливая повреждение кишечного эпителия во время заболевания. Клинические исследования коррелируют повышенную эпителиальную секрецию IL-18 с увеличением тяжести ВЗК. Концентрация IL-18 в сыворотке крови значительно выше у пациентов с БК чем у здоровых пациентов, что позволяет предположить, что инфильтрированные макрофаги в воспаленной слизистой оболочке кишки продуцируют IL-18, который затем потенциально регулирует мукозальные лимфоциты [8].

Понимание механизмов действия IL-18 открывает новые перспективы для разработки более эффективных терапевтических стратегий. В этом контексте особый интерес представляют иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), которые могут выступать в качестве потенциального инструмента для клеточной терапии.

ММСК характеризуются исключительной способностью модулировать фенотип и функциональные свойства различных иммунных клеток, которые играют важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний. Показано, что ММСК эффективно способствуют поляризации макрофагов в подтип M2 (противовоспалительный), что считается полезным при иммунозависимых расстройствах. ММСК-индуцированная поляризация M2 сопровождается повышенной секрецией противовоспалительных факторов, таких как IL-10 и аргиназы-1 и снижением продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-12 и IL-1 β [2].

Данные стволовые клетки нарушают созревание дендритных клеток, уменьшая их способность активировать Т-клетки. Это сопровождается снижением экспрессии HLA-DR, CD40, OX40L, CD80, CD83 и CD86.

ММСК ингибируют генерацию и провоспалительные свойства CD4⁺ Т-хелперов (Th)1 и Th17, в то же время способствуя пролиферации регуляторных Т-клеток и их ингибиторным возможностям. ММСК также нарушают секрецию цитокинов и цитотоксическую активность провоспалительных CD8⁺ Т-клеток. Кроме того, ММСК ингибируют дифференцировку, пролиферацию и секрецию антител В-клеток [2].

Материалы и методы исследования. В качестве материала исследования использованы мононуклеары периферической крови (МПК) 5 пациентов с БК. Выделение МПК производилось путем центрифугирования разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиенте плотности. После чего проводилось длительное культивирование МПК в концентрации 2×10^6 клеток на лунку при разных условиях:

- 1) без добавления стимулятора (контроль);
- 2) с добавлением неспецифического поликлонального стимулятора – фитогемагглютинин (РНА, Sigma, Германия) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл;

3) с добавлением специфического стимулятора – маннан *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, Германия) в конечной концентрации 2,0 мкг/мл.

Культивирование проходило в CO₂-инкубаторе (Revco, Германия) в течение 6 суток в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С.

Определение концентрации IL-18 в супернатантах клеточных культур осуществляли после клеточной терапии с использованием ММСК, а именно: до начала терапии, а также через 1, 3, 6 и 9 месяцев после проведения лечения. Анализ проводился методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов «Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ» (А-8770, Вектор БЕСТ, РФ).

Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 8.0. Оценка значимости различий между зависимыми группами производилась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (p (W)). Для описания данных использовали значение медианы, 25 % и 75 % перцентилей: Me (25 %; 75 %). Результаты считались статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение. Проведен сравнительный анализ уровня IL-18 в культурах с разными условиями культивирования, в зависимости от периода клеточной терапии (таблица).

Динамика уровня IL-18 в супернатантах клеточных культур в разные периоды после клеточной терапии, %, Me (25÷75 %)

Условия культивирования	Период наблюдения					p (W)
	До проведения клеточной терапии	1 месяц после клеточной терапии	3 месяца после клеточной терапии	6 месяцев после клеточной терапии	9 месяцев после клеточной терапии	
	1	2	3	4	5	
Medium	8,54 (3,7÷8,7)	4,04 (3,87÷4,57)	5,97 (4,67÷6,33)	3,87 (2,81÷4,18)	2,44 (2,11÷3,18)	p ₁₋₅ =0,04
PHA	9,37 (8,84÷9,79)	8,01 (6,89÷9,84)	7,82 (5,97÷10,89)	8,78 (6,32÷11,11)	8,56 (2,46÷10,04)	n/s
Mannan	12,11 (11,18÷14,5)	6,98 (5,97÷7,01)	3,51 (3,16÷4,92)	3,88 (2,81÷4,57)	4,52 (3,01 ÷ 5,46)	p ₁₋₂ =0,04 p ₁₋₃ =0,04 p ₁₋₄ =0,04 p ₁₋₅ =0,04

Примечания. 1. n/s – нет статистически значимых результатов;

2. Medium – клеточная культура без стимуляторов; PHA – культура клеток с добавлением митогена фитогемагглютинаина; Mannan – культура клеток с добавлением полисахарида маннана.

Анализ показал наличие статистически значимого различия в уровне IL-18 в культуре без добавления стимуляторов до начала клеточной терапии ММСК и после 9 месяцев лечения. Также зафиксированы изменения в динамике данного цитокина в культуре с маннаном на протяжении всего периода наблюдения после клеточной терапии (p<0,05).

Кроме того, отмечено увеличение концентрации IL-18 в культуре с маннаном до начала клеточной терапии по сравнению с другими культурами (p<0,05) (рис.1). Маннан – компонент клеточной стенки некоторых грибов, бактерий и дрожжей, который может быть частью нормальной микробиоты кишечника, способствуя поддержанию баланса микрофлоры. Однако одна из причин возникновения БК – это нарушение иммунологической толерантности, вследствие чего у пациентов с данной патологией маннан выступает в качестве антигена, который участвует в патогенетической индукции воспалительного процесса в кишечнике. Маннан не

только влияет на врожденный иммунный ответ, но и может взаимодействовать с Т-клетками, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов. Это объясняет повышенное содержание IL-18 до начала проведения терапии в клеточной культуре с маннаном.

