

Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Приволжский исследовательский медицинский университет»

На правах рукописи

Васильева Екатерина Александровна

**Цитофизиология фибробластов кожи детей подросткового возраста при
воспалительных заболеваниях кишечника**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор И.В. Мухина

Москва

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Физиологическая роль фибробластов	14
1.1.1 Спонтанная и реактивная секреция биологически активных компонентов фибробластами	14
1.1.2 Возраст-зависимые изменения функциональной активности фибробластов.....	17
1.1.3 Особенности дермальных фибробластов.....	21
1.2 Функциональная активность интестинальных фибробластов при локальном воспалении в кишечнике.....	24
1.2.1 Особенности функционирования иммунной системы при хроническом воспалении кишечника (болезни Крона и язвенном колите)....	24
1.2.2 Особенности функционирования интестинальных фибробластов при локальном воспалении в кишечнике.....	27
1.3 Иммуномодулирующее действие липополисахарида.....	30
1.4 Биомедицинские клеточные продукты для терапии воспалительных заболеваний кишечника.....	33
1.5 Заключение по обзору литературы.....	35
Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Объект исследования.....	38
2.2 Схема экспериментов <i>in vitro</i>	39
2.3 Выделение и культивирование дермальных фибробластов.....	41
2.4 Морфологические исследования, подсчёт и оценка жизнеспособности культивируемых клеток.....	42
2.5 Клоногенный анализ.....	43
2.6 Определение времени удвоения популяции фибробластов.....	43

2.7 Иммунофенотипирование клеток.....	44
2.8 Исключение микробной и вирусной контаминации.....	45
2.8.1 Полимеразная цепная реакция.....	45
2.8.2 Микробиологический посев на стерильность.....	45
2.9 Иммуноферментный анализ секрета дермальных фибробластов.....	46
2.10 Иммуноблоттинг.....	46
2.11 Вызванная секреторная активность дермальных фибробластов.....	47
2.12 Статистическая обработка результатов.....	48
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1 Морфология, клоногенный потенциал и антигенный фенотип дермальных фибробластов детей подросткового возраста в норме и при локальном воспалении в кишечнике.....	49
3.1.1 Морфология дермальных фибробластов.....	49
3.1.2 Клоногенный потенциал дермальных фибробластов.....	53
3.1.3 Жизнеспособность дермальных фибробластов	62
3.1.4 Антигенный фенотип дермальных фибробластов.....	62
3.1.5 Контаминация.....	66
3.2 Функциональная характеристика дермальных фибробластов здоровых детей и с воспалительными заболеваниями кишечника.....	66
3.2.1 Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и супернатанте дермальных фибробластов детей	66
3.2.2 Спонтанная секреция дермальными фибробластами ростовых факторов	72
3.2.3 Спонтанная продукция дермальными фибробластами растворимых компонентов внеклеточного матрикса (макромолекул коллагена IV типа, фибронектин).....	77
3.2.4 Влияние различных сроков культивирования на стабильность	

секретома дермальных фибробластов.....	83
3.3 Индуцированная секреция дермальных фибробластов	83
3.4 Обсуждение полученных результатов	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Важной проблемой клеточной биологии является исследование адаптации клеток к действию различных локальных и системных стрессорных факторов. Одними из таких клеток, способных к участию в системном ответе, являются фибробласты. Клетки фибробластического дифферона входят в состав стромы паренхиматозных органов и соединительнотканых оболочек. Фибробласты принимают участие в синтезе компонентов межклеточного матрикса, в организации местных защитных реакций, в формировании грануляционной ткани в пролиферативной фазе физиологической и репаративной регенерации (Cole M.A. et al., 2018). Они создают микроокружение для других клеток, регулируют их дифференцировку и рост, выделяя в межклеточное пространство факторы роста, цитокины, оказывающие аутокринный и паракринный эффекты (Stunova A., Vistejnova L., 2018). Фибробласты способны резорбировать гипертрофированный внеклеточный матрикс, фагоцитировать апоптотические нейтрофилы, праймировать моноциты для последующего модулирования клеток адаптивной иммунной системы (Hall S.E. et al., 1994; Owens B. et al., 2013; Witte S. et al., 2017).

В онтогенезе пролиферативная и миграционная способность, синтетическая активность фибробластов претерпевают возрастные изменения. Процесс старения связан с уменьшением числа юных и зрелых фибробластов, что отражается на качественном составе внеклеточного матрикса (ВКМ) (Ярыгин К.Н. и др., 2009; Haydont V., Bernard B.A., Fortunel N.O., 2018).

В ряде работ описана важная роль фибробластов в патогенезе воспаления, а также в процессе заживления повреждений тканей, при онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях (Greaves N.S. et al., 2013; Higashino N. et al., 2019; Chen J.Q. et al., 2019).

Известно, что при хроническом течении местного воспалительного процесса повышен риск развития системных проявлений воспаления. Так, например, у одной трети пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) развиваются внекишечные системные поражения (Veloso F.T., 2011; Fousekis F.S. et al., 2018). Патогенез внекишечных проявлений, затрагивающих, в частности, кожу при данных патологиях, остается невыясненным. Из клинических наблюдений известно, что болезни органов пищеварения оказывают значительное влияние на состояние кожи, а симптомы ее поражения могут свидетельствовать о патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Физиологические механизмы этой взаимосвязи могут быть различны, а в ряде случаев остаются до конца неясными. Тем не менее, внекишечные симптомы могут играть ключевую роль в формировании хронического течения первичного заболевания. В связи с этим функциональное состояние фибробластов кожи при гастроэнтерологических заболеваниях, вероятно, может иметь большое значение для оценки активности воспалительного и дегенеративного процессов в кишечнике, их динамики и назначения адекватной терапии. Усиление внимания к проблеме функционального состояния фибробластов при воспалении связано также с развитием регенеративной медицины и разработкой новых способов клеточной терапии с применением мезенхимальных стромальных клеток с целью восполнения дефекта кишечной стенки, вызванным хроническим воспалением кишечника (URL: <http://www1.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=3eb0aceee9a7b619c9d3ae6894497a40>).

Актуальность изучения функции фибробластов кожи детей при их вовлечении в системный ответ на хроническое воспаление в кишечнике, например, при болезни Крона (БК) и язвенном колите (ЯК), обусловлена и тем, что во всем мире в последние десятилетия наблюдается омоложение и стремительный рост заболеваемости ВЗК среди детей (Benchimol E.I. et al., 2017). В западных странах заболеваемость ВЗК достигает 58 случаев на 100 000 детей в

год (Benchimol E.I. et al., 2011). В то же время по-прежнему остается малоизученной функциональная активность фибробластов кожи и их значение в развитии адаптационных и компенсаторно-приспособительных процессов у детей при наличии воспалительного процесса в организме.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день в клеточной биологии достаточно хорошо изучены функциональные характеристики фибробластов кожи человека. Описаны фибробласты, полученные из разных источников, регионов организма. Однако накопленные данные о секреторной активности фибробластов получены преимущественно в экспериментальных моделях или от взрослых доноров (Srirama G., Bigliardi P.L., Bigliardi-Qi M., 2015; Tigges J. et al., 2014). Описаны возрастные изменения фибробластов. Так, с возрастом повышается уровень секреции ими IL-1 β , IL-4, IL-15, INF γ , CXCL-10, TNF α , фибронектина, коллагена III типа, относительно коллагена I типа (Sprenger C.C., Plymate S.R., Reed M.J., 2010) и замедляется синтез гиалуроновой кислоты и гликозаминогликанов (Lee B.M., Han D.G., Choi W.S., 2015), а также изменяется экспрессия белков, которые участвуют в регуляции клеточного цикла (Waldera-Lupa D.M., Stuhler K., 2015), наблюдаются нарушения клеточной организации, изменения цитоскелета, что приводит к морфологическим изменениям клетки в целом, таким как увеличение ее объема и поверхности (Reed M.J., Ferrara N.S., Vernon R.B., 2001; Lämmermann I. et al., 2018). В фибробластах взрослых организмов снижается экспрессия белков, участвующих в барьерной проницаемости и подвижности (Fukazawa A. et al., 2008; Boulch M.L. et al., 2017). Однако следует отметить, что практически не встречаются данные о функциональной характеристике фибробластов человека в определенные периоды онтогенеза, в частности в подростковом возрасте, характеризующимся быстрым ростом и половым созреванием организма.

Остается невыясненным вопрос, насколько долгосрочны изменения морфофункциональных свойств фибробластов вследствие воздействия на них сходных условий микроокружения тканевой ниши и насколько реактивно фибробласты реагируют перестройкой в экспрессии генома на перемещение их в новые условия, например, культивирования.

В связи с этим, необходимо проведение исследований функциональной активности фибробластов кожи в норме и при ВЗК у детей, что позволит расширить фундаментальные знания о секреторной функции фибробластов кожи, а также разработать новые диагностические критерии воспалительных заболеваний.

Цель исследования – определить морфофункциональные свойства фибробластов кожи детей в норме и особенности их реактивности при воспалительных заболеваниях кишечника.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ морфологии, фенотипа и клоногенного потенциала фибробластов кожи детей подросткового возраста в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника.

2. Определить секреторную активность – продукцию цитокинов, ростовых факторов, молекул внеклеточного матрикса культивируемых фибробластов кожи у детей подросткового возраста в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника.

3. Выявить особенности стимулированного индуктором воспаления липополисахаридом грамотрицательных бактерий секрета культивируемых фибробластов кожи в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника.

4. Оценить стабильность секрета фибробластов кожи детей в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника на различных сроках культивирования *in vitro*.

Объект и предмет исследования – фибробласты дермы детей, их цитофизиологические особенности при воспалении кишечника.

Теоретической и методологической базой диссертационного исследования являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященные клеточной биологии фибробластов, патогенезу воспалительных заболеваний кишечника.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций, соответствующие научной тематике.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 5, 6.

Научная новизна

Впервые выявлены различия между фибробластами кожи детей подросткового возраста в условиях физиологической нормы и при воспалительных заболеваниях кишечника по морфологическим характеристикам, клоногенному потенциалу, поверхностным маркерам и молекулам секрета.

Впервые показано, что фибробласты кожи предплечья вовлечены в системный ответ на хроническое локальное воспаление в кишечнике, продуцируют провоспалительный секрет с повышенным содержанием IL-1 β , FAP, PDGF-BB, фибронектина, но сниженным содержанием IL-10, FGFb и

макромолекул коллагена IV типа, отсутствием изменений в секреции TGF β 1, снижением соотношения IL-1RA/IL-1 β .

На фоне воспалительных заболеваний кишечника липополисахарид *E. coli* O55:B5 подавляет процесс образования макромолекул коллагена IV типа фибробластами кожи, в то время как его воздействие на фибробласты кожи детей в условиях физиологической нормы не выявлено.

Провоспалительный профиль спонтанно секретируемых биологически активных молекул фибробластами кожи детей с воспалительными заболеваниями кишечника сохраняется в течение 6 пассажей при культивировании фибробластов кожи *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют имеющиеся фундаментальные знания о секреторной функции фибробластов кожи, а также о роли индукторов воспаления (липополисахарид *Escherichia coli*) в активации секреторной функции фибробластов кожи детей подросткового возраста при физиологической норме и воспалении. На основании выявленных особенностей секрета фибробластов кожи детей высказано предположение о том, что фибробласты кожи участвуют в системном ответе на хроническое локальное воспаление в кишечнике, изменяя свой нормальный секреторный фенотип на фенотип провоспалительной направленности, снижением синтеза и выделения макромолекул сетепобразующего коллагена IV типа, участвующего в образовании базальной мембраны, играющей важную роль в структурной целостности слоев кожи.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием возможности практического использования функциональных характеристик фибробластов кожи в качестве диагностических критериев и мониторинга хронического воспаления, в частности, при воспалительных заболеваниях кишечника у детей. Кроме того, выявленное постоянство провоспалительного

секретома длительно культивируемых фибробластов кожи детей подросткового возраста, предполагает пересмотр возможности использования аутологичных фибробластов для клеточной терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей.

Основные выводы и результаты работы использованы в учебном процессе при разработке соответствующих спецкурсов для студентов биологических и медицинских факультетов вузов.

Методология и методы исследования

Методологически работа построена на системном подходе и комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных авторов в области цитологических и функциональных особенностей фибробластов кожи человека различных возрастных групп в условиях физиологической нормы и при патологических состояниях, и их сравнении с данными, полученными в результате диссертационного исследования. На основании анализа были сформулированы задачи работы – выявление морфофункциональных особенностей фибробластов кожи детей с воспалительными заболеваниями кишечника. В работе использованы культуры фибробластов кожи детей с воспалительными заболеваниями кишечника и условно здоровых детей, а также комплекс методов: проточная цитофлуориметрия, микроскопия, клональный анализ, определение времени удвоения популяции, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Секреторный фенотип фибробластов кожи детей подросткового возраста с воспалительными заболеваниями кишечника ассоциирован с хроническим воспалительным процессом в кишечном тракте и имеет провоспалительную направленность со сниженным выделением макромолекул коллагена IV типа;

2. Липополисахарид *E. coli* O55:B5 подавляет продукцию макромолекул коллагена IV типа культивируемыми фибробластами кожи у детей с воспалительными заболеваниями кишечника;

3. Спонтанная секреция биологически активных молекул фибробластами кожи детей в условиях физиологической нормы и дистанционного локального воспаления в кишечнике устойчива в процессе длительного культивирования *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, использованием современных адекватных методов исследования и корректных методов статистического анализа.

Материалы диссертации доложены: на «Юбилейной двадцатой объединенной Российской гастроэнтерологической недели с международным участием» (Москва, 2014), Общероссийской научно-практической конференции «Технологический прогресс в лабораторной медицине – клинические перспективы и экономические пределы» (Москва, 2014), 15-м Международном медицинском форуме 23-й специализированной выставке «Медицина+» (Нижний Новгород, 2014), XV Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015), XXIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), XIX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016), XVI Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017).

Личное участие автора заключалось в планировании, проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, 6 из которых – статьи в журналах из Перечня РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 1 статья – в другом издании, 13 – материалы конференций.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на русском языке, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 16 отечественных и 199 зарубежных источника, приложения. Работа изложена на 160 страницах печатного текста, иллюстрирована 13 рисунками и 19 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Физиологическая роль фибробластов

1.1.1 Спонтанная и реактивная секреция биологически активных компонентов фибробластами

Преобладающей популяцией волокнистой соединительной ткани являются клетки фибробластического дифферона. В эмбриональном периоде ряд мезенхимных клеток зародыша дают начало дифферону фибробластов, к которому относят: стволовые клетки, полустволовые клетки-предшественники, малоспециализированные фибробласты, дифференцированные фибробласты (зрелые, активно функционирующие), фиброциты (дефинитивные формы клеток), миофибробласты и фиброкласты.

Физиологическая роль фибробластов заключается в способности продуцировать компоненты ВКМ. Основу ВКМ составляют волокнистые структуры (фибриллярные и нефибриллярные коллагены, эластические волокна) и интегративно-буферная метаболическая среда (основное вещество) (Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И., 2009).

Фибробласты создают структуру и поддерживают количественное соотношение состава ВКМ, секретируя все типы коллагенов (фибриллярные коллагены – I, II, III, V, XI; нефибриллярные – IX, XII, XIV), эластин, фибриллин, виментин, ламинин, фибронектин, мукополисахариды, гликопротеины, протеогликаны, гликозаминогликаны (Zouboulis C.C. et al., 2008). Они участвуют в процессе заживления раны и её фиброзировании, активно секретируя, помимо перечисленных молекул, факторы роста – TGF (Transforming growth factor, TGF), HGF (Hepatocyte growth factor, HGF), а также гиалуронан, декорин (Varedi M. et al., 1997; Meran S. et al., 2007; Mohan R.R. et al., 2010). Фибробласты участвуют в

формировании и поддержании физиологического структурно-функционального состояния базальной мембраны, продуцируя коллагены IV и VII типов, ламинин-1, нидоген (Poschl D. et al., 2004; Marinkovich M.P. et al., 1993; Contard P. et al., 1993).

В процессе физиологического обновления ВКМ и протекания в нём реакций задействованы матриксные металлопротеиназы и тканевые ингибиторы металлопротеиназ, вырабатываемые фибробластами (Gill S.E., Parks W.C., 2008). Данные клетки оказывают влияние на гомеостаз эпителиальных клеток, продуцируя факторы KGF (Keratinocyte growth factor, KGF), EGF (Epidermal growth factor, EGF), SCF (Stem cell factor, SCF), CSF (Colony-stimulating factor, CSF), GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (Kalluri R., Zeisberg M., 2006). Они секретируют проангиогенные факторы – VEGF (Vascular endothelial growth factor, VEGF), PDGF (Platelet-derived growth factor, PDGF), FGF (Fibroblast growth factor, FGF), способствуя образованию сосудов, стимулируя рост эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток (Greaves N.S. et al., 2013).

Haniffa в экспериментах *in vitro* выявил иммуномодулирующее действие фибробластов (Haniffa M.A. et al., 2009). Показано их участие в иммунном ответе, заключающееся в продукции целого ряда цитокинов и хемокинов: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, CXCL12 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 12, CXCL12) (Rogler G. et al., 2001).

Профиль биологически активных веществ, секретируемый фибробластами, зависит от микроокружения. Фибробласты подвержены регуляторным влияниям других клеток, особенно при воспалении. Количество фибробластов в очаге воспаления увеличивается, где они активируются. С одной стороны, фибробласты способны самостоятельно усиливать синтез белков ВКМ под влиянием собственных ростовых факторов, а с другой – на них воздействуют индукторы репарации тромбоцитов, лейкоцитов и макрофагов, участвующих в

воспалительном процессе. При этом один и тот же индуктор может по-разному подготавливать фибробласты к синтезу ВКМ в разные фазы воспаления (Shi Y. et al., 2012; Маянская И.В. и др., 2013; Menicacci B. et al., 2017; Kurashima Y. et al., 2017).

В ряде работ показано изменение секреторной активности фибробластов в зависимости от источника индукции. При добавлении FGFb в культуральную среду наблюдалось значительное увеличение скорости пролиферации клеток, увеличение экспрессии HLA-I (Human leucocyte antigens – I, HLA-I) класса и индукция низкой экспрессии HLA-DR (Human leukocyte antigen – antigen D Related, HLA-DR). Фибробластоподобные клетки, обработанные FGFb, обладают более выраженным иммуносупрессивным потенциалом. Кроме того, FGFb влияет на мультилинейную дифференциацию прогениторных клеток, направляя в остеогенез и ограничивая нейрогенный потенциал (Shi H.X., 2013).

LPS-праймированные (Lipopolysaccharide, LPS) фибробластоподобные клетки усиливают активацию Т-клеток. При добавлении полиинозинполицитидиловой кислоты данные клетки проявляют иммуносупрессивный эффект (Waterman R.S. et al., 2010).

В зависимости от концентрации в культуральной среде TGFβ может стимулировать рост или ингибировать и блокировать дифференциацию фибробластов (Rieder F., Fiocchi C., 2008). TGFβ регулирует PDGF-рецептор, повышая синтез CTGF (Connective tissue growth factor, CTGF) и IGF-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1), факторы, непосредственно действующие на пролиферацию (Simmons J.G. et al., 2002).

Показано, что на миграцию фибробластов могут влиять: фибронектин, PDGF-AB, IGF-1, TGFβ (Leeb S.N. et al., 2004). Медиаторы, активирующие воспаление, такие как TNFα (Tumor necrosis factor-α, TNFα), IFNγ (Interferon-γ, IFNγ), PGE2 (Prostaglandin E2, PGE2), подавляют миграцию фибробластов (Rieder F. et al., 2010).

Показана прямая зависимость между снижением регенераторного потенциала дермальных фибробластов взрослых доноров и увеличением дозы облучения (Еремин П.С. и др., 2013).

Дермальные фибробласты в фибриновом матриксе, обработанные тромбоспондином-1, продуцируют повышенное количество VEGF, который стимулирует эндотелиальные клетки (Kellouche S. et al., 2007).

Гепатоцитарный фактор роста (HGF) имеет различные эффекты на заживление, включая стимуляцию ангиогенеза, регуляцию отложения и деградации матрикса, стимуляцию миграции и пролиферации кератиноцитов (Conway K. et al., 2006). Продукция HGF вовлекает внутриклеточную сигнализацию с помощью таких молекул как c-JUN и интегрин-связанная киназа (Schnickmann S. et al., 2009).

Провоспалительный цитокин IL-1 β и дексаметазон ингибирует синтез коллагена дермальными фибробластами (Martens M.F., Huyben C.M., Hendriks T., 1992), глюкокортикоиды повышают экспрессию гена проколлагена (Graham M.F. et al., 1995).

Клиническое применение анти-TNF антител ведет к повышению секреции TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) фибробластами, изолированными из воспаленной толстой кишки пациентов с БК, а также усилению их миграции (Di Sabatino A. et al., 2007).

1.1.2 Возраст-зависимые изменения функциональной активности фибробластов

Большинство работ, касающихся изучения физиологии фибробластов в онтогенезе, посвящены исследованиям фибробластов в зрелом, пожилом и старческом возрасте. Показано, что пролиферативная и миграционная способность, синтетическая активность претерпевают возрастные изменения в

фибробластах. Одновременно происходят внутриклеточные модификации экспрессии miRNA (micro Ribonucleic acid, miRNA), длины теломера, трансмембранных рецепторов, секреции апоптотических белков и факторов клеточного цикла (Lynch K., Pei M., 2014). Ряд исследователей предполагает, что большинство возрастных изменений, выявляемых на уровне протеома, сопряжены с посттранскрипционной регуляцией, эффективностью трансляции, стабильностью и модификацией белков, а не с регуляцией экспрессии генов. Изменения не связаны с экспрессией соответствующих транскриптов в 77% белков взрослого организма (Waldera-Lupa D.M. et al., 2014).

В литературе отмечено, что возрастные изменения происходят в основном в группах белков со средней и низкой численностью, которые ассоциированы с цепью переноса электронов, окислительным фосфорилированием, клеточным дыханием в митохондриях. Отсюда учёные делают вывод, что снижение клеточной пролиферации и белкового синтеза *in situ* фибробластами взрослых организмов являются следствием неадекватной митохондриально-ядерной сигнализации (Kalfalah F. et al., 2014).

Возраст-зависимый секреторный фенотип дермальных фибробластов *in situ* характеризуется изменениями в секреции различных матриксных металлопротеиназ, цитокинов и других белков. Процесс старения связан с уменьшением числа юных и зрелых фибробластов, что отражается на качественном составе ВКМ (Ярыгин К.Н. и др., 2009; Haydont V., Bernard B.A., Fortunel N.O., 2018). С одной стороны, с возрастом повышается уровень IL-1 β , IL-4, IL-15, INF γ , CXCL-10, TNF α , фибронектина, коллагена III типа относительно коллагена I типа (Sprenger C.C., Plymate S.R., Reed M.J., 2010). С другой стороны, замедляется синтез гиалуроновой кислоты, гликозаминогликанов (Lee B.M., Han D.G., Choi W.S., 2015).

Показана роль mTOR (mammalian target of rapamycin, mTOR) и NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) сигнализации

в старении фибробластов и развитии их специфического возрастного секреторного фенотипа (Tiggers J. et al., 2014). В условиях *in situ* в фибробластах взрослого организма происходят изменения в гомеостазе кальция, увеличение неправильно свернутых белков, что способствует активации NF- κ B пути и приводит к повышению продукции IL-8 (Park S.H. et al., 2010). Увеличение концентрации IL-8 ассоциировано с клеточным старением (Corpe J.P. et al., 2010).

Большинство исследований по фибробластам направлено на выявление единичных генов и сигнальных путей, участвующих в процессе старения. Показана активация p53/p21 и p16(INK4a)/pRb путей, различная экспрессия интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ и ингибирующих их белков в данном процессе (Kim Y.M. et al., 2013). Данные литературы свидетельствуют, что изменения miRNA вовлечены в процесс старения. Обнаружено, что повышенной экспрессии двух miRNAs (miR-152 и miR-181a) достаточно для индукции старения фибробластов (Mancini M. et al., 2012). В 117 mRNA (messenger Ribonucleic acid, mRNA) и 12 miRNAs выявлены возрастные изменения в одинаковых культурах дермальных фибробластов (Kalfalah F. et al., 2014; Rock K. et al., 2014).

С возрастом в различных органах накапливаются стареющие фибробласты, устойчивые к пролиферативным и проапоптотическим сигналам. Встречаются фибробласты с деструктивными изменениями, содержащие липофусцин и жир (Ярыгин К.Н. и др., 2009). Клеточное старение индуцируется вследствие укорочения теломерной последовательности, стресса, онкогенной активации. Ряд исследователей указывает, что все клетки от доноров разных возрастов, полученные при низком количестве пассажей (≤ 6), имеют одинаковое TRFL-значение (Telomere restriction fragment length, TRFL), составляющее около 3,6 kbp. Отмечают, что *in situ* фибробласты дермы человека в культуре не подвергаются значительному укорочению репликативного теломера (Waldera-Lupa D.M., Stuhler K., 2015). В других работах показано, что теломерная последовательность в

фибробластах различается между индивидами и может укорачиваться с различной скоростью при старении *in vivo* (Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W., 1990).

Достаточно подробно описан ограниченный пролиферативный потенциал *in vitro* клеточных культур в контексте клеточного старения. Известны шесть белков, участвующие в регуляции клеточного цикла, экспрессия которых изменяется с возрастом в дермальных фибробластах (Waldera-Lupa D.M., Stuhler K., 2015). Также снижение регуляторных и каталитических компонентов в протеасомах может привести к накоплению токсичных агрегатов (Lopez-Otin C. et al., 2013).

Показаны возрастные нарушения клеточной организации и изменения цитоскелета, что приводит к морфологическим изменениям, таким как увеличенный объем клетки и её поверхности (Reed M.J., Ferrara N.S., Vernon R.B., 2001; Lämmermann I. et al., 2018). В фибробластах взрослых организмов снижается экспрессия белков, участвующих в барьерной проницаемости и подвижности (Boulch M.L. et al., 2017; Fukazawa A. et al., 2008). При старении в дермальных фибробластах *in situ* снижается гибель клеток от апоптоза. Нарушение регуляции апоптоза может привести к накоплению поврежденных и нефункциональных клеток. Важным аспектом механизма апоптоза является эндоцитоз ядерных регуляторов – IGFBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3, IGFBP3). Между различными возрастными группами выявлены различия в экспрессии белков, связанных с процессами эндоцитоза, что может привести к снижению обращаемости IGFBP3, которые в свою очередь могут способствовать устойчивости к апоптозу фибробластов (Lee K.W. et al., 2005). С возрастом повышается экспрессия HSPA1A/B (Heat shock protein family A/B), который защищает белки от агрегации и ингибирует CASP3-опосредованный апоптоз (Caspase-3, CASP3) (Marcotte R., Lacelle C., Wang E., 2004).

Фибробласты различной степени зрелости отличаются по миграционной способности в культуре. Формирование монослойной культуры эмбриональных

фибробластов происходит примерно в 5,74 раза быстрее, чем зрелых фибробластов дермы (Ледовской С.Н., Лазаренко В.А., Бурда Ю.Е., 2010). Это обусловлено дезагрегацией актинового цитоскелета, пониженной экспрессией $\alpha 2\beta 1$ -интегринов, связывающихся с ламинином и коллагеном I типа (Reed M.J., Ferrara N.S., Vernon R.B., 2001).

Интересно отметить, что в клинических исследованиях трансплантация мезенхимальных стромальных клеток у пожилых больных язвенным колитом оказывается менее эффективной, чем у больных среднего и молодого возраста (Лазебник Л.Б. и др., 2010).

1.1.3 Особенности дермальных фибробластов

Дермальные фибробласты составляют гетерогенную популяцию резидентных клеток мезенхимального происхождения, локализуются между эпидермисом и гиподермой кожи (Driskell R.R., Watt F.M., 2015). Дермальные фибробласты отличаются полиморфизмом, могут иметь различную форму: овальную, полигональную, веретеновидную, отросчатую (Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И., 2009). Иммунофенотипически дермальные фибробласты характеризуются как клетки, экспрессирующие маркеры мезенхимальных клеток (CD73, CD90, CD105), а также структурные белки ВКМ (виментин, эластин, коллагены I, III, IV, V типов) (Sorrell J.M., Caplan A.I., 2009). Данные клетки ответственны за синтез и организацию внеклеточного матрикса, поддерживают структурную целостность и гомеостаз кожи, участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции окружающих клеток, могут обладать провоспалительным, проангиогенным, профиброгенным потенциалом (Weiss R.A., 2013). Согласно данным литературы функциональная гетерогенность дермальных фибробластов отражает существование различных линий

фибробластов и позволяет с готовностью отвечать на сигналы от вышележащего эпидермиса, таким образом показывая пластичность (Vedrenne N. et al., 2012).

Дермальные фибробласты из разных анатомических участков отличаются по экспрессии генов и выполняемым функциям (Chipev C.C., Simon M., 2002). Наиболее выражены различия между фибробластами передней и задней, проксимальной и дистальной, верхней и нижней половин тела. Фибробласты обладают позиционной памятью и проявляют соответствующий фенотип (Chang H.Y. et al., 2002). Исследователи обнаружили постоянную экспрессию специфических генов, которые отражают место происхождения фибробластов. Наиболее известны сайт специфические гены Нох (Nobox, Нох) (Wang K.C., Helms J.A., Chang H.Y., 2009). Фибробласты сохраняют свою экспрессию генов НОХ, несмотря на экспансию в культуре, таким образом, поддерживается суждение, что фибробласты поддерживают свою функциональную идентичность после размножения в культуре (Rinn J.L. et al., 2008). При сопоставлении дермальных и недермальных тканевых фибробластов выявлены различия в экспрессии 396 генов, в частности сигнальных молекул, участвующих в заживлении раны – IL-6, IL-8, TGF β , HGF, KGF (кератиноцитарный фактор роста) (Rinn J.L. et al., 2006; Nolte S.V. et al., 2008). Таким образом, дермальные фибробласты влияют на определение региональной идентичности кожи.

В дополнение к топографической вариабельности дермальные фибробласты из различных микроанатомических участков имеют специфические свойства своих ниш (Driskell R.R. et al., 2013). Дермальные фибробласты можно разделить на субпопуляции: фибробласты, ассоциированные с волосяной фолликулой (дермальные папиллярные и оболочечные клетки) и интерстициальные фибробласты (папиллярные и ретикулярные дермальные фибробласты) (Thangapazham R.L., Darling T.N., Meyerle J., 2014).

Между фибробластами ретикулярного и папиллярного слоёв дермы найдены функциональные и структурные различия. Различия выражены в

скорости пролиферации, качественном и количественном составе белков ВКМ, что приводит к созданию специфического микроокружения в нише. Папиллярный слой содержит коллагены XII, XVI, IV и VI типов, тенасцин-С, протеогликан версикан, отсутствующие или присутствующие в матриксе ретикулярного слоя в малых количествах. В ретикулярном слое содержится коллаген XIV и тенасцин-Х, которые отсутствуют в папиллярном слое (Sorrell J.M., Caplan A.I., 2004). Синтез коллагена не зависит от происхождения фибробластов в дерме, хотя ретикулярные фибробласты синтезируют интенсивнее проколлаген, чем папиллярные фибробласты (Tajima S., Pinnell S.R., 1981). Функционально папиллярные фибробласты в сравнении с ретикулярными фибробластами обладают повышенной способностью к дифференцировке и созреванию в эпидермальном направлении, секреции различных растворимых факторов для восстановления целостности кожи (Pageon H., Zucchi H., Asselineau D., 2012). В экспериментах ретикулярные фибробласты секретируют различные уровни фактора роста кератиноцитов, IL-6, подавляют терминальную дифференцировку кератиноцитов и формирование базальной мембраны (Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I., 2004). Ретикулярные фибробласты секретируют сигнальные молекулы, которые дифференцированно реконструируют коллаген-гликозаминогликаный матрикс (Varkey M., Ding J., Tredget E.E., 2011). В ряде работ показано, что верхние дермальные фибробласты необходимы для формирования волосяной фолликулы. Нижние дермальные фибробласты ответственны за синтез внеклеточного матрикса, инициируют процесс заживления раны; в результате формируется ткань с отсутствием волосяных фолликул (Driskell R.R. et al., 2013).

В дерме выделяют скопление фибробластов у основания волосяной фолликулы. Они могут дифференцироваться в дермальные фибробласты в процессе заживления раны, регенерировать дермальный слой кожи, участвовать в сигнализации, необходимой для морфогенеза волосяного фолликула и

координации цикла развития волоса (Botchkarev V.A., Paus R., 2003). Данные клетки функционально отличаются от дермальных фибробластов различной активацией NF κ B и снижением чувствительности к бактериальному липополисахариду (Hill R.P., Haycock J.W., Jahoda C.A., 2012).

1.2 Функциональная активность интестинальных фибробластов при локальном воспалении в кишечнике

1.2.1 Особенности функционирования иммунной системы при хроническом воспалении кишечника (болезни Крона и язвенном колите)

Воспаление лежит в основе широкого спектра физиологических процессов и ряда заболеваний. Воспалительный «механизм» включает и направляет индукторы, сенсоры, медиаторы и эффекторы (ткани и клетки, на функциональное состояние которых оказали влияние медиаторы воспаления), где каждый из компонентов определяет направление ответа. Так, наиболее тяжелыми заболеваниями кишечника, характеризующимися прогрессирующими воспалительно-деструктивными поражениями желудочно-кишечного тракта, считают болезнь Крона и язвенный колит. Предрасположенность к этим заболеваниям реализуется на уровне иммунной системы кишечника.

Физиологическое состояние кишечника достигается иммунологической толерантностью к пищевым антигенам и комменсальной микрофлоре, а также контролем над её балансом популяциями клеток врожденной и приобретенной иммунной системы (Guarner F. et al., 2006). Иммунную систему слизистой оболочки кишечника составляют макрофаги, моноциты, нейтрофилы, дендритные клетки, NK клетки (natural killer, NK), эозинофилы, базофилы, интраэпителиальные лимфоциты, ILC клетки (innate lymphoid cells, ILC), лимфоидные образования в собственной пластинке кишечника (Пейеровы

бляшки, изолированные лимфоидные фолликулы, неструктурированные лимфоциты), брыжеечные лимфатические узлы (Manus T.E., Manus M.M., Diculescu M.M., 2016).

