

УДК 615.262.1, 615.324



ПРИМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОМА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ АДЬЮВАНТНОГО АРТРИТА И КОНТАКТНО-АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА НА ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ

П.А. Голубинская¹, М.В. Сарычева¹, А.А. Должиков¹, В.П. Бондарев², М.С. Стефанова³,
В.О. Солдатов¹, С.В. Надеждин¹, М.В. Корокин¹, М.В. Покровский¹, Ю.Е. Бурда¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Областное патологоанатомическое бюро»
комитета здравоохранения Курской области
305007, Россия, г. Курск, ул. Сумская, 45а

³ Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Городская больница №2 г. Белгорода»
308036, Россия, г. Белгород, ул. Губкина, 46

E-mail: polinapigeon@gmail.com

Получено 15.10.2020

Принята к печати 30.12.2020

Терапевтическое действие мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток доказано на различных моделях заболеваний. Одним из механизмов является паракринное воздействие клеток на окружающие ткани.

Цель. Изучение эффективности секрета мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при лечении адьювантного артрита и контактно-аллергического дерматита у крыс линии Wistar.

Материалы и методы. На 26 самках крыс введением полного адьюванта Фрейнда моделировали адьювантный артрит, лечили введением 100 мкл секрета мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток или физиологического раствора. На 30 самках крыс моделировали контактно-аллергический дерматит путём нанесения на кожу 200 мкл масляного раствора динитрофторбензола на 1, 5 и 6-е сутки, затем лечили мазью с флуоцинолоном (положительный контроль), детским кремом (отрицательный контроль), детским кремом с секретом от нативных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток или от клеток, обработанных дексаметазоном.

Результаты. Секретом не оказал противовоспалительного эффекта при адьювантном артрите, судя по показателям продольных и поперечных размеров лап у крыс и гистологического исследования. Наиболее эффективным на модели контактно-аллергического дерматита оказался крем с секретом от мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, обработанных дексаметазоном, – клиническое улучшение наступило на 2 сутки. Секретом от нативных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и флуоцинолоном оказали терапевтический эффект на 3 сутки применения, отрицательный контроль – на 4 сутки. Коэффициент лимфоцитарной инфильтрации был достоверно ниже ($p < 0,05$) во всех случаях по сравнению с отрицательным контролем ($2,8 \pm 0,1$), однако самая низкая инфильтрация наблюдалась при использовании крема с секретами от нативных ($1,75 \pm 0,1$) и стимулированных дексаметазоном ($1,76 \pm 0,1$) мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток.

Заключение. Крем с секретом мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток на модели контактно-аллергического дерматита, который является классической местной реакцией гиперчувствительности замедленного типа, сильнее подавляет лимфоцитарную инфильтрацию, чем высокоактивный топический глюкокортикостероид – флуоцинолон. Однако требуется дальнейшее изучение терапевтического действия секрета на моделях системных воспалительных заболеваний после его предварительной очистки от крупномолекулярных белков.

Ключевые слова: стволовые клетки; воспаление; секретом; адьювантный артрит; аллергический дерматит

Список сокращений: АА – адьювантный артрит; ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа; ГКС – глюкокортикостероиды; ДНФБ – динитрофторбензол; ИЛ – интерлейкин; КАД – контактно-аллергический дерматит; кДа – килодальтоны; ММСК – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; мРНК – микро-рибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; CD – кластер дифференцировки; FoxP3 – белок Forkhead box P3; IFN γ – интерферон гамма; NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би»; NK-клетки – натуральные киллеры; STAT5 – сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 5; Th1, Th17 – Т-хелперы 1, Т-хелперы-17; TNF α – фактор некроза опухоли альфа.

Для цитирования: П.А. Голубинская, М.В. Сарычева, А.А. Должиков, В.П. Бондарев, М.С. Стефанова, В.О. Солдатов, С.В. Надеждин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, Ю.Е. Бурда. Применение секрета мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в лечении адьювантного артрита и контактно-аллергического дерматита на животных моделях. *Фармация и фармакология*. 2020;8(6):416-425. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425

© П.А. Голубинская, М.В. Сарычева, А.А. Должиков, В.П. Бондарев, М.С. Стефанова, В.О. Солдатов, С.В. Надеждин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, Ю.Е. Бурда, 2020

For citation: P.A. Golubinskaya, M.V. Sarycheva, A.A. Dolzhikov, V.P. Bondarev, M.S. Stefanova, V.O. Soldatov, S.V. Nadezhdin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, Yu.E. Burda. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(6):416-425. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425

APPLICATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELL SECRETOME IN THE TREATMENT OF ADJUVANT ARTHRITIS AND CONTACT-ALLERGIC DERMATITIS IN ANIMAL MODELS

P.A. Golubinskaya¹, M.V. Sarycheva¹, A.A. Dolzhikov¹, V.P. Bondarev², M.S. Stefanova³,
V.O. Soldatov¹, S.V. Nadezhdin¹, M.V. Korokin¹, M.V. Pokrovsky¹, Yu.E. Burda¹

¹Belgorod State National Research University
85, Pobeda St., Belgorod, Russia 308015

²Regional Pathoanatomical Bureau of the Health Committee of the Kursk Region
45a, St. Sumsкая, Kursk, Russia, 305007

³City Hospital No. 2
46, Gubkin St., Belgorod, Russia 308036

E-mail: polinapigeon@gmail.com

Received 15 Oct 2020

Accepted 30 Dec 2020

The therapeutic effect of multipotent mesenchymal stem cells has been proven on various disease models. One of the mechanisms is the paracrine effect of the cells on the surrounding tissues.

The aim. To investigate the secretome effectiveness of the multipotent mesenchymal stem cells in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in Wistar rats.

Materials and methods. Adjuvant arthritis was simulated in 26 female rats by the administration of Freund's complete adjuvant and then treated with the administration of 100 µl of multipotent mesenchymal stem cell secretome or saline. Contact-allergic dermatitis was modeled on 30 female rats by applying 200 µl of an oil solution of dinitrofluorobenzene to the skin on days 1, 5 and 6. Then the rats were treated with fluocinolone ointment (a positive control), baby cream (a negative control), baby cream with a secretome of native multipotent mesenchymal stem cells or from the cells processed with dexamethasone.