Культивирование лимфоцитов с маннаном позволяет создать модель для изучения механизмов, участвующих в патогенезе БК. Улучшить понимание, как ММСК могут влиять на воспалительные процессы и как их использование может быть оптимизировано для достижения наилучших результатов.

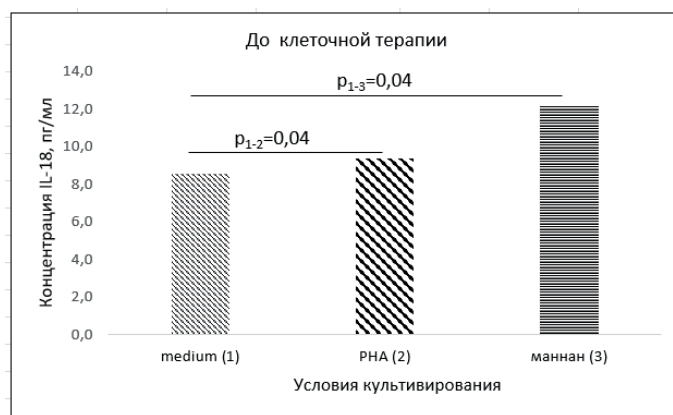


Рис. 1. Концентрация IL-18 в супернатантах клеточных культур до начала клеточной терапии ММСК.

* - $p < 0,05$

После первого месяца клеточной терапии с использованием ММСК полученные результаты указывают на различия в уровнях IL-18 между культурой без стимуляторов и культурами, обработанными маннаном и РНА ($p < 0,05$).

В течение девяти месяцев наблюдений за терапией зафиксировано существенное снижение концентрации IL-18 в культуре без стимуляторов и в культуре обработанной маннаном ($p < 0,05$). В то же время разница уровней IL-18 в культуре с РНА до и после девяти месяцев клеточной терапии оказалась незначительной (рис. 2). При этом выявлена тенденция к уменьшению маннан-индуцированной продукции провоспалительного цитокина по отношению к содержанию IL-18 в культуре с РНА. Эти данные указывают на способность ММСК модулировать воспалительные процессы без подавления клеточного иммунитета.

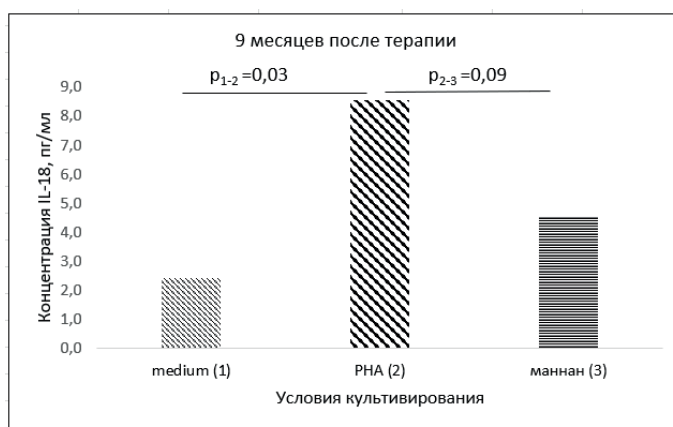


Рис. 2. Концентрация IL-18 в супернатантах клеточных культур после 9 месяцев клеточной терапии ММСК.

* - $p < 0,05$

Заключение. Клеточная терапия ММСК оказывает иммуномодулирующее действие и приводит к снижению уровня маннан-индуцированной продукции IL-18. Таким образом, использование ММСК в терапии пациентов с БК демонстрирует значительный потенциал для улучшения подходов к лечению данного заболевания, что подтверждается динамикой уровня IL-18 в супернатантах клеточных культур. Полученные результаты открывают новые перспективы для применения ММСК как эффективного терапевтического подхода, способствующего не только уменьшению воспалительных процессов, но и улучшению регенеративных способностей тканей у пациентов с БК.

Дальнейшие исследования необходимы для более глубокого понимания механизмов действия ММСК и их долгосрочного влияния на клинические проявления заболевания.

Библиографические ссылки

1. Combination treatment of inflammatory bowel disease: Present status and future perspectives / JK. Triantafyllidis // *World J Gastroenterol* 2024. Vol. 30. iss.15. P. 2068-2080.
2. Huang Y., Wu Q. Tam PKH. Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23. iss.17. P. 10023.
3. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment / S. A. Ihim [et al.] // *Front Immunol*. 2022 Vol. 13. P. 91-99.
4. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis // *Immunol Rev*. 2018. Vol. 281. iss. 1. P. 138-153.
5. Khor B., Gardet A., Xavier R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Nature*. 2011. Vol. 474. P. 307-317.
6. Martyniak A., Wędrychowicz A., Tomasiak P.J. Endogenous Opioids in Crohn's Disease // *Biomedicines*. 2023. Vol. 11. P. 20-37.
7. Singh N., Bernstein C. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease // *United European Gastroenterol J*. 2022. Vol. 10. P. 47-53.
8. Williams M. A., O'Callaghan A., Corr S.C. IL-33 and IL-18 in Inflammatory Bowel Disease Etiology and Microbial Interactions // *Front Immunol*. 2019. Vol. 10. art. 1091. P. 12-15.