Интересно отметить, что при воспалительных заболеваниях кишечника выявлены генетические отклонения в ряде звеньев иммунной системы. В ходе полногеномного исследования определены 77 генов, ассоциированных с болезнью Крона и 47 локусов с язвенным колитом (Franke A. et al., 2010; Fiocchi C., 2012). Показано наличие полиморфных вариантов в генах, ассоциированных с изменением процесса узнавания PAMP (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) кишечной микрофлоры (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2/caspase recruitment domain-containing protein 15, NOD2/CARD15), TLR-4 (Toll-like receptor 4, TLR-4), аутофагией (autophagy-related 16-like 1 gene, ATG16L1, immunity-related guanosine triphosphatase gene, IRGM), IL-23R (interleukin 23 receptor, IL-23R), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3), TNFSF15 (tumor necrosis factor ligand superfamily 15, TNFSF15), лейкоцитарным антигеном человека, IRF-5 (interferon regulatory factor 5, IRF-5), PTPN-22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, PTPN-22) (Hampe J. et al., 2007; Duerr R.H. et al., 2006; Burton P.R. et al., 2007). Выявленные полиморфизмы свидетельствуют о вовлеченности врожденной и приобретенной иммунной системы в развитие ВЗК.

Дисфункции во врожденной иммунной системе индуцируют функциональные отклонения в приобретенной иммунной системе. Воспаленная слизистая оболочка толстой кишки при ВЗК сильно инфильтрирована активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами, для которых характерны усиленный клеточный цикл и резистентность к апоптозу (Bouma G., Strober W., 2003). В результате этой клеточной активности происходит повышенная секреция различных провоспалительных медиаторов – реактивный кислород, метаболиты азота, эйкозаноиды, хемокины, цитокины, которые способствуют изменениям в

сигнальных каскадах и поддерживают воспалительный процесс в кишечнике (Strober W., Fuss I.J., 2011). Так, при БК преобладает Th1 и Th17 иммунный ответ с повышением секреции INF- γ , TNF α , IL-17 и IL-22, а при ЯК цитокиновый профиль (IL-5, IL-13) опосредован Th2 (Christophi G.P. et al., 2012). Слизистая оболочка кишечника при БК и ЯК сильно инфильтрирована Th17 клетками, которые продуцируют IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (Sugihara T. et al., 2010). Провоспалительные цитокины и лиганды Toll-like рецепторов индуцируют экспрессию в интестинальных миофибробластах пациентов с ЯК micro-RNAs, в частности miRNA(miR)-155, модулирующей их провоспалительный фенотип (Pathak S. et al., 2015).

В гуморальном звене иммунитета при ВЗК наблюдается, как правило, дисиммуноглобулинемия: снижение продукции секреторного IgA и компенсаторное увеличение концентрации IgG, стимулирующего продукцию провоспалительных цитокинов, антител к резидентной микрофлоре. В собственной пластинке слизистой оболочки кишечника при БК и ЯК отмечено повышение количества IgG-продуцирующих клеток и уровня IgG в слизи (Macpherson A. et al., 1996). Активация и относительное повышение В-клеток в крови у больных с БК и ЯК приводит к появлению антимикробных антител к микроорганизмам-комменсалам и аутоантител. Для больных ЯК характерно наличие антинейтрофильных цитоплазматических антител, а для БК – антитела к *Saccharomyces cerevisiae*. Уровень данных антител сопряжён с протяженностью поражения и активностью заболевания (Mokhtarifar A. et al., 2013; Bertin D. et al., 2013).

1.2.2 Особенности функционирования интестинальных фибробластов при локальном воспалении в кишечнике

Физиологическая регенерация ткани при остром воспалении обеспечивается стандартным соотношением клеточных дифферонов и их нормальным функционированием. В условиях локального хронического воспаления для поддержания гомеостаза в ткани происходят компенсаторно-приспособительные морфофункциональные преобразования (репаративная регенерация). В процессе восстановления поврежденной целостности ткани активное участие принимают фибробласты.

Во-первых, мезенхимальные клетки собственной пластинки слизистой оболочки кишечника участвуют в ремоделировании ВКМ и механической регуляции ткани. Во-вторых, они регулируют функции эпителия и стволовых клеток в ответ на повреждение (Roulis M., Flavell R.A., 2016). Кишечный эпителий – высоко динамичная структура, способная полностью обновиться за 3-8 дней (Asfaha S., 2015). Архитектоника и функционирование кишечника взрослого организма поддерживается взаимодействием эпителия и мезенхимы, также необходимым для поддержания ниши количеством интестинальных стволовых клеток (Powell D.W. et al., 2011). Интестинальные фибробласты в ответ на внешние стимулы создают микроокружение, продуцируя различные факторы роста, например, AREG (amphiregulin, AREG), стимулирующие регенерацию кишечного эпителия по паракринному пути. Фибробласты являются преобладающей клеточной популяцией, экспрессирующей AREG в кишечном эпителии (Shao J., Sheng H., 2010).

В экспериментах на мышах *in vivo* показано, что интестинальные фибробласты играют важнейшую гомеостатическую роль при эпителиальном повреждении, активируя Tpl2-COX-2-PGE2 (tumor progression locus-2 kinase – cyclooxygenase-2 – prostaglandin E2, Tpl2-COX-2-PGE2) молекулярный путь,

который способствует компенсаторной пролиферации эпителия (Roulis M. et al., 2014).

Процесс заживления повреждения сопряжен с прогрессивной дифференциацией фибробластов в протомиофибробласты, затем в миофибробласты и, параллельно, повышением напряжения ткани (Hinz B., 2010). В ответ на повреждение, фибробласты мигрируют в очаг повреждения и реорганизуют ВКМ, оказывая механическое напряжение на него. Под действием механического напряжения в фибробластах происходит развитие внутриклеточных волокон напряжения и дифференциация их в протомиофибробласты (Tomasek J.J. et al., 2002). Волокна напряжения протомиофибробластов состоят из β - и γ -цитоплазматического актина и не содержат α -SMA (Desmouliere A., Charonniere C., Gabbiani G., 2005). Под влиянием TGF β протомиофибробласты дифференцируются в миофибробласты (Hinz B., 2010). Миофибробласты экспрессируют α -SMA и актиновые микрофиламенты, ассоциированные с сократительными белками (немышечный миозин). Эта сеть сильно связана с внеклеточными фибриллами фибронектина через трансмембранные комплексы адгезии. Таким образом, сокращение внутриклеточного сократительного аппарата в миофибробластах напрямую передаётся в ВКМ и способствует закрытию раны (Tomasek J.J. et al., 2002). Одновременно происходит отложение коллагена и экспрессия матриксных металлопротеиназ миофибробластами, что способствует ремоделированию матрикса. Далее миофибробласты подвергаются апоптозу вследствие снижения клеточной плотности, в то время как оставшиеся фибробласты начинают продуцировать коллаген 1 типа (Sorrell J.M., Caplan A.I., 2004).

В течение нормального процесса заживления, количество α -SMA+ миофибробластов повышается, затем снижается (Powell D.W. et al., 2005). Временное появление мезенхимальных клеток характерно для нормального процесса заживления, но персистенция этих клеток ассоциирована с избыточным

отложением коллагена и фиброзом, который часто наблюдается у пациентов с БК, и вызывает мезенхимально-клеточную гиперплазию, дезорганизацию ткани и отложение фибриллярного коллагена (Andoh A. et al., 2007). Изменения в ремоделировании при ВЗК человека возникают в результате дисбаланса между процессами синтеза и расщепления матрикса. Интестинальные фибробласты, изолированные из воспалённой области кишечника пациентов с ВЗК, экспрессируют повышенное количество MMP1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1), MMP2 (Matrix metalloproteinase-2, MMP-2) и MMP3 (Matrix metalloproteinase-3, MMP-3) (McKaig B.C. et al., 2003). К особенности фибробластов пациентов с БК относят нахождение их в активном окислительном состоянии, которое способствует экспрессии MMP3 (Catarzi S. et al., 2011; Fontani F. et al., 2014).

В экспериментальной модели БК на мышах $Tnf\alpha ARE/+$ с гиперпродукцией TNF показано, что перед клиническими проявлениями заболевания фибробласты подвздошной кишки интенсивно секретируют MMP9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) (Armaka M. et al., 2008) и ICAM1 (Inter-cellular adhesion molecule 1, ICAM1) (Roulis M. et al., 2011), что косвенно свидетельствует об их участии в ремоделировании ВКМ и иницировании приобретенного иммунного ответа. При хроническом воспалении отклонения в экспрессии MMPs, TIMP и секреции коллагена фибробластами может привести к развитию интестинального фиброза (Roulis M., Flavell R.A., 2016).

В культуре фибробластов толстой кишки человека под влиянием механического напряжения ВКМ, подобное наблюдается в стриктуре стенки кишки пациентов с БК, отмечена повышенная клеточная пролиферация, сниженная экспрессия MMP и усиленная секреция α -SMA. Основываясь на этих данных, исследователи предполагают, что существует взаимосвязь между механическими свойствами интестинальной стриктуры при БК и развитием профибротического клеточного фенотипа фибробластов (Johnson L.A. et al., 2013). При хроническом воспалении TL1a (TNF-like ligand 1A, TL1a) активирует

миофибробласты, приводя к увеличению экспрессии коллагена (Shih D.Q. et al., 2014). Мезенхимальные клетки, изолированные из собственной пластинки стриктуры стенки кишки пациентов с БК, продуцируют больше общего коллагена и коллагена III типа, чем мезенхимальные клетки, изолированные из нестриктурированной или нормально кишки (Graham M.F., 1995).

Под влиянием воспалительного микроокружения и механического напряжения может наблюдаться эпителиально-мезенхимальная и эндотелиально-мезенхимальная трансформация, что также может способствовать процессу интестинального фиброгенеза (Scharl M. et al., 2015).

В результате отложения ВКМ в слизистой оболочке и подслизистом слое происходит утолщение, уплотнение и укорочение стенки кишки при ЯК, при БК формируется стриктура стенки кишки (Burke J.P. et al., 2007). При неблагоприятном прогнозе заболевания у детей с БК отмечена высокая фибробластическая активность с повышением доли функционально незрелых фибробластов (Федулова Э.Н. и др., 2013).

В литературе достаточно хорошо описаны механизмы воспаления, показано участие ряда факторов, которые предполагают участие фибробластов. Показано, что воспалительная инфильтрация слизистой оболочки и стенки кишки изменяет функционирование интестинальных фибробластов. До сих пор остается непонятным степень участия клеток других частей организма, в частности фибробластов дермы, в компенсаторно-приспособительном ответе на локальное воспаление в кишечнике, как у взрослых, так и у детей.

1.3 Иммуномодулирующее действие липополисахарида

Липополисахарид является молекулярным паттерном внешней мембраны грамотрицательных бактерий, занимая до 75% всей клеточной поверхности (Caroff M., Karibian D., 2003). LPS представляет собой макромолекулу, состоящую

из липида А, центрального олигосахарида и О-специфической цепи полисахарида. Липид А ответственен за токсические свойства LPS. О-полисахаридная цепь определяет бактериальную сероспецифичность и антигенные свойства микроорганизма (Rhee S.H., 2014). Биологическая активность LPS видоспецифична и зависит от структуры липида А (длина и число жирных кислот, количество фосфатных остатков).

Липополисахарид относится к индукторам воспаления. Незначительное количество LPS в крови при бактериальной инфекции является достаточным, чтобы вызвать мощную воспалительную реакцию (Alexander C., Rietschel E.T., 2001). В распознавании LPS принимают участие LBP (Lipopolysaccharide binding protein, LBP), CD14, MD-2 (Myeloid differentiation factor 2) и TLR4 (Toll-like receptor 4, TLR4) (Bosshart H., Heinzelmann M., 2007). LBP – белок острой фазы воспаления, который вырабатывается гепатоцитами. Он с высокой аффинностью связывает в кровотоке липид А, экстрагирует его или переносит для связывания с мембранным или растворимым рецепторным белком CD14 (Jerala R., 2007). Далее полученный агрегат связывается с рецепторным комплексом TLR4-MD-2, что индуцирует димеризацию TLR4 (Akashi-Takamura S., Miyake K., 2008). Конформационные изменения в рецепторном комплексе привлекают адаптерные белки MyD88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88), TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein including interferon- β , TRIF), TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein, TIRAP), TRAM (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) к цитоплазматическому домену TLR4, что инициирует внутриклеточный каскад реакций и активирует транскрипционные факторы NF κ B и IRF3 (Interferon-regulatory factor 3, IRF3). TLR4 активирует MyD88-зависимый и TRIF-зависимый сигнальные пути (Kagan J.C. et al., 2008; Kenny E.F., O'Neill L.A., 2008; Choi Y.J. et al., 2013). Активация первого пути ведет к секреции широкого спектра провоспалительных цитокинов, а второго способствует развитию эндотоксической толерантности (Mata-Haro V. et al., 2007). Shi показал, что CASP-

4, 5, 11 напрямую могут связываться с LPS в цитоплазме, самоактивируясь и вызывая пироптоз (Shi J. et al., 2014).

Рецептор TLR4 экспрессируют на своей клеточной поверхности моноциты, макрофаги, лимфоциты, полиморфноядерные лейкоциты, дендритные клетки, тучные клетки, эпителиальные клетки кишечника, фибробласты (Bosshart H., Heinzelmann M., 2007; Otte J.M., Rosenberg I.M., Podolsky D.K., 2003).

Липополисахарид способствует значительному повышению пролиферации нормальных фибробластов кожи человека, также усиливает синтез и секрецию коллагена (Yang H. et al., 2013). Было показано, что после стимулирования фибробластов бактериальным антигеном, увеличивается их количество и объём (Powell D.W. et al., 2011). В экспериментах на мышах показано, что в кишечинальных фибробластах в ответ на LPS активируются NF- κ B, PI3-kinase, и MAPK сигнальные пути и усиливается секреция провоспалительных молекул (Walton K.L., Holt L., Sartor R.B., 2009). Кроме того, в экспериментах на мышах показано, что кишечинальные фибробласты значительно выше экспрессируют TGF β 1 и IL-6 в ответ на LPS (Walton K.L., Holt L., Sartor R.B., 2009; van Tol E.A. et al., 1999). Транскрипционный фактор NF κ B может быть активирован агонистами TLR2, а также провоспалительными молекулами, такими как IL-1 β .

По данным литературы зрелый здоровый кишечник проявляет толерантность к обилию LPS и другим бактериальным антигенам, присутствующим в просвете кишечника, через ингибирование или активацию путей, ассоциированных с про- и противовоспалительными сигналами. Сниженная регуляция IRAK-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK-1) в постнатальном периоде снижает TLR4 сигнализацию в ответ на LPS (Lotz M. et al., 2006). В других работах низкие дозы флагеллина и LPS снижают регуляцию некоторых генов, ответственных за провоспалительные цитокины, клеточную смерть, апоптоз, ассоциированных с продукцией IL-8 (Li N. et al., 2012).

При нарушении целостности барьерной ткани кишечника происходит инвазия микроорганизмов, распространение эндотоксинов с кровотоком и запуск иммунного ответа (Feehley T., Belda-Ferre P., Nagler C.R., 2016). Интестинальные фибробласты рассматривают как непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки, которые формируют непрерывную сеть под эпителиальным слоем на всём протяжении желудочно-кишечного тракта и играют большую роль в иммунном ответе слизистой оболочки кишечника, сигнализируя через TLR 1-9 (Owens B.M.J. et al., 2013). Их расположение идеально для реагирования на перемещение микробного антигена. Данные литературы свидетельствуют, что содержание LPS значительно повышено при ВЗК и потенциально может участвовать в развитии воспалительных заболеваний, в том числе БК, ЯК и некротизирующего энтероколита (Cario E., Podolsky D.K., 2000; Leaphart C.L. et al., 2007). Исследования показали, что увеличение уровня LPS в толстой кишке приводит к воспалению кишечника (Im E. et al., 2012). С другой стороны, есть данные, что LPS может оказывать протективное действие на повреждение эпителия у мышей (Rakoff-Nahoum S. et al., 2004).

1.4 Биомедицинские клеточные продукты для терапии воспалительных заболеваний кишечника

Биологические характеристики клеток фибробластического дифферона позволяют рассматривать их для применения в клинической практике.

Большое внимание к поиску новых лекарственных средств вызвано целым рядом недостатков традиционной терапии БК и ЯК, включающей применение системных и селективных иммунодепрессантов, глюкокортикостероидов, 5-аминосалициловой кислоты, противовирусных препаратов и антибиотиков, которая не всегда оказывается эффективной, часто сопровождается отрицательными побочными эффектами и приводит к возникновению

резистентности к ним. Биологические препараты (анти-ФНО терапия) элиминируют воспаление, но не способствуют репарации ткани с восстановлением её функциональности. На биологическую терапию первоначально не отвечают 30% пациентов. Также, несмотря на эффективность анти-ФНО- α препаратов, считается, что от 30%-40% пациентов с ЯК и 40% пациентов с БК перестанут отвечать на анти-ФНО терапию со скоростью около 10% -13% в год (Ben-Horin S., Chowers Y., 2011; Leung Y., Panaccione R., 2008; Gisbert J.P., Panés J., 2009). В России стоимость одного курса анти-ФНО терапии составляет 150 тысяч рублей. До 80% всех пациентов с БК подвергается оперативному вмешательству (Bernell O., Lapidus A., Hellers G., 2000). Резекция кишки при БК может привести к развитию синдрома короткой кишки и глубоких нарушений процессов пищеварения.

В последнее время в связи с развитием регенеративной медицины разрабатываются и применяются новые способы терапии ВЗК у взрослых пациентов с применением аллогенных и аутологичных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. В литературе описан способ местного лечения эрозивно-язвенных поражений слизистых при язвенном колите с использованием эмбриональных фибробластов, предварительно подвергнутых воздействию дексаметазона (Бурда Ю.Е., 2003).

В педиатрической практике приоритетным является применение биомедицинских клеточных продуктов на основе аутологичного материала, несомненным преимуществом которых является отсутствие побочных реакций со стороны иммунной системы организма. Однако возникают этические разногласия по забору аутологичного костного мозга и жировой ткани у детей с ВЗК. Кроме того, дети с ВЗК, как правило, имеют дистрофическое телосложение (Тутина О.А. и др., 2008). Экспериментальные работы свидетельствуют о возможности терапевтического использования дермальных фибробластов в качестве альтернативы МСК (Haniffa M.A. et al., 2009). Показано, что закономерности,

установленные для культуры фибробластов, имеют общий характер и относятся к миграции и функциональной активности клеток *in vivo* (Васильев Ю.М., 2003). Биомедицинские клеточные продукты на основе фибробластов могут быть применены для лечения хронических и острых ран, заболеваний пародонта, хронической ишемии нижних конечностей, онкологии (URL: http://new.fips.ru/iiss/search_res.xhtml?faces-redirect=true). В литературе ряд исследований посвящен изучению продукции цитокинов и факторов роста дермальными фибробластами при патологических состояниях – системном склерозе, ожогах, фибромускулярной дисплазии (Noronha S.M. et al., 2014; Lonati P.A. et al., 2014; Ganesh S.K. et al., 2014). Однако до настоящего времени остается не достаточно изучена функциональная активность фибробластов, локализованных вне патологического очага и стабильность их состояния в процессе длительного культивирования в условиях *in vitro*.

1.5 Заключение по обзору литературы

Дермальные фибробласты представляют собой ключевое звено в биологии кожи, они не только поддерживают гомеостаз межклеточного матрикса дермы, обеспечивая его ремоделирование и обновление, но также играют значительную роль в поддержании физиологического состояния других слоев кожи. По мнению Н.П. Омеляненко, фибробласты можно рассматривать как «сторожевые» клетки, которые организуют ответ ткани на инфекцию или повреждение (Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И., 2009). На сегодняшний день в клеточной биологии достаточно хорошо изучены функциональные характеристики дермальных фибробластов. Охарактеризованы иммуностимулирующие свойства, описаны фибробласты, полученные из разных источников, регионов. Однако накопленные данные о секреторной активности фибробластов получены преимущественно в экспериментальных моделях или от взрослых доноров.

Данные о функциональной активности и характеристиках дермальных фибробластов в раннем онтогенезе в норме и при заболеваниях кишечника детей отсутствуют. Тем не менее, фибробласты собственной пластинки реактивно участвуют во многих физиологических и репаративных процессах в ходе сложных, до сих пор плохо изученных, взаимодействий с другими типами клеток, компонентами ВКМ, факторами роста, медиаторами воспаления и бактериями.

Фибробласты тесно взаимодействуют с эпителием в период развития организма. Они участвуют в функционировании ниши стволовых клеток кишечника, вырабатывают факторы регуляции пролиферации и дифференцировки эпителия, а также активно поддерживают эпителиальный гомеостаз при повреждении.

Также фибробласты реагируют на микроокружение, распознают микробные сигналы и активируются воспалительной средой, созданной профессиональными клетками врожденной и приобретенной иммунной системы, для поддержания и восстановления структуры внеклеточного матрикса и эпителиальной целостности. Они служат посредниками в качестве клеточного звена между иммунными механизмами и регенерацией ткани.

Фибробласты являются клетками, обладающими профиброгенным потенциалом. В физиологических условиях эти клетки находятся в покое состоянии. Под действием ряда факторов происходит их активация, что может привести к избыточной продукции ими компонентов ВКМ и развитию фиброза. Это является одной из важных причин для проведения исследований по влиянию на фибробласты биологически активных веществ, с которыми они контактируют при нарушении целостности ткани.

Фибробластический дифферон включает прогениторные клетки, которые имеют достаточно высокий пролиферативный потенциал. В литературе отмечено, что первичные культуры, полученные от людей старческой возрастной группы, сохраняют до 14% митотически активных фибробластов (Байрейтер К., Франц П.,

Родеман Х., 1995). В результате культивирования *in vitro* из небольшого биоптата кожи (размером 3–5 мм) можно получить достаточное для проведения эффективной клеточной терапии количество функционально-активных фибробластов. Культуры дермальных фибробластов обладают способностью активно синтезировать компоненты межклеточного матрикса, включая коллаген, эластин, гликозаминогликаны, факторы роста (Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I., 2004; Zouboulis C.C. et al., 2008). В условиях *in vitro* генетический и эпигенетический контроль, по всей видимости, нивелируется (или ослабевает) и наблюдается активация митотической активности клеток-предшественников фибробластов (Байрейтер К., Франц П., Родеман Х., 1995). Данному процессу в немалой степени способствуют и ростовые факторы/цитокины, входящие в состав стандартной питательной среды, используемой при культивировании фибробластов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили фибробласты, полученные из биоптатов кожи предплечья 10 детей с воспалительными заболеваниями кишечника: 5 детей с болезнью Крона, 5 детей с язвенным колитом и 5 условно здоровых детей (контроль) в возрасте 13-17 лет. Выбор минимально возможного для статистической обработки количества обследуемых детей обусловлен трудностью взятия биологического материала у детей и редкостью встречаемости БК и ЯК, которые относятся к орфанным заболеваниям. От всех участников и их родителей было получено письменное информированное согласие на предоставление биологического материала, исследование одобрено этическим комитетом и Ученым советом ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №4 заседания комитета по этике ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России от 25.03.2015).

Критериями включения пациентов были возраст, отсутствие аутоиммунных заболеваний (кроме болезни Крона, язвенного колита), педиатрический индекс активности болезни Крона – PCDAI (Pediatric Crohn's Disease Activity Index) и язвенного колита – PUCAI (Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index), продолжительность заболевания.

Диагноз основного заболевания был установлен в педиатрическом отделении Университетской клиники ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (зав. отделом – д.м.н. Э.Н. Федулова) на основании анамнестических данных, характерной клинической симптоматики, лабораторных

данных, эндоскопического исследования слизистой оболочки кишечника и морфологического анализа биоптатов кишечника.

Забор биоптата предплечья для изучения секреторной функции дермальных фибробластов осуществлял детский хирург в стерильных условиях процедурного кабинета. Иссеченный материал кожи размером 3х3 мм помещали в герметичную стерильную пробирку с транспортной Средой 199 с солями Хэнкса и глутамином (ПанЭко, Россия) с добавлением 275 Ед/мл пенициллина и 275 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия).

Одновременно со взятием биоптата у всех участников исследования был проведен забор периферической крови из локтевой вены в стерильных условиях процедурного кабинета. Образцы сыворотки аликвотировали и хранили в замороженном состоянии при -20°C в течение 2 месяцев.

2.2 Схема экспериментов *in vitro*

Схема исследования представлена в таблице 1.

В первую группу вошли дермальные фибробласты условно здоровых детей (контрольная группа). На момент забора материала у детей ранее не были диагностированы заболевания желудочно-кишечного тракта, не верифицированы хронические заболевания, отсутствовали воспалительные (сезонные) заболевания за последние шесть месяцев, были чистые покровы кожи и не было избыточной массы тела. Возраст участников в группе от 13 до 17 лет, средний возраст составил $16,0 \pm 1,41$ лет.

Во вторую группу включены дермальные фибробласты детей с болезнью Крона. По степени активности заболевания (PCDAI) дети относились к группе со средним течением, в среднем индекс активности составил $19,60 \pm 5,61$ балла. Возраст участников от 13 до 17 лет, средний возраст участников составил $14,60 \pm 1,82$ лет. Впервые заболевание диагностировано более шести месяцев

назад. Манипуляции с дермальными фибробластами проведены аналогично с первой группой.

Третью группу составили дермальные фибробласты детей с язвенным колитом. В среднем индекс активности (PUCAI) в данной группе равен $14,80 \pm 3,27$ баллов, все дети из группы со средним течением. Возраст участников от 13 до 17 лет, средний возраст – $16,60 \pm 0,89$ лет. Впервые заболевание диагностировано более шести месяцев назад. Манипуляции с дермальными фибробластами проведены аналогичным с первой группой образом.

Таблица 1

Схема экспериментов с использованием культивируемых дермальных фибробластов предплечья детей *in vitro*

Название группы	Кол-во пациентов	Серия	Количество пассажей	Количество культур
Дермальные фибробласты детей с болезнью Крона	5	Спонтанный секретом	6*	30
		Индукцированный LPS секретом	1	15
Дермальные фибробласты детей с язвенным колитом	5	Спонтанный секретом	6*	30
		Индукцированный LPS секретом	1	15
Дермальные фибробласты условно здоровых детей (контроль)	5	Спонтанный секретом	6*	30
		Индукцированный LPS секретом	1	15

Примечание: *- серия для изучения зависимости секретома от количества пассажей.

После получения первичной культуры дермальных фибробластов в серии экспериментов по изучению спонтанной секреции цитокинов, факторов роста и компонентов внеклеточного матрикса клетки были культивированы до шестого пассажа в пяти повторах с целью увеличения клеточности и изучения стабильности фенотипа дермальных фибробластов.

Обработку дермальных фибробластов известными индуктором воспаления (LPS) проводили на четвертом пассаже в трёх повторах.

2.3 Выделение и культивирование дермальных фибробластов

В стерильных условиях ламинарного бокса БАВп-01 «Ламинар С» – 1,2 (Ламинарные системы, Россия) биоптат кожи предплечья детей отмывали 3 раза в транспортной Среде 199 с солями Хэнкса и глутамином (ПанЭко, Россия) с добавлением 275 Ед/мл пенициллина и 275 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) и помещали в 0,25% раствор трипсина (ПанЭко, Россия) на 12 часов при +4°C с целью дезагрегации. Дерму отделяли от эпидермиса, отмывали 3 раза в PBS (Helicon, Россия), измельчали на небольшие фрагменты (1–2 мм) с помощью хирургического скальпеля и анатомического пинцета, помещали в культуральные флаконы 25 см² (Corning, США), вносили по 2 мл питательной среды DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), 0,33 мг/мл L-глутамина (ПанЭко, Россия), 55 Ед/мл пенициллина и 55 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия).

Образцы инкубировали в течение 3 дней при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ (Thermo scientific, Германия). Замену культуральной среды проводили каждые 3 дня, вносили по 5 мл питательной среды.

После достижения культурой 90%-100% конфлюэнтности (за 6 дней), клетки снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсин-ЭДТА с солями Хэнкса (ПанЭко, Россия). Для отделения клеток от остатков кусочков дермы и

разделения клеточных конгломератов, клеточную суспензию пропускали через систему фильтрации Steriflip Filter Unit, размер пор 100 μm (Millipore, Китай).

На следующий пассаж клетки пересевали с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на 1 cm^2 поверхности культурального флакона. Супернатанты каждого пассажа культур дермальных фибробластов отбирали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 μm (GE Osmonics, США) и при необходимости аликвоты хранили при -80°C в течение 2 месяцев.

2.4 Морфологические исследования, подсчёт и оценка жизнеспособности культивируемых клеток

Морфологию дермальных фибробластов оценивали в нативных культурах и в препаратах, окрашенных по Романовскому-Гимзе (Абрис, Россия), при помощи инвертированного светоптического микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Концентрацию клеток после энзиматического снятия с пластика подсчитывали в камере Горяева.

Ядерно-цитоплазматическое соотношение определяли с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США), (Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., 2012) и рассчитывали по следующей формуле (1):

$$ЯЦО = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}}, \quad (1)$$

где $S_{\text{я}}$ – площадь ядра клетки; $S_{\text{ц}}$ – площадь цитоплазмы.

Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеточной суспензии 0,4% раствором трипанового синего (ПанЭко, Индия) в соотношении 1:20.

2.5 Клоногенный анализ

Клоногенный анализ проводили после каждого пассажа по эффективности колониеобразования фибробластов. Дермальные фибробласты, помещённые в питательную среду (см. 2.3), высевали с плотностью 10 клеток на 1 см² поверхности чашки Петри (Corning, США). Клетки культивировали в течение 10 дней при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Образовавшиеся колонии на чашке Петри окрашивали по Романовскому-Гимзе.

В ходе подсчёта учитывали колонии, содержащие более 50 клеток, также изучали морфологию составляющих их клеток.

Эффективность колониеобразования фибробластов (ЭКОф) рассчитывали по формуле (2):

$$ЭКОф = \frac{N_{кол}}{N_{кл}} \times 100\%, \quad (2)$$

где N_{кол} – количество образовавшихся колоний; N_{кл} – количество эксплантированных клеток.

2.6 Определение времени удвоения популяции фибробластов

На каждом пассаже дермальные фибробласты засевали с плотностью 1,5x10⁴ клеток на 1 см² поверхности культурального флакона и культивировали до достижения культурой 90%-100% конфлюэнтности, клетки снимали с поверхности пластика методом трипсинизации (см. 2.3). Подсчёт клеток проводили в камере Горяева. Время удвоения оценивали по формуле (3):

$$T_2 = \frac{T_k \times \ln 2}{\ln\left(\frac{N_k}{N_0}\right)}, \quad (3)$$

где T_2 – время удвоения;

T_k – время культивирования одного пассажа в часах;

N_k – число клеток, собранных через T_k ;

N_0 – число засеянных клеток.

2.7 Иммунофенотипирование клеток

Оценку экспрессии специфических поверхностных клеточных маркеров проводили иммунофенотипированием дермальных фибробластов на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США). Для этого клетки снимали с поверхности пластика методом трипсинизации (см. 2.3), отмывали от культуральной среды и фермента, подсчитывали их количество.

В работе использовали набор моноклональных антител для определения мезенхимальных стромальных клеток – CD73-APC (экто-5'-нуклеотидаза), CD90-FITC (антиген дифференцировки тимоцитов 1), гемопоэтических клеток – CD45-PE (общий лейкоцитарный антиген), CD34-PE (молекула межклеточной адгезии), CD11b-PE (интегрин альфа-M), CD19-PE (B-лимфоцитарный антиген), HLA-DR-PE (молекула главного комплекса гистосовместимости DR), а также CD13-PE (аминопептидаза N), CD44-PE (трансмембранный гликопротеин), CD10-FITC (нейтральная эндопептидаза), CD166-PE (молекула адгезии), CD29-PE (субъединица $\beta 1$ интегрина) (BD Bioscience, США). Суспензию клеток инкубировали с антителами в разведениях, рекомендованных производителем, в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее отмывали от не связавшихся с антигеном антител раствором CellWash (Becton Dickinson, США).

Результаты анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva 6.1.3 (Becton Dickinson, США).

2.8 Исключение микробной и вирусной контаминации

2.8.1 Полимеразная цепная реакция

Молекулярные исследования выполняли совместно с сотрудниками лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из клеточной суспензии сорбентным методом. Культуральную суспензию для анализа отбирали после 3 пассажа. Использовали комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (НекстБио, Россия).

Методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации были проанализированы: микоплазма, вирус Эпштейна-Барр, вирусы герпеса 1, 2, 6 типов, цитомегаловирус человека, *Candida spp.* Для выявления ДНК применяли наборы: «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL», «АмплиСенс HHV1, II-скрин-FL», «АмплиСенс *Mycoplasma hominis*-FL», «АмплиСенс *Candida albicans*/*Candida glabrata*/*Candida krusei* – мульти прайм-FL» (АмплиСенс, Россия). Исследование проводили на амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 2.0 standard edition (Bio-Rad, США).

2.8.2 Микробиологический посев на стерильность

Микробиологические исследования выполняли совместно с сотрудниками бактериологической лаборатории. Клеточную суспензию отбирали после 3 пассажа и высевали на чашки Петри с 5% кровяным агаром, в жидкую тиогликолевую среду и среду Сабуро. Инкубировали в термостате при оптимальной температуре (37°C – 5% кровяной агар, тиогликолевая среда; 22°C – среда Сабуро) в течение 8 дней в аэробных и анаэробных условиях.

Заключение о стерильности культуральной среды делали при отсутствии роста микроорганизмов на чашках Петри и в пробирках.