Results. Judging by the indicators of the longitudinal and transverse dimensions of the paws in rats and a histological examination, the secretome did not have any anti-inflammatory effect on adjuvant arthritis. A cream with a secretome from multipotent mesenchymal stem cells processed with dexamethasone, was the most effective on the model of contact-allergic dermatitis: the clinical improvement occurred on the 2nd day. The secretome from native multipotent mesenchymal stem cells and fluocinolone had a therapeutic effect on the 3rd day of application, the negative control – on the 4th day. The lymphocytic infiltration coefficient was significantly lower ($p < 0.05$) in all the cases compared to the negative control (2.8 ± 0.1). However, the lowest infiltration was observed when the cream with secretome from native (1.75 ± 0.1) and dexamethasone-stimulated (1.76 ± 0.1) multipotent mesenchymal stem cells was being used.

Conclusion. The cream with the secretome of multipotent mesenchymal stem cells suppresses lymphocytic infiltration more strongly than the highly active topical glucocorticosteroid – fluocinolone – on the model of contact-allergic dermatitis, which is a classic local delayed-type hypersensitivity reaction. However, a further study of the therapeutic effect of the secretome on models of systemic inflammatory diseases is required after its preliminary purification from large-molecular proteins.

Keywords: stem cells; inflammation; secretion; adjuvant arthritis; allergic dermatitis

Abbreviations: AA – adjuvant arthritis; DTHS – delayed-type hypersensitivity; GCS – glucocorticosteroids; DNFB – dinitrofluorobenzene; IL – interleukin; KAD – contact-allergic dermatitis; kDa – kilodaltons; MMSC – multipotent mesenchymal stem cells; mRNA – micro-ribonucleic acid; RNA – ribonucleic acid; CD – cluster of differentiation; FoxP3 – FOXP3, Forkhead Box Protein P; IFN γ – interferon gamma; NF- κ B – nuclear factor “kappa-bi”; NK cells – Natural killer cells; STAT5 – Signal transducer and activator of transcription 5; Th1 – T-helper 1; Th17 – T-helper 17; TNF α – Tumor necrosis factor α .

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день изучение терапевтического действия секрета мультимпотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) является актуальным в области регенеративной медицины. Проведенные доклинические и клинические исследования доказали эффективность и безопасность ММСК в терапии atopического дерматита, остеоартрита и других воспалительных заболеваний [1–4]. Последнее десятилетие наблюдается рост исследований, связанных с изучением механизмов действия ММСК, связанных

с регенерацией тканей. Основными направлениями, в которых могут действовать ММСК, считаются: секреция биологически активных веществ, микровезикулы, экзосомы [5, 6]. Секретом ММСК содержит обширный спектр биологически активных веществ, обладает иммуномодулирующими свойствами и поэтому потенциально применим в терапии без использования самих клеток [7].

В отличие от секретомов ММСК, топические глюкокортикостероиды (ГКС), которые повсеместно применяются в терапии, имеют ряд недостатков. Во-пер-

вых, ГКС могут приводить к местным и системным побочным эффектам, развитие которых маловероятно при использовании секретомов ММСК [8]. Кроме того, противопоказаниями к применению ГКС являются ожоги и раны, что напротив, может быть показанием для использования секретомов ММСК.

Дексаметазон – мощный синтетический глюкокортикоид, который широко применяется в лечении воспалительных заболеваний, а также в клеточных технологиях для усиления дифференцировки ММСК в остео-, хондро- и адипогенном направлении *in vitro* [9]. Показано, что влияние дексаметазона на апоптоз, клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку ММСК зависит от времени воздействия и концентрации препарата [9]. Также дексаметазон влияет на профиль экспрессируемых ММСК РНК и мРНК [10], миграционную способность и форму клеток [11]. Усиленные дексаметазоном ММСК ингибируют экспрессию CD69 и продукцию IFN γ , а также фосфорилирование STAT5 в NK-клетках [12]. Возможно, получится использовать ГКС для подавления синтеза провоспалительных цитокинов опосредованно, с помощью обработанных дексаметазоном ММСК и их секретомы, избегая повышенного риска развития осложнений, характерных для ГКС.

Установлено, что секретом ММСК снижает продукцию мононуклеарами крови провоспалительных цитокинов и цитокинов, вовлеченных в клеточно-опосредованное иммунное воспаление [13]. В литературе показано, что галектиновая сеть опосредует иммуномодулирующие эффекты ММСК [14, 15]. Показано стимулирующее влияние секретомы ММСК жировой ткани, в составе которого обнаружено более 100 белков [16], на пролиферативную и миграционную способности различных типов клеток кожи [17]. Показана способность человеческих ММСК жировой ткани регулировать широкий спектр медиаторов воспаления вместе с подавлением Th1 и Th17 ответов при ревматоидном артрите [18]. Ранее нами было проведено пилотное исследование о влиянии секретомы нативных и стимулированных дексаметазоном ММСК на течение экспериментальных заболеваний [19]. В этой связи, нами были выбраны соответствующие модели заболеваний – адьювантный артрит (АА) и контактно-аллергический дерматит (КАД), которые воспроизводят аутоиммунную реакцию, схожую с патогенезом ревматоидного артрита [20], и реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) соответственно.

ЦЕЛЬ. Изучение эффективности секретомы ММСК на моделях воспалительных заболеваний: АА и КАД у крыс линии Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение секретомы мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток

Секретом от ММСК из жировой ткани человека получали путём культивирования клеток на 4 пассаже в условиях газового инкубатора (37°C, 5% CO $_2$) в течение 48 часов в бессывороточной питательной

среде без фенолового красного DMEM/F12 (Панэко, Россия). Часть клеток обрабатывали 10 мкмоль/мл дексаметазона. Затем отмывали от препарата фосфатно-солевым буфером и также культивировали в течение 48 ч в бессывороточной питательной среде DMEM/F12 без фенолового красного (Панэко, Россия). Супернатант собирали, концентрировали с помощью установки для ультрафильтрации Vivaflo 200 (Sartorius, Германия) на мембранах с MWCO 3 кДа. В качестве белка для стандартизации был выбран галектин-1, поскольку доказано его присутствие в секретоме ММСК и известны его противовоспалительные свойства [20, 22]. Содержание галектина-1 в концентрированном секретоме определяли с помощью иммуноферментного анализа на наборах CloudClone Corp. (США). Затем доводили концентрацию галектина-1 до 6 пг/мл с помощью фосфатно-солевого буфера, поскольку галектин-1 был выбран в качестве идентифицируемого фактора с целью стандартизации препарата. В расчете на 1 г общего белка в секретоме ММСК обработанных дексаметазоном галектина-1 было в среднем в 1,5 раза больше, чем в секретоме нативных ММСК. Оптическую плотность для последующего вычисления концентрации белка измеряли с помощью Nano Photometer N60 (Implen, Германия). Полученный секретом стерилизовали с помощью фильтров с диаметром пор 0,22 мкм (Merk, Millipore, США) и до использования хранили при –20°C. Методика подготовки секретомы подробно изложена в патенте RU 2747024 «Композиция с противовоспалительной и иммуносупрессивной активностью на основе секретомы мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и способ ее получения».

Животные

Половозрелые крысы обоих полов линии Wistar (вес 200–260 г) были получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая» (Московская область, пос. Столбовая). Животные содержались в контролируемых условиях: индивидуальные вентилируемые клетки с температурой 21–22°C и влажностью воздуха 55–60%. Световой режим: 16 ч света и 8 ч темноты. Животных кормили полнорационным комбикормом. В качестве подстилки использовали древесные опилки. Для наркотизации животных применяли Золетил 100 (Virbac, Франция) в дозе 1 мг/100 г веса животного. Работа была выполнена с соблюдением всех биоэтических норм согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU].

Дизайн исследования

Для моделирования АА 26 самкам крыс вводили 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда (Sigma, США) в плантарную поверхность задних лап [21].

Выбор самок животных для исследования обусловлен повышенной распространенностью моделируемого заболевания среди женщин [3]. Введение повторяли через неделю. Через 2 недели после первого введения наблюдался отёк задних лап, хромота. Затем в заднюю правую лапу опытным животным (10 крыс) подкожно вводили 100 мкл секрета ММСК. Другой опытной группе (10 крыс) вводили 100 мкл секрета от ММСК предварительно обработанных дексаметазоном. Группе контроля (6 крыс) в правую заднюю лапу вводили 100 мкл физиологического раствора. Задние левые лапы оставались без лечения. Отёк лап измеряли с помощью электронного штангенциркуля (Энкор 10740, Россия).

В качестве индуктора КАД использовали сначала 3% раствор динитрофторбензола (ДНФБ) в 1-е сутки, затем, на 5 и 6 сутки, – 1% раствор ДНФБ в оливковом масле, который наносили в объёме 200 мкл на депилированную кожу верхней половины спины 30 самок крыс линии Wistar [23]. На шестые сутки развивалось воспаление с гиперемией, отеком кожи, шелушением. Купирование воспаления проводили ежедневным однократным применением детского крема («Аванта», Россия) (отрицательный контроль), мази с топическим ГКС флуоцинолоном в концентрации 0,025% («Флуцинар», Jelfa, Польша) (положительный контроль), детского крема с добавлением секрета от обработанных дексаметазоном ММСК или секрета от необработанных ММСК. При этом у животных во всех 3 группах исследуемые препараты (секреты) или положительный контроль (флуоцинолон) наносили на область правой лопатки, а отрицательный контроль (детский крем) – на область левой лопатки, что позволило избежать необходимости создания отдельной контрольной группы и связанной с ней вариабельности индивидуального ответа. Детский крем был выбран в качестве основы, к которой добавлялся секрет ММСК, в силу его доступности и уже известных, клинически исследованных свойств крема.

Животных выводили из эксперимента путём цервикальной дислокации под наркозом. После визуальной оценки и фотопотоколирования подвешенных экспериментальным воздействиям участков тела, вырезали кусочки кожи или задней лапы, которые фиксировали в 10% растворе формалина. Гистологические препараты с окраской гематоксилином и эозином были изготовлены стандартным способом. Исследование микропрепаратов проводили под микроскопом «Ломо», оснащённым видеокамерой «DV1000» с программой «McrA-View 7.3.1.7» (ЛОМО-микросистемс, Россия). Для количественной оценки степени лимфоцитарной инфильтрации дермы производили полуколичественную оценку степени инфильтрации: слабая (1+) – до 5 лимфоцитов в площади сосочкового слоя; умеренная/средняя (2+) – 5–10 лимфоцитов; сильная/выраженная (3+) – больше 10 лимфоцитов. Данные статистически об-

рабатывали с помощью электронной таблицы MS Excel 2016, с вычислением среднего коэффициента инфильтрации. Дополнительно был проведен анализ частоты выраженной степени инфильтрации, которая сопровождается эпидермальными повреждениями, её зависимости от использованных для лечения препаратов.

Статистическая обработка результатов

Для статистического анализа использовали критерий Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса, критерий Фишера, U-критерий Манна-Уитни. Уровень значимости был принят $p < 0,05$. Вычисления производили с помощью программного обеспечения SPSSStatistics 17.0 (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По показателям продольных и поперечных размеров лап у крыс с АА не было выявлено статистически значимых различий между группами. Гистологическое исследование показало, что использование секрета ММСК привело к развитию хронического артрита и периартрита с гиперпластическим синовиом иммуновоспалительного характера без вовлечения костно-хрящевых структур (рис. 1, рис. 2). В контрольной группе при введении физиологического раствора отмечалось постепенное снижение воспалительных явлений в суставах лап, одинаковое с обеих сторон. Гистологически в синовиальной оболочке суставов были выявлены единичные полнокровные капилляры без признаков воспаления.

Макроскопическая оценка участков кожи с экспериментальным КАД в группе отрицательного контроля и их гистологическое исследование показали, что использованная модель заболевания адекватно воспроизводит изменения характерные для реакции гиперчувствительности замедленного типа: гиперемия и инфильтративно-воспалительные изменения кожи, преимущественно вокруг волосяных воронок наблюдались обильные чешуйчатые роговые массы, в некоторых случаях до образования крупных гиперкератотических бляшек. При гистологическом исследовании (рис. 3) выявлены воспалительные изменения за счет гиперкератоза, лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации с единичными эозинофилами, отека и сосудистой реакции.