2.9 Иммуноферментный анализ секрета дермальных фибробластов

Уровень цитокинов (интерлейкин 1, β – IL-1 β , антагонист рецептора интерлейкина 1 – IL-1RA, интерлейкин 10 – IL-10), факторов роста (трансформирующий фактор роста – TGF β 1, основной фактор роста фибробластов – FGF basic, тромбоцитарный фактор роста – PDGF-BB, белок активации фибробластов – FAP), компонентов ВКМ (макромолекулы фибронектина, коллагена IV типа) в супернатанте дермальных фибробластов (1-6 пассаж) и сыворотке крови определяли методом ELISA, используя методику производителя.

Использовали следующие тест-системы: TGF- β 1, IL-1 β , IL-1RA, IL-10, (Bender Medsystems, Австрия); FGF basic, PDGF-BB (R&S, США); фибронектин (Technoclone, Австрия); FAP (RayBio, США); коллаген IV (EKF diagnostics, Япония).

Результаты определяли на фотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм, с использованием программного обеспечения Magellan v. 1.2 (Tecan, Австрия).

2.10 Иммуноблоттинг

Разделение белков супернатанта дермальных фибробластов проводили в 12% полиакриламидном геле. Гели готовили по стандартной методике. Электрофорез проводили при 40 мА в электрофоретической камере (Bio-Rad, Китай). Перенос белков с геля на мембрану Immobilon-P (Millipore, США) осуществляли в электрофоретической камере. Детекцию белков проводили на

SNAP i.d. 2.0 Protein Detection System (Millipore, США). Мембрану промывали в растворе PBS-Tween20 (Helicon, Россия), неспецифическое окрашивание блокировали реагентом BlokTM Noise Cancelling Reagents (Millipore, США), инкубирование с первичными антителами проводили в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее мембрану тщательно промывали в PBS-Tween20, после чего инкубировали с вторичными антителами в течение 10 минут при комнатной температуре.

В работе использованы следующие антитела: monoclonal anti-fibrinectin antibody (Sigma, США), mouse anti-type IV collagen (Millipore, США), rabbit anti-laminin polyclonal antibody (Millipore, США), anti-rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibody (Sigma, США), anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody (Sigma, США). В качестве контроля были применены fibronectin solution from human fibroblasts (Sigma, США) и collagen type IV from human cell culture (Sigma, США). Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью реактива Luminata Classico Western HRP Substrate (Millipore, США).

Детекцию хемилюминесценции проводили на приборе ChemiDocTM MP Imaging System (Bio-Rad, США). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab 4.1 (Bio-Rad, США).

2.11 Вызванная секреторная активность дермальных фибробластов

Клетки после третьего пассажа засевали в 24-луночный планшет (Thermo scientific, Германия) с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на 1 см^2 поверхности. Культивировали до достижения культурой монослоя (7 дней) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для стимуляции секреторной активности дермальных фибробластов культуральную среду в соответствующих лунках меняли на питательную среду (см. 2.3), содержащую индуктор воспаления.

Контролями служили лунки с дермальными фибробластами, в которые добавляли питательную среду без индуктора.

В качестве стимулятора активности дермальных фибробластов использовали индуктор воспаления липополисахарид «Lipopolysaccharides из *Escherichia coli*, серотип O55:B5» (Sigma, Германия) в концентрации 10 мкг/мл.

Стимуляцию дермальных фибробластов проводили в течение 24 часов. Супернатанты отбирали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (GE Osmonics, США). Аликвоты хранили при -80°C в течение 2 месяцев.

2.12 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью интегрированного пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows XP (StatSoft, США). Описательная статистика признака включила среднюю арифметическую (M) и стандартное отклонение (SD), медиану (Me) и интерквартильный размах (25-й – 75-й процентиля).

Проверка гипотезы о нормальном распределении проводилась с применением критерия Шапиро-Уилка, который применяется для выборок с $n < 50$. Гипотеза о нормальном распределении значений переменной отвергалась, если критерий статистики значим. Различия между выборками, имеющими распределение, отличающееся от нормального, оценивались по U – критерию Манна-Уитни. Для множественной проверки статистических гипотез использовали критерий Краскела-Уоллиса. Групповую вероятность ошибки первого рода контролировали методом Холма. Оценку корреляционных связей осуществляли методом Спирмена (R). Нулевые гипотезы отвергали при уровне значимости критерия $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Морфология, клоногенный потенциал и антигенный фенотип дермальных фибробластов детей подросткового возраста в норме и при локальном воспалении в кишечнике

3.1.1 Морфология дермальных фибробластов

Первичные культуры дермальных фибробластов получали из биоптата кожи предплечья детей подросткового возраста. Выход клеток из биоптата наблюдался на 5 сутки. Все неприкрепившиеся клетки удалялись при замене культуральной среды в процессе культивирования. Большинство адгезированных клеток приобретали удлинненную форму, с распластанной цитоплазмой, плотно прилегающей к пластику культурального флакона (активные фибробласты) (рисунок 1).

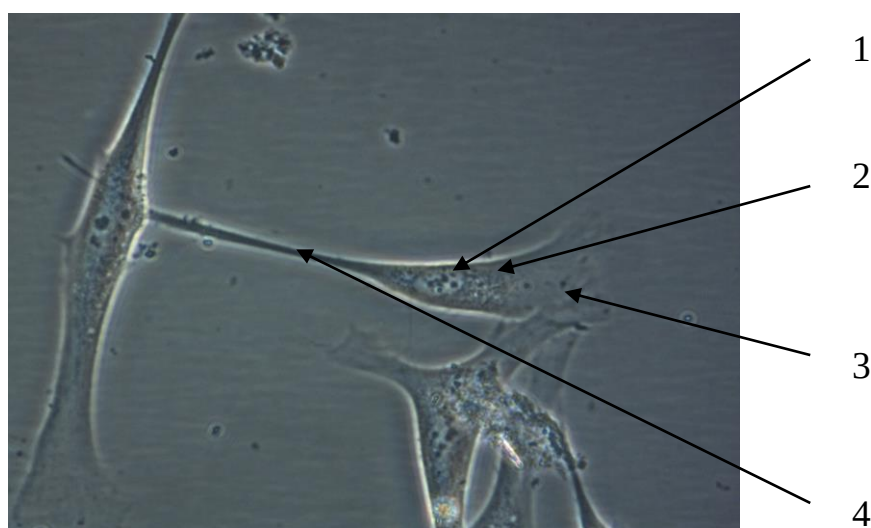


Рисунок 1. Микрофотография культуры фибробластов.

Фибробластоподобные клетки дермы ребенка с болезнью Крона

1 – ядро с ядрышками; 2 – эндоплазма; 3 – эктоплазма; 4 – отросток первого порядка. Ув. x200

На этапе выделения первичной клеточной культуры выявлялись небольшие веретеновидные, более крупные веретеновидные, плащевидные фибробласты. Полученные результаты говорят о наличии в популяции клеток различной степени дифференцировки.

Дермальные фибробласты детей имели веретеновидную форму и преимущественно образовывали отростки первого и второго порядка. В слабо базофильной цитоплазме выделялись структурно отличные участки: эндоплазма и эктоплазма. Эндоплазма была представлена пересекающимися нитевидными структурами, гранулами и включениями. В эктоплазме отмечалось однонаправленное расположение микрофибриллярных структур.

В центральной, наиболее широкой части клетки, определялось овальное с чёткими контурами базофильное ядро, в котором визуализировалось от 2 до 4 ядрышек.

Длина дермальных фибробластов, включая отростки, условно здоровых детей статистически значимо превышала данный показатель у детей с воспалительными заболеваниями кишечника.

Площадь ядра и цитоплазмы дермальных фибробластов детей с язвенным колитом статистически значимо ниже (таблица 2), чем дермальных фибробластов контрольной группы.

У детей с болезнью Крона площадь ядра и цитоплазмы сопоставимы с условно здоровыми детьми. В процессе культивирования площадь ядра и цитоплазмы варьировала в пределах исследуемых групп. Однако для дермальных фибробластов всех групп характерно, что размер ядра в 7,5 раз меньше площади цитоплазмы.

Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с заболеваниями ЖКТ не отличалось. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Морфологические характеристики культивируемых фибробластов
предплечья детей, Ме [25-й – 75-й процентиля]**

Показатель	Заболевание		
	Условно здоровые (контроль)	Болезнь Крона	Язвенный колит
Количество наблюдений	300	300	300
Ядерно- цитоплазматическое соотношение	0,136 [0,11-0,17]	0,142 [0,11-0,18]	0,135 [0,11-0,17]
Количество ядрышек	2 [2-3]	3 [2-3]	2 [2-3]
Длина клетки, µм	184,29 [150,42-223,74]	172,71 [131,81-204,016] (p=0,0005)*	168,26 [139,27-202,95] (p=0,00085)*
Площадь ядра, µм ²	150,22 [134,56-163,56]	145,58 [136,30-162,98]	140,94 [125,86-153,70] (p<0,0001)* (p<0,0001)**
Площадь цитоплазмы, µм ²	1114,76 [865,94-1349,08]	1077,06 [836,36-1351,40]	1058,79 [826,5-1266,72] (p=0,033)*

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Болезнь Крона», p<0,05 (критерий Mann-Whitney); ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

Во всех группах размер ядра дермальных фибробластов находился в прямой корреляционной зависимости с площадью цитоплазмы (R=0,42, p<0,0001). Также

прямая зависимость обнаружена между количеством ядрышек и размером ядра, и клетки в целом ($R=0,17$, $p<0,0001$; $R=0,099$, $p=0,0053$).

После формирования монослоя большинство клеток приобретали веретеновидную форму, которые были ориентированы в одном направлении и располагались параллельно или волнообразно вокруг центра колониеобразования (рисунок 2).

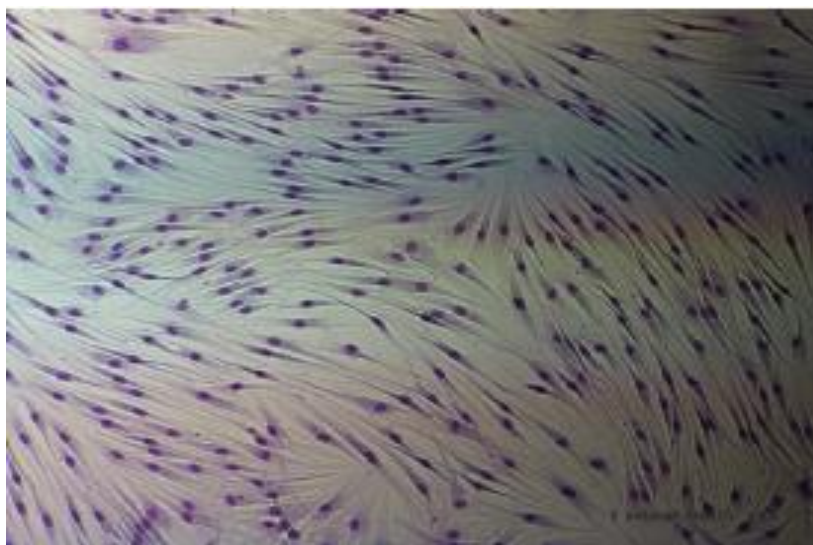


Рисунок 2. Монослойная культура дермальных фибробластов ребенка с болезнью Крона, 6 пассаж. Окраска по Романовскому – Гимзе. Ув. $\times 100$

Таким образом, культуры дермальных фибробластов, полученные от условно здоровых детей и детей с воспалительными заболеваниями кишечника, имели сходную фибробластоподобную морфологию. Морфометрические различия выявлены в длине дермальных фибробластов: длина дермальных фибробластов условно здоровых детей превышала данный показатель у детей с ВЗК на 10%, а также в площадях ядра и цитоплазмы: у дермальных фибробластов детей с язвенным колитом они были ниже на 5,8% и 5,3% соответственно, чем дермальные фибробласты контрольной группы.

Полученные результаты могут говорить о различиях в организации и ориентации цитоскелета фибробластов, обеспечивающего, в частности, динамическое изменение клетки в ответ на меняющееся микроокружение. Ядерно-цитоплазматическое отношение сопоставимо у дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с заболеваниями ЖКТ. Также небольшое ядро, содержащее несколько ядрышек (до 4-х), окружённое большим объёмом цитоплазмы, превышающее ядро в 7,5 раз, свидетельствует о пребывании дермальных фибробластов всех групп в метаболически активном состоянии.

3.1.2 Клоногенный потенциал дермальных фибробластов

В ходе исследования эффективности колониеобразования отмечено, что колонии, сформированные дермальными фибробластами, отличались друг от друга по плотности, размеру и морфологическим характеристикам, входящих в их состав клеток.

В окрашенных препаратах выделялось четыре типа колоний.

(1) Плотные колонии. В плотных колониях преобладали веретеновидные клетки, расположенные близко и строго упорядоченно относительно друг друга. Данные колонии содержали от сотен до нескольких тысяч клеток (рисунок 3 а-б).

(2) Рыхлые колонии состояли из различных по величине полиморфных дермальных фибробластов с наличием выраженных отростков. Дермальные фибробласты разобщены между собой, не имели определенной ориентации. Колонии включали до нескольких сотен дермальных фибробластов (рисунок 3 в-г).

(3) Смешанные колонии состояли из веретеновидных и полиморфных дермальных фибробластов (рисунок 3 д-е).

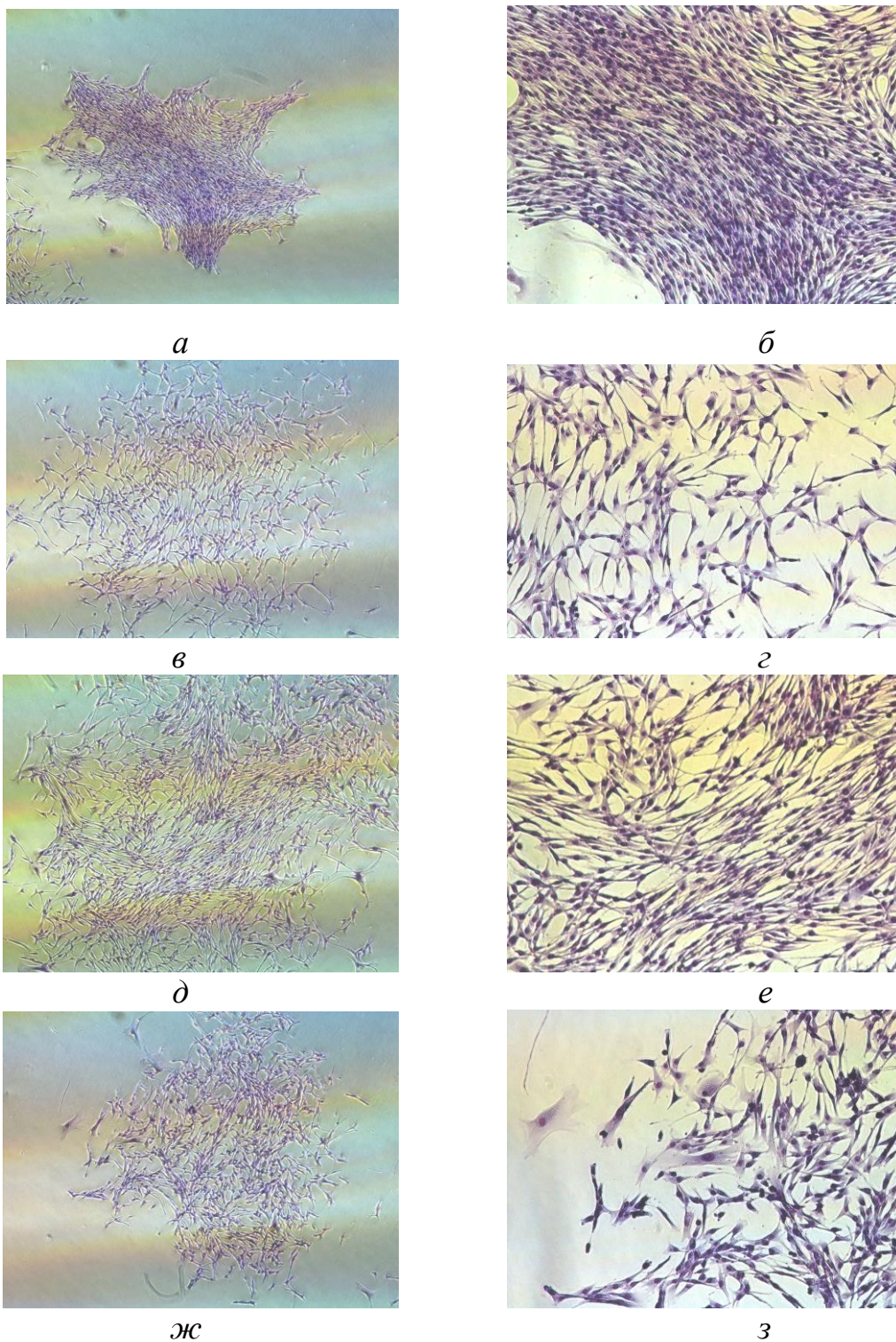


Рисунок 3. Колонии, сформированные дермальными фибробластами:

а-б – плотные; *в-г* – рыхлые; *д-е* – смешанные; *ж-з* – колонии с дегенерирующими клетками. Окраска по Романовскому – Гимзе. Ув. х40, х100

(4) Колонии с дегенерирующими клетками характеризовались наличием распластанных клеток с отсутствием чётких границ между клетками и признаками кариопикноза (рисунок 3 ж-з).

В ходе анализа экспериментальных данных выявлены различия в формировании различных типов колоний как межгрупповые, так и в рамках исследуемых групп. Данные отображены на рисунке 4.

В группе дермальных фибробластов условно здоровых детей наблюдалось преобладание смешанных, относительно плотных в 1,9 раза ($p < 0,0001$) и рыхлых колоний в 2,5 раза ($p = 0,00057$). Дермальные фибробласты детей с болезнью Крона формировали с одинаковой эффективностью два типа колоний: рыхлые и смешанные. Менее продуктивно данные клетки организовывали плотные колонии в пределах группы (в 2,5 раза, $p < 0,0001$; в 1,7 раза, $p = 0,048$ относительно смешанных и рыхлых соответственно).

Отмечено снижение формирования плотных и смешанных колоний в группе дермальных фибробластов с язвенным колитом относительно рыхлых колоний. Данные клетки создавали рыхлые колонии более интенсивно по сравнению с плотными ($p < 0,0001$) и смешанными ($p < 0,0001$) колониями соответственно в 6,5 раза и 2,2 раза. Также выявлено снижение плотных колоний относительно смешанных колоний в 2,9 раза ($p < 0,0001$).

Дермальные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника интенсивнее формировали рыхлые колонии и менее эффективно плотные, чем клетки условно здоровых детей.

Образование смешанных колоний происходило с одинаковой эффективностью дермальными фибробластами условно здоровых детей и детей с болезнью Крона. В то же время в группе дермальных фибробластов детей с язвенным колитом выявлено уменьшение количества смешанных колоний в 1,7 раза по сравнению с группой дермальных фибробластов условно здоровых детей.

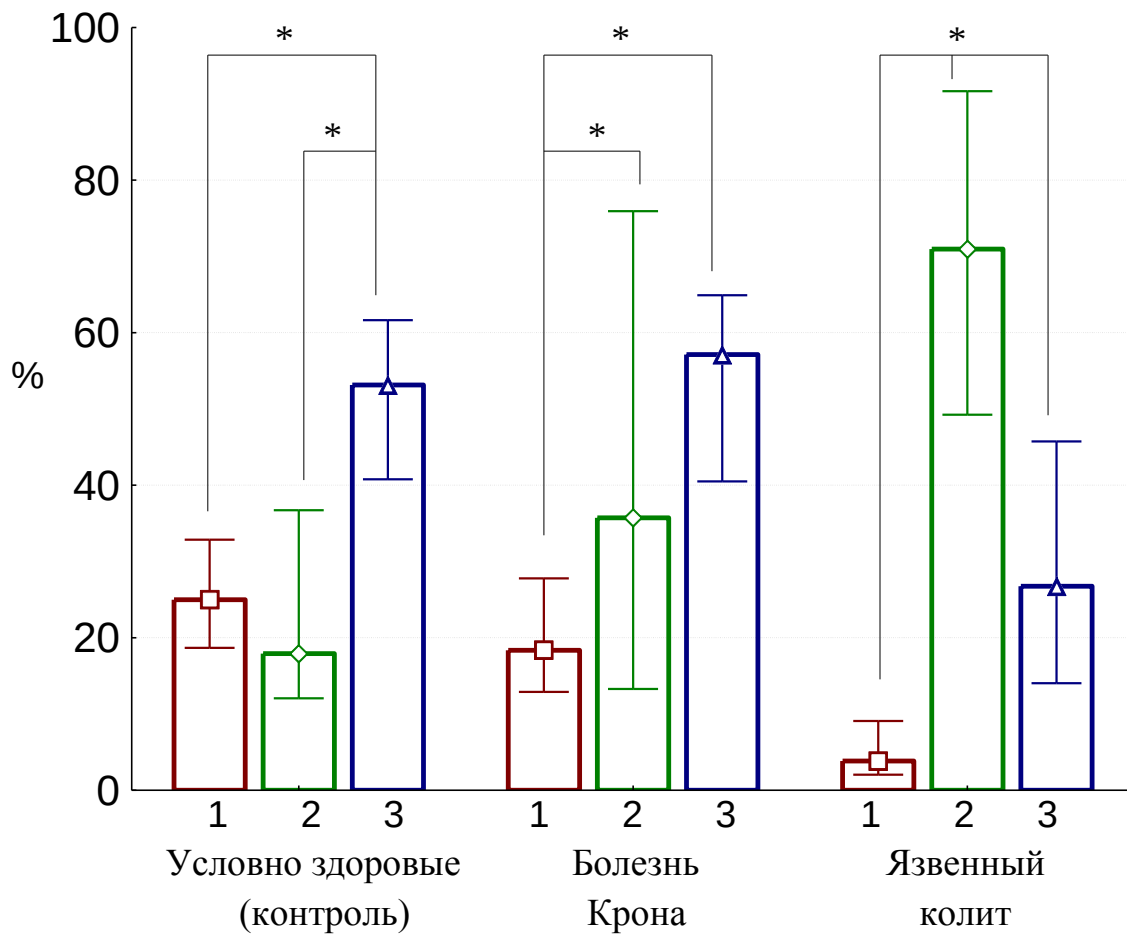


Рисунок 4. Распределение типов колоний, образованных дермальными фибробластами детей в культуре, Ме [25-й – 75-й процентиля]

1 – плотные колонии; 2 – рыхлые колонии; 3 – смешанные колонии;

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Дермальные фибробласты детей с язвенным колитом интенсивнее формировали рыхлые колонии, чем дермальные фибробласты детей с болезнью Крона в 2,3 раза. Одновременно наблюдалось снижение количества плотных в 2 раза и смешанных в 1,7 раза колоний дермальных фибробластов при язвенном колите по сравнению с формированием колоний при болезни Крона.

Во всех группах колонии с дегенерирующими клетками были единичными, что не имело статистически значимых различий. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Типы колоний дермальных фибробластов детей, Ме [25-й – 75-й процентиля]

Группы обследуемых детей	Плотные колонии, %	Рыхлые колонии, %	Смешанные колонии, %
Условно здоровые (контроль)	26,23 [18,92-33,077]	18,17 [13,64-22,22]	55,32 [46,84-61,65]
Болезнь Крона	19,0 [15,70-26,087] (p=0,049)*	22,84 [17,48-42,88] (p=0,026)*	58,16 [44,76-65,28]
Язвенный колит	8,97 [5,97-16,79] (p=0,022)* (p=0,00044)**	70,97 [49,23-91,67] (p<0,0001)* (p<0,0001)**	27,69 [20,41-48,077] (p<0,0001)* (p<0,0001)**

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Болезнь Крона», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таким образом, дермальные фибробласты условно здоровых детей интенсивнее формируют смешанные колонии относительно плотных и рыхлых колоний на 25% и 32% соответственно. Дермальные фибробласты детей с болезнью Крона также преимущественно формируют смешанные колонии; их доля увеличена на 32% и 22% по сравнению с плотными и рыхлыми колониями соответственно. Дермальные фибробласты детей с язвенным колитом с большей эффективностью образуют рыхлые колонии относительно плотных и смешанных

колоний на 60% и 39% соответственно; при этом смешанные колонии преобладают над количеством плотных колоний на 20%.

Выявлены межгрупповые различия в формировании типа колонии. Так, дермальные фибробласты детей с болезнью Крона и язвенным колитом соответственно на 10% и 49% интенсивнее формируют рыхлые колонии относительно условно здоровых детей. В то время как дермальные фибробласты условно здоровых детей эффективнее образуют плотные колонии на 6% и 16% по сравнению с дермальными фибробластами детей с болезнью Крона и язвенным колитом и смешанные колонии на 21% относительно дермальных фибробластов детей с язвенным колитом.

Преобладание рыхлых колоний и недостаточное уравнивание их плотными и смешанными колониями в популяции дермальных фибробластов детей с ВЗК может способствовать изменению как в структуре дермы и, как следствие, её дисфункции, так и смежного с ней эпидермиса.

Анализ эффективности колониобразования выявил особенности в способности дермальных фибробластов создавать колонии. При подсчете эффективности колониобразования учитывали колонии, содержащие более 50 клеток (рисунок 5; таблица 1, Приложение 1). Следует отметить, что для культур детских дермальных фибробластов характерно меньшее время удвоения популяций по сравнению с клеточными культурами, полученными от пожилых доноров, в которых преобладают более крупные зрелые дифференцированные фибробласты (Schneider E.L., Mitsui Y., 1976).

На первом пассаже эффективность колониобразования различалась между всеми исследуемыми группами. Максимальная эффективность колониобразования наблюдалась в группе условно здоровых детей, средняя эффективность в группе детей с болезнью Крона и минимальная – в группе детей с язвенным колитом.

На втором пассаже в группе дермальных фибробластов условно здоровых детей наблюдалось резкое снижение данного показателя и стабилизация его с третьего пассажа.

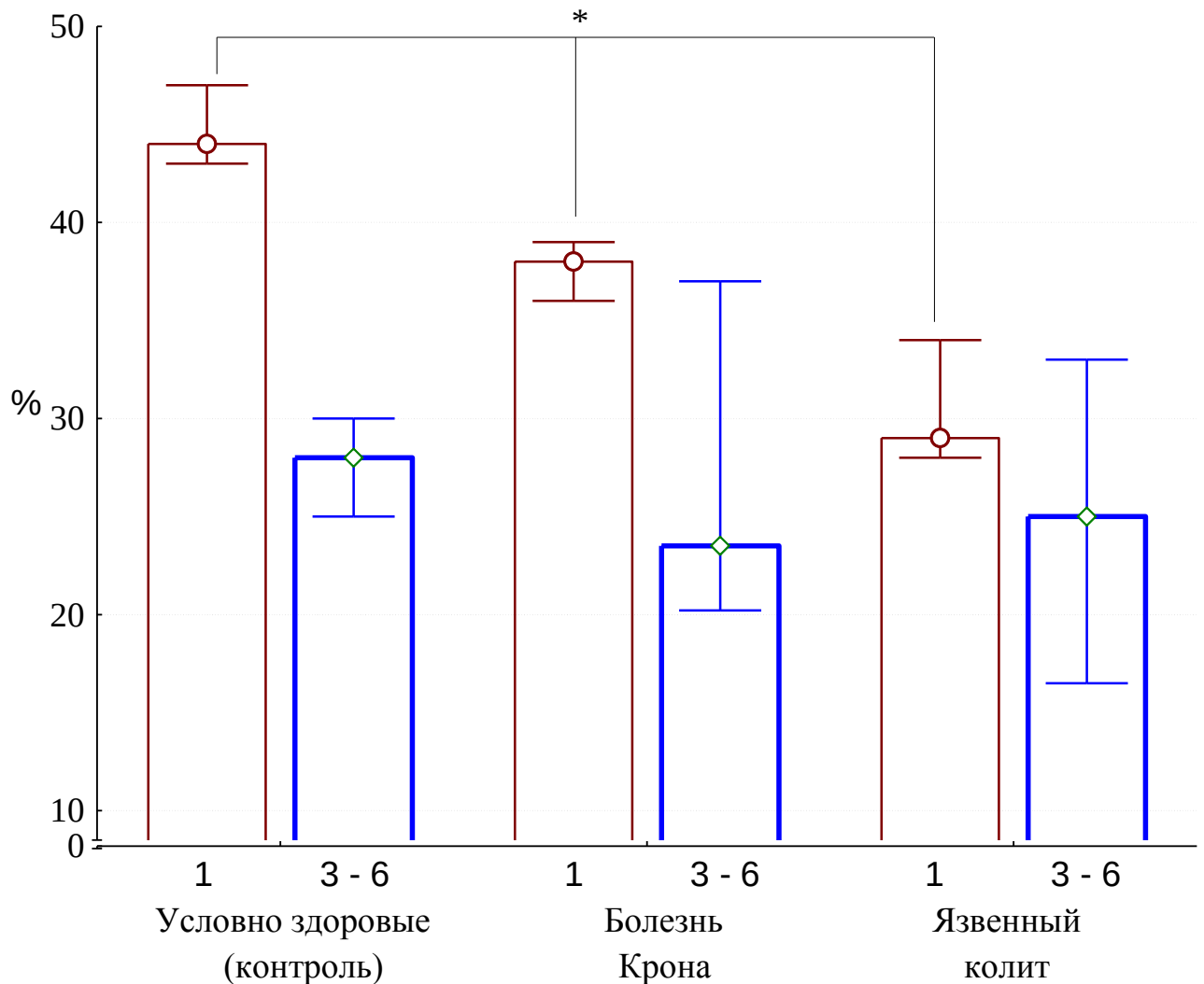


Рисунок 5. Эффективность образования колоний дермальными фибробластами в зависимости от пассажа, Ме [25-й – 75-й процентиля]
1, 3-6 – номер пассажа

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

С высокой эффективностью колонии образовывали дермальные фибробласты детей с болезнью Крона на первых двух пассажах, но к третьему пассажиру данная способность у клеток снижалась и сохранялась на таком уровне до шестого пассажа.

Отмечено, что дермальные фибробласты детей с язвенным колитом формировали колонии с первого по шестой пассаж с одинаково низкой интенсивностью.

Таким образом, хронические воспалительные заболевания кишечника у детей вызывают снижение эффективности колониеобразования на 7,5% и 16% у дермальных фибробластов детей с болезнью Крона и язвенным колитом соответственно в культуре на первом пассаже. С третьего пассажа разница в эффективности колониеобразования между дермальными фибробластами условно здоровых детей и детей с воспалительными заболеваниями кишечника исчезает.

Ввиду отсутствия различий по времени удвоения популяции между пассажами в пределах группы дермальных фибробластов, значения с первого по шестой пассаж были объединены. Данные представлены на рисунке 6 (таблица 2, Приложение 1).

В процессе вычисления времени удвоения клеточной популяции были получены следующие результаты. Время удвоения популяций дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с язвенным колитом статистически значимо не отличалось, хотя и наблюдалась тенденция к замедлению роста колоний дермальных фибробластов детей с язвенным колитом. Более медленным ростом характеризовались дермальные фибробласты детей с болезнью Крона, для удвоения клеток требовалось больше времени (на 16%) по сравнению с другими группами.

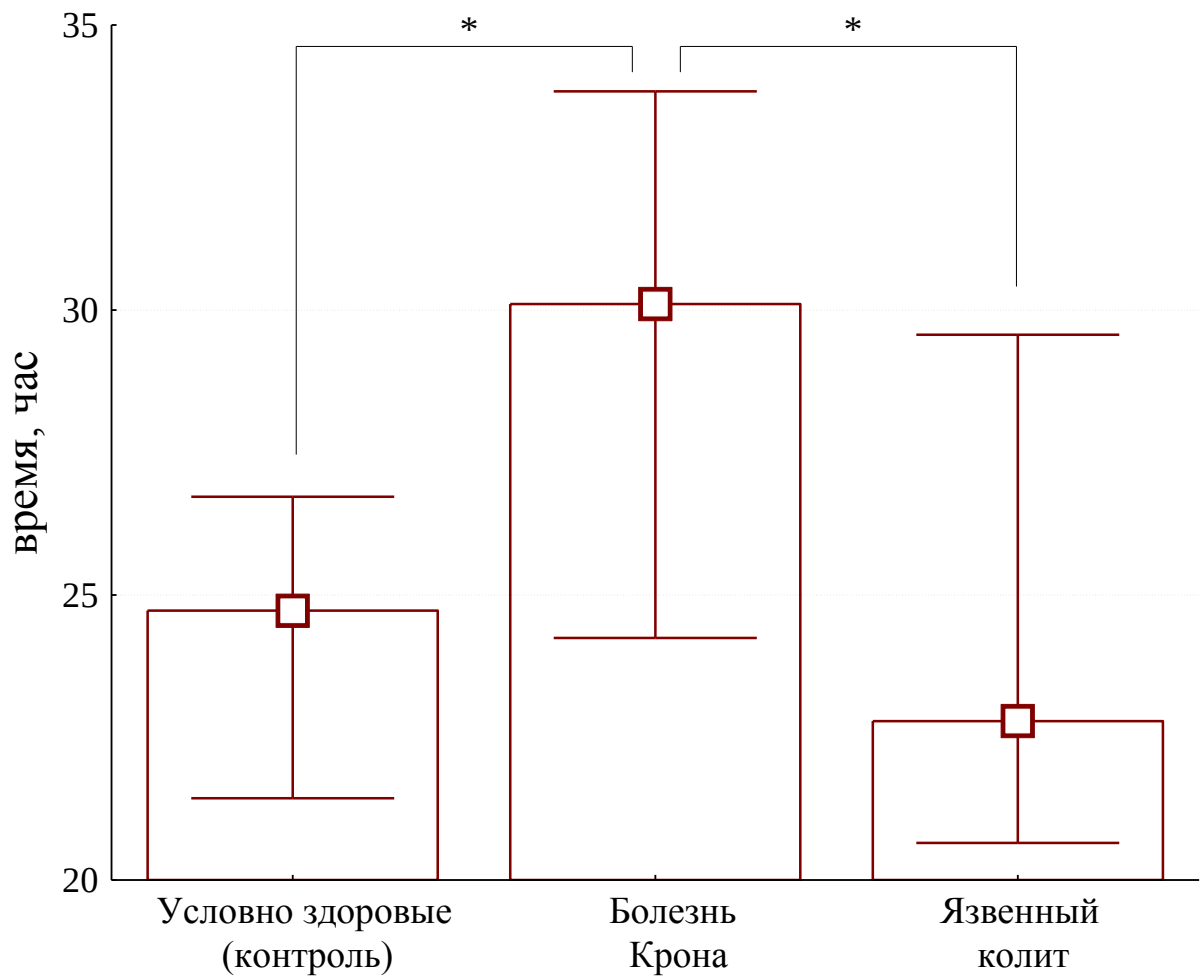


Рисунок 6. Время удвоения популяции дермальных фибробластов,
Me [25-й – 75-й процентиля]

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Таким образом, дермальные фибробласты детей с БК растут медленнее относительно условно здоровых детей, что, вероятно, замедляет обновление и восстановление ткани после повреждения и может способствовать уменьшению слоя дермы у данных пациентов.