При оценке степени лимфоцитарной инфильтрации с использованием градации по числу лимфоцитов в поле зрения установлено, что преобладали низкая (1+) и средняя (2+) степени, суммарно наблюдавшиеся в 67,2% оцененных участков дермы (таблица 1). Высокая степень лимфоцитарной инфильтрации преобладала в глубоких участках дермы. Лимфоцитарные и лимфоцитарно-макрофагальные инфильтраты часто располагались непосредственно вокруг венул, создавая картину лимфоцитарного венулярного васкулита, характерного для КАД. Отдельные скопления мононуклеарных элементов имели вид гранулем.

Таблица 1 – Индекс лимфоцитарной инфильтрации в разных группах лечения КАД

Группа	Индекс лимфоцитарной инфильтрации, среднее ± стандартное отклонение
Лечение детским кремом К(-)	2,8±0,1
Лечение флуоцинолоном К(+)	2,18±0,08*
Лечение детским кремом с секретомом ММСК	1,75±0,1*#
Лечение детским кремом с секретомом от обработанных дексаметазоном ММСК	1,76±0,1*#

Примечание: * – есть статистически значимые различия в сравнении с группой К(-), $p < 0,05$; # – есть статистически значимые различия в сравнении с группой К(+), $p < 0,05$

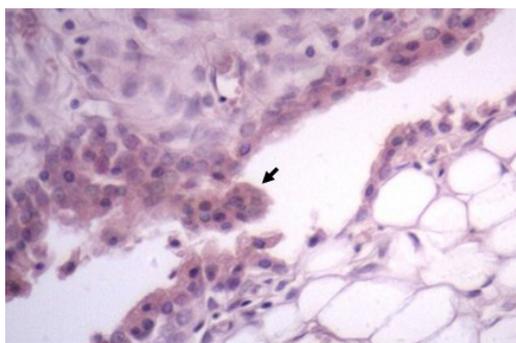


Рисунок 1 – Общий вид сустава с адьювантным артритом (стрелка)

Примечание: окрашено гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$

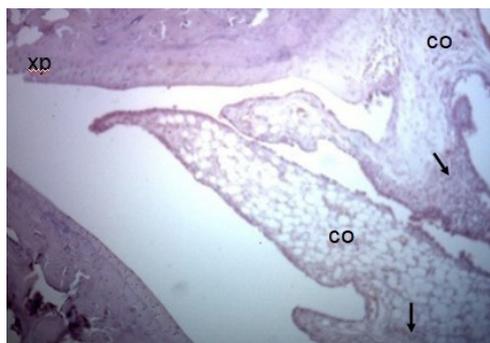


Рисунок 2 – Гиперплазия синовиоцитов с формированием псевдопапиллярных структур

Примечание: ХР – участок кости с суставным хрящом без видимых морфологических изменений; СО – складки синовиальной оболочки с диффузно-очаговой воспалительной инфильтрацией (стрелки)

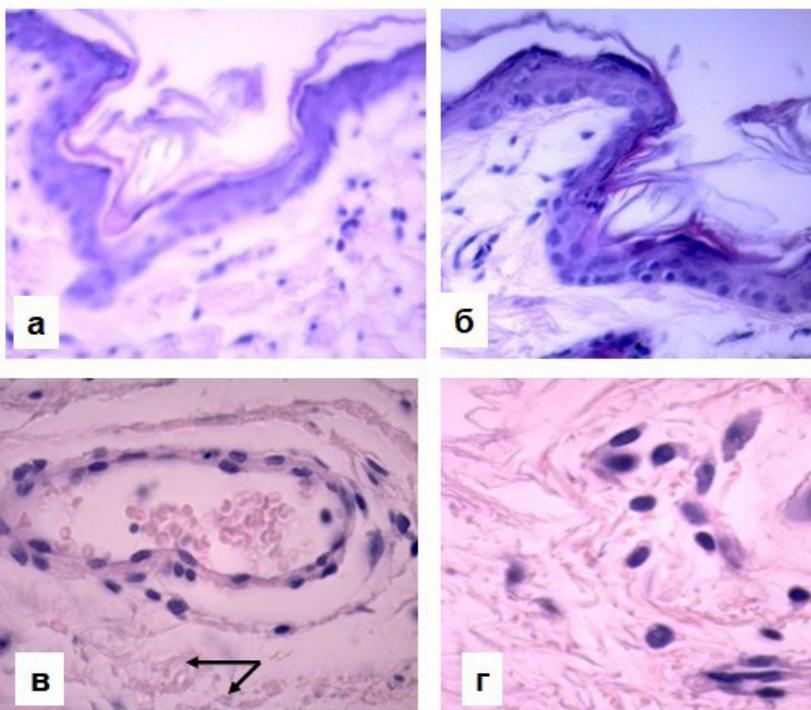


Рисунок 3 – Кожа с изменениями характерными для контактно-аллергического дерматита

Примечание: Окр. Гематоксилином и эозином, ул. 400; а, б – эпидермис с очагами гиперкертоза и слущивания рогового слоя, отек сосочкового слоя, низкая плотность лимфоцитарного инфильтрата; в – полнокровная вена на границе с гиподермой, периваскулярный отек; г – скопление незрелых фибробластов в сосочковом слое, воспалительные элементы отсутствуют

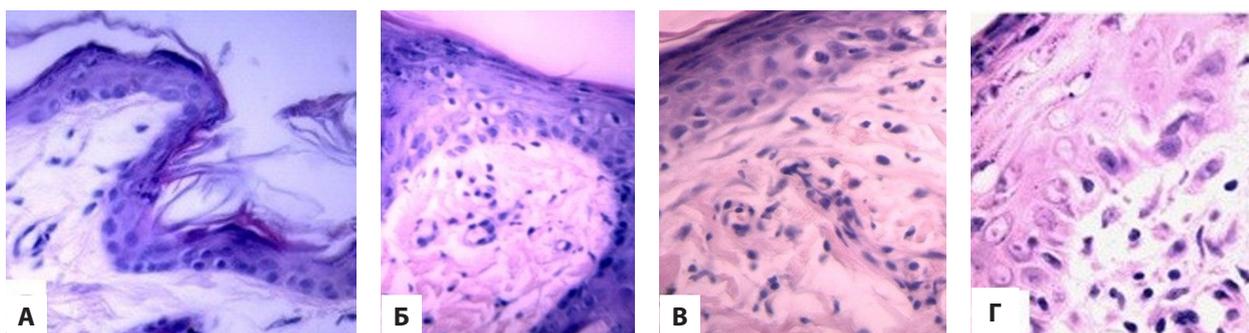


Рисунок 4 – Лимфоцитарный инфильтрат

Примечание: Окр. Гематоксилином и эозином, ув. 400. А – группа отрицательного контроля (детский крем); Б – группа положительного контроля (лечение флуоцинолоном); В – группа лечения детским кремом с добавлением секретома ММСК; Г – группа лечения детским кремом с добавлением секретома ММСК обработанных дексаметазоном

У животных с моделированным КАД и лечением мазью с 0,025% флуоцинолоном клиническое улучшение наступало на 3 сутки применения препарата. Наиболее существенным сохранившимся симптомом была диффузная эритема кожного покрова. Эпидермис при этом был без деструктивных изменений, имел изменения в виде сохранения очагов гиперкератоза, десквамации рогового слоя. Микроскопически этим изменениям соответствовали полнокровие дермальных микрососудов, отек сосочкового слоя, периваскулярный отек в глубже расположенных тканях. В эпидермисе – утолщение рогового слоя с участками его расслоения и десквамации как отдельными роговыми чешуйками, так и целыми пластами роговых масс. Оценка состава и выраженности клеточных инфильтратов в дерме выявила преобладание низкой и средней представленности лимфоцитарного компонента в целом дерме, с меньшей степенью в сосочковом слое в отличие от глубоких слоёв. Количественно (таблица 1) это отразилось в величинах индекса лимфоцитарной инфильтрации, который оказался достоверно ($p < 0,05$) меньше в сравнении с группой отрицательного контроля. Отдельно для сосочкового слоя индекс достоверно ($p = 0,004$) меньше, чем в группе отрицательного контроля. Дополнительно к этому при непараметрическом статистическом анализе влияния действия флуоцинолона на частоту высокой степени лимфоцитарной инфильтрации обнаружено, что в целом для дермы оно незначительное, а отдельно для сосочкового слоя достоверно ($p = 0,03$) среднее. Однако на качественном уровне и при количественной оценке лимфоцитарных инфильтратов проявляется неравнозначность эффекта в поверхностных участках дермы, где он более выражен, и в ее глубине. В сосочковом слое часто обнаруживались как скопления незрелых фибробластов, так и заметное количество фибробластов с морфологическими признаками функциональной активности.

Внешне состояние кожного покрова при использовании детского крема с секретомом от ММСК было сходным с наблюдавшимся при использовании флу-

оцинолона: диффузная эритема, мелкие чешуйчатые роговые наложения, очаги деструкции эпидермиса отсутствовали. Улучшение состояние кожного покрова наблюдалось также на 3 сутки после начала лечения, как и в группе флуоцинолона. При гистологическом исследовании также обнаружены сходные изменения в виде утолщения и десквамации рогового слоя эпидермиса, отека сосочкового слоя, полнокровия дермальных микрососудов. В сосочковом слое дермы были заметны скопления зрелых фибробластов с признаками функциональной активности. Высокая степень лимфоцитарной инфильтрации выявлена только в 10% исследованных участков кожи. Соответственно индекс инфильтрации оказался достоверно ($p = 0,05$) меньшим в сравнении с отрицательным контролем, и положительным контролем (лечение флуоцинолоном) для дермы в целом ($p < 0,05$), но статистически не отличался от показателя сосочкового слоя в этой группе (рис. 4).

По непараметрическим критериям степень влияния секретомы на частоту высокой степени лимфоцитарной инфильтрации оказалась средней, но достоверной ($p = 0,016$). Таким образом, секретом ММСК оказывает сопоставимый с флуоцинолоном положительный эффект. Имеется определенное превосходство секретомы, заключающееся в наличии противовоспалительного эффекта во всей толще дермы, о чем свидетельствуют приведенные статистические показатели.

В экспериментальной группе с применением крема с секретомом от предварительно обработанных дексаметазоном ММСК макро-, и микроскопическая картины изменений кожи оказались сходными с таковыми в предыдущей группе. Однако клиническое улучшение наблюдалось раньше – на 2 сутки после начала терапии данным кремом. Кожный покров эритематозный, с пылевидными и мелкочешуйчатыми роговыми наложениями, но без деструктивных очагов в эпидермисе. Гистологически выявлялись очаги утолщения эпидермиса, в основном за счет рогового слоя, который характеризовался расслоениями и слущиванием пластов роговых масс. Сосочко-

вый слой дермы с разной степенью отека. Клеточный инфильтрат качественно и количественно отличался в разных участках дермы и в зависимости от глубины. В сосочковом слое при преобладании низкой и средней степеней лимфоцитарной инфильтрации (суммарно 71% оценённых участков) встречались немногочисленные очаги с плотным лимфоцитарным инфильтратом, проникающим в ростковый слой эпидермиса с формированием картин периполеза. В глубоких слоях дермы и в прилежащей гиподерме инфильтрат полиморфнее за счет присутствия многочисленных эозинофилов и частично дегранулированных тучных клеток. Количественная оценка лимфоцитарной инфильтрации дала сходные с предыдущей группой результаты, в том числе в сопоставлении с группами отрицательного и положительного контролей. Индекс лимфоцитарной инфильтрации в сравнении с группой отрицательного контроля достоверно меньше ($p=0,001$), но данное отличие достоверно также только в сопоставлении с дермой в целом. Между собой группы с секретомом и детским кремом по этому показателю не отличались. По непараметрическим оценкам влияние данного препарата на частоту высокой лимфоцитарной инфильтрации оказалось слабым.