3.1.3 Жизнеспособность дермальных фибробластов

Анализ жизнеспособности дермальных фибробластов показал, что доля погибших клеток в ходе пассирования невысокая, выживаемость составила $\geq 97\%$. Отмечено, что популяция дермальных фибробластов условно здоровых детей не отличается по жизнеспособности относительно клеток с воспалительными заболеваниями кишечника. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4

Жизнеспособность дермальных фибробластов детей, Me [25-й – 75-й процентиля]

Заболевание	Жизнеспособность, %
Условно здоровые (контроль)	99,0 [98,0-99,0]
Болезнь Крона	98,0 [98,0-99,0]
Язвенный колит	98,0 [97,0-99,0]

3.1.4 Антигенный фенотип дермальных фибробластов

Результаты иммунофенотипирования дермальных фибробластов в культуре клеток свидетельствовали о наличии поверхностных CD-кластеров, характерных для мезенхимальных стромальных клеток. Данные представлены в таблице 5.

В исследуемых популяциях отмечена высокая доля клеток, положительных по следующим показателям: CD90 (Thy-1), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD44 (трансмембранный гликопротеин), CD13 (GP150).

Таблица 5

**Иммунофенотип дермальных фибробластов по шести пассажам,
Me [25-й – 75-й процентиля]**

Антиген	Заболевание	Процент положительных клеток, %	Интенсивность экспрессии, <i>hν</i>
CD90	Условно здоровые (контроль) (n=5)	95,80 [85,85-99,70]	604,0 [217,0-988,0]
	Болезнь Крона (n=5)	95,40 [75,70-99,70]	562,0 [261,0-1034,0]
	Язвенный колит (n=4) (n=1)	99,80 [76,10-100]	882,0 [210,0-1603,0] 13080,50 [9661,0-15843,0]
CD73	Условно здоровые (контроль) (n=5)	100 [99,90-100]	2399,50 [741,0-3137,0]
	Болезнь Крона (n=4) (n=1)	100 [99,90-100]	2790,0 [2222,0-3107,0] 17276,0 [14320,50-19752,0]
	Язвенный колит (n=2) (n=3)	100 [99,80-100]	728,50 [520,0-802,0] 5451,0 [2842,0-5804,0]
CD44	Условно здоровые (контроль) (n=5)	99,90 [98,65-100]	2427,0 [504,0-3509,0]
	Болезнь Крона (n=5)	99,70 [99,30-100]	2446,0 [892,0-4352,0]
	Язвенный колит (n=5)	100 [99,90-100]	4375,50 [3491,0-8215,0] (p=0,00028)* (p=0,002)**
CD13	Условно здоровые (контроль) (n=5)	99,80 [97,20-99,95]	1145,50 [299,0-1956,50]
	Болезнь Крона (n=5)	97,85 [91,75-99,75]	843,0 [285,0-1612,0]
	Язвенный колит (n=5)	100 [99,90-100]	2766,0 [1774,0-4023,0] (p=0,00018)* (p<0,0001)**

CD10	Условно здоровые (контроль) (n=5)	39,05 [19,35-61,40]	136,50 [96,0-250,50]
	Болезнь Крона (n=5)	40,0 [26,50-48,0]	152,0 [88,0-221,0]
	Язвенный колит (n=5)	63,10 [45,80-99,30] (p=0,0041)* (p=0,005)**	250,0 [208,0-268,0] (p=0,041)* (p=0,012)**
CD166	Условно здоровые (контроль) (n=5)	19,30 [14,20-23,50]	131,50 [127,0-140,0]
	Болезнь Крона (n=5)	14,20 [13,0-17,10]	130,0 [118,50-136,0]
	Язвенный колит (n=5)	23,0 [16,80-41,90]	142,50 [129,0-148,0]
CD29	Условно здоровые (контроль) (n=5)	18,55 [13,0-25,50]	125,50 [122,0-139,0]
	Болезнь Крона (n=5)	3,0 [2,40-9,0] (p=0,0018)*	113,0 [110,0-126,0]
	Язвенный колит (n=5)	3,95 [2,90-7,45] (p=0,00013)*	120,50 [113,0-129,0]
CD45 CD19 CD34 CD11b HLA-DR	Условно здоровые (контроль) (n=5)	отрицательно	отрицательно
	Болезнь Крона (n=5)	отрицательно	отрицательно
	Язвенный колит (n=5)	отрицательно	отрицательно

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Болезнь Крона», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

n – число пациентов, от которых получены дермальные фибробласты

Меньшая доля клеток условно здоровых детей имела на поверхности дермальных фибробластов CD10 (нейтральная эндопептидаза) (40%), CD166 (молекула адгезии) (20%) и CD29 (субъединица β_1 интегрина) (20%).

Были выявлены отличия между популяциями дермальных фибробластов детей с язвенным колитом и клетками условно здоровых детей и детей с болезнью Крона по количеству CD10-положительных клеток. В популяции дермальных фибробластов детей с язвенным колитом в 2 раза было больше CD10-положительных клеток.

Кроме того, популяция дермальных фибробластов детей с язвенным колитом отличалась от других популяций по уровню экспрессии антигенов CD44, CD13 и CD10 на клеточной поверхности, которая была повышена в среднем в 2 раза.

На поверхности всех исследуемых клеток отсутствовали маркеры гемопоэтических клеток: общий лейкоцитарный антиген CD45, мембранный антиген В-клеток CD19, HLA-DR, маркер гемопоэтических стволовых клеток человека CD34, маркер CD11b, характерный для моноцитов, макрофагов и гранулоцитов.

Описанный антигенный фенотип дермальных фибробластов сохранялся в течение 6 пассажей. Изменений в интенсивности экспрессии данных антигенов дермальными фибробластами в процессе культивирования не выявлено (таблица 3, 4, Приложение 1).

Таким образом, антигенный фенотип дермальных фибробластов детей соответствует фенотипу мезенхимальных стромальных клеток. Отличия между популяциями дермальных фибробластов детей с язвенным колитом и клетками условно здоровых детей и детей с болезнью Крона выявлены по количеству CD10-положительных клеток и уровню экспрессии антигенов CD44, CD13 и CD10 на клеточной поверхности, которая была повышена в среднем в 2 раза, что,

вероятно, связано с быстрым переходом стадий нормальной дифференцировки фибробластов.

3.1.5 Контаминация

В ходе бактериологического исследования культуральной суспензии дермальных фибробластов рост микроорганизмов отсутствовал на всех используемых средах. Тестирование культуральной суспензии на вирусы, микроорганизмы, грибы не выявило содержания ДНК в образцах. Результаты проведенных анализов свидетельствовали об отсутствии бактериальной, грибковой и вирусной контаминации в исследуемых пробах. Данные представлены в таблицах 5 и 6, Приложение 1.

3.2 Функциональная характеристика дермальных фибробластов здоровых детей и с воспалительными заболеваниями кишечника

3.2.1 Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и супернатанте дермальных фибробластов детей

В ходе работы был проанализировано содержание провоспалительного цитокина IL-1 β , его рецепторного антагониста IL-1RA и противовоспалительного цитокина IL-10 в супернатанте дермальных фибробластов и сыворотке исследуемых детей (рисунок 7; таблица 7, Приложение 1).

IL-1 β . У детей с болезнью Крона и язвенным колитом наблюдалась гиперпродукция IL-1 β на системном уровне и в супернатанте дермальных фибробластов по сравнению с условно здоровыми детьми.

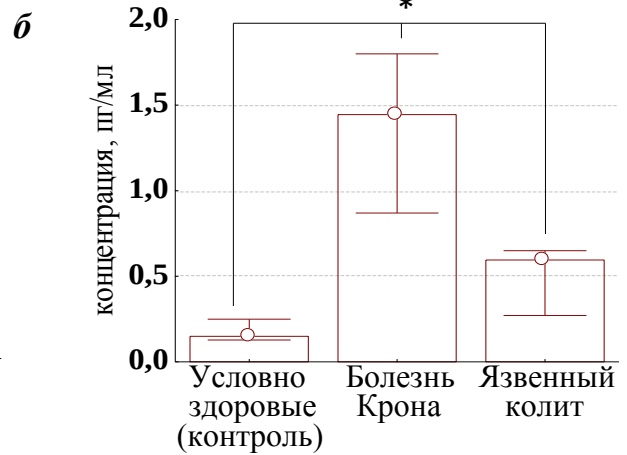
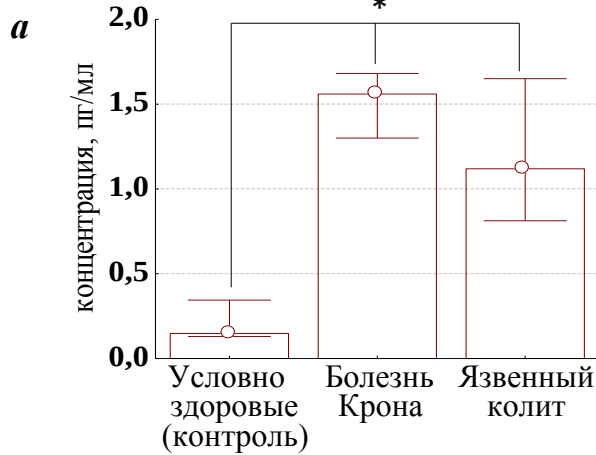
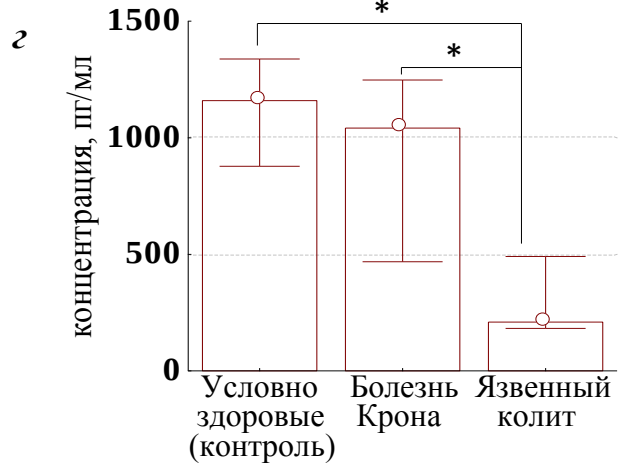
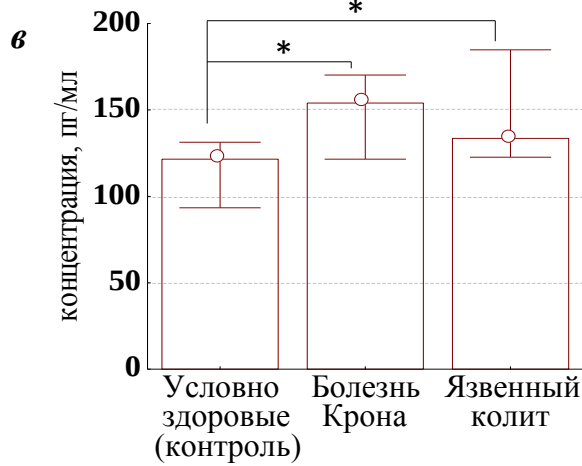
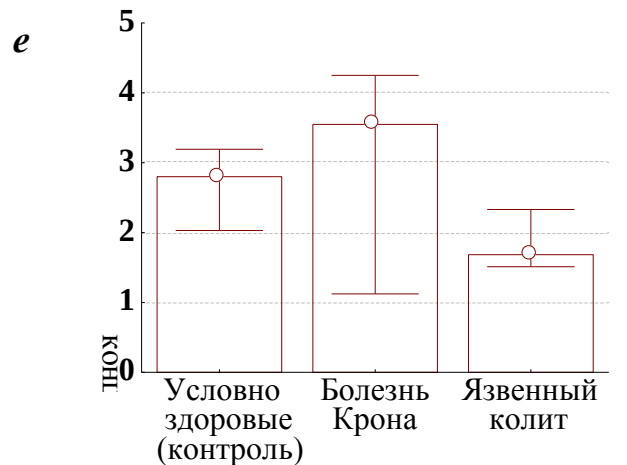
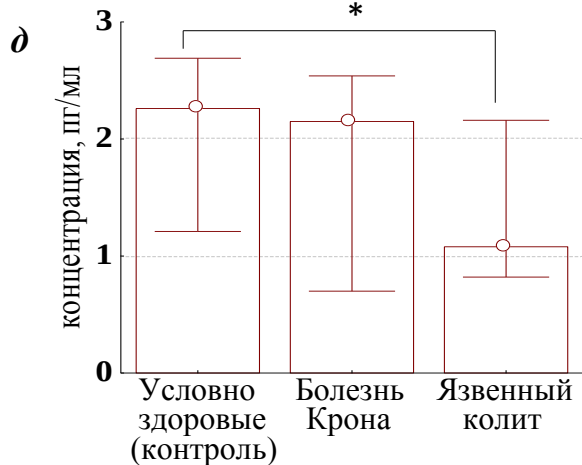
IL-1 β **IL-1RA****IL-10**

Рисунок 7. Содержание цитокинов, спонтанно секретируемых дермальными фибробластами (а, в, д) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г, е),

Me [25-й – 75-й процентиля]

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Таким образом, как на системном уровне, так и на уровне культивируемых дермальных фибробластов выявлено повышение секреции провоспалительных цитокинов у детей, имеющих болезнь Крона и язвенный колит относительно условно здоровых детей.

В сыворотке детей с болезнью Крона уровень IL-1 β повышен в 7,7 раз относительно условно здоровых детей. В сыворотке детей с язвенным колитом уровень IL-1 β повышен в 3 раза относительно условно здоровых детей. Значительное увеличение концентрации IL-1 β на системном уровне является результатом активности преимущественно иммунных клеток и свидетельствует о наличии системной воспалительной реакции в организме детей с ВЗК при хроническом течении заболеваний.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона уровень IL-1 β повышен в 6,3 раз относительно условно здоровых детей. В супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом уровень IL-1 β повышен в 5,3 раз относительно условно здоровых детей. Увеличение секреции IL-1 β дермальными фибробластами детей с ВЗК также говорит об активации в них провоспалительного потенциала в результате вовлечения дермальных фибробластов в системную воспалительную реакцию.

IL-1RA. Концентрация в сыворотке рецепторного антагониста провоспалительного цитокина IL-1RA (противовоспалительное действие) имела тенденцию к снижению у детей с болезнью Крона и достоверно была ниже у детей с язвенным колитом. В то же время в супернатант дермальные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника секретировали достоверно больше антагониста провоспалительного цитокина IL-1RA, чем дермальные фибробласты условно здоровых детей.

В сыворотке детей с болезнью Крона уровень IL-1RA снижен в 1,2 раза относительно условно здоровых детей. В сыворотке детей с язвенным колитом

уровень IL-1RA снижен в 3,7 раза относительно условно здоровых детей. Значительное снижение концентрации антагониста рецептора к провоспалительному цитокину IL-1 β на системном уровне свидетельствует о наличии системной воспалительной реакции в организме детей с ВЗК при хроническом течении заболеваний.

Противоположные результаты получены в супернатанте дермальных фибробластов. У детей с болезнью Крона концентрация IL-1RA повышена в 1,3 раза относительно условно здоровых детей. В супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом уровень IL-1RA повышен в 1,7 раза относительно условно здоровых детей. Полученные данные говорят о том, что дермальные фибробласты детей с ВЗК проявляли повышение противовоспалительного ответа, однако количества IL-1RA, вероятно, недостаточно для компенсации действия IL-1 β как на системном, так и на местном уровне.

Таким образом, выявлено различие направленности изменения в содержании антагониста рецептора провоспалительного цитокина IL-1RA на системном уровне и секреции дермальными фибробластами в культуре, взятыми у детей, имеющих болезнь Крона и язвенный колит по сравнению с условно здоровыми детьми.

IL-10. Сывороточный уровень противовоспалительного цитокина IL-10 у детей с язвенным колитом имел тенденцию к снижению относительно группы условно здоровых детей, однако из-за небольшой выборки не имел статистически значимых различий между исследуемыми группами. Ту же самую тенденцию к снижению имела и концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 в супернатанте дермальных фибробластов по сравнению с условно здоровыми детьми. Достоверное снижение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 в супернатанте доказано в группе у детей с язвенным колитом.

В сыворотке детей с болезнью Крона концентрация IL-10 не отличается от условно здоровых детей, а в сыворотке детей с язвенным колитом понижена в 1,4 раза относительно условно здоровых детей. Полученные данные можно интерпретировать как нарушение в секреции IL-10, приводящее к дисбалансу в цитокиновой сети воспалительного ответа, что способствует поддержанию воспаления на системном уровне в условиях хронического течения заболевания.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона уровень IL-10 снижен в 1,2 раза относительно условно здоровых детей. В супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом уровень IL-10 снижен в 1,5 раза относительно условно здоровых детей.

Таким образом, воспалительные заболевания кишечника у детей приводят, вероятно, к снижению концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке крови, определенный вклад в которую вносят и дермальные фибробласты больных детей, уменьшающие секрецию противовоспалительного цитокина IL-10.

Для уточнения данных о соотношении секретируемых противо- и провоспалительных факторов и выявления достоверных изменений между группами было подсчитано соотношение секретируемых молекул антагониста/агониста IL-1 β рецептора в супернатантах дермальных фибробластов и сыворотке условно здоровых и больных детей.

Было показано (таблица 6), что соотношение концентраций IL-1Ra/IL-1 β в сыворотке детей с болезнью Крона и язвенным колитом относительно контрольной группы снижено в 8 и 12 раз соответственно.

В супернатантах дермальных фибробластов детей с болезнью Крона и язвенным колитом данное соотношение противовоспалительного/провоспалительного факторов также ниже соответственно в 5,6 раз и в 4,3 раза по сравнению с таким же показателем условно здоровых детей.

Таблица 6

**Соотношение содержания антагониста/агониста IL-1 β рецепторов в сыворотке и супернатантах дермальных фибробластов здоровых и больных воспалительными заболеваниями кишечника детей,
Me [25-й – 75-й процентиля]**

Заболевание	IL-1RA/IL-1 β	
	Сыворотка	Супернатант
Условно здоровые (контроль)	6096,39 [5290-8921,6]	661,85 [313,53-820,76]
Болезнь Крона	754,18 [619,35-1058,48] p=0,0027*	103,6 [85,49-122,7] p<0,0001* p=0,016**
Язвенный колит	669,2 [482,94-755,17] p=0,0045*	131,36 [97,55-164,34] p<0,0001*

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney) ;

** - статистически значимые различия с группой «Язвенный колит», p<0,05 (критерий Mann-Whitney)

Таким образом, достоверно доказано, что при развитии воспалительных заболеваний кишечника у детей снижено содержание противовоспалительных факторов (например, антагониста рецептора провоспалительного фактора IL-1RA) в сыворотке крови, что отражает системный ответ иммунной системы при хроническом воспалении. В то же время выявлено, что дермальные фибробласты предплечья, не относящиеся пространственно к кишечнику, были вовлечены в

системный усиленный воспалительный ответ и проявляли провоспалительный секретом.

3.2.2 Спонтанная секреция дермальными фибробластами ростовых факторов

В сыворотке крови детей и супернатантах их дермальных фибробластов была измерена концентрация факторов роста.

FAP. Данные представлены на рисунке 8 (таблица 8, Приложение 1). В сыворотке детей с БК количество белка активации фибробластов – FAP (fibroblast activation protein, FAP), снижено в 1,2 раза относительно условно здоровых детей.

В сыворотке детей с язвенным колитом белок активации фибробластов на уровне, наблюдаемом по данному фактору в группе условно здоровых детей.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона концентрация FAP, противоположно его значению в сыворотке, повышена в 2,5 раза относительно условно здоровых детей.

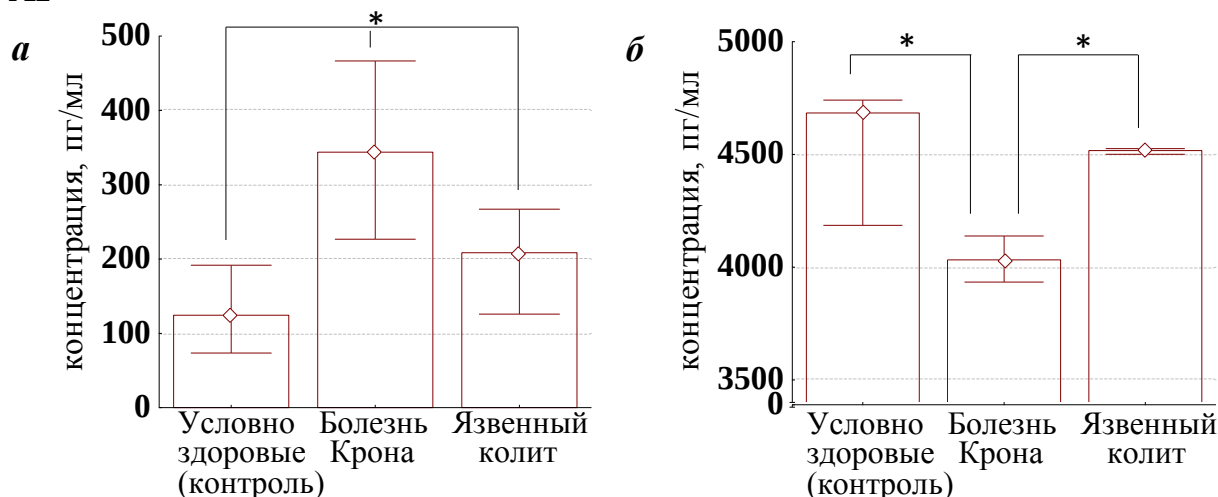
В супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом уровень белка активации фибробластов повышен в 1,6 раза относительно условно здоровых детей.

Таким образом, дермальные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника характеризовались более интенсивной секрецией фибробласт-активирующего белка по сравнению с контрольной группой условно здоровых детей. Полученные результаты подтверждают данные других экспериментов в нашей работе, свидетельствующие в пользу нахождения дермальных фибробластов в активном состоянии при ВЗК.

PDGF-BB. Продукция тромбоцитарного фактора роста – PDGF-BB, являющегося мощным стимулятором репаративной регенерации тканей,

пролиферации клеток, в частности фибробластов, дермальными фибробластами детей с болезнью Крона и язвенным колитом достоверно повышена по сравнению с дермальными фибробластами условно здоровых детей (рисунок 8; таблица 8, Приложение 1).

FAP



PDGF-BB

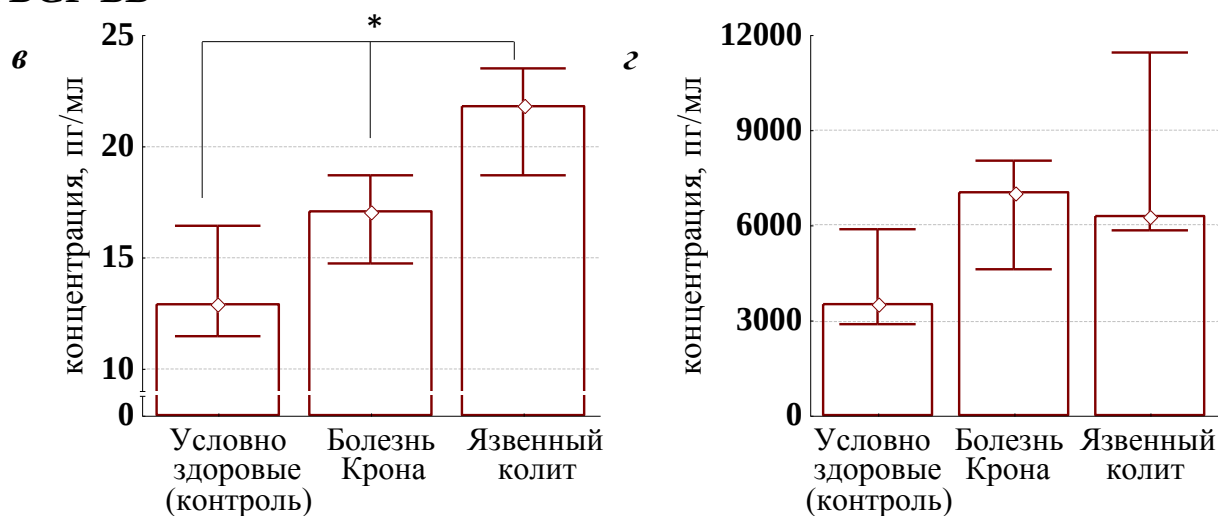


Рисунок 8. Белок активации фибробластов и тромбоцитарный фактор роста, секретируемые дермальными фибробластами (а, в) и их содержание в сыворотке крови (б, г), Me [25-й – 75-й проценти]

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Сывороточный уровень PDGF-BB детей с болезнью Крона повышен в 1,5 раза относительно условно здоровых детей.

В сыворотке детей с язвенным колитом обнаружено увеличение количества PDGF-BB в 2,3 раза относительно условно здоровых детей.

Повышение концентрации тромбоцитарного фактора роста в сыворотке свидетельствовало о стимуляции системного ответа клеток на хроническое воспаление в кишечнике, в том числе, вероятно, и дермальных фибробластов, секретирующих PDGF-BB.

Действительно, было показано, что и в супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона концентрация PDGF-BB повышена в 1,2 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом концентрация PDGF-BB также повышена в 1,5 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

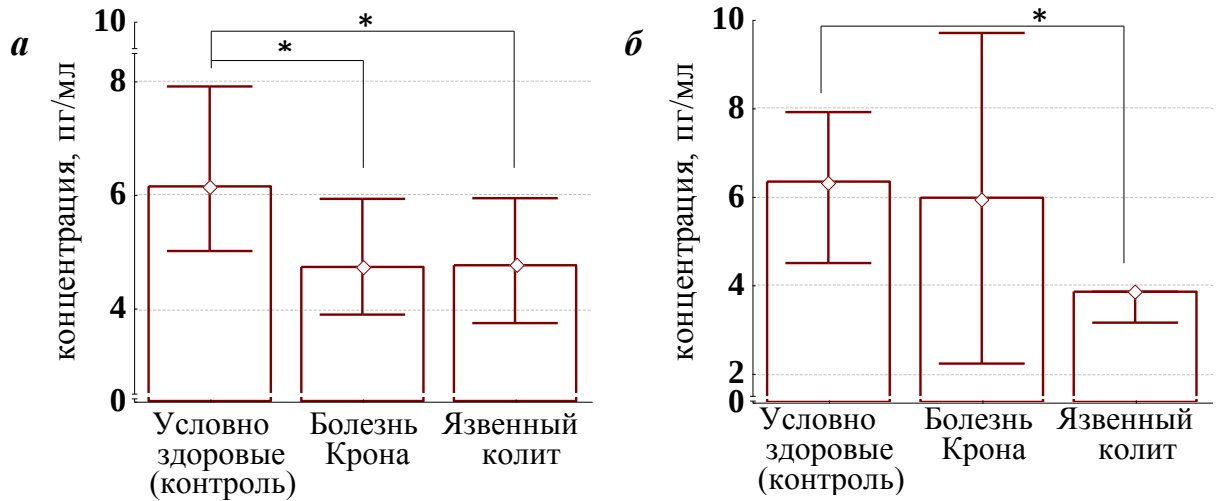
Полученные результаты говорят о наличии высокого потенциала к ангиогенным процессам у дермальных фибробластов детей с ВЗК, вовлеченных в системный ответ на хроническое воспаление в кишечнике.

Таким образом, дермальные фибробласты предплечья детей вовлечены в системный ответ на развитие хронических воспалительных заболеваний кишечника у детей, и характеризуются повышенным синтезом мощного стимулятора репарации тканей и ангиогенеза тромбоцитарного фактора роста – PDGF-BB.

FGFb. Несмотря на выявленное активное состояние дермальных фибробластов у детей при ВЗК, содержание фактора роста фибробластов – FGFb, играющего ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки широкого спектра клеток и тканей, в сыворотке крови и супернатантах дермальных фибробластов детей с язвенным колитом снижено относительно

значений в группе условно здоровых детей (контроль) (рисунок 9; таблица 8, Приложение 1).

FGFb



TGFβ1

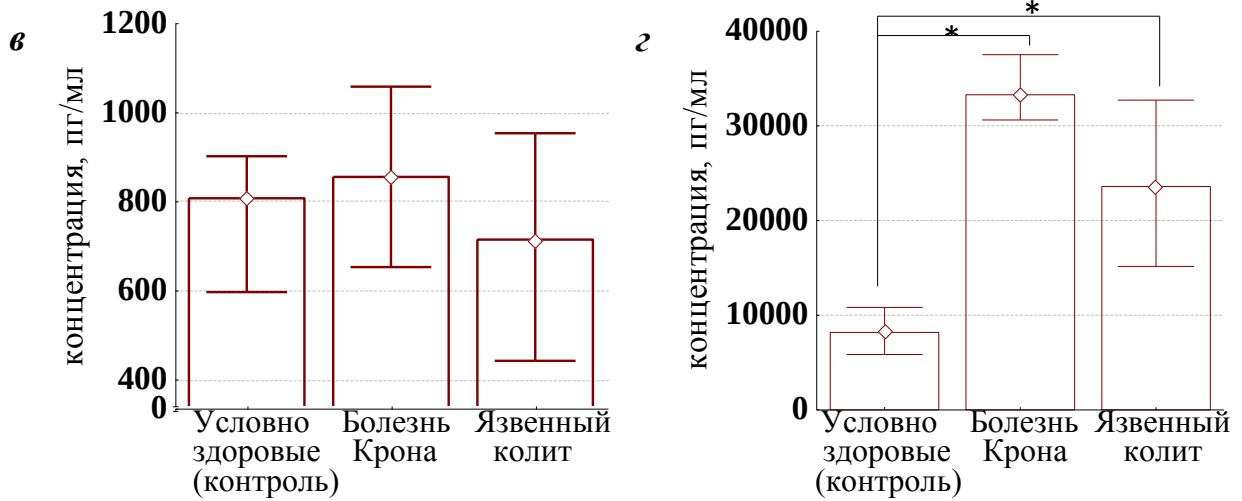


Рисунок 9. Факторы роста, секретируемые дермальными фибробластами (а, в) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г),

Me [25-й – 75-й процентиля]

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

В сыворотке детей с болезнью Крона и условно здоровых детей содержится одинаковое количество молекул FGFb. У детей с язвенным колитом сывороточная концентрация FGFb снижена в 1,7 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

Таким образом, на системном уровне выявлен дисбаланс между факторами репаративной регенерации при хроническом течении ВЗК у детей.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона концентрация FGFb снижена в 1,3 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

Содержание FGFb в супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом снижено в 1,3 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

Таким образом, дермальные фибробласты предплечья, активированные воспалением в кишечнике, проявляют снижение продукции фактора роста фибробластов, что, по-видимому, отражается в его снижении на системном уровне и вносит вклад в нарушение репаративной регенерации в условиях хронического течения заболевания.

TGFβ1. Статистически значимых различий в супернатанте дермальных фибробластов по содержанию TGFβ1 обнаружено не было, в то время как на системном уровне наблюдается значимое увеличение содержания TGFβ1 у детей с ВЗК (рисунок 9; таблица 8, Приложение 1).

В сыворотке детей с болезнью Крона концентрация TGFβ1 увеличена в 3,7 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

В сыворотке детей с язвенным колитом концентрация TGFβ1 повышена в 2,9 раза относительно значений в группе условно здоровых детей.

Повышение сывороточного уровня TGFβ1 обусловлено накоплением в результате деятельности клеток иммунной системы, что способствует, например,

дифференцировке фибробластов в миофибробласты в зоне высокой ремоделирующей активности.

В супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона и язвенным колитом содержание TGF β 1 находится на одном уровне со значением данного показателя в группе условно здоровых детей.

Таким образом, дермальные фибробласты у детей с воспалительными заболеваниями кишечника проявляли не только провоспалительный фенотип, но и дисбаланс в продукции факторов, регулирующих репаративную регенерацию при воспалении: повышение синтеза, стимулирующего репаративную регенерацию и ангиогенез, фибробласт-активирующего фактора – FAP, тромбоцитарного фактора роста – PDGF-BB, снижение секреции фактора роста фибробластов – FGFb, и отсутствие изменений в секреции TGF β 1.

Наблюдаемый секреторный фенотип по ростовым факторам обусловлен вовлечением дермальных фибробластов в системную реакцию на длительное хроническое воспаление в кишечнике.

3.2.3 Спонтанная продукция дермальными фибробластами растворимых компонентов внеклеточного матрикса (макромолекул коллагена IV типа, фибронектина)

С целью оценки секреторной активности дермальных фибробластов в отношении продукции и выделения белков матрикса методами иммуноблоттинга детектированы мажорные белки внеклеточного матрикса (рисунок 10). Антителами против коллагена IV типа и фибронектина выявлены соответствующие фрагменты белков. Видны различия в интенсивности полос на дорожках между группами исследуемых.

Фибронектин. Полуколичественное определение концентрации фрагментов белков показало, что дермальные фибробласты детей с болезнью Крона почти в 2 раза интенсивнее продуцировали фибронектин по сравнению с дермальными фибробластами условно здоровых детей и с язвенным колитом, средние значения концентраций которых составили соответственно 84,40 мкг/мл, 38,83 мкг/мл и 39,10 мкг/мл (таблица 7).