По основным морфологическим критериям имеются достоверные противовоспалительные эффекты крема с секретомом от обработанных дексаметазоном ММСК и необработанных ММСК, не уступающие препарату сравнения – флуоцинолону, даже превосходящие его распространенностью на всю толщу дермы. Таким образом, препараты подействовали равноценно, но по непараметрическим статистическим критериям влияния на частоту высокой степени лимфоцитарной инфильтрации выявляется определенное преимущество крема с секретомом ММСК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в клинических исследованиях изучается терапевтическое действие ММСК и их экзосом при остеоартрите [24, 25]. Показана способность человеческих ММСК жировой ткани регулировать широкий спектр медиаторов воспаления вместе с подавлением Th1 и Th17 ответов при ревматоидном артрите [26]. Применение клеток или их экзосом, содержащих спектр различных биологически активных веществ, может выступать терапевтическим преимуществом наряду с обычными протоколами лечения с использованием иммунодепрессантов. В литературе так же есть данные об изучении действия стимулированных с помощью IFN γ и TNF α *in vitro* ММСК или их секретом на модель остеоартрита. В данном случае инъекция секретомом ММСК, которые были выделены из костного мозга пожилых людей, как и инъекция самих клеток, приводила к раннему уменьшению боли и оказывала протекторное действие на развитие повреждения хряща, без эффекта на суб-

хондральную кость у мышей [27]. В другом источнике описан эксперимент с индуцированием у мышей остеоартрита, который затем лечили введением секретомом ММСК [28]. Терапевтическое воздействие секретомом ММСК в данном случае привело к значительному снижению синовиального инфильтрата и гиперплазии синовиальной интимы и хряща по сравнению с группой контроля (введение питательной среды). Наблюдаемый в нашем эксперименте эффект секретомом ММСК может быть обусловлен присутствием крупномолекулярных ксеногенных белков в используемом секретомом человеческих ММСК, которые также способны вызвать иммунный ответ – коллагеновый артрит. Присутствующие в секретомом противовоспалительные и иммуносупрессивные факторы оказались не в состоянии предотвратить его развитие в данной модели. Описанные в литературе результаты не согласуются с нашими, поскольку авторы применяли секретомом от аллогенных ММСК. Показанная нами эффективность крема с секретомом ММСК на модели КАД, являющейся демонстрацией классической местной реакции гиперчувствительности замедленного типа, не уступает топическому ГКС высокой активности – флуоцинолону, но даже превосходит его по параметру снижения лимфоцитарной инфильтрации ($p<0,05$). При этом, поскольку крупномолекулярные белки не способны проникать через эпидермис в глубокие слои кожи, то мы на модели КАД не наблюдали эффекта усиления воспаления, как на модели АА. Отличие в эффективности секретомом на двух моделях заболеваний может быть связано также с тем, что для использования на системных моделях требуется очистка секретомом от крупномолекулярных соединений и/или использования аллогенных клеток для его получения.

Показано, что экстракт ММСК из пуповины человека подавляет Т-клеточный ответ и NF- κ B-зависимую активацию транскрипции в кератиноцитах, тем самым снижая воспаление при атопическом дерматите [29]. В качестве терапии кожных заболеваний также изучаются экзосомы ММСК жировой ткани [30, 31], которые снижают экспрессию провоспалительных цитокинов. Из обзоров доклинических исследований видно, что использование кондиционной среды от ММСК может быть дешевле, быстрее и может дать равноценный или более мощный эффект, чем препарат на основе внеклеточных везикул ММСК для лечения многих заболеваний. На сегодняшний день не было сообщений о том, что концентраты питательной среды от ММСК не безопасны по сравнению с внеклеточными везикулами [32]. Однако пока не известно, какие именно молекулы секретомом отвечают за лечебный эффект. Показано, что при терапии различных органов и систем играют роль как белки и микроРНК, так и липиды, длинные не кодирующие РНК [32]. Сами клетки также оказались эффективны в терапии атопического дерматита как у

собак [33] и мышей [34], так и у людей [35]. При этом гистологическое исследование кожи мышей с экспериментальным атопическим дерматитом выявило, что эпидермальная гиперплазия и инфильтрация лимфоцитов, вызванные индукцией заболевания, были ослаблены внутривенным введением клеток дозозависимым образом. В данной статье показано, что клетки после системного введения покидают очаг воспаления в течение 2 часов и оказывают свой терапевтический эффект паракринно [34]. С учетом данных фактов, нами был выбран крем с секретомом клеток для местного лечения КАД.

Показано, что внеклеточные везикулы от ММСК подавляют воспаление на мышинной модели КАД путём ингибирования цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1 типа, а также снижения уровня TNF- α и IFN- γ . При этом везикулы индуцировали CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки и повышали уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [36]. Другие авторы показали, что у мышей с КАД одновременное лечение ММСК и дексаметазоном не влияло на противовоспалительное действие клеток. Кроме того, совместное введение ММСК с дексаметазоном снижало локальную экспрессию IFN- γ и TNF- α в ткани уха мышей с КАД [37]. Возможно, перечисленные выше механизмы действия имели место и в нашем исследовании при использовании крема с секретомом ММСК.

Действие крема с секретомом ММСК оказало видимый эффект на коже на день раньше, чем топический ГКС. Снижение степени лимфоцитарной инфильтрации было достоверно выше при использовании крема с секретомом ($p < 0,05$), чем флуоци-

нолона. В отличие от секретомов ММСК, топические ГКС имеют ряд недостатков. Во-первых, ГКС могут приводить к местным и системным побочным эффектам, такие как атрофия эпидермиса, инфекционные осложнения, влияние на все виды обмена веществ при резорбции с больших поверхностей, что маловероятно при использовании секретомов ММСК в силу наличия регенеративных свойств и отсутствия значимого влияния на обменные процессы при применении ММСК во множестве исследований. Во-вторых, противопоказаниями к применению являются ожоги и раны, что напротив, может быть показанием для использования секретомов ММСК также вследствие их регенеративных свойств [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, противовоспалительная активность комплекса гуморальных факторов секрета как нативных, так и индуцированных дексаметазоном *in vitro* ММСК при местном применении способствует значимому снижению воспаления кожи на модели контактно-аллергического дерматита, с почти суточным преимуществом у секрета индуцированных ММСК. При этом индекс лимфоцитарной инфильтрации достоверно ниже при использовании секретомов, чем после применения топического ГКС. Это является основанием для дальнейшего изучения терапевтических эффектов различных фракций секрета ММСК и раскрытия его механизма действия. Однако для изучения системного эффекта секрета, необходимо проводить его очистку от крупных молекул или использовать для его получения аллогенные ММСК.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Авторы заявляют о финансировании со стороны ООО «Инновационный центр «Бирюч – новые технологии» и ООО «Центр клеточных технологий Бирюч».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

П.А. Голубинская – написание текста статьи, выполнение лабораторных работ, проведение экспериментов с животными, анализ данных; М.В. Сарычева – проведение лабораторных работ и экспериментов с животными, анализ данных; А.А. Должиков – изготовление гистологических препаратов, анализ данных; В.П. Бондарев – изготовление гистологических препаратов, анализ данных; М.С. Стефанова – анализ данных; В.О. Солдатов – проведение экспериментов с животными; С.В. Надеждин – выполнение лабораторных работ; М.В. Корокин – проверка критически важного интеллектуального содержания; М.В. Покровский – разработка концепции исследования; Ю.Е. Бурда – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Hoffman A.M., Dow S.W. Concise review: stem cell trials using companion animal disease models // *Stem Cells*. – 2016. – Т. 34, №. 7. – P. 1709–1729. DOI: 10.1002/stem.2377.
- Kim H.S., Lee J.H., Roh K.H., Jun H.J., Kang K.S., Kim T.Y. Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies // *Stem cells*. – 2017. – Т. 35, №. 1. – P. 248–255. DOI: 10.1002/stem.2401.
- Freitag J., Bates D., Boyd R., Shah K., Barnard A., Huguenin L., Tenen A. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy—a review // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2016. – Т. 17, №. 1. – P. 230. DOI:10.1186/s12891-016-1085-9.

4. Golchin A., Farahany T.Z., Khojasteh A., Soleimanifar F., Ardeshiryajimi A. The clinical trials of mesenchymal stem cell therapy in skin diseases: an update and concise review // *Current stem cell research & therapy*. – 2019. – Т. 14, №. 1. – P. 22–33. DOI:10.2174/1574888X13666180913123424.
5. Gwam C., Mohammed N., Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review // *Annals of Translational Medicine*. 2021. № 1 (9). С. 70. Jiang S. [и др.]. Research Progress on Stem Cell Therapies for Articular Cartilage Regeneration // *Stem Cells International*. 2021. (2021). С. 8882505. DOI: 10.21037/atm-20-5030.
6. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function // *Stem Cell Research & Therapy*. 2016. № 1 (7). DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7.
7. Liu A., Zhang X., He H., Zhou L., Naito Y., Sugita S., Lee J. W. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2020. – Т. 20. – №. 2. – С. 125-140. DOI:10.1080/14712598.2020.1689954.
8. Kucharzewski M. Rojczyk E., Wilemska-Kucharzewska K., Wilk R., Hudecki J., Los M. J. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing // *European Journal of Pharmacology*. 2019. (843). С. 307–315. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.12.012.
9. Wang H., Pang B., Li Y., Zhu D., Pang T., Liu Y. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells // *Cytotherapy*. 2012. № 4 (14). С. 423–430. DOI: 10.3109/14653249.2011.652735.
10. Li T., Xu Y., Wang Y., Jiang Y. Differential expression profiles of long noncoding RNAs and mRNAs in human bone marrow mesenchymal stem cells after exposure to a high dosage of dexamethasone // *Stem Cell Research & Therapy*. 2021. № 1 (12). С. 9. DOI: 10.1186/s13287-020-02040-8.
11. Schneider N., da Costa Gonçalves F., Pinto F. O., da Costa Lopez P. L., Araujo A. B., Pfaffenseller, Passos E.P., Cirne-Lima E.O., Meurer L., Lazzaron M., Paz A. H. Dexamethasone and azathioprine promote cytoskeletal changes and affect mesenchymal stem cell migratory behavior // *PLoS one*. 2015. № 3 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0120538.
12. Michelo C. M., Fasse E., Van Cranenbroek B., Linda K., van der Meer A., Abdelrazik H., Joosten I. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early Natural Killer cell activation // *Transplant Immunology*. 2016. (37). С. 1–9. DOI: 10.1016/j.trim.2016.04.008.
13. Nauta A. J., Kruijselbrink A. B., Lurvink E., Willemsze R., Fibbe W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+–derived and monocyte-derived dendritic cells // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2006. № 4 (177). С. 2080–2087. DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2080.
14. Del Fattore A., Luciano R., Pascucci L., Goffredo B. M., Giorda E., Scapaticci M., Fierabracci A., Muraca M. Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes // *Cell Transplantation*. 2015. № 12 (24). С. 2615–2627. DOI: 10.3727/096368915X687543.
15. Gieseke F., Kruchen A., Tzaribachev N., Bentzien F., Dominici M., Müller I. Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation // *European Journal of Immunology*. 2013. № 10 (43). С. 2741–2749. DOI: 10.1002/eji.201343335.
16. J. Salgado A., L. Reis R., Sousa, N., M. Gimble, J. Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine // *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2010. № 2 (5). С. 103–110. DOI: 10.2174/157488810791268564.
17. Gwam C., Mohammed N., Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review // *Annals of Translational Medicine*. 2021. № 1 (9). С. 70. DOI: 10.21037/atm-20-5030.
18. Maumus M., Jorgensen C., Noël D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes // *Biochimie*. 2013. № 12 (95). С. 2229–2234. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.04.017.
19. Голубинская П. А., Сарычева М. В., Пузанов М. В., Бурда Ю. Е. Применение секретомы стволовых клеток в лечении адьювантного артрита, эндотоксического шока и кожного заболевания на животных моделях. // *Биология стволовых клеток. Гены и клетки*. – 2020. – Т. 15, №3, Приложение.
20. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Щелкунов С.Н. Ревматоидный артрит: лабораторные модели заболевания // *Медицинская иммунология*. – 2015. – Т. 17, №. 3. DOI:10.15789/1563-0625-2015-3-203-210.
21. Fajka-Boja R., Urbán V. S., Szebeni G. J., Czibula Á., Blaskó A., Kriston-Pál É., Makral., HornungÁ., SzabóE., UherF., G. ThanN., MonostoriÉ., Monostori É. Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells // *Cytotherapy*. – 2016. – Т. 18, №. 3. – P. 360–370. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.12.004.
22. Zhang Y., Ge X.H., Guo X.J., Guan S.B., Li X.M., Gu, W., Xu W.G. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the function of dendritic cells by secreting galectin-1 // *BioMed research international*. – 2017. – Т. 2017. DOI: n10.1155/2017/3248605.
23. Бурда Ю.Е., Сарычева М.В. Разработка модели контактно-аллергического дерматита у крыс линии Wistar. Фармакология живых систем: 6 лет пассионарного развития: сб. материалов всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Белгород, 9–13 апр. 2018 г. / М-во образования и науки РФ, НИУ «БелГУ»; под ред. М.В. Покровского. – Белгород, 2018. – С. 35–36.
24. Freitag J., Bates D., Boyd R., Shah K., Barnard A., Huguenin L., Tenen A. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy—a review // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2016. – Т. 17, No.1. – P. 230. DOI:10.1186/s12891-016-1085-9.
25. Toh W.S., Lai R.C., Hui J.H.P., Lim S.K. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2017. – Т. 67. – P. 56–64. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.11.008.
26. Baharlou R., Rashidi N., Ahmadi-Vasmehjani A., KhoubyariM., Sheikh M., Erfanian S.Immunomodulatory effects of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on T cell subsets in patients with rheumatoid arthritis // *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. – 2019. – Т. 18, No.1. – P. 114–119. DOI: 10.18502/ijaai.v18i1.637.
27. Khatab S., van Osch G., Kops N., Bastiaansen-Jenniskens Y., Bos K., Verhaar J.A.N., Bernsen M.R., Buul G.M.Mesenchymal stem cell secretome reduces pain and prevents