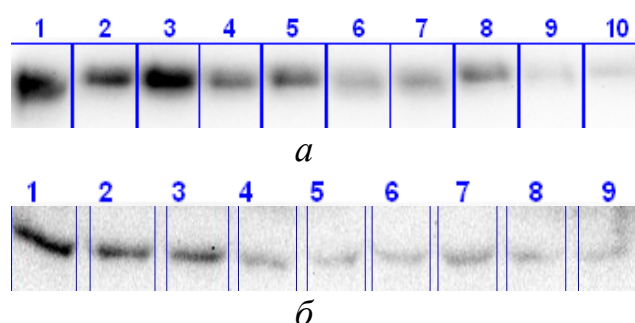


Рисунок 10. Иммуноблоттинг белков, синтезируемых дермальными фибробластами: *а* – окраска антителами против фибронектина; *б* – окраска антителами против коллагена IV типа.

а) иммунопреципитат фибронектина в супернатанте дермальных фибробластов: 1 – контроль; 2-4 – детей с БК; 5-7 – детей с ЯК; 8-10 – условно здоровых детей; *б)* иммунопреципитат коллагена 4 типа в супернатанте дермальных фибробластов: 1 – контроль; 2-3 – условно здоровых детей; 4-6 – детей с ЯК; 7-9 – детей с БК

Коллаген IV типа. Антителами к коллагену IV типа определялись белковые полосы, содержание данного белка для детей с язвенным колитом и болезнью Крона (26,90 мкг/мл, 47,0 мкг/мл соответственно) было снижено относительно значений в группе дермальных фибробластов условно здоровых детей (95,30 мкг/мл).

Ламинин выявлялся в следовых количествах и не подлежал дальнейшему анализу.

Таблица 7

**Компоненты внеклеточного матрикса в супернатанте (мкг/мл),
продуцируемые дермальными фибробластами, Ме [25-й – 75-й процентиля]**

Структурные макромолекулы внеклеточного матрикса	Условно здоровые (контроль)	Болезнь Крона	Язвенный колит
Коллаген IV типа	95,30 [44,0-97,70]	47,0 [23,90-70,95]	26,90 [20,75-31,80] p=0,016*
Фибронектин	38,83 [38,10-39,40]	84,40 [73,50-123,95] p=0,014*	39,10 [37,90-44,60]

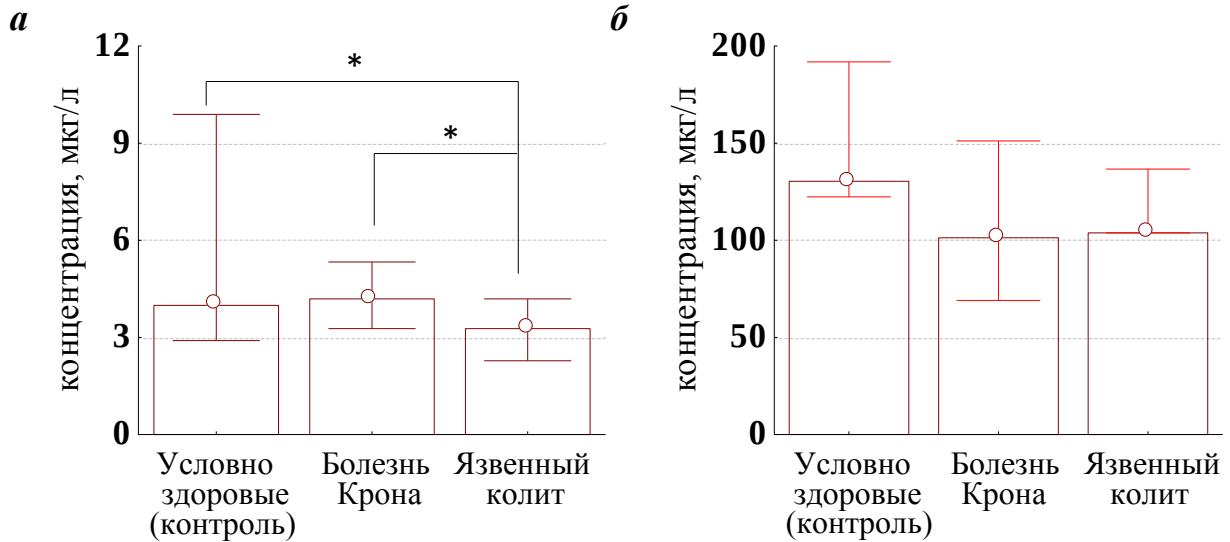
* - статистически значимые различия с группой «Контроль», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таким образом, методом иммуноблоттинга были выявлены особенности секрета дермальных фибробластов детей с ВЗК, а именно снижение продукции макромолекул коллагена IV типа и повышение продукции фибронектина.

Для подтверждения результата было проведено определение макромолекул коллагена IV типа и фибронектина в ходе иммуноферментного анализа. Данные анализа по уровню продукции дермальными фибробластами компонентов ВКМ представлены на рисунке 11 (таблица 9, Приложение 1).

Коллаген IV типа. Продукция макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами детей с язвенным колитом статистически значимо снижена по сравнению с условно здоровыми детьми и детьми с болезнью Крона.

Коллаген IV типа



Фибронектин

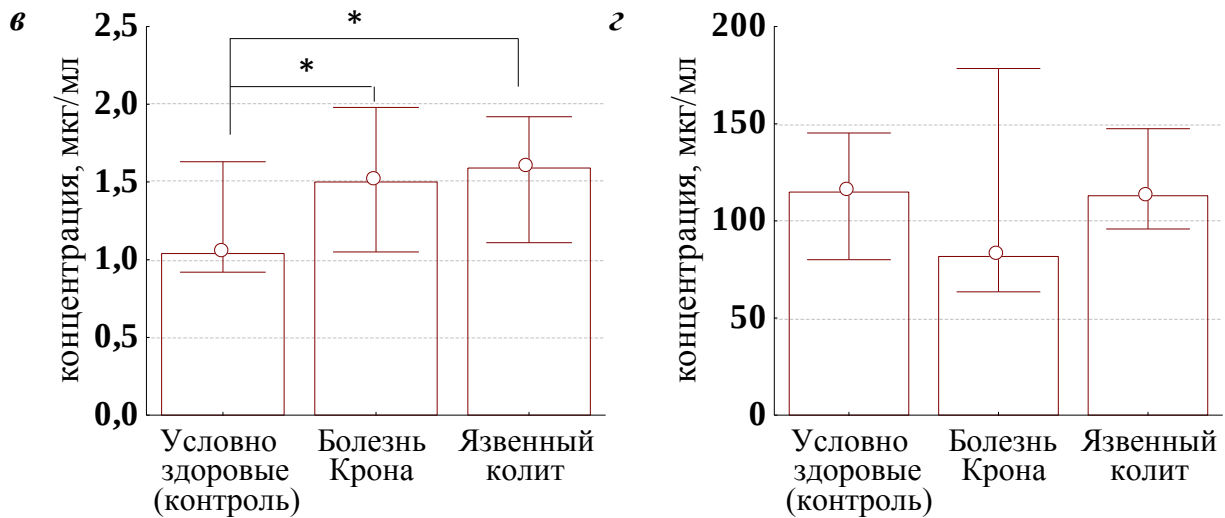


Рисунок 11. Компоненты внеклеточного матрикса, продуцируемые дермальными фибробластами (а, в) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г), Me [25-й – 75-й процентиля]

* – статистически значимые различия (p < 0,05, критерий Mann-Whitney)

Концентрация макромолекул коллагена IV типа в супернатанте условно здоровых детей превышает в 1,6 раз его уровень в супернатанте дермальных фибробластов детей с язвенным колитом. Дермальные фибробласты детей с болезнью Крона интенсивнее в 1,2 раза продуцируют макромолекулы коллагена IV типа в супернатант, чем дермальные фибробласты детей с язвенным колитом.

Таким образом, дермальные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника характеризовались снижением продукции макромолекул коллагена IV типа по сравнению с контрольной группой условно здоровых детей. Причем у детей с язвенным колитом сниженная продукция макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами была достоверной по сравнению с недостоверными изменениями у детей с болезнью Крона. Однако следует отметить, что и у детей с болезнью Крона также имелась тенденция к понижению концентрации макромолекул коллагена IV типа в супернатанте.

В супернатанте дермальных фибробластов группы детей с язвенным колитом наблюдалась прямая зависимость между уровнем макромолекул коллагена IV типа и провоспалительным цитокином IL-1 β ($R=0,74$, $p=0,0024$), и противовоспалительными цитокинами (IL-10, $R=0,84$, $p=0,0001$; IL-1RA, $R=0,75$, $p=0,002$).

В супернатанте дермальных фибробластов группы детей с болезнью Крона выявлена обратная зависимость между уровнем макромолекул коллагена IV типа и провоспалительными цитокинами IL-1 β ($R=-0,51$, $p=0,013$).

В контрольной группе концентрация макромолекул коллагена IV типа находился в обратной зависимости от провоспалительного цитокина IL-1 β ($R=-0,87$, $p<0,0001$), противовоспалительных цитокинов IL-10 ($R=-0,71$, $p=0,01$) и TGF β ($R=-0,68$, $p=0,0019$) и в прямой зависимости с соотношением IL-1RA/IL-1 β ($R=0,71$, $p=0,0009$).

Выявленная динамика концентрации макромолекул коллагена IV наблюдалась и на системном уровне: в сыворотке исследуемых пациентов также наблюдалось снижение содержания макромолекул коллагена IV типа. Известно, что синтез и продукция макромолекул коллагена IV типа способствует поддержанию нормальной организации дермы и эпидермиса.

Фибронектин. Дермальные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника интенсивнее продуцируют фибронектин относительно контрольной группы условно здоровых детей (рисунок 11; таблица 9, Приложение 1).

Содержание фибронектина в супернатанте дермальных фибробластов детей с болезнью Крона превышает его концентрацию в супернатанте условно здоровых детей в 1,4 раза.

Продукция фибронектина дермальными фибробластами детей с язвенным колитом повышена в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой.

В сыворотке крови детей статистически значимых различий по содержанию фибронектина между группами не обнаружено.

Данные иммуноферментного анализа по содержанию компонентов внеклеточного матрикса в супернатантах фибробластов согласовались с результатами иммуноблоттинга.

Таким образом, важным результатом исследования продукции белков внеклеточного матрикса было заключение о том, что при воспалительных заболеваниях кишечника дермальные фибробласты снижали продукцию макромолекул коллагена IV типа, определяющего целостность базальной мембраны, структурность расположения и взаимодействия слоев кожи, что может быть причиной нарушения функций кожи при воспалительных заболеваниях кишечника, но повышали продукцию фибронектина, участвующего в адгезии и миграции клеток. Под действием хронического воспаления наблюдается

дисфункция фибробластов, что отражается в изменении соотношения компонентов внеклеточного матрикса и, как следствие, его дезорганизация.

3.2.4 Влияние различных сроков культивирования на стабильность секрета дермальных фибробластов

В процессе культивирования после каждого пассажа была измерена концентрация цитокинов (IL-1 β , IL-1RA, IL-10), факторов роста (TGF β 1, FGFb, PDGF-BB, FAP), компонентов ВКМ (макромолекулы коллагена IV типа, фибронектина).

При множественном и попарном сравнении концентрации исследуемых показателей в супернатантах первых шести пассажей дермальных фибробластов внутри контрольной группы, детей с болезнью Крона и язвенным колитом в пределах нашей выборки статистически значимых различий не выявлено ни по одному из параметров (таблица 10, Приложение 1).

Таким образом, в ходе исследования была показана стабильность секрета дермальных фибробластов здоровых детей и с воспалительными заболеваниями кишечника в течение 6 пассажей.

3.3 Индуцированная секреция дермальных фибробластов

В процессе исследования была проведена оценка воздействия LPS *E. coli* O55:B5 *in vitro* на изменение количественного состава секрета в популяциях дермальных фибробластов.

После стимулирования дермальных фибробластов LPS *E. coli* O55:B5 посредством добавления его в культуральную среду отмечено, что его влияние на секрецию IL-1 β , IL-1RA, IL-10, TGF β 1, FGFb, PDGF-BB, FAP, фибронектин отсутствовало (таблица 11, Приложение 1).

В ответ на добавление LPS *E. coli* O55:B5 дермальные фибробласты двух групп детей с ВЗК снижали продукцию макромолекул коллагена IV типа (рисунок 12; таблица 12, Приложение 1).

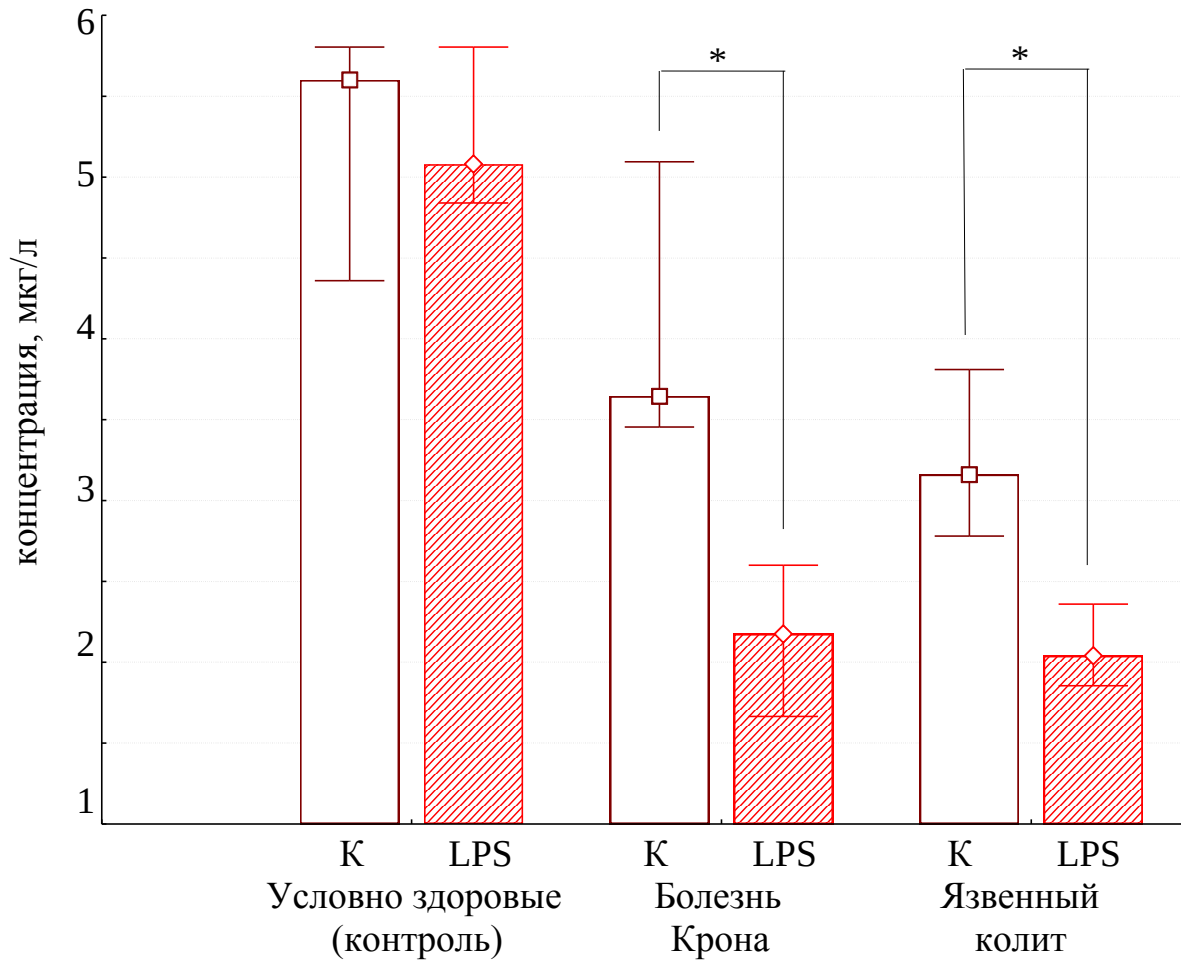


Рисунок 12. Влияние LPS *E. coli* O55:B5 на продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами, Me [25-й – 75-й процентиля]
 К – контроль, без добавления LPS; LPS – с добавлением LPS
 * - статистически значимые различия, $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Концентрация в супернатанте макромолекул коллагена IV типа уменьшалась на 50,2%, с $4,27 \pm 1,51$ мкг/л до $2,13 \pm 0,55$ мкг/л ($p = 0,021$) у детей с

БК; на 38,7% с $3,72 \pm 1,98$ мкг/л до $2,28 \pm 0,83$ мкг/л ($p=0,027$) у детей с ЯК; на 3,4% в группе условно здоровых детей.

Таким образом, индуктор воспаления липополисахарид (LPS *E. coli* O55:B5) еще больше снижает продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами по сравнению с его низким спонтанным уровнем в результате хронического воспаления у детей с болезнью Крона и язвенным колитом.

Из полученных данных можно заключить, что наличие эндотоксина (LPS) в кровотоке вследствие эндогенной или экзогенной бактериальной инвазии может способствовать изменению структуры базальной мембраны дермы детей с БК и ЯК, нарушая функционирование ткани кожи.

Отмечено, что дермальные фибробласты условно здоровых детей более устойчивы на действие LPS. Данный факт можно объяснить тем, что под воздействием хронического воспаления в кишечнике происходит снижение резервной функции системы репарации по поддержанию и восстановлению базальной мембраны со стороны дермальных фибробластов у детей с ВЗК.

3.4 Обсуждение полученных результатов

Фибробласты играют ключевую роль в регуляции физиологических параметров кожи. Они не только участвуют в синтезе ростовых факторов/цитокинов/хемокинов, матричных металлопротеиназ, продукции и организации межклеточного матрикса дермы, но и взаимодействуют друг с другом и с клетками других типов, оказывая значительное влияние на функции всех клеток кожи. Основные функции фибробластов кожи – продукция, организация, обновление межклеточного матрикса, регуляция процесса воспаления, участие в заживлении ран и регуляция дифференцировки эпидермиса. В связи с физиологическими функциями дермальных фибробластов естественно можно предположить, что они будут принимать участие в системных

воспалительных реакциях, а также в системном ответе на локальное воспаление в различных органах и тканях, например, в кишечнике.

На сегодняшний день проведено множество исследований в попытке понять механизм воспалительных заболеваний кишечника. Как правило, большинство из них направлены на выявление биомаркеров в сыворотке крови пациентов с данными заболеваниями (Toptygina A.P. et al., 2014; Kleiner G. et al., 2015). Однако сведения, полученные в подобных исследованиях, отражают совокупность процессов целого организма и в большей части относятся к состоянию иммунной системы, так как источником большинства медиаторов являются иммунные клетки. В то время как в развитии болезни Крона и язвенного колита задействованы различные типы клеток: эпителиальные, эндотелиальные клетки, фибробласты (Okamoto R., Watanabe M., 2016; Cromer W.E. et al., 2011).

В литературе описаны противоречивые сведения, происходящие на клеточном уровне в соединительной ткани. С одной стороны, интестинальные фибробласты активированы в кишечнике пациентов с БК и ЯК, но их измененный фенотип не является специфичным для ВЗК. Кроме того, интестинальные фибробласты, выделенные из воспаленного и фиброзированного участка кишки пациентов с БК и ЯК, имеют функциональные различия с интестинальными фибробластами гистологически нормального участка взрослых (Lawrance I.C., Maxwell L., Doe W., 2001).

С другой стороны, выявлены особенности среди интестинальных фибробластов при различных заболеваниях, происходящих в кишечнике взрослых пациентов. Так, например, фибробласты серозной оболочки резекционного материала, полученного от взрослых пациентов с ВЗК, экспрессируют повышенный уровень молекулы адгезии ICAM-1 на своей клеточной поверхности и в цитоплазме, а также транскрипционный фактор NF-κB по сравнению с фибробластами серозной оболочки пациентов с колоректальным раком. Транскрипционный фактор NF-κB участвует в регуляции продукции цитокинов,

что отражается в повышенной концентрации цитокинов, наблюдаемой при ВЗК. Результатом праймирования ICAM-1 является усиленное межклеточное взаимодействие, что способствует сокращению коллагена и формированию стриктур. Изменение уровня экспрессии молекул адгезии в фибробластах серозной оболочки связано с влиянием воспалительного микроокружения: повышенное содержание цитокинов и факторов роста на местном уровне. Интересно, что у этих же пациентов одновременно были проанализированы дермальные фибробласты и обнаружено, что они секретируют исследуемые показатели на физиологическом уровне (Brannigan A.E. et al., 2002). Из вышеописанного можно было заключить, что воспалительный процесс в данном случае локализован в пределах кишечника и его распространения на периферию не происходило.

В большинстве случаев, однако, для пациентов с ВЗК характерны полиорганные поражения внекишечной локализации (Brown S.R., Coviello L.C., 2015). Ряд исследователей связывают осложнения в виде проявлений на коже, ротовой полости, глазах, суставах с активностью ВЗК и объясняют эти проявления следствием воспаления. Другие объясняют манифестации нутритивными и метаболическими нарушениями (Veloso F.T., 2011; Huang B.L., Chandra S., Shih D.Q., 2012).

Нами была выдвинута гипотеза, что длительное повреждение ткани кишечника в результате хронического воспаления у детей нарушает регуляцию физиологических механизмов, в результате чего компенсаторно-приспособительные реакции развиваются не только на местном уровне, но и на системном уровне, что выражается в изменении функции различных органов и тканей, в частности кожи.

Фибробласты дермы, хорошо изученные у взрослых доноров, представляют собой наиболее доступный клеточный материал внекишечной локализации в

педиатрии, физиологические функции которых могут быть изучены как *in vivo*, так и *in vitro*.

Важным свойством фибробластов является их гетерогенность, описанная для клеток, выделенных из различных макро- и микроанатомических областей (Chang H.Y. et al., 2002). В литературе показаны отличия между культивируемыми фибробластами папиллярного и ретикулярного слоя дермы одного анатомического участка в клеточной морфологии и пролиферативном потенциале, продукции внеклеточного матрикса, продукции и реакции на факторы роста и цитокины (Mine S. et al., 2008). Гетерогенность основана на вариабельности экспрессии генома под воздействием факторов микроокружения (Srirama G., Bigliardi P.L., Bigliardi-Qi M., 2015). По данным литературы показано также, что в процессе длительного культивирования дермальные фибробласты папиллярного слоя секретируют коллаген подобно фибробластам, изолированным из ретикулярного слоя дермы (Izumi T., Tajima S., Nishikawa T., 1995).

В связи с разноречивостью данных литературы относительно дермальных фибробластов взрослых пациентов и отсутствия данных о функции дермальных фибробластов при воспалении у детей на первом этапе исследования перед нами была поставлена задача – провести морфологическое, иммунофенотипическое описание, определить пролиферативную способность культур дермальных фибробластов детей с ВЗК. Для её решения были применены следующие подходы и методы: микроскопия, проточная цитофлуориметрия, клоногенный анализ, определение времени удвоения популяции фибробластов.

В результате исследования морфологии показано, что культуры изолированных дермальных фибробластов условно здоровых детей (контроль) и детей с БК и ЯК имели характеристики, соответствующие культуре типичных фибробластов как представителей мезенхимальных стромальных клеток.

Интересно отметить, что в ядре визуализировалось от 2 до 4 ядрышек, а размер ядер дермальных фибробластов во всех группах был в 7,5 раз меньше

площади цитоплазмы. Полученные данные свидетельствуют о высокой метаболической активности дермальных фибробластов детей.

Также в ходе изучения морфологии исследуемых клеток была выявлена особенность, относящаяся к дермальным фибробластам детей с ВЗК. Данные клетки обладали меньшей площадью, занимаемой клеткой на поверхности пластика, хотя известно, что фибробласты взрослых людей достигали большего размера на твёрдых субстратах по сравнению с более эластичными субстратами (Fisher G.J. et al., 2016). Известно, что на клеточной поверхности сосредоточены рецепторы, ответственные за их контакт с белками ВКМ, опосредующие воздействие различных регуляторных факторов. В дополнение было показано ранее, что уменьшение размера фибробласта коррелирует со снижением продукции компонентов ВКМ (Arora P.D., Narani N., McCulloch C.A., 1999; Kessler D. et al., 2001; Quan T. et al., 2013).

В нашей работе фибробласты дермы детей формируют различные типы колоний, подобно описанному разнообразию колониальных структур фибробластов взрослых обследуемых людей (Зорин В.Л. и др., 2014). В ходе исследования выявлена закономерность в создании колоний дермальными фибробластами детей. Важно отметить, что отличия наблюдались в формировании типов колоний как межгрупповых, так и в пределах исследуемых групп. Так, дермальные фибробласты детей с ВЗК интенсивнее формировали рыхлые колонии и менее эффективно плотные относительно клеток условно здоровых детей (контроль).

Интересно отметить, что дермальные фибробласты детей с БК характеризовались более медленным ростом относительно популяций дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с язвенным колитом. Хронические воспалительные заболевания кишечника у детей вызывали снижение эффективности колониеобразования на 7,5% и 16% у дермальных фибробластов детей с БК и ЯК соответственно в культуре на первом пассаже. С

третьего пассажа разница в эффективности колониеобразования между дермальными фибробластами здоровых детей и детей с воспалительными заболеваниями кишечника исчезала.

В противоположность дермальным фибробластам детей по данным литературы для интестинальных фибробластов взрослых с БК и ЯК, выделенных из воспаленного или фиброзированного участка кишки, отмечена более высокая скорость пролиферации относительно интестинальных фибробластов гистологически нормального участка (Lawrance I.C., Maxwell L., Doe W., 2001).

Преобладание в наших исследованиях рыхлого типа колоний в популяции дермальных фибробластов детей с БК в сочетании с более медленным ростом могут способствовать структурным и физиологическим изменениям не только в дерме, но также в эпидермисе. По данным Тутина и др. уменьшение подкожно-жировой клетчатки и снижение тургора тканей наблюдается у 40,3% детей с ЯК и 54,2% детей с БК (Тутин О.А. и др., 2008).

По данным литературы на сегодняшний день не выявлено специфического маркера на цитоплазматической мембране фибробластов дермы, характерного исключительно для данной популяции клеток. В связи с чем, фибробласты как клетки, имеющие мезенхимальное происхождение, должны экспрессировать соответствующие маркеры – CD90, CD73, CD105, CD44 (Dominici M. et al., 2006). Однако известно, что иммунофенотипический профиль популяции фибробластов гетерогенен. Так, выявляют одинаковые по численности положительные и отрицательные по наличию CD90 популяции фибробластов, сходные по уровню секреции коллагенов, виментина и отличающиеся, в частности, по экспрессии IL-6 (Borrello M.A., Phipps R.P., 1996). В экспериментах на мышах показано, что интенсивность экспрессии CD105 фибробластами кожи живота значительно ниже, чем ММСК (мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка, ММСК) костного мозга и почки (Cakiroglu F. et al., 2016). Кроме того, процесс созревания

клеток, микроокружение в тканях также сопровождается изменением в уровне экспрессии белков поверхностной антигенной структуры.

В настоящем исследовании было показано, что антигенный фенотип дермальных фибробластов детей соответствует фенотипу мезенхимальных стромальных клеток. В исследуемых популяциях отмечена высокая доля клеток, положительных по следующим показателям: CD90 (Thy-1), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD44 (трансмембранный гликопротеин), CD13 (GP150).

Меньшая доля клеток условно здоровых детей имела на поверхности дермальных фибробластов CD10 (нейтральная эндопептидаза) (40%), CD166 (молекула адгезии) (20%) и CD29 (субъединица β_1 интегрина) (20%).

Были выявлены отличия между популяциями дермальных фибробластов детей с язвенным колитом и клетками условно здоровых детей и детей с болезнью Крона по количеству CD10-положительных клеток. В популяции дермальных фибробластов детей с ЯК в 2 раза было больше CD10-положительных клеток. Кроме того, популяция дермальных фибробластов детей с ЯК отличалась от других популяций по уровню экспрессии антигенов CD44, CD13 и CD10 на клеточной поверхности, которая была повышена в среднем в 2 раза.

Еще одной особенностью дермальных фибробластов детей является по нашим результатам фенотипическая и морфологическая стабильность. По данным литературы длительное культивирование фибробластов взрослых и пожилых людей *in vitro* ведет к снижению пролиферативного потенциала (Hayflick L., 1979) и количества маленьких клеток (Angello J.C. et al., 1987).

На втором этапе исследования была проведена оценка функциональной активности дермальных фибробластов детей с БК, ЯК и условно здоровых детей (контроль). Для решения поставленной задачи методом ELISA были определены цитокины, факторы роста, компоненты ВКМ в супернатанте дермальных фибробластов и в сыворотке.

При исследовании *in vitro* дермальных фибробластов, обнаружены различия в цитокиновом профиле между нормой и ВЗК, а также между БК и ЯК.

Специфическим маркером фибробластов, находящихся в активном состоянии служит FAP. Известно, что экспрессия FAP выражена в фибробластах стромы и опухолевых клетках (Hamson E.J. et al., 2014). В ряде работ показана роль FAP в развитии хронического воспаления и создании условий, способствующих процессам фиброзирования, например, при циррозе печени. Хроническое воспаление стенки кишечника сопровождается БК и ЯК, что приводит к развитию фиброза. По мнению ряда исследователей, физиологическая роль FAP заключается в облегчении клеточной инвазии и росте (Kelly T. et al., 2012). Так, у пациентов с БК в области фиброза обнаруживается слабая экспрессия FAP и сильное окрашивание на FAP в фибробластах, граничащих с зоной фиброза (Scharl M. et al., 2015).

В нашем исследовании экспрессия FAP дермальными фибробластами детей с ЯК была усилена относительно условно здоровых детей (контроль). Дермальные фибробласты детей с БК также интенсивнее экспрессировали FAP в сравнении и с дермальными фибробластами условно здоровых детей (контроль), и с группой детей с ЯК. Это свидетельствует о том, что дермальные фибробласты детей с ВЗК находятся в более активном физиологическом состоянии, что также отражается на уровне провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Наблюдается увеличение продукции провоспалительного цитокина IL-1 β и антагониста его рецептора IL-1Ra в супернатантах дермальных фибробластов детей с БК и ЯК по сравнению с контрольной группой. При этом в группе детей с БК наблюдалась более слабая компенсация IL-1 β его рецепторным антагонистом. IL-1 β является центральным эффектором воспалительного ответа. В условиях *in vitro* IL-1 β усиливает рост фибробластов и может стимулировать рост соединительной ткани (Thornton S.C. et al., 1990). По одним данным IL-1 снижает выработку коллагена, а по другим увеличивает его продукцию фибробластами (Goldring M.B., Krane S.M.,

1987). IL-1 β может быть причиной снижения общего объема ВКМ (Kim M.S. et al., 2014). Показано, что IL-1 может косвенно вызвать регенерацию тканей эпидермиса с помощью стимуляции продукции KGF фибробластами (Maas-Szabowski N., Stark H.J., Fusenig N.E., 2000). Фибробласты дермы человека в ответ на стимуляцию их TNF- α , IL-1 α усиливают синтез и накопление IL-1 β , IL-1RA (Maret M. et al., 2004). В сыворотке пациентов с ВЗК наблюдается повышенная концентрация TNF- α по данным авторов (Singh U.P. et al., 2016). В наших экспериментах на системном уровне у детей с БК и ЯК наблюдается гиперпродукция провоспалительного цитокина IL-1 β по сравнению с условно здоровыми детьми. Концентрация в сыворотке рецепторного антагониста IL-1RA, блокирующего взаимодействие IL-1 β со специфическими рецепторами, не отличалась между контрольной группой и детьми с БК, в то время как для детей с ЯК выявлено статистически значимое снижение концентрации IL-1RA относительно значений обеих групп.

Также в наших экспериментах не наблюдалось компенсации воспалительной активности дермальных фибробластов со стороны секреции ими противовоспалительного цитокина IL-10, который может снижать местное воспаление, способствовать заживлению повреждения (Sabat R. et al., 2010). Секреция дермальными фибробластами детей с ЯК цитокина IL-10 статистически значимо снижена, и имеет одинаковую тенденцию с их концентрацией в сыворотке. Содержание данных показателей в супернатантах дермальных фибробластов детей с БК не отличался от контрольной группы.

В регуляции гомеостаза и формировании цитокиновой сети помимо количественного содержания отдельного цитокина важную роль играет баланс между различными медиаторами и соотношение цитокин/рецептор. В ряде исследований (Akash M.S., Rehman K., Chen S., 2013) показано, что баланс между IL-1 β и IL-1RA играет важную роль в ограничении дальнейшего повреждения пораженных тканей и может оказывать влияние на исход воспалительного

процесса. Повышенное содержание IL-1RA коррелирует с благоприятным прогнозом. С повышением активности ВЗК наблюдается снижение соотношения IL-1RA/IL-1, хотя остаётся постоянным в непоражённой области при БК и контрольных образцах воспалённой ткани (Dionne S. et al., 1998). Дисбаланс IL-1 β и IL-1RA в слизистой кишечника, наблюдаемый у пациентов с ВЗК, происходит вследствие недостаточной продукции эндогенного IL-1RA и может способствовать развитию хронического воспаления кишечника (Cominelli F., Pizarro T.T., 1996). Повышенный уровень IL-1 при ВЗК также может быть результатом стимулирования макрофагов толстой кишки, который может активировать IL-1 конвертирующий фермент и освободить зрелый IL-1 β в слизистую толстого кишечника (McAlindon M.E., Hawkey C.J., Mahida Y.R., 1998).

В наших исследованиях соотношение IL-1RA/IL-1 β в сыворотке детей с БК и ЯК относительно контрольной группы снижено в 8 и 12 раз соответственно. В супернатантах дермальных фибробластов детей с болезнью Крона и язвенным колитом данное соотношение также ниже соответственно в 5,6 раз и в 4,3 раз по сравнению с данным показателем условно здоровых детей (контроль). Снижение значения IL-1RA/IL-1 β обусловлено гиперпродукцией IL-1 β . Так, дермальные фибробласты детей с БК и ЯК секретировали его соответственно в 6,3 раз и в 5,3 раз интенсивнее относительно условно здоровых (контроль). Одновременно, повышенная продукция IL-1 β сопровождалась увеличением экспрессии IL-1RA дермальными фибробластами детей с БК и ЯК по сравнению с контрольной группой, но только в 1,3 раза и 1,7 раза соответственно, что не компенсировало повышенную секрецию провоспалительного цитокина. Полученные данные секреторной функции дермальных фибробластов, вероятно, отражали у исследуемых пациентов активную фазу хронического воспаления кишечника.

В настоящей работе раскрыто понимание функциональных различий между дермальными фибробластами детей с ВЗК и условно здоровых детей (контроль). Известно, что дермальные фибробласты человека играют важную роль в

ангиогенезе, обеспечивая молекулами межклеточного матрикса, необходимыми для поддержания морфогенеза капилляров (Berthod F. et al., 2006) и баланса проангиогенных и антиангиогенных факторов, участвующих в создании васкулярной плотности (Hudon V. et al., 2003).

В работе была исследована продукция такого ангиогенного фактора роста как PDGF-BB. Показано, что дермальные фибробласты детей с ВЗК обладают большей ангиогенной активностью, чем клетки условно здоровых детей. При этом дермальные фибробласты детей с ЯК обладают более сильным ангиогенным потенциалом, чем дети с БК. PDGF также усиливает пролиферацию фибробластов и продукцию ВКМ и участвует в разрушении старого коллагена (Lin H. et al., 2006). Так, по данным литературы некоторые ростовые факторы – PDGF-AA, PDGF-BB, EGF, FGFb и TGF β 1 – стимулируют синтез коллагена I типа, а также продукцию гиалуроновой кислоты дермальными фибробластами (Kim M.S. et al., 2014). Продукция данного ангиогенного фактора, а также стимулятора роста и деления клеток PDGF-BB дермальными фибробластами детей с БК и ЯК повышена.

Отмечено, что содержание одного из главных факторов роста FGFb, стимулирующего рост фибробластов и регулирующего ангиогенез, в супернатантах дермальных фибробластов детей с БК и ЯК снижено относительно условно здоровых детей. По данным литературы FGFb предотвращает апоптоз клеток в пограничной с некрозом области и способствует выживаемости оставшихся клеток (Chen X. et al., 2002).

В ряде исследований показана важная роль TGF β 1 в лечении кишечных повреждений и анастомозов, а также его отрицательное действие в развитии фибротических заболеваний, таких как склеродермия, интерстициальный легочный фиброз. Он влияет на дифференцировку премиофибробластов в миофибробласты, которые принимают участие в сокращении раны. Снижение активности TGF- β сигнального пути может способствовать снижению ВКМ в

коже взрослого человека (Quan T. et al., 2010). TGF β 1 оказывает на системном уровне сильный иммуносупрессивный эффект, на местном уровне TGF β 1 может проявлять провоспалительные свойства. TGF β 1 может действовать в согласии с эпидермальным фактором роста, инсулиноподобным фактором роста, фактором роста фибробластов, фактором роста эндотелия сосудов, защищая ткань хозяина от веществ, находящихся в полости кишечника, и облегчать восстановление повреждения слизистой оболочки при ВЗК (Kanazawa S. et al., 2001). Статистически значимых различий в супернатанте дермальных фибробластов по TGF β 1 обнаружено не было, в то время как на системном уровне наблюдается значимое увеличение данного показателя у детей с ВЗК. Вероятно, в сыворотке повышенная концентрация TGF β 1 является следствием его накопления от продукции целым рядом клеток организма.

Коллаген IV типа является главным компонентом дермо-эпидермального соединения. Рядом исследователей показано, что TGF β 1 значительно повышает экспрессию гена и белка коллагена IV типа в дермальных фибробластах и, возможно, в процесс синтеза макромолекул коллагена IV типа вовлечен TGF β 1 путь сигнализации (Feru J. et al., 2016). Интестинальные фибробласты при ВЗК интенсивнее продуцируют коллаген, что способствует отложению коллагена под слизистой оболочкой при ЯК и трансмурально при БК (Matthes H. et al., 1992). Дермальные фибробласты влияют на формирование базальной мембраны (Randles M., Humphries M.J., Lennon R., 2016). Продукция макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами детей с ЯК значимо снижена по сравнению с условно здоровыми детьми и детьми с БК. В сыворотке исследуемых пациентов также наблюдается снижение содержания макромолекул коллагена IV типа. Результаты могут свидетельствовать о деструктивных процессах, протекающих в коже при ВЗК. В супернатанте дермальных фибробластов группы детей с ЯК наблюдается прямая зависимость между уровнем макромолекул коллагена IV типа и провоспалительным цитокином IL-1 β , и противовоспалительными

цитокинами. В супернатанте дермальных фибробластов группы детей с БК выявлена обратная зависимость между уровнем макромолекул коллагена IV типа и провоспалительными цитокинами IL-1 β . В контрольной группе содержание макромолекул коллагена IV типа находится в обратной зависимости от провоспалительного цитокина IL-1 β , противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF β 1 и в прямой зависимости с соотношением IL-1RA/IL-1 β .

Дермальные фибробласты детей с БК и с ЯК интенсивнее продуцируют фибронектин относительно здоровых детей. Содержание фибронектина в сыворотке не изменялось.

Таким образом, фибробласты дермы, полученные от пациентов с ВЗК, отражают системную реакцию организма на воспаление в кишечном тракте у детей.

В литературе, вследствие отсутствия понимания причины возникновения ВЗК, исследователи выдвигают лишь гипотезы, основываясь на клинических проявлениях заболевания: нарушение интестинального эпителиального барьера и/или дисбаланс между Treg и эффекторными Т-клетками. Согласно первой гипотезе, первичным является воспалительный процесс, который повреждает слизистую оболочку и способствует проникновению антигенов, тем самым активируя воспалительный процесс. Вторая гипотеза предполагает, что воспаление запускается изменением в слизистой оболочке (Martinez-Montiel M.P., Gomez-Gomez G.J., Flores A.I., 2014).

Мы предполагаем, что изменения в секреторном профиле дермальных фибробластов у детей с ВЗК, полученные в настоящем исследовании, являются ответной реакцией на воспалительный процесс, локализованный в кишечнике. Подтверждению нашей гипотезе служат следующие аргументы: циркуляция медиаторов воспаления в кровотоке детей с ВЗК, чистые кожные покровы и первичная манифестация БК или ЯК в возрасте старше 10 лет у всех испытуемых детей.

На третьем этапе исследования для понимания клеточных и метаболических нарушений в развитии ВЗК у детей была исследована пролиферативная и секреторная активность *in vitro* фибробластов дермы в ответ на воздействие молекулярных частей мембраны бактерий – липополисахарида (LPS).

Мы исследовали продукцию цитокинов, факторов роста, компонентов ВКМ в ответ на активацию рецептора к LPS – TLR4/2 – на поверхности дермальных фибробластов.

По данным литературы зрелый здоровый кишечник проявляет толерантность к обилию LPS и другим бактериальным антигенам, присутствующим в просвете кишечника, через ингибирование или активацию путей, ассоциированных с про- и противовоспалительными сигналами. Сниженная регуляция IRAK-1 в постнатальном периоде снижает TLR4 сигнализацию в ответ на LPS (Lotz M. et al., 2006). В других работах низкие дозы флагеллина и LPS снижают регуляцию некоторых генов, ответственных за провоспалительные цитокины, клеточную смерть, апоптоз, ассоциированных с продукцией IL-8 (Li N. et al., 2012). Однако незрелая слизистая оболочка кишечника более проницаема и гиперчувствительна на провокацию стимулами (Nanthakumar N.N. et al., 2000; van Elburg R.M. et al., 2003; Claud E.C. et al., 2004). Интестинальные фибробласты рассматривают как непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки, которые формируют непрерывную сеть под эпителиальным слоем на всём протяжении желудочно-кишечного тракта и играют большую роль в иммунном ответе слизистой оболочки кишечника, сигнализируя через TLR 1-9 (Owens B.M.J. et al., 2013). Их расположение идеально для реагирования на перемещение микробного антигена. LPS способствует значительному повышению пролиферации нормальных фибробластов кожи человека, также усиливает синтез и продукцию коллагена (Yang H. et al., 2013). Было показано, что после стимулирования их бактериальным антигеном, увеличивается их количество и объём (Powell D.W. et al., 2011). В экспериментах

на мышах показано, что в кишечинальных фибробластах в ответ на LPS активируются NF- κ B, PI3-kinase, и MAPK сигнальные пути и усиливается секреция провоспалительных молекул (Walton K.L.W., Holt L., Sartor R.B., 2009). Кроме того, в экспериментах на мышах показано, что кишечинальные фибробласты значительно выше экспрессируют TGF β 1 и IL-6 в ответ на LPS (Walton K.L.W., Holt L., Sartor R.B., 2009; van Tol E.A. et al., 1999).

Для поддержания иммунной системы в состоянии физиологического тонуса в кровотоке постоянно присутствует эндотоксин в концентрации 3-10 пкг/мл (Rietschel E., Westphal O., 1999). В литературе отмечена зависимость содержания эндотоксина от ряда факторов: возрастной, конституциональный, физический и психоэмоциональный стресс, воспалительные заболевания (Аниховская И.А., Салахов И.М., Яковлев М.Ю., 2016). Для пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями также характерно повышение уровня LPS в сыворотке периферической крови (Салахов И.М. и др., 2015). Так, увеличение концентрации LPS в сыворотке установлено у детей с ВЗК (Pasternak B.A. et al., 2010), а также отмечена её положительная корреляция с тяжестью болезни Крона (Guo Y. et al., 2015).

В общем кровотоке эндотоксин оказывает воздействие на клетки кровеносной системы. Считается, что для развития лихорадочного приступа достаточно присутствие бактериального эндотоксина в концентрации 1 нг/мл в инфузионном растворе (Русанова Е.В., Ниязатов А.Г., Протас И.М., 2013). При повреждении целостности барьерной ткани (кожа, слизистая оболочка кишечника) происходит непосредственное взаимодействие клеток рыхлой волокнистой соединительной ткани (фибробласты) с большим количеством LPS.

В экспериментах *in vitro* значительное снижение жизнеспособности BJ (foreskin) фибробластов человека происходит через 48 часов, подвергшихся обработке 1000 мкг/мл LPS *Porphyromonas gingivalis* (Li X. et al., 2016).

В настоящей работе мы подвергли фибробласты предплечья детей длительному воздействию LPS *E. coli* O55:B5 (24 часа). Была использована концентрация (10 мкг/мл), которая в сто раз меньше, предположительно снижающую жизнеспособность фибробластов *in vitro*, что позволяет смоделировать острое воспаление *in vitro* и свидетельствует, что *E.coli* LPS-индуцированное снижение экспрессии коллагенов происходит в живых клетках.

В настоящем исследовании показано, что фибробласты дермы детей с воспалительными заболеваниями кишечника отвечают на воздействие LPS. При добавлении липополисахарида наблюдается снижение продукции макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами.

E.coli LPS-индуцированное снижение продукции макромолекул коллагена IV типа фибробластами дермы детей с ВЗК в течении 24 часов может быть результатом целого ряда процессов, в частности, регуляции функционирования транскрипционных факторов, модификации структуры хроматина, внутриклеточной и внеклеточной протеолитической деградации коллагена.

Kouba показал, что экспрессия гена коллагена I типа зависит от активации NFκB (Kouba D.J. et al., 1999). Li впервые выявил роль лизосомальной протеазы – Cathepsin B – в регуляции экспрессии коллагенов III и IV типов фибробластами через хроническую активацию сигнального пути TLR2/NFκB и последующее повреждение в процессе окисления (Li X. et al., 2016). Интересно, что после воздействия LPS *Porphyromonas gingivalis* в течение 3 и 12 часов на первичную культуру фибробластов наблюдается значительное повышение экспрессии mRNA коллагенов III и IV типов, что может иметь защитный ответ на воздействие TLR2 агонистом LPS во время острой активации сигнального пути TLR2 и стимулировать дальнейшую экспрессию TLR2 на поверхности фибробластов (Li X. et al., 2016; Liu Y. et al., 2013; Hamidi S., Schafer-Korting M., Weindl G., 2014). При увеличении времени воздействия до 24 часов и 48 часов наблюдается

снижение продукции коллагенов III и IV типов фибробластами, что вызвано повышением экспрессии протеаз (Li X. et al., 2016).

Транскрипционный фактор NFκB может быть активирован агонистами TLR2, а также провоспалительными молекулами, такими как IL-1β. Одной из важных функций цитокинов является изменение физиологического состояния клеток и путей их ответа на окружающие стимулы. Возможно, спонтанное снижение продукции макромолекул коллагена IV типа фибробластами дермы детей с язвенным колитом также связано с лизосомальной деградацией макромолекул коллагена IV типа.

Индуктор воспаления липополисахарид (LPS *E. coli* O55:B5) еще больше снижает продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами по сравнению с его низким уровнем в результате хронического воспаления у детей с болезнью Крона и язвенным колитом. Из полученных данных можно заключить, что наличие данного эндотоксина в кровотоке может способствовать изменению структуры базальной мембраны дермы детей с БК и ЯК, нарушая функционирование ткани кожи. Данный факт можно объяснить тем, что под воздействием хронического воспаления происходит снижение резервной функции системы репарации по поддержанию и восстановлению базальной мембраны со стороны дермальных фибробластов у детей с ВЗК. Отмечено, что дермальные фибробласты условно здоровых детей более устойчивы на действие LPS. Известно, что LPS может стимулировать экспрессию провоспалительных цитокинов в дермальных фибробластах (Wang J. et al., 2011). Однако в нашем исследовании изменения в экспрессии генов цитокинов, факторов роста фибробластов дермы не коррелировало с присутствием LPS, что согласуется с данными полученными Malpass (Malpass G.E. et al., 2013). Предполагают, что фибробласты, локализованные в тканях (кожа, кишечник), часто контактирующих с антигенами, имеют защитные механизмы, предохраняющие их от избыточной

активации, и не поддаются праймированию провоспалительными цитокинами (Crowley T. et al., 2017).

Схема ингибирующего действия *E.coli* LPS на продукцию макромолекул коллагена IV типа представлена на рисунке 13.

Таким образом, в результате исследования дермальных фибробластов детей условно здоровых и имеющих ВЗК, были выявлены особенности их морфофункционального состояния.

Дермальные фибробласты детей с ВЗК характеризуются меньшими размерами, но находятся в более активном состоянии (повышение секреции FAP) относительно условно здоровых детей.

Одновременно дермальные фибробласты детей с ВЗК интенсивнее поддерживают воспалительный процесс повышенной секрецией IL-1 β и недостаточной для его компенсации продукцией IL-1RA и IL-10.

Также дермальные фибробласты детей с ВЗК более активированы для поддержания ангиогенеза и фиброгенеза (повышение продукции PDGF-BB, фибронектина).

Снижение продукции макромолекул коллагена IV типа будет способствовать изменению структуры базальной мембраны и эпителиально-мезенхимальному переходу, что также инициирует фиброз.

Несмотря на подготовленность клеток перехода к активным процессам репарации не происходит (отсутствие изменений в секреции TGF β 1 и снижение продукции FGFb).

Также дермальные фибробласты детей с ВЗК интенсивнее формируют рыхлые колонии, чем плотные.

Выявленные особенности морфофункциональных характеристик предполагают изменение структуры дермы у детей с ВЗК относительно условно здоровых детей.

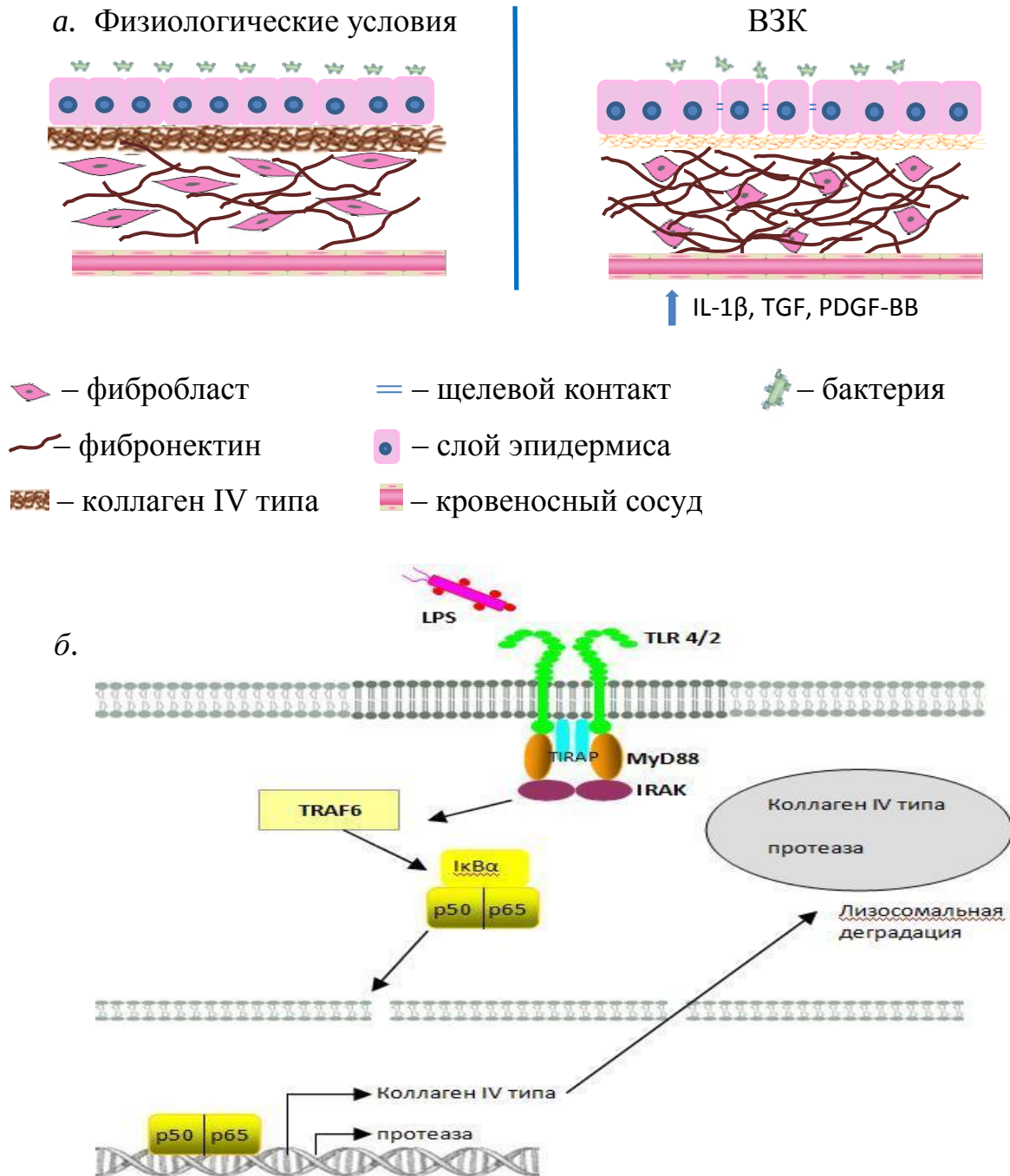


Рисунок 13. Модель регуляции функционирования фибробластов дермы детей с ВЗК (а) и схематическое представление молекулярного механизма ингибирующего действия *E.coli* LPS (б)

Изменения секреторного фенотипа фибробластов дермы у детей с БК и ЯК имеют однонаправленный характер, хотя более выражено снижение концентрации макромолекул коллагена IV типа и повышение PDGF-BB у дермальных фибробластов детей с ЯК, чем с БК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению влияния хронического локального воспаления в кишечнике на функциональную активность фибробластов соединительной ткани детей. Воспаление лежит в основе большинства известных заболеваний человека и представляет собой комплексное воздействие целого ряда биологически активных веществ на все типы клеток организма. В качестве модели было выбрано хроническое воспаление, локализованное в кишечнике – болезнь Крона и язвенный колит. Оба типа воспаления обусловлены развитием адаптивного иммунного ответа, по клеточному (БК) и гуморальному (ЯК) типу.

Полученные результаты свидетельствуют, что развитие системной реакции организма на хроническое локальное воспаление в кишечнике влияет на состав секрета фибробластов кожи предплечья, анатомически разобщенных с очагом воспаления. Фибробласты кожи детей с ВЗК характеризуются стабильно повышенной секрецией IL-1 β , белка активации фибробластов, тромбоцитарного фактора роста, фибронектина, снижением количества основного фактора роста фибробластов, макромолекул коллагена IV типа, отсутствием изменений трансформирующего фактора роста β 1. При культивировании они интенсивнее формируют рыхлые колонии, чем плотные. Изменение нормального секреторного фенотипа фибробластов кожи на провоспалительный у подростков с ВЗК имеет однонаправленный характер.

Дополнительное стимулирование фибробластов дермы (праймированных медиаторами хронического воспаления) липополисахаридом *Escherichia coli* серотип O55:B5 ингибирует образование основного белка базальной мембраны – коллагена IV типа, что в сочетании с профиброгенными свойствами активированных фибробластов может способствовать изменению качественного и количественного состава соединительной ткани кожи.

Таким образом, развивающиеся системные компенсаторно-приспособительные реакции, возникшие в результате хронического воспаления кишечника у детей, вовлекают фибробласты кожи в системный ответ, что приводит к изменению их нормального секреторного фенотипа на стабильный провоспалительный, профиброгенный фенотип.

Можно предположить, что любой воспалительный процесс, менее генерализованный, чем наблюдаемый при ВЗК, и ограниченный одним тканевым компартментом, будет оказывать влияние на основную физиологическую функцию фибробластов – секреторную функцию и способствовать развитию морфофункциональных изменений фибробластов в провоспалительном направлении, описанном в данной работе.

ВЫВОДЫ

1. Фибробласты кожи детей подросткового периода, выделенные из физиологически нормальной кожи здоровых детей, характеризовались метаболически активным состоянием, высокой эффективностью колониеобразования на первом пассаже с преобладанием колоний плотного типа. Фибробласты кожи при воспалительных заболеваниях кишечника также характеризовались метаболически активным состоянием, но имели меньшую длину, интенсивнее формировали колонии рыхлого типа, а при болезни Крона обладали меньшей скоростью удвоения популяции.

2. Антигенный фенотип фибробластов кожи подростков характеризовался набором поверхностных CD-кластеров, характерных для мезенхимальных стромальных клеток: CD90 (антиген дифференцировки тимоцитов 1), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD44 (трансмембранный гликопротеин), CD13 (аминопептидаза N). Поверхностные маркеры CD10 (нейтральная эндопептидаза), CD166 (молекула адгезии) и CD29 (субъединица $\beta 1$ интегрина) присутствовали на мембране фибробластов кожи только у 40% - 20% детей. Воспалительные процессы в кишечнике, особенно при язвенном колите, повышали в 2 раза уровень экспрессии антигенов CD44, CD13 и CD10 на клеточной поверхности, но снижали в 2-3 раза количество CD29 положительных клеток относительно фибробластов кожи здоровых подростков.

3. Фибробласты кожи детей подросткового периода с воспалительными заболеваниями кишечника характеризовались провоспалительным фенотипом секретома, а именно, увеличением секреции IL-1 β , FAP, PDGF-BB, фибронектина, снижением соотношения IL-1RA/IL-1 β , продукции FGFb, макромолекул коллагена IV типа, отсутствием изменений в продукции TGF $\beta 1$.

4. Липополисахарид *E. coli* O55:B5 подавлял процесс образования макромолекул коллагена IV типа фибробластами кожи детей с хроническими

заболеваниями кишечника: при болезни Крона на 50%, язвенном колите - на 38%, не вызывая изменений в синтезе макромолекул коллагена IV типа клетками детей без воспалительных заболеваний кишечника.

5. Секретом фибробластов кожи детей подросткового периода в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника стабилен в процессе 6 пассажей при культивировании *in vitro*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВКМ – внеклеточный матрикс

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

ЯК – язвенный колит

ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

α -SMA – α -гладкомышечный актин

AREG – амфирегулин

ATG16L1 – 16-подобный ген 1, связанный с аутофагией

CASP3 – каспаза-3

CD – кластер дифференцировки

CSF – колониестимулирующий фактор

CTGF – фактор роста соединительной ткани

CXCL12 – хемокин (C-X-C мотив) лиганд 12

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла

EGF – эпидермальный фактор роста

FAP – белок активации фибробластов

FGFb – основной фактор роста фибробластов

FOXP3 – белок семейства FOX

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HGF – фактор роста гепатоцитов

HLA-DR – молекула главного комплекса гистосовместимости DR

HLA-I – молекула главного комплекса гистосовместимости – I

Нох – гомеобокс

HS – гепарансульфат

HSPA1A/B – белок теплового шока семейства A/B

$h\nu$ – квант света

ICAM1 – молекула межклеточной адгезии 1

IFN γ – интерферон- γ

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

IGFBP3 – белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста

IL – интерлейкин

IL-23R – рецептор интерлейкина 23

ILC – врожденные лимфоидные клетки

IRAK-1 – интерлейкин-1 рецептор-ассоциированная киназа-1

IRF3 – регуляторный фактор интерферона 3

IRF-5 – регуляторный фактор интерферона 5

IRGM – гуанозинтрифосфатный ген, связанный с иммунитетом

KGF – фактор роста кератиноцитов

LBP – липополисахарид связывающий белок

LPS – липополисахарид

MD-2 – миелоидный фактор дифференцировки 2

miRNA – микро-рибонуклеиновая кислота

MMP – матриксная металлопротеиназа

MPO – миелопероксидаза

mRNA – матричная рибонуклеиновая кислота

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих

MyD88 – миелоидный фактор дифференцировки 88

NF- κ B – ядерный фактор- κ B

NK – натуральные киллеры

NOD2/CARD15 – NOD2-подобный рецептор/каспазоактивирующий белок-15

PAMP – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

PBS – натрий-фосфатный буфер

PCDAI – педиатрический индекс активности болезни Крона

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PGE2 – простагландин E2

PI3K/AKT – фосфоинозитид-3-киназа/Akt

PTPN-22 – протеин-тирозинфосфатаза, нерецепторный тип 22

PUCAI – педиатрический индекс активности язвенного колита

Ras/MAPK – Ras/митоген-активируемая протеинкиназа

SCF – фактор стволовых клеток

STAT – активатор транскрипции, участвующий в передаче сигнала

STAT3 – активатор транскрипции-3, участвующий в передаче сигнала

TGF – трансформирующий фактор роста

TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназы-1

TIRAP – TIR домен-содержащий адаптерный белок

TL1a – TNF-подобный лиганд 1A

TLR – toll-подобный рецептор

TNFSF15 – лиганд фактора некроза опухоли суперсемейства-15

TNF α – фактора некроза опухоли- α

Trp2-COX-2-PGE2 – локус-2 киназы прогрессии опухоли – циклооксигеназа-2 – простагландин E2

TRAM – TRIF-связанная адаптерная молекула

TRFL – длина рестрикционного фрагмента теломера

TRIF – TIR домен-содержащий адаптерный белок, включающий интерферон- β

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аниховская, И. А. Кишечный эндотоксин и стресс в адаптации и старении / И. А. Аниховская, И. М. Салахов, М. Ю. Яковлев // Вестник российской академии наук. – 2016. – № 1. – С. 19–24.
2. Байрейтер, К. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации / К. Байрейтер, П. Франц, Х. Родеман // Онтогенез. – 1995. – Т. 236, № 1. – С. 22–37.
3. Бурда, Ю. Е. Клинико-иммунологическое обоснование противовоспалительного действия аллогенных эмбриональных фибробластов при трансплантации: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.36 / Бурда Юрий Евгеньевич. – Курск, 2003. – 109 с.
4. Васильев, Ю. М. Динамическая архитектура клетки. Нерешенные проблемы / Ю. М. Васильев // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – Vol. 14, № 3. – Р. 22–24.
5. Еремин, П. С. Оценка морфофункциональных свойств фибробластов кожи человека после воздействия ионизирующего излучения / П. С. Еремин, И. И. Еремин, В. Л. Зорин, Г. П. Димов, А. В. Аксеев, А. Ю. Бушманов, К. В. Котенко // КТТИ. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 21.
6. Зорин, В. Л. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека / В. Л. Зорин, П. Б. Копнин, А. И. Зорина, И. И. Еремин, Н. Л. Лазарева, Т. С. Чаузова, Д. П. Самчук, А. П. Петрикина, П. С. Еремин, И. Н. Корсаков, О. С. Гринаковская, Е. В. Соловьева, К. В. Котенко, А. А. Пулин // Гены и клетки. – 2014. – Т. IX, № 2. – С. 53–60.
7. Лазебник, Л. Б. Возраст как прогностический фактор эффективности мезенхимальных стромальных клеток в лечении больных язвенным колитом / Л. Б. Лазебник, О. В. Князев, А. И. Парфенов, А. Г. Конопляников, В. Э.

Сагынбаева, И. Н. Ручкина, Л. И. Ефремов, П. Л. Щербаков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 12. – С. 3–9.

8. Ледовской, С. Н. Сравнительный экономический анализ получения первичной культуры фибробластов различной степени зрелости для лечения ожогов / С. Н. Ледовской, В. А. Лазаренко, Ю. Е. Бурда // Человек и его здоровье. – 2010. – №1. – С. 113–116.

9. Маянская, И. В. Иммуносупрессивное действие действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток / И. В. Маянская, А. Ю. Гоганова, Н. И. Толкачева, В. И. Ашкинази, А. Н. Маянский // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 2. – С.122–127.

10. Омеляненко, Н. П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия): в 2 т. / Н. П. Омеляненко, Л. И. Слуцкий; под редакцией академика РАН и РАМН С. П. Миронова. – М. : Известия, 2009. – 1 т.

11. Русанова, Е. В. Роль эндотоксина в развитии гнойно-септических заболеваний и методы его выявления в крови / Е. В. Русанова, А. Г. Ниязматов, И. М. Протас // Альманах клинической медицины. – 2013. – № 29. – С. 70–73.

12. Салахов, И. М. Нормативные показатели системной эндотоксинемии как базисный элемент определения роли липополисахаридов кишечной микрофлоры в общей патологии / И. М. Салахов, И. А. Аниховская, И. А. Майский, М. М. Маркелова, П. Л. Окороков, Г. Р. Хасанова, В. А. Юрков // Патогенез. – 2015. – Т. 13, №1. – С. 18–27.

13. Тутина, О. А. Лечебное питание при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона у детей / О. А. Тутина, Э. Н. Федулова, В. Н. Копейкин, О. В. Фёдорова, А. Р. Богомоллов // Педиатрическая фармакология. – 2008. – Т.5, №5. – С. 110–115.

14. Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный институт промышленной собственности : [сайт]. URL: <http://www1.fips.ru/>

15. Федулова, Э. Н. Некоторые морфологические критерии прогнозирования степени тяжести течения болезни Крона у детей / Э. Н. Федулова, Е. А. Жукова, О. А. Тутина, Т. А. Кузнецова, О. В. Шумилова, О. В. Фёдорова // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т. 12, № 5. – С. 108–111.
16. Ярыгин, К. Н. Клеточные технологии в ревитализации кожи лица / К. Н. Ярыгин, В. В. Бурунова, В. А. Ступин, Г. О. Смирнова, Н. Е. Мантурова, Г. В. Ставицкая // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17, № 17. – С. 1058–1061.
17. Akash, M. S. IL-1Ra and its delivery strategies: inserting the association in perspective / M. S. Akash, K. Rehman, S. Chen // Pharm. Res. – 2013. – Vol. 30, № 11. – P. 2951–2966.
18. Akashi-Takamura, S. TLR accessory molecules / S. Akashi-Takamura, K. Miyake // Curr Opin Immunol. – 2008. – Vol. 20, № 4. – P. 420–425.
19. Alexander, C. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity / C. Alexander, E. T. Rietschel // J. Endotoxin Res. – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 167–202.
20. Andoh, A. Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut / A. Andoh, S. Bamba, M. Brittan, Y. Fujiyama, N. A. Wright // Pharmacol Ther. – 2007. – Vol. 114, № 1. – P. 94–106.
21. Angello, J. C. Proliferative potential of human fibroblasts: An inverse dependence on cell size / J. C. Angello, W. R. Pendergrass, T. H. Norwood, J. Prothero // J. Cell Physiol. – 1987. – Vol. 132. – P. 125–130.
22. Armaka, M. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases / M. Armaka, M. Apostolaki, P. Jacques, D. L. Kontoyiannis, D. Elewaut, G. Kollias // J. Exp. Med. – 2008. – Vol. 205, № 2. – P. 331–337.
23. Arora, P. D. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts / P. D. Arora, N. Narani, C. A. McCulloch // Am. J. Pathol. – 1999. – Vol. 154. – P. 871–882.

24. Asfaha, S. Intestinal stem cells and inflammation / S. Asfaha // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 25. – P. 62–66.
25. Benchimol, E. I. Trends in epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease in Canada: distributed network analysis of multiple population-based provincial health administrative databases / E. I. Benchimol, C. N. Bernstein, A. Bitton, M. W. Carroll, H. Singh, A. R. Otley, M. Vutcovici, W. El-Matary, G. C. Nguyen, A. M. Griffiths, D. R. Mack, K. Jacobson, N. Mojaverian, D. Tanyingoh, Y. Cui, Z. J. Nugent, J. Coulombe, L. E. Targownik, J. L. Jones, D. Leddin, S. K. Murthy, G. G. Kaplan // *Am J Gastroenterol*. – 2017. – Vol. 112. – P. 1120–1134.
26. Benchimol, E. I. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends / E. I. Benchimol, K. J. Fortinsky, P. Gozdyra, M. Van den Heuvel, J. Van Limbergen, A. M. Griffiths // *Inflamm. Bowel. Dis*. – 2011. – Vol. 17. – P. 423–439.
27. Ben-Horin, S. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease / S. Ben-Horin, Y. Chowers // *Aliment Pharmacol. Ther*. – 2011. – Vol. 33, № 9. – P. 987–995.
28. Bernell, O. Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease / O. Bernell, A. Lapidus, G. Hellers // *Br J Surg*. – 2000; . – Vol. 87. – P. 1697–1701.
29. Berthod, F. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation *in vitro* / F. Berthod, L. Germain, N. Tremblay, F. A. Auger // *Cell Physiol*. – 2006. – Vol. 207. – P. 491–498.
30. Bertin, D. Targeting tissular immune response improves diagnostic performance of anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's Disease / D. Bertin, J-C. Grimaud, N. Lesavre, C. Benelmouloud, A. Desjeux, S. Garcia, S. Desplat-Jégo // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. 1–8.