- cartilage damage in a murine osteoarthritis model // European cells & materials. – 2018. – Т. 36. – P. 218–230. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.049.
28. Kay A.G., Long G., Tyler G., Stefan A., Broadfoot S. J., Piccinini A. M., Middleton J., Kehoe O. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis // Scientific reports. – 2017. – Т. 7, No.1. – P. 1–11. DOI:10.1038/s41598-017-18144-w.
 29. Song J., Kang H.J., Ju H.M., Park A., Park H., Hong J.S., Kim C.J., Shim J.-Y., Yu J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts ameliorate atopic dermatitis in mice by reducing the T cell responses // Scientific reports. – 2019. – Т. 9, No.1. – P. 1–9. DOI:10.1038/s41598-019-42964-7.
 30. Xiong M., Zhang Q., Hu W., Zhao C., Lv W., Yi Y., Wu Y., Wu, M. Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells: The Emerging Roles and Applications in Tissue Regeneration of Plastic and Cosmetic Surgery // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Т. 8. – P. 931. DOI:10.3389/fcell.2020.574223.
 31. Cho B.S., Kim J.O., Ha D.H., Yi Y.W. Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis // Stem cell research & therapy. – 2018. – Т. 9, No. 1. – P. 187. DOI:10.1186/s13287-018-0939-5.
 32. Bogatcheva N. V., Coleman M. E. Conditioned medium of mesenchymal stromal cells: a new class of therapeutics // Biochemistry (Moscow). – 2019. – Т. 84. – No. 11. – P. 1375–1389. DOI: 10.1134/S0006297919110129.
 33. Villatoro A.J., Hermida-Prieto M., Fernández V., Fariñas F., Alcoholado C., Rodríguez-García M. I., Becerra J. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety // Veterinary Record. – 2018. DOI: 10.1136/vr.104867.
 34. Shin T.H., Lee B.C., Choi S.W., Shin J.H., Kang I., Lee J.Y., Kim J.-J., Lee H.-K., Jung J.-E., Choi Y.-W., Lee S.-H., Yoon J.-S., Choi J.-S., Lee C.-S., Seo Y., Kim H.-S., Kang K.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation // Oncotarget. – 2017. – Т. 8, No. 1. – P. 512. DOI: 10.18632/oncotarget.13473.
 35. Daltro S.R.T., Meira C.S., Santos I.P., Ribeiro dos Santos R., Soares M.B.P. Mesenchymal Stem Cells and Atopic Dermatitis: A Review // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Т. 8. – P. 326. DOI:10.3389/fcell.2020.00326.
 36. Guo L., Lai P., Wang Y., Huang T., Chen X., Luo C., Geng S., Huang X., Wu S., Ling W., Huang L., Du X., Weng J. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells prevent contact hypersensitivity through the suppression of Tc1 and Th1 cells and expansion of regulatory T cells // International immunopharmacology. – 2019. – Т. 74. – P. 105663. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.05.048.
 37. Wang D., Sun Y.Q., Gao W.X., Fan X.L., Shi J.B., Fu, Q.L. An in vitro and in vivo study of the effect of dexamethasone on immunoinhibitory function of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells // Cell transplantation. – 2018. – Т. 27, No.9. – P. 1340–1351. DOI: 10.1177/0963689718780194.

АВТОРЫ

Голубинская Полина Александровна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1765-9042. E-mail: polinapigeon@gmail.com

Сарычева Марина Владиславовна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-3618-5284. E-mail: dr.sarycheva@mail.ru

Должиков Александр Анатольевич – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-2798-513X. E-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru

Бондарев Вячеслав Павлович – начальник бюро, врач-патологоанатом высшей категории, Областное патологоанатомическое бюро комитета здравоохранения Курской области. E-mail: svbond46@yandex.ru

Стефанова Мария Сергеевна – врач-терапевт, ОГБУЗ «Городская больница №2» г. Белгород. ORCID ID: 0000-0001-5549-1634. E-mail: stefanova-ms@yandex.ru

Солдатов Владислав Олегович – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии,

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-9706-0699. E-mail: zinkfingers@gmail.com

Надеждин Сергей Викторович – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии института фармации, химии и биологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-6249-2464. E-mail: nadezdin@bsu.edu.ru

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1493-3376. E-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Бурда Юрий Евгеньевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1183-4436. E-mail: burda@bsu.edu.ru