31. Borrello, M. A. Differential Thy-1 expression by splenic fibroblasts defines functionally distinct subsets / M. A. Borrello, R. P. Phipps // *Cell Immunol.* – 1996. – Vol. 173. – P. 198–206.
32. Bosshart, H. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin / H. Bosshart, M. Heinzelmann // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1096. – P. 1–17.
33. Botchkarev, V. A. Molecular biology of hair morphogenesis: Development and cycling / V. A. Botchkarev, R. Paus // *J. Exp. Zool. B. Mol Dev Evol.* – 2003. – Vol. 298, № 1. – P. 164–180.
34. Boulch, M. L. Proteome oxidative carbonylation during oxidative stress-induced premature senescence of WI-38 human fibroblasts / M. L. Boulch, E. K. Ahmed, A. Rogowska-Wrzesinska, M. A. Baraibar, B. Friguet // *Mechanisms of Ageing and Development.* – 2017. – P. 1–39.
35. Bouma, G. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease / G. Bouma, W. Strober // *Nature Reviews Immunology.* – 2003. – Vol. 3, № 7. – P. 521–533.
36. Brannigan, A. E. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with Inflammatory Bowel Disease is secondary to inflammation / A. E. Brannigan, R. W. G. Watson, D. Beddy, H. Hurley, J. M. Fitzpatrick, P. R. O'Connell // *Ann. Surg.* – 2002. – Vol. 235, № 4. – P. 507–511.
37. Brown, S. R. Extraintestinal manifestations associated with inflammatory bowel disease / S. R. Brown, L. C. Coviello // *Surg. Clin. North. Am.* – 2015. – Vol. 95, № 6. – P. 1245–1259.
38. Burke, J. P. Fibrogenesis in Crohn's disease / J. P. Burke, J. J. Mulsow, C. O'Keane, N. G. Docherty, R. W. Watson, P. R. O'Connell // *Am. J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 102, № 2. – P. 439–448.
39. Burton, P. R. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants / P. R. Burton, D. G. Clayton, L. R. Cardon, N. Craddock, P. Deloukas, A. Duncanson, D. P. Kwiatkowski, M. I. McCarthy, W. H.

Ouwehand, N. J. Samani, J. A. Todd, P. Donnelly, J. C. Barrett, D. Davison, D. Easton, D. M. Evans, H. T. Leung, J. L. Marchini, A. P. Morris, C. C. Spencer, M. D. Tobin, A. P. Attwood, J. P. Boorman, B. Cant, U. Everson, J. M. Hussey, J. D. Jolley, A. S. Knight, K. Koch, E. Meech, S. Nutland, C. V. Prowse, H. E. Stevens, N. C. Taylor, G. R. Walters, N. M. Walker, N. A. Watkins, T. Winzer, R. W. Jones, W. L. McArdle, S. M. Ring, D. P. Strachan, M. Pembrey, G. Breen, D. St Clair, S. Caesar, K. Gordon-Smith, L. Jones, C. Fraser, E. K. Green, D. Grozeva, M. L. Hamshire, P. A. Holmans, I. R. Jones, G. Kirov, V. Moskvina, I. Nikolov, M. C. O'Donovan, M. J. Owen, D. A. Collier, A. Elkin, A. Farmer, R. Williamson, P. McGuffin, A. H. Young, I. N. Ferrier, S. G. Ball, A. J. Balmforth, J. H. Barrett, T. D. Bishop, M. M. Iles, A. Maqbool, N. Yuldasheva, A. S. Hall, P. S. Braund, R. J. Dixon, M. Mangino, S. Stevens, J. R. Thompson, F. Bredin, M. Tremelling, M. Parkes, H. Drummond, C. W. Lees, E. R. Nimmo, J. Satsangi, S. A. Fisher, A. Forbes, C. M. Lewis, C. M. Onnie, N. J. Prescott, J. Sanderson, C. G. Matthew, J. Barbour, M. K. Mohiuddin, C. E. Todhunter, J. C. Mansfield, T. Ahmad, F. R. Cummings, D. P. Jewell, J. Webster, M. J. Brown, M. G. Lathrop, J. Connell, A. Dominiczak, C. A. Marciano, B. Burke, R. Dobson, J. Gungadoo, K. L. Lee, P. B. Munroe, S. J. Newhouse, A. Onipinla, C. Wallace, M. Xue, M. Caulfield, M. Farrall, A. Barton, I. N. Bruce, H. Donovan, S. Eyre, P. D. Gilbert, S. L. Hilder, A. M. Hinks, S. L. John, C. Potter, A. J. Silman, D. P. Symmons, W. Thomson, J. Worthington, D. B. Dunger, B. Widmer, T. M. Frayling, R. M. Freathy, H. Lango, J. R. Perry, B. M. Shields, M. N. Weedon, A. T. Hattersley, G. A. Hitman, M. Walker, K. S. Elliott, C. J. Groves, C. M. Lindgren, N. W. Rayner, N. J. Timpson, E. Zeggini, M. Newport, G. Sirugo, E. Lyons, F. Vannberg, A. V. Hill, L. A. Bradbury, C. Farrar, J. J. Pointon, P. Wordsworth, M. A. Brown, J. A. Franklyn, J. M. Heward, M. J. Simmonds, S. C. Gough, S. Seal, M. R. Stratton, N. Rahman, M. Ban, A. Goris, S. J. Sawcer, A. Compston, D. Conway, M. Jallow, M. Newport, G. Sirugo, K. A. Rockett, S. J. Bumpstead, A. Chaney, K. Downes, M. J. Ghori, R. Gwilliam, S. E. Hunt, M. Inouye, A. Keniry, E. King, R. McGinnis, S. Potter, R. Ravindrarajah, P. Whittaker, C.

Widden, D. Withers, N. J. Cardin, D. Davison, T. Ferreira, J. Pereira-Gale, I. B. Hallgrimsdottir, B. N. Howie, Z. Su, Y. Y. Teo, D. Vukcevic, D. Bentley, M. A. Brown, A. Compston, M. Farrall, A. S. Hall, A. T. Hattersley, A. V. Hill, M. Parkes, M. Pembrey, M. R. Stratton, S. L. Mitchell, P. R. Newby, O. J. Brand, J. Carr-Smith, S. H. Pearce, R. McGinnis, A. Keniry, P. Deloukas, J. D. Reveille, X. Zhou, A. M. Sims, A. Dowling, J. Taylor, T. Doan, J. C. Davis, L. Savage, M. M. Ward, T. L. Learch, M. H. Weisman, M. Brown // *Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39, № 11. – P. 1329–1337.

40. Cakiroglu, F. Differences of cell surface marker expression between bone marrow- and kidney-derived murine mesenchymal stromal cells and fibroblasts / F. Cakiroglu, J. W. Osbahr, J. Kramer, J. Rohwedel // *Cell Mol. – Biol.* – 2016. – Vol. 62, № 12. – P. 11–17.

41. Cario, E. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease / E. Cario, D. K. Podolsky // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68, № 12. – P. 7010–7017.

42. Caroff, M. Structure of bacterial lipopolysaccharides / M. Caroff, D. Karibian // *Carbohydr. Res.* – 2003. – Vol. 338, № 23. – P. 2431–2447.

43. Catarzi, S. Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients / S. Catarzi, F. Favilli, C. Romagnoli, T. Marcucci, L. Picariello, F. Tonelli, M. T. Vincenzini, T. Iantomasi // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2011. – Vol. 17, № 8. – P. 1674–1684.

44. Chang, H. Y. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts / H. Y. Chang, J. T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. Rijn, D. Botstein // *PNAS.* – 2002. – Vol. 99, № 20. – P. 12877–12882.

45. Chen, J. Q. TGF β 1 and HGF regulate CTGF expression in human atrial fibroblasts and are involved in atrial remodelling in patients with rheumatic heart disease / J. Q. Chen, Y. S. Guo, Q. Chen, X. L. Cheng, G. J. Xiang, M. Y. Chen, H. L. Wu, Q. L. Huang, P. L. Zhu, J. C. Zhang // *J Cell Mol Med.* – 2019. – Vol. 29. – P. 1–8.

46. Chen, X. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production / X. Chen, Y. Li, L. Wang, M. Katakowski, L. Zhang, J. Chen, Y. Xu, S.C. Gautam, M. Chopp // *Neuropathology*. – 2002. – Vol. 22, № 4. – P. 275–279.
47. Chipev, C. C. Phenotypic differences between dermal fibroblasts from different body sites determine their responses to tension and TGF β 1 / C. C. Chipev, M. Simon // *BMC Dermatol.* – 2002. – Vol. 2, № 13. – P. 1–13.
48. Choi, Y. J. PTEN regulates TLR5-induced intestinal inflammation by controlling Mal/TIRAP recruitment / Y. J. Choi, J. Jung, H. K. Chung, E. Im, S. H. Rhee // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 243–254.
49. Christophi, G. P. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease / G. P. Christophi, R. Rong, P. G. Holtzapple, P. T. Massa, S. K. Landas // *Inflamm Bowel Dis.* – 2012. – Vol. 18, № 12. – P. 2342–2356.
50. Claud, E. C. Developmentally regulated I κ B expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation / E. C. Claud, L. Lu, P. M. Anton, T. Savidge, W. A. Walker, B. J. Cherayil // *PNAS*. – 2004. – Vol. 101, № 19. – P. 7404–7408.
51. Cole, M. A. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging / M. A. Cole, T. Quan, J. J. Voorhees, G. J. Fisher // *Journal of Cell Communication and Signaling*. – 2018. – Vol. 12. – P. 35–43.
52. Cominelli, F. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease / F. Cominelli, T. T. Pizarro // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1996. – Vol. 10. – P. 49–53.
53. Contard, P. Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone / P. Contard, R. L. Bartel, L. Jacobs, J. S. Perlish, E. D. MacDonald, L. Handler, D. Cone, R. Fleischmajer // *J. Invest. Dermatol.* – 1993. – Vol. 100, № 1. – P. 35–39.

54. Conway, K. The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing / K. Conway, P. Price, K. G. Harding, W. G. Jiang // *Wound Repair Regen.* – 2006. – Vol. 14, № 1. – P. 2–10.
55. Coppe, J. P. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression / J. P. Coppe, P. Y. Desprez, A. Krtolica, J. Campisi // *Annual review of pathology.* – 2010. – Vol. 5. – P. 99–118.
56. Cromer, W. E. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases / W. E. Cromer, J. M. Mathis, D. N. Granger, G. V. Chaitanya, J. S. Alexander // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, № 5. – P. 578–593.
57. Crowley, T. Priming in response to pro-inflammatory cytokines is a feature of adult synovial but not dermal fibroblasts / T. Crowley, J. D. O’Neil, H. Adams, A. M. Thomas, A. Filer, C. D. Buckley, A. R. Clark // *Arthritis Research & Therapy.* – 2017. – Vol. 19, № 35. – P. 1-11.
58. Desmouliere, A. Tissue repair, contraction and the myofibroblast / A. Desmouliere, C. Chaponnier, G. Gabbiani // *Wound Repair Regen.* – 2005. – Vol. 13, № 1. – P. 7–12.
59. Di Sabatino, A. Functional modulation of Crohn’s disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies / A. Di Sabatino, S. L. Pender, C. L. Jackson, J. D. Prothero, J. N. Gordon, L. Picariello, L. Rovedatti, G. Docena, G. Monteleone, D. S. Rampton, F. Tonelli, G. R. Corazza, T. T. Macdonald // *Gastroenterology.* – 2007. – Vol. 133, № 1. – P. 137–149.
60. Dionne, S. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD) / S. Dionne, I. D. D’Agata, J. Hiscott, T. Vanounou, E. G. Seidman // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – Vol. 112. – P. 435–442.
61. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R.

Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E. Horwitz // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315–317.

62. Driskell, R. R. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair / R. R. Driskell, B. M. Lichtenberger, E. Hoste, K. Kretzschmar, B. D. Simons, M. Charalambous, S. R. Ferron, Y. Herault, G. Pavlovic, A. C. Ferguson-Smith, F. M. Watt // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 277–281.

63. Driskell, R. R. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin / R. R. Driskell, F. M. Watt // *Trends Cell Biol.* – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 92–99.

64. Duerr, R. H. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene / R. H. Duerr, K. D. Taylor, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. S. Silverberg, M. J. Daly, A. H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L. W. Datta, E. O. Kistner, L. P. Schumm, A. T. Lee, P. K. Gregersen, M. M. Barmada, J. I. Rotter, D. L. Nicolae, J. H. Cho // *Science*. – 2006. – Vol. 314, № 5804. – P. 1461–1463.

65. Feehley, T. What's LPS got to do with it? A role for gut LPS variants in driving autoimmune and allergic disease / T. Feehley, P. Belda-Ferre, C. R. Nagler // *Cell Host Microbe*. – 2016. – Vol. 19, № 5. – P. 572–574.

66. Feru, J. Aging decreases collagen IV expression *in vivo* in the dermo-epidermal junction and *in vitro* in dermal fibroblasts: possible involvement of TGF- β 1 / J. Feru, E. Delobbe, L. Ramont, B. Brassart, C. Terryn, A. Dupont-Deshorgue, C. Garbar, J. C. Monboisse, F. X. Maquart, S. Brassart-Pasco // *Eur. J. Dermatol.* – 2016. – Vol. 26, № 4. – P. 350–360.

67. Fiocchi, C. Genes and 'in-vironment': how will our concepts on the pathophysiology of inflammatory bowel disease develop in the future? / C. Fiocchi // *Dig Dis*. – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 2–11.

68. Fisher, G. J. Reduction of fibroblast size/mechanical force down-regulates TGF- β type II receptor: implications for human skin aging / G. J. Fisher, Y. Shao, T.

He, Z. Qin, D. Perry, J. J. Voorhees, T. Quan // *Aging Cell*. – 2016. – Vol. 15. – P. 67–76.

69. Fontani, F. Redox regulation of MMP-3/TIMP-1 ratio in intestinal myofibroblasts: effect of N-acetylcysteine and curcumin / F. Fontani, T. Marcucci, L. Picariello, F. Tonelli, M. T. Vincenzini, T. Iantomasi // *Exp. cell Res.* – 2014. – Vol. 323, № 1. – P. 77–86.

70. Fousekis, F. S. Hepatobiliary manifestations and complications in inflammatory bowel disease: a review / F. S. Fousekis, V. I. Theopistos, K. H. Katsanos, E. V. Tsianos, D. K. Christodoulou // *Gastroenterol Res.* – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 83–94.

71. Franke, A. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci / A. Franke, D. P. McGovern, J. C. Barrett, K. Wang, G. L. Radford-Smith, T. Ahmad, C. W. Lees, T. Balschun, J. Lee, R. Roberts, C. A. Anderson, J. C. Bis, S. Bumpstead, D. Ellinghaus, E. M. Festen, M. Georges, T. Green, T. Haritunians, L. Jostins, A. Latiano, C. G. Mathew, G. W. Montgomery, N. J. Prescott, S. Raychaudhuri, J. I. Rotter, P. Schumm, Y. Sharma, L. A. Simms, K. D. Taylor, D. Whiteman, C. Wijmenga, R. N. Baldassano, M. Barclay, T. M. Bayless, S. Brand, C. Büning, A. Cohen, J. F. Colombel, M. Cottone, L. Stronati, T. Denson, M. De Vos, R. D'Inca, M. Dubinsky, C. Edwards, T. Florin, D. Franchimont, R. Gearry, J. Glas, A. Van Gossum, S. L. Guthery, J. Halfvarson, H. W. Verspaget, J. P. Hugot, A. Karban, D. Laukens, I. Lawrance, M. Lemann, A. Levine, C. Libioulle, E. Louis, C. Mowat, W. Newman, J. Panés, A. Phillips, D. D. Proctor, M. Regueiro, R. Russell, P. Rutgeerts, J. Sanderson, M. Sans, F. Seibold, A. H. Steinhardt, P. C. Stokkers, L. Torkvist, G. Kullak-Ublick, D. Wilson, T. Walters, S. R. Targan, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. D'Amato, R. K. Weersma, S. Kugathasan, A. M. Griffiths, J. C. Mansfield, S. Vermeire, R. H. Duerr, M. S. Silverberg, J. Satsangi, S. Schreiber, J. H. Cho, V. Annese, H. Hakonarson, M. J. Daly, M. Parkes // *Nat Genet.* – 2010. – Vol. 42, № 12. – P. 1118–1125.

72. Fukazawa, A. GEF-H1 mediated control of NOD1 dependent NF- κ B activation by Shigella effectors / A. Fukazawa, C. Alonso, K. Kurachi, S. Gupta, C. F. Lesser, B. A. McCormick, H. C. Reinecker // PLoS pathogens. – 2008. – Vol. 4, № 11. – P. 1–15.
73. Ganesh, S. K. Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- β expression and connective tissue features / S. K. Ganesh, R. Morissette, Z. Xu, F. Schoenhoff, B. F. Griswold, J. Yang, L. Tong, M. L. Yang, K. Hunker, L. Sloper, S. Kuo, R. Raza, D. M. Milewicz, C. A. Francomano, H. C. Dietz, J. V. Eyk, N. B. McDonnell // FASEB J. – 2014. – Vol. 28, № 8. – P. 3313–3324.
74. Gill, S. E. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing / S. E. Gill, W. C. Parks // Int J Biochem Cell Biol. – 2008. – Vol. 40, № 6/7. – P. 1334–1347.
75. Gisbert, J. P. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review / J. P. Gisbert, J. Panés // Am J Gastroenterol. 2009;104(3):760–767.
76. Goldring, M. B. Modulation by recombinant interleukin-1 synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells / M. B. Goldring, S. M. Krane // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 16724–16729.
77. Graham, M. F. Corticosteroids increase procollagen gene expression, synthesis, and secretion by human intestinal smooth muscle cells / M. F. Graham, A. Willey, J. Adams, R. F. Diegelmann // Gastroenterology. – 1995. – Vol. 109. – P. 1454–1461.
78. Greaves, N. S. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing / N. S. Greaves, K. J. Ashcroft, M. Baguneid, A. Bayat // J. Dermatol. Sci. – 2013. – Vol. 72, № 3. – P. 206–217.

79. Guarner, F. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited / F. Guarner, R. Bourdet-Sicard, P. Brandtzaeg, H. S. Gill, P. McGuirk, W. van Eden, J. Versalovic, J. V. Weinstock, G. A. Rook // *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*. – 2006. – Vol. 3, № 5. – P. 275–284.

80. Guo, Y. Serum Levels of Lipopolysaccharide and 1,3- β -D-Glucan Refer to the Severity in Patients with Crohn's Disease / Y. Guo, G. Zhou, C. He, W. Yang, Z. He, Z. Liu // *Mediators of Inflammation*. – Vol. 2015. – P 1–9.

81. Hall, S. E. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblast with participation of fibroblast vitronectin receptor and involvement of mannose/fucose-specific lectin / S. E. Hall, J. S. Pavill, P. M. Henson, C. Haslett // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 153. – P.3218–3227.

82. Hamidi, S. TLR2/1 and sphingosine 1-phosphate modulate inflammation, myofibroblast differentiation and cell migration in fibroblasts / S. Hamidi, M. Schäfer-Korting, G. Weindl // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2014. – Vol. 1841, №. 4. – P. 484–494.

83. Hampe, J. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1 / J. Hampe, A. Franke, P. Rosenstiel, A. Till, M. Teuber, K. Huse, M. Albrecht, G. Mayr, F. M. De La Vega, J. Briggs, S. Günther, N. J. Prescott, C. M. Onnie, R. Häsler, B. Sipos, U. R. Fölsch, T. Lengauer, M. Platzer, C. G. Mathew, M. Krawczak, S. Schreiber // *Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 207–211.

84. Hamson, E. J. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy / E. J. Hamson, F. M. Keane, S. Tholen, O. Schilling, M. D. Gorrell // *Proteomics Clin. Appl.* – 2014. – Vol. 8, № 5/6. – P. 454–463.

85. Haniffa, M. A. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? / M. A. Haniffa, M. P. Collin, C. D. Buckley, F. Dazzi // *Haematologica*. – 2009. – Vol. 94, № 2. – P. 258–263.

86. Harley, C. B. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts / C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider // *Nature*. – 1990. – Vol. 345. – P. 458–60.
87. Haydont, V. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, cellular and molecular players / V. Haydont, B. A. Bernard, N. O. Fortunel // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2018. – P. 1–27.
88. Hayflick, L. The cell biology of aging / L. Hayflick // *J. Invest. Dermatol.* – 1979. – Vol. 73. – P. 8–14.
89. Higashino, N. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma / N. Higashino, Y. Koma, M. Hosono, N. Takase, M. Okamoto, H. Kodaira, M. Nishio, M. Shigeoka, Y. Kakeji, H. Yokozaki // *Laboratory Investigation*. – 2019. – Vol. 25. – P. 1–16.
90. Hill, R. P. Human hair follicle dermal cells and skin fibroblasts show differential activation of NF κ B in response to pro-inflammatory challenge / R. P. Hill, J. W. Haycock, C. A. Jahoda // *Exp. Dermatol.* – 2012. – Vol. 21, № 2. – P. 158–160.
91. Hinz, B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell / B. Hinz // *J. Biomech.* – 2010. – Vol. 43, № 1. – P. 146–155.
92. Huang, B. L. Skin manifestations of inflammatory bowel disease / B. L. Huang, S. Chandra, D. Q. Shih // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3, № 13. – P. 1–13.
93. Hudon, V. A tissueengineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation *in vitro* / V. Hudon, F. Berthod, A. F. Black, O. Damour, L. Germain, F. A. Auger // *Br.J. Dermatol.* – 2003. – Vol. 148. – P. 1094–1104.
94. Im, E. Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice / E. Im, F. M. Riegler, C. Pothoulakis, S. H. Rhee // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2012. – Vol. 303. – P. 490–497.

95. Izumi, T. Differential expression of (alpha)1 and (alpha)2 chains of type VI collagen in the upper, middle, and lower dermal fibroblasts *in vitro* / T. Izumi, S. Tajima, T. Nishikawa // J. Biochem. – 1995. – Vol. 117. – P. 1004–1007.
96. Jerala, R. Structural biology of the LPS recognition / R. Jerala // Intern. J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 297, № 5. – P. 353–363.
97. Johnson, L. A. Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts / L. A. Johnson, E. S. Rodansky, K. L. Sauder, J. C. Horowitz, J. D. Mih, D. J. Tschumperlin, P. D. Higgins // Inflamm. Bowel Dis. – 2013. – Vol. 19. – P. 891–903.
98. Kagan, J. C. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta / J. C. Kagan, T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, R. Medzhitov // Nat Immunol. – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 361–368.
99. Kalfalah, F. Inadequate mito-biogenesis in primary dermal fibroblasts from old humans is associated with impairment of PGC1A-independent stimulation / F. Kalfalah, S. Sobek, B. Bornholz, C. Gotz-Rosch, J. Tigges, E. Fritsche, J. Krutmann, K. Korner, R. Deenen, S. Ohse, M. Boerries, H. Busch, F. Boege // Experimental gerontology. – 2014. – Vol. 56. – P. 59–68.
100. Kalluri, R. Fibroblasts in cancer / R. Kalluri, M. Zeisberg // Nat Rev Cancer. – 2006. – Vol. 6, № 5. – P. 392–401.
101. Kanazawa, S. VEGF, basic-FGF and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation / S. Kanazawa, T. Tsunoda, E. Onuma, T. Majima, M. Kagiya, K. Kikuchi // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 96. – P. 822–828.
102. Kellouche, S. Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation / S. Kellouche, S. Mourah, A. Bonnefoy, D. Schoëvaert, M. P. Podgorniak, F. Calvo, M. F. Hoylaerts, C. Legrand, C. Dosquet // Exp Cell Res. – 2007. – Vol. 313, № 3. – P. 486–499.

103. Kelly, T. Fibroblast activation protein- α : a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies / T. Kelly, Y. Huang, A. E. Simms, A. Mazur // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 297. – P. 83–116.
104. Kenny, E. F. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update / E. F. Kenny, L. A. O'Neill // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 43, № 3. – P. 342–349.
105. Kessler, D. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a “synthetic” phenotype / D. Kessler, S. Dethlefsen, I. Haase, M. Plomann, F. Hirche, T. Krieg, B. Eckes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 36575–36585.
106. Kim, M. S. Comparative study of various growth factors and cytokines on type I collagen and hyaluronan production in human dermal fibroblasts / M. S. Kim, H. J. Song, S. H. Lee, C. K. Lee // *Journal of Cosmetic Dermatology*. – 2014. – Vol. 13. – P. 44–51.
107. Kim, Y. M. Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence / Y. M. Kim, H. O. Byun, B. A. Jee, H. Cho, Y. H. Seo, Y. S. Kim, M. H. Park, H. Y. Chung, H. G. Woo, G. Yoon // *Aging cell*. – 2013. – Vol. 12, № 4. – P. 622–634.
108. Kleiner, G. Pediatric patients with inflammatory bowel disease exhibit increased serum levels of proinflammatory cytokines and chemokines, but decreased circulating levels of macrophage inhibitory protein-1 β , interleukin-2 and interleukin-17 / G. Kleiner, V. Zanin, L. Monasta, S. Crovella, L. Caruso, D. Milani, A. Marcuzzi // *Exp. Ther. Med.* – 2015. – Vol. 9, № 6. – P. 2047–2052.
109. Kouba, D. J. Nuclear factor- κ B mediates TNF- α inhibitory effect on α 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts / D. J. Kouba, K. Y. Chung, T. Nishiyama, L. Vindevoghel, A. Kon, J. F. Klement, J. Uitto, A. Mauviel // *Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 162, № 7. – P. 4226–4234.
110. Kurashima, Y. Mucosal mesenchymal cells: secondary barrier and peripheral educator for the gut immune system / Y. Kurashima, D. Yamamoto, S.

Nelson, S. Uematsu, P. B. Ernst, T. Nakayama, H. Kiyono // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1–8.

111. Lämmermann, I. Blocking negative effects of senescence in human skin fibroblasts with a plant extract / I. Lämmermann, L. Terlecki-Zaniewicz, R. Weinmüllner, M. Schosserer, H. Dellago, A. D. M. Branco, D. Autheried, B. Sevcnikar, L. Kleissl, I. Berlin, F. Morizot, F. Lejeune, N. Fuzzati, S. Forestier, A. Toribio, A. Tromeur, L. Weinberg, J. C. H. Almaraz, M. Scheideler, M. Rietveld, A. E. Ghalbzouri, E. Tschachler, F. Gruber, J. Grillari // *Aging and Mechanisms of Disease*. – 2018. – Vol. 4. – P. 1–10.

112. Lawrance, I. C. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease / I. C. Lawrance, L. Maxwell, W. Doe // *Inflammatory Bowel Disease*. – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 226–236.

113. Leaphart, C. L. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair / C. L. Leaphart, J. Cavallo, S. C. Gripar, S. Cetin, J. Li, M. F. Branca, T. D. Dubowski, C. P. Sodhi, D. J. Hackam // *J Immunol*. – 2007. – Vol. 179, № 7. – P. 4808–4820.

114. Lee, B. M. Rejuvenating effects of facial hydrofilling using restylane vital / B. M. Lee, D. G. Han, W. S. Choi // *Archives of plastic surgery*. – 2015. – Vol. 42, № 3. – P. 282–287.

115. Lee, K. W. Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77 / K. W. Lee, L. Ma, X. Yan, B. Liu, X. K. Zhang, P. Cohen // *The Journal of biological chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 17. – P. 16942–16948.

116. Leeb, S. N. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts / S. N. Leeb, D. Vogl, J. Grossmann, W. Falk, J. Schölmerich, G. Rogler, C. M. Gelbmann // *Am J Gastroenterol*. – 2004. – Vol. 99, № 2. – P. 335–340.

117. Leung, Y. Anti-adhesion molecule strategies for Crohn disease / Y. Leung, R. Panaccione // *Bio Drugs*. – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 259–264.

118. Li, N. Microbial cell components induced tolerance to flagellin-stimulated inflammation through Toll-like receptor pathways in intestinal epithelial cells / N. Li, M. C. Quidgley, F. H. Kobeissy, J. Joseph, J. Neu // *Cytokine*. – 2012. – Vol. 60, № 3. – P. 806–811.
119. Li, X. Cathepsin B Regulates Collagen Expression by Fibroblasts via Prolonging TLR2/NF- κ B Activation / X. Li, Z. Wu, J. Ni, Y. Liu, J. Meng, W. Yu, H. Nakanishi, Y. Zhou // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–12.
120. Lin, H. The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds / H. Lin, B. Chen, W. Sun, W. Zhao, Y. Zhao, J. Dai // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – P. 5708–5714.
121. Liu, Y. Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophages inflammatory signal to microglia in response to *Porphyromonas gingivalis* LPS / Y. Liu, Z. Wu, X. Zhang, J. Ni, W. Yu, Y. Zhou, H. Nakanishi // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–11.
122. Lonati, P. A. High IL-17E and Low IL-17C Dermal Expression Identifies a Fibrosis-Specific Motif Common to Morphea and Systemic Sclerosis / P. A. Lonati, N. C. Brembilla, E. Montanari, L. Fontao, A. Gabrielli, S. Vettori, G. Valentini, E. Laffitte, G. Kaya, P. L. Meroni, C. Chizzolini. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. 1–10.
123. Lopez-Otin, C. The hallmarks of aging / C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer // *Cell*. – 2013. – Vol. 153, № 6. – P. 1194–1217.
124. Lotz, M. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells / M. Lotz, D. Gütle, S. Walther, S. Ménard, C. Bogdan, M. W. Hornef // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, № 4. – P. 973–984.
125. Lynch, K. Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies / K. Lynch, M. Pei // *Organogenesis*. – 2014. – Vol. 10, № 3. – P. 289–298.

126. Maas-Szabowski, N. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1 induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts / N. Maas-Szabowski, H.-J. Stark, N. E. Fusenig // *J. Invest. Dermatol.* – 2000. – Vol. 114, № 6. – P. 1075–1084.

127. Macpherson, A. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria / A. Macpherson, U. Y. Khoo, I. Forgacs, J. Philpott-Howard, I. Bjarnason // *Gut.* – 1996. – Vol. 38, № 3. – P. 365–375.

128. Malpass, G. E. Complete artificial saliva alters expression of proinflammatory cytokines in human dermal fibroblasts / G. E. Malpass, S. Arimilli, G. L. Prasad, A. C. Howlett // *Toxicol Sci.* – 2013. – Vol. 134, № 1. – P. 18–25.

129. Mancini, M. MicroRNA-152 and -181a participate in human dermal fibroblasts senescence acting on cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix / M. Mancini, G. Saintigny, C. Mahe, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Melino, E. Candi // *Aging.* – 2012. – Vol. 4, № 11. – P. 843–853.

130. Manuc, T. E. Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets / T. E. Manuc, M. M. Manuc, M. M. Diculescu // *Clin. Exp. Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 15, № 9. – P. 59–70.

131. Marcotte, R. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3 / R. Marcotte, C. Lacelle, E. Wang // *Mechanisms of ageing and development.* – 2004. – Vol. 125, № 10/11. – P. 777–783.

132. Maret, M. Production of intracellular IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra isoforms by activated human dermal and synovial fibroblasts: phenotypic differences between human dermal and synovial fibroblasts / M. Maret, R. Chicheportiche, J. M. Dayer, C. Gabay // *Cytokine.* – 2004. – Vol. 25, № 5. – P. 193–203.

133. Marinkovich, M. P. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane / M. P. Marinkovich, D. R. Keene, C. S. Rimbey, R. E. Burgeson // *Dev. Dyn.* – 1993. – Vol. 197. – P. 255–267.

134. Martens, M. F. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts / M. F. Martens, C. M. Huyben, T. Hendriks // *Gut*. – 1992. – Vol. 33, № 12. – P. 1664–1670.

135. Martínez-Montiel, M. P. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease / M. P. Martínez-Montiel, G. J. Gómez-Gómez, A. I. Flores // *World J Gastroenterol*. – 2014. – Vol. 20, № 5. – P. 1211–1227.

136. Mata-Haro, V. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4 / V. Mata-Haro, C. Cekic, M. Martin, P. M. Chilton, C. R. Casella, T. C. Mitchell // *Science*. – 2007. – Vol. 316, № 5831. – P. 1628–1632.

137. Matthes, H. Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases / H. Matthes, H. Herbst, D. Schuppan, A. Stallmach, S. Milani, H. Stein, E. O. Riecken // *Gastroenterology*. – 1992. – Vol. 102, № 2. – P. 431–442.

138. McAlindon, M. E. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease / M. E. McAlindon, C. J. Hawkey, Y. R. Mahida // *Gut*. – 1998. – Vol. 42. – P. 214–219.

139. McKaig, B. C. Expression and Regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinases by Intestinal Myofibroblasts in Inflammatory Bowel Disease / B. C. McKaig, D. McWilliams, S. A. Watson, Y. R. Mahida // *American Journal of Pathology*. – 2003. – Vol. 162, № 4. – P. 1355–1360.

140. Menicacci, B. Modulation of the senescence-associated inflammatory phenotype in human fibroblasts by Olive phenols / B. Menicacci, C. Cipriani, F. Margheri, A. Mocali, L. Giovannelli // *Int. J. Mol. Sci.* . – 2017. – Vol. 18. – P. 1–13.

141. Meran, S. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype / S. Meran, D. Thomas, P. Stephens, J. Martin, T. Bowen, A. Phillips, R. Steadman // *J. Biol. Chem*. – 2007. – Vol. 282, № 35. – P. 25687–25697.

142. Mine, S. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging / S. Mine, N. O. Fortunel, H. Pigeon, D. Asselineau // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. 1–13.

143. Mohan, R. R. Decorin transfection suppresses profibrogenic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts / R. R. Mohan, R. Gupta, M. K. Mehan, J. W. Cowden, S. Sinha // Exp Eye Res. – 2010. – Vol. 91, № 2. – P. 238–245.

144. Mokhtarifar, A. Diagnostic value of ASCA and atypical p-ANCA in differential diagnosis of inflammatory bowel disease / A. Mokhtarifar, A. Ganji, M. Sadrneshin, A. Bahari, A. Esmaeilzadeh, K. Ghafarzadegan, S. Nikpour // Middle East J Dig Dis. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 93–97.

145. Nanthakumar, N. N. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis / N. N. Nanthakumar, R. D. Fusunyan, I. Sanderson, W. A. Walker // PNAS. – 2000. – Vol. 97, № 11. – P. 6043–6048.

146. Nolte, S. V. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering / S. V. Nolte, W. Xu, H. O. Renekampff, H. P. Rodemann // Cells Tissue Organs. – 2008. – Vol. 187, № 3. – P. 165–176.

147. Noronha, S. M. Keratinocyte growth factor, interleukins (1 beta, 6, 8, 10, 12), and tumor necrosis factor alpha in culture medium of dermal fibroblast of burned patients / S. M. Noronha, S. A. Noronha, A. G. Klepp, M. Z. Ipolito, L. M. Ferreira, A. Gagnani // Acta Cir Bras. – 2014. – Vol. 29, № 1. – P. 62–68.

148. Okamoto, R. Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease / R. Okamoto, M. Watanabe // J. Gastroenterol. – 2016. – Vol. 51, № 1. – P. 11–21.

149. Otte, J. M. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine / J. M. Otte, I. M. Rosenberg, D. K. Podolsky // Gastroenterology. – 2003. – Vol. 124, № 7. – P. 1866–1878.

150. Owens, B. M. J. CD90⁺ Stromal Cells are Non-Professional Innate Immune Effectors of the Human Colonic Mucosa / B. M. J. Owens, T. A. M. Steevels, M. Dudek, D. Walcott, M.-Y. Sun, A. Mayer, P. Allan, A. Simmons // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4, № 307. – P. 1–11.

151. Pigeon, H. Distinct and complementary roles of papillary and reticular fibroblasts in skin morphogenesis and homeostasis / H. Pigeon, H. Zucchi, D. Asselineau // *Eur. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 324–332.

152. Park, S. H. Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma / S. H. Park, H. J. Choi, H. Yang, K. H. Do, J. Kim, D. W. Lee, Y. Moon // *The Journal of biological chemistry.* – 2010. – Vol. 285, № 46. – P. 35330–35339.

153. Pasternak, B. A. Lipopolysaccharide Exposure is Linked to Activation of the Acute Phase Response and Growth Failure in Pediatric Crohn's Disease and Murine Colitis / B. A. Pasternak, S. D'Mello, I. I. Jurickova, X. Han, T. Willson, L. Flick, L. Petiniot, N. Uozumi, S. Divanovic, A. Traurnicht, E. Bonkowski, S. Kugathasan, C. L. Karp, L. A. Denson // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2010. – Vol. 16, № 5. – P. 856–869.

154. Pathak, S. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis / S. Pathak, A. R. Grillo, M. Scarpa, P. Brun, R. D'Inca, L. Nai, A. Banerjee, D. Cavallo, L. Barzon, G. Palù, G. C. Sturniolo, A. Buda, I. Castagliuolo // *Exp Mol Med.* – 2015. – Vol. 47, № 5. – P. 1–9.

155. Pöschl, D. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development / D. Pöschl, U. Schlötzer-Schrehardt, I. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya, U. Mayer // *Development.* – 2004. – Vol. 131, № 7. – P. 1619–1628.

156. Powell, D. W. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer / D. W. Powell, P. A. Adegboyega, J.

F. Di Mari, R. C. Mifflin // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 1. – P. 2–7.

157. Powell, D. W. Mesenchymal Cells of the Intestinal Lamina Propria / D. W. Powell, I. V. Pinchuk, J. I. Saada, X. Chen, R. C. Mifflin // *Annu Rev Physiol.* – 2011. – Vol. 73. – P. 213–237.

158. Quan, T. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function / T. Quan, E. Little, H. Quan, Z. Qin, J. J. Voorhees, G. J. Fisher // *J. Invest. Dermatol.* – 2013. – Vol. 133. – P. 1362–1366.

159. Quan, T. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin / T. Quan, Y. Shao, T. He, J. J. Voorhees, G. J. Fisher // *J. Invest. Dermatol.* – 2010. – Vol. 130. – P. 415–424.

160. Rakoff-Nahoum, S. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis / S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov // *Cell.* – 2004. – Vol. 118. – P. 229–241.

161. Randles, M. Proteomic definitions of basement membrane composition in health and disease / M. Randles, M. J. Humphries, R. Lennon // *Matrix Biology.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–37.

162. Reed, M. J. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors / M. J. Reed, N. S. Ferrara, R. B. Vernon // *Mech. Ageing Dev.* – 2001. – Vol. 122, № 11. – P. 1203–1220.

163. Rhee, S. H. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. / S. H. Rhee // *Intestinal Research.* – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 90–95.

164. Rieder, F. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease – Current knowledge and future perspectives / F. Rieder, C. Fiocchi // *J Crohn's Colitis*. – 2008. – Vol. 2, № 4. – P. 279–290.

165. Rieder, F. Prostaglandin E2 inhibits migration of colonic lamina propria fibroblasts / F. Rieder, M. Georgieva, A. Schirbel, M. Artinger, A. Zügner, M. Blank, J. Brenmoehl, J. Schölmerich, G. Rogler // *Inflamm Bowel Dis*. – 2010. – Vol. 16, № 9. – P. 1505–1513.

166. Rietschel, E. Endotoxin: Historical Perspectives / E. Rietschel, O. Westphal; edited by H. Bode, S. Opal, S. Vogel, D. Morrison. – New York : Basel, 1999. – 1 P.

167. Rinn, J. L. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs / J. L. Rinn, C. Bondre, H. B. Gladstone, P. O. Brown, H. Y. Chang // *Plos genetics*. – 2006. – Vol. 2, №7. – P. 1084–1096.

168. Rinn, J. L. A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate / J. L. Rinn, J. K. Wang, N. Allen, S. A. Brugmann, A. J. Mikels, H. Liu, T. W. Ridky, H. S. Stadler, R. Nusse, J. A. Helms, H. Y. Chang // *Genes Dev*. – 2008. – Vol. 22, № 3. – P. 303–307.

169. Röck, K. MiR-23a-3p causes cellular senescence by targeting hyaluronan synthase 2: possible implication for skin aging / K. Röck, J. Tigges, S. Sass, A. Schutze, A. M. Florea, A. C. Fender, F. J. Theis, J. Krutmann, F. Boege, E. Fritsche, G. Reifenberger, J. W. Fischer // *The Journal of investigative dermatology*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–23.

170. Rogler, G. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures / G. Rogler, C. M. Gelbmann, D. Vogl, M. Brunner, J. Schölmerich, W. Falk, T. Andus, K. Brand // *Scand J Gastroenterol*. – 2001. – Vol. 36, № 4. – P. 389–398.

171. Roulis, M. Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology / M. Roulis, M. Armaka, M.

Manoloukos, M. Apostolaki, G. Kollias // PNAS. – 2011. – Vol. 108, № 13. – P. 5396–5401.

172. Roulis, M. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease / M. Roulis, R. A. Flavell // Differentiation. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–16.

173. Roulis, M. Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis / M. Roulis, C. Nikolaou, E. Kotsaki, E. Kaffe, N. Karagianni, V. Koliarakis, K. Salpea, J. Ragoussis, V. Aidinis, E. Martini, C. Becker, H. R. Herschman, S. Vetrano, S. Danese, G. Kollias // PNAS. – 2014. – Vol. 111, № 43. – P. 4658–4667.

174. Sabat, R. Biology of interleukin-10 / R. Sabat, G. Gruetz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, J. Gegnat // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–44.

175. Scharl, M. Hallmarks of epithelial to mesenchymal transition are detectable in Crohn's disease associated intestinal fibrosis / M. Scharl, N. Huber, S. Lang, A. Furst, E. Jehle, G. Rogler // Clin. Transl. Med. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 1–9.

176. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9. – P. 671–675.

177. Schneider, E. L. The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age / E. L. Schneider, Y. Mitsui // PNAS. – 1976. – Vol. 73, № 10. – P. 3584–3588.

178. Schnickmann, S. AP-1-controlled hepatocyte growth factor activation promotes keratinocyte migration via CEACAM1 and urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen receptor / S. Schnickmann, D. Camacho-Trullio, M. Bissinger, R. Eils, P. Angel, P. Schirmacher, A. Szabowski, K. Breuhahn // J Invest Dermatol. – 2009. – Vol. 129, № 5. – P. 1140–1148.

179. Shao, J. Amphiregulin promotes intestinal epithelial regeneration: roles of intestinal subepithelial myofibroblasts / J. Shao, H. Sheng // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151, № 8. – P. 3728–3737.

180. Shi, H. X. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair *in vitro* and *in vivo* / H. X. Shi, C. Lin, B. B. Lin, Z. G. Wang, H. Y. Zhang, F. Z. Wu, Y. Cheng, L. J. Xiang, D. J. Guo, X. Luo, G. Y. Zhang, X. B. Fu, S. Bellusci, X. K. Li, J. Xiao // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. 1–12.

181. Shi, J. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS / J. Shi, Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu, F. Shao // *Nature*. – 2014. – Vol. 514. – P. 187–192.

182. Shi, Y. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses / Y. Shi, J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson, G. Ren // *Trends Immunol.* – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 136–143.

183. Shih, D. Q. Inhibition of a novel fibrogenic factor T11a reverses established colonic fibrosis / D. Q. Shih, L. Zheng, X. Zhang, H. Zhang, Y. Kanazawa, R. Ichikawa, K. L. Wallace, J. Chen, C. Pothoulakis, H. W. Koon, S. R. Targan // *Mucosal Immunol.* – 2014. – Vol. 7, № 6. – P. 1492–1503.

184. Simmons, J. G. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts / J. G. Simmons, J. B. Pucilowska, T. O. Keku, P. K. Lund // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2002. – Vol. 283, № 3. – P. 809–818.

185. Singh, U. P. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients / U. P. Singh, N. P. Singh, E. A. Murphy, R. L. Price, R. Fayad, M. Nagarkatti, P. S. Nagarkatti // *Cytokine*. – 2016. – Vol. 77. – P. 44–49.

186. Sorrell, J. M. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes / J. M. Sorrell, M. A. Baber, A. I. Caplan // *J. Cell. Physiol.* – 2004. – Vol. 200. – P. 134–145.

187. Sorrell, J. M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep / J. M. Sorrell, A. I. Caplan // J Cell Sci. – 2004. – Vol. 117. – P. 667–675.
188. Sorrell, J. M. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all / J. M. Sorrell, A. I. Caplan // Int Rev Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 276. – P. 161–214.
189. Sprenger, C. C. Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression / C. C. Sprenger, S. R. Plymate, M. J. Reed // Int J Cancer. – 2010. – Vol. 127, № 12. – P. 2739–2748.
190. Srirama, G. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models *in vitro* / G. Srirama, P. L. Bigliardi, M. Bigliardi-Qi // European Journal of Cell Biology. – 2015. – Vol. 94. – P. 483–512.
191. Strober, W. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / W. Strober, I. J. Fuss // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 140, № 6. – P. 1756–1767.
192. Stunova, A. Dermal fibroblasts-A heterogeneous population with regulatory function in wound healing / A. Stunova, L. Vistejnova // Cytokine Growth Factor Rev. – 2018. – Vol. 39. – P. 137–150.
193. Sugihara, T. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease / T. Sugihara, A. Kobori, H. Imaeda, T. Tsujikawa, K. Amagase, K. Takeuchi, Y. Fujiyama, A. Andoh // Clin Exp Immunol. – 2010. – Vol. 160, № 3. – P. 386–393.
194. Tajima, S. Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis / S. Tajima, S. R. Pinnell // J. Investig. Dermatol. – 1981. – Vol. 77. – P. 410–412.
195. Thangapazham, R. L. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts / R. L. Thangapazham, T. N. Darling, J. Meyerle // Int J Mol Sci. – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 8407–8427.

196. Thornton, S. C. Interaction of immune and connective tissue cells: the effects of lymphokines and monokines on fibroblasts growth / S. C. Thornton, S. B. Por, B. J. Walsh, R. Penny, S. N. Breit // *J. Leuk. Biol.* – 1990. – Vol. 47. – P. 312–320.

197. Tigges, J. The hallmarks of fibroblast ageing / J. Tigges, J. Krutmann, E. Fritsche, J. Haendeler, H. Schaal, J. W. Fischer, F. Kalfalah, H. Reinke, G. Reifenberger, K. Stuhler, N. Ventura, S. Gundermann, P. Boukamp, F. Boege // *Mechanisms of ageing and development.* – 2014. – Vol. 138. – P. 26–44.

198. Tomasek, J. J. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling / J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R. A. Brown // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3, № 5. – P. 349–363.

199. Toptygina, A. P. Cytokine profile in children with inflammatory bowel disease / A. P. Toptygina, E. L. Semikina, G. V. Bobyleva, L. V. Miroshkina, S. V. Petrichuk // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 79, № 12. – P. 1371–1375.

200. van Elburg, R. M. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age / R. M. van Elburg, W. Fetter, C. Bunkers, H. Heymans // *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* – 2003. – Vol. 88, № 1. – P. 52–55.

201. van Tol, E. A. Bacterial cell wall polymers promote intestinal fibrosis by direct stimulation of myofibroblasts / E. A. van Tol, L. Holt, F. L. Li, F. M. Kong, R. Rippe, M. Yamauchi, J. Pucilowska, P. K. Lund, R. B. Sartor // *Am.J.Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. 245–255.

202. Varedi, M. Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts / M. Varedi, A. Ghahary, P. G. Scott, E. E. Tredget // *J. Cell. Physiol.* – 1997. – Vol. 172, № 2. – P. 192–199.

203. Varkey, M. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar / M. Varkey, J. Ding, E. E. Tredget // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 30. – P. 7581–7591.

204. Vedrenne, N. The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing / N. Vedrenne, B. Coulomb, A. Danigo, F. Bonte, A. Desmouliere // *Pathol Biol.* – 2012. – Vol. 60, № 1. – P. 20–27.

205. Veloso, F. T. Extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease: Do they influence treatment and outcome? / F. T. Veloso // *World Journal of Gastroenterology.* – 2011. – Vol. 17, № 22. – P. 2702–2707.

206. Waldera-Lupa, D. M. Proteome-wide analysis reveals an age-associated cellular phenotype of in situ aged human fibroblasts / D. M. Waldera-Lupa, F. Kalfalah, A-M. Florea, S. Sass, F. Kruse, V. Rieder, J. Tigges, E. Fritsche, J. Krutmann, H. Busch, M. Boerries, H. E. Meyer, F. Boege, F. Theis, G. Reifemberger, K. Stuhler // *Aging.* – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 856–872.

207. Waldera-Lupa, D. M. Proteome-wide analysis of in situ aged fibroblasts / D. M. Waldera-Lupa, K. Stühler // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 1342–1343.

208. Walton, K. L. W. Lipopolysaccharide activates innate immune responses in murine intestinal myofibroblasts through multiple signaling pathways / K. L. W. Walton, L. Holt, R. B. Sartor // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2009. – Vol. 296, № 3. – P. 601–611.

209. Wang, J. Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring / J. Wang, K. Hori, J. Ding, Y. Huang, P. Kwan, A. Ladak, E. E. Tredget // *J. Cell. Physiol.* – 2011. – Vol. 226. – P. 1265–1273.

210. Wang, K. C. Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of HOX gene expression / K. C. Wang, J. A. Helms, H. Y. Chang // *Trends Cell Biol.* – 2009. – Vol. 19, № 6. – P. 268–275.

211. Waterman, R. S. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype / R. S. Waterman, S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, A. M. Betancourt // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. 1–14.

212. Weiss, R. A. Autologous cell therapy: will it replace dermal fillers? / R. A. Weiss // *Facial Plast Surg Clin North Am.* – 2013. – Vol. 21, № 2. – P. 299–304.
213. Witte, S. F. H. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells / S. F. H. Witte, F. Luk, J. M. S. Parraga, M. Gargasha, A. Merino, S. S. Korevaar, A. S. Shankar, L. O'Flynn, S. J. Elliman, D. Roy, M. G. H. Betjes, P. N. Newsome, C. C. Baan, M. J. Hoogduijn // *Stem Cells.* – 2017. – P. 1–21.
214. Yang, H. Effect of lipopolysaccharide on the biological characteristics of human skin fibroblasts and hypertrophic scar tissue formation / H. Yang, C. Hu, F. Li, L. Liang, L. Liu // *IUBMB Life.* – 2013. – Vol. 5, № 6. – P. 526–532.
215. Zouboulis, C. C. Human skin stem cells and the ageing process / C. C. Zouboulis, J. Adjaye, H. Akamatsu, G. Moe-Behrens, C. Niemann // *Exp. Gerontol.* – 2008. – Vol. 43, № 11. – P. 986–997.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1

Эффективность образования колоний дермальными фибробластами в зависимости от пассажа, Ме [25-й – 75-й процентиля]

Группы обследуемых детей	Пассаж	ЭКО-ф, %
Условно здоровые (контроль)	1	44,0 [43,0-47,0]
	2	13,0 [12,0-17,0]
	3-6	28,0 [25,0-30,0]
Болезнь Крона	1	38,0 [36,0-39,0] (p=0,0022)*
	2	40,43 [28,0-51,06] (p=0,00068)*
	3-6	23,5 [20,21-37,0]
Язвенный колит	1	29,0 [28,0-34,0] (p=0,0022)* (p=0,016)**
	2	27,0 [20,0-39,0] (p=0,0032)*
	3-6	25,0 [16,50-33,0]

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Болезнь Крона», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таблица 2

**Время удвоения популяции дермальных фибробластов,
Me [25-й – 75-й процентиля]**

Группы обследуемых детей	T₂, час
Условно здоровые (контроль)	24,73 [21,44-26,73]
Болезнь Крона	30,11 [24,25-33,84] (p=0,018)* (p=0,024)**
Язвенный колит	22,79 [20,65-29,57]

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Язвенный колит», p<0,05 (критерий Mann-Whitney)

Таблица 3

**Иммунофенотип дермальных фибробластов в течение 6 пассажей
(процент положительных клеток, Ме [25-й – 75-й процентиля])**

Антиген	Заболевание	Номер пассажа					
		1	2	3	4	5	6
CD90	Условно здоровые (контроль)	97,75 [83,80-99,60]	98,40 [87,30-99,90]	95,10 [87,55-99,75]	90,10 [76,90-99,90]	87,10 [81,40-99,0]	93,05 [88,0-99,50]
	Болезнь Крона	95,40 [84,60-99,40]	87,050 [72,15-99,10]	87,20 [79,0-99,70]	99,40 [91,40-99,90]	81,45 [74,80-93,10]	99,80 [86,25-99,90]
	Язвенный колит	99,20 [84,80-99,80]	99,90 [99,80-100]	83,40 [64,60-100]	99,90 [81,05-99,95]	100 [99,40-100]	89,20 [75,0-100]
CD73	Условно здоровые (контроль)	100 [99,85-100]	100 [100-100]	100 [100-100]	100 [99,90-100]	100 [99,90-100]	99,95 [99,90-100]
	Болезнь Крона	99,90 [99,80-100]	100 [100-100]	100 [99,90-100]	100 [100-100]	99,95 [99,85-100]	100 [99,90-100]
	Язвенный колит	100 [99,80-100]	100 [99,80-100]	100 [99,85-100]	100 [99,90-100]	99,90 [97,40-100]	100 [99,90-100]
CD44	Условно здоровые (контроль)	99,20 [97,60-100]	99,90 [98,70-100]	100 [100-100]	100 [96,30-100]	99,90 [99,50-99,90]	99,75 [99,60-99,80]

	Болезнь Крона	98,30 [96,60-100]	99,70 [99,60-99,70]	99,50 [99,30-99,90]	99,80 [99,70-99,90]	99,50 [99,30-100]	100 [99,50-100]
	Язвенный колит	100 [100-100]	100 [99,80-100]	100 [99,95-100]	100 [99,90-100]	100 [100-100]	100 [99,90-100]
CD13	Условно здоровые (контроль)	99,90 [98,50-100]	99,50 [98,80-99,90]	99,90 [99,30-100]	99,90 [90,70-100]	99,90 [99,90-99,90]	96,70 [90,50-99,50]
	Болезнь Крона	92,60 [85,30-99,90]	98,60 [94,80-99,40]	96,30 [95,60-98,25]	97,60 [91,90-99,0]	98,0 [93,90-99,90]	99,10 [88,60-99,30]
	Язвенный колит	100 [99,20-100]	99,95 [99,90-100]	100 [100-100]	100 [100-100]	99,90 [99,0-100]	100 [99,90-100]
CD10	Условно здоровые (контроль)	40,60 [24,0-53,80]	39,05 [22,75-47,90]	45,50 [17,70-51,35]	18,45 [6,40-30,50]	46,25 [25,45-63,45]	42,70 [16,80-58,40]
	Болезнь Крона	41,45 [40,0-42,90]	40,0 [40,0-41,90]	47,0 [40,0-68,40]	33,25 [19,25-47,30]	48,0 [31,70-49,0]	23,95 [23,05-31,65]
	Язвенный колит	68,55 [37,20-99,90]	43,90 [43,70-83,0]	59,95 [41,90-78,0]	63,10 [53,90-99,30]	94,90 [75,90-99,90]	62,15 [53,85-80,95]
CD166	Условно здоровые (контроль)	16,95 [14,20-19,70]	29,50 [23,50-35,50]	18,65 [11,70-25,60]	24,55 [17,60-30,55]	14,0 [7,40-20,60]	17,75 [16,60-18,90]
	Болезнь Крона	13,70 [13,0-15,10]	18,0 [16,70-19,20]	18,0 [16,70-19,20]	13,0 [11,70-14,20]	16,45 [13,70-19,20]	7,40 [7,20-10,0]
	Язвенный колит	30,0 [23,0-37,0]	22,0 [19,05-30,0]	19,05 [17,10-21,0]	40,50 [39,10-41,90]	15,95 [15,10-16,80]	51,70 [15,10-59,50]

CD29	Условно здоровые (контроль)	10,50 [8,0-13,0]	25,05 [19,10-31,0]	20,50 [18,0-23,0]	21,05 [18,55-27,0]	12,50 [11,0-14,0]	28,15 [25,50-30,80]
	Болезнь Крона	8,90 [6,20-10,10]	3,70 [2,40-5,0]	10,20 [6,40-12,50]	3,10 [2,40-4,20]	3,10 [2,40-4,20]	2,20 [1,90-3,10]
	Язвенный колит	6,85 [3,70-10,0]	5,60 [3,95-8,50]	5,60 [4,20-7,0]	5,75 [3,10-8,40]	2,30 [1,80-2,80]	5,20 [2,20-7,45]
CD45 CD19 CD34 CD11b HLA-DR	Условно здоровые (контроль)	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно
	Болезнь Крона	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно
	Язвенный колит	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно	отрицательно

* - статистически значимые различия между пассажирами в группах заболеваний, $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таблица 4

**Иммунофенотип дермальных фибробластов в течение 6 пассажей
(интенсивность экспрессии (*hν*), Me [25-й – 75-й процентиля])**

Антиген	Заболевание	Номер пассажа					
		1	2	3	4	5	6
CD90	Условно здоровые (контроль)	768,0 [217,0-1250,0] (n=5)	642,0 [625,0-1828,0] (n=5)	652,0 [499,0-1109,0] (n=5)	704,0 [149,0-988,0] (n=5)	499,0 [142,0-818,0] (n=5)	330,50 [217,0-583,0] (n=5)
	Болезнь Крона	873,0 [298,0-947,0] (n=5)	578,0 [204,0-1034,0] (n=5)	562,0 [240,0-940,0] (n=5)	310,0 [261,0-562,0] (n=5)	520,0 [295,50-734,50] (n=5)	1272,0 [561,0-1320,0] (n=5)
	Язвенный колит	893,0 [210,0-1202,0] (n=5) 12020 (n=1)	890,0 [330,0-1150,0] (n=4) 15843 (n=1)	886,50 [170,0-1603,0] (n=4) 14141 (n=1)	673,50 [152,0-1195,0] (n=4) 18106 (n=1)	1495,0 [567,0-2423,0] (n=4) 9661 (n=1)	824,0 [229,0-2730,0] (n=4) 8824 (n=1)
CD73	Условно здоровые (контроль)	2620,0 [1508,50-3526,0] (n=5)	3137,0 [2820,0-3154] (n=5)	2795,0 [2342,0-2854,0] (n=5)	2457,0 [741,0-4297,0] (n=5)	1635,0 [816,0-3420,0] (n=5)	1319,0 [681,0-2136,0] (n=5)

	Болезнь Крона	2339,0 [1527,0-2790,0] (n=5)	2365,0 [1289,0-2912] (n=5)	2955,0 [2248,0-3009,0] (n=5)	2773,50 [2352,5-3226] (n=4) 15120 (n=1)	2669,0 [1907,0-3708,0] (n=4) 13521 (n=1)	3370,0 [2970,0-8572] (n=4) 19752 (n=1)
	Язвенный колит	372,0 [224,0-520,0] (n=2) 3542,50 [1148,0-5937,0] (n=3)	669,0 [372,0-707,50] (n=2) 7964,0 [5937,0-9991] (n=3)	838,0 [816,0-860,0] (n=2) 4146,50 [2637,0-7721,0] (n=3)	749,50 [669,0-816,0] (n=2) 5724,50 [5179,5-5870] (n=3)	420,0 [320,0-520,0] (n=2) 2637,0 [1790,0-3778,0] (n=3)	846,50 [746,0-947,0] (n=2) 4714,0 [2842,0-5804] (n=3)
CD44	Условно здоровые (контроль)	3654,50 [1986,5-4384,5] (n=5)	2575,0 [2372,0-5287] (n=5)	3417,0 [2204,0-3470,0] (n=5)	2298,0 [340,0-2474,0] (n=5)	3126,0 [535,0-3360,0] (n=5)	1079,0 [473,0-2381,0] (n=5)
	Болезнь Крона	2641,0 [460,0-4822,0] (n=5)	1308,0 [698,0-2780,0] (n=5)	1361,0 [891,0-3059,0] (n=5)	1946,0 [1681,0-2527] (n=5)	2997,0 [821,0-6979,0] (n=5)	3708,50 [2365,0-4352] (n=5)
	Язвенный колит	4017,0 [2141,0-7893] (n=5)	7422,50 [3205,0-11640] (n=5)	7143,0 [3491,0-10056] (n=5)	3836,0 [3312-13523] (n=5)	4530,0 [3660,0-8611,0] (n=5)	4221,0 [3650,0-7033] (n=5)
CD13	Условно здоровые (контроль)	2058,0 [722,0-2959,50] (n=5)	2286,0 [1049,0-2857] (n=5)	1560,0 [646,0-1586,0] (n=5)	820,0 [170,0-1629,0] (n=5)	1517,0 [613,0-2188,0] (n=5)	688,0 [227,0-1130,0] (n=5)

	Болезнь Крона	1099,0 [180,0-2018,0] (n=5)	700,50 [265,0-1322,0] (n=5)	438,50 [237,0-1571,0] (n=5)	1105,0 [402,0-1653,0] (n=5)	950,0 [310,0-2034,0] (n=5)	1072,0 [397,0-1171,0] (n=5)
	Язвенный колит	2794,0 [1661,0-4061,0] (n=5)	3669,50 [1864,0-5475] (n=5)	2848,0 [2030,0-4484,0] (n=5)	2912,0 [1865,0-7128] (n=5)	2117,0 [1598,0-4023,0] (n=5)	1774,0 [1771,0-2766] (n=5)
CD10	Условно здоровые (контроль)	196,0 [107,0-284,0] (n=5)	131,0 [109,0-247,0] (n=5)	140,0 [117,0-251,0] (n=5)	113,0 [67,0-150,0] (n=5)	171,0 [137,0-254,0] (n=5)	100,50 [94,0-233,0] (n=5)
	Болезнь Крона	223,50 [80,0-367,0] (n=5)	87,0 [80,0-221,0] (n=5)	98,0 [88,0-276,0] (n=5)	144,50 [88,0-217,50] (n=5)	152,0 [88,0-214,0] (n=5)	164,50 [145,50-199,0] (n=5)
	Язвенный колит	217,0 [195,50-230,0] (n=5)	220,0 [200,0-239,0] (n=5)	250,0 [226,0-268,0] (n=5)	260,0 [251,0-292,0] (n=5)	307,0 [280,0-320,50] (n=5)	208,0 [192,0-252,0] (n=5)
CD166	Условно здоровые (контроль)	135,50 [131,0-140,0] (n=5)	152,0 [143,0-161,0] (n=5)	136,0 [132,0-140,0] (n=5)	131,50 [129,0-136,0] (n=5)	129,0 [127,0-131,0] (n=5)	121,0 [118,0-124,0] (n=5)
	Болезнь Крона	136,0 [134,0-138,0] (n=5)	115,50 [97,0-134,0] (n=5)	126,50 [115,0-138,0] (n=5)	130,0 [122,0-138,0] (n=5)	129,0 [115,0-140,0] (n=5)	126,0 [122,0-138,0] (n=5)
	Язвенный колит	144,50 [134,50-146,50] (n=5)	146,50 [143,0-149,0] (n=5)	136,0 [126,0-146,0] (n=5)	157,0 [149,0-165,0] (n=5)	135,50 [129,0-142,0] (n=5)	135,0 [125,50-157,5] (n=5)

CD29	Условно здоровые (контроль)	204,0 [115,0-293,0] (n=5)	139,50 [139,0-140,0] (n=5)	120,0 [116,0-124,0] (n=5)	123,0 [119,0-125,50] (n=5)	124,50 [122,0-127,0] (n=5)	126,50 [124,0-129,0] (n=5)
	Болезнь Крона	112,0 [110,0-117,0] (n=5)	111,50 [110,0-113,0] (n=5)	123,0 [121,0-126,0] (n=5)	134,50 [111,0-158,0] (n=5)	128,0 [114,0-142,0] (n=5)	114,0 [110,0-117,0] (n=5)
	Язвенный колит	111,0 [107,0-120,0] (n=5)	114,50 [110,0-124,0] (n=5)	115,0 [108,0-122,0] (n=5)	129,0 [124,0-134,0] (n=5)	126,50 [119,0-134,0] (n=5)	119,50 [112,0-130,0] (n=5)
CD45 CD19 CD34 CD11b HLA-DR	Условно здоровые (контроль)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)
	Болезнь Крона	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)
	Язвенный колит	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)	отрицательно (n=5)

* - статистически значимые различия между пассажирами в группах заболеваний, $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

n – число пациентов, от которых получены дермальные фибробласты.

Таблица 5

**Молекулярно-генетические исследования культуральной суспензии
дермальных фибробластов**

Наименование	Результат
Mycoplasma hominis	отрицательно
Epstein-Barr virus	отрицательно
Herpes simplex virus 1	отрицательно
Herpes simplex virus 2	отрицательно
Human herpesvirus 6	отрицательно
Cytomegalovirus	отрицательно
Candida albicans	отрицательно
Candida glabrata	отрицательно
Candida krusei	отрицательно

Таблица 6

**Бактериологическое исследование культуральной суспензии дермальных
фибробластов**

Наименование	Результат
Bacillus subtilis	отрицательно
Staphylococcus aureus	отрицательно
Staphylococcus epidermidis	отрицательно
Candida albicans	отрицательно
Streptococcus spp.	отрицательно

Таблица 7

Содержание молекул, спонтанно секретируемых дермальными фибробластами в культуре в сравнении с их содержанием в сыворотке крови, Ме [25-й – 75-й процентиля]

Цитокин	Условно здоровые (контроль)		Болезнь Крона		Язвенный колит	
	Суперна- тант, пг/мл	Сыворот- ка крови, пг/мл	Суперна- тант, пг/мл	Сыворот- ка крови, пг/мл	Суперна- тант, пг/мл	Сыворот- ка крови, пг/мл
IL-1 β	0,15 [0,13-0,35]	0,15 [0,13-0,25]	1,56 [1,30-1,68] p<0,0001* p=0,011**	1,45 [0,87-1,80] p=0,0027* p=0,028**	1,12 [0,81-1,65] p<0,0001*	0,60 [0,27-0,65] p=0,0045*
IL-1RA	121,56 [93,42-131,34]	1159,61 [877,88-1338,24]	153,97 [121,56-170,18] p=0,00016*	1041,66 [468,20-1248,16] p=0,045**	133,53 [122,63-184,75] p=0,00073*	209,82 [182,57-490,86] p=0,0045*
IL-10	2,26 [1,21-2,69]	2,80 [2,03-3,19]	2,15 [0,70-2,54]	3,55 [1,12-4,25]	1,079 [0,82-2,16] p=0,00069*	1,68 [1,51-2,33]

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Язвенный колит», p<0,05 (критерий Mann-Whitney)

Таблица 8

Факторы роста, синтезируемые дермальными фибробластами в сравнении с их содержанием в сыворотке крови, Ме [25-й – 75-й процентиля]

Фактор роста	Условно здоровые (контроль)		Болезнь Крона		Язвенный колит	
	Супернатант, пг/мл	Сыворотка, пг/мл	Супернатант, пг/мл	Сыворотка, пг/мл	Супернатант, пг/мл	Сыворотка, пг/мл
FAP	124,55 [73,55-191,75]	4683,90 [4185,32-4741,20]	343,80 [226,70-466,63] p<0,0001* p<0,0001**	4032,16 [3934,10-4138,59] p=0,045* p=0,045**	208,50 [125,85-267,12] p=0,0032*	4517,27 [4500,68-4526,32]
PDGF-BB	12,87 [11,44-16,40]	3500,0 [2868,85-5858,40]	17,05 [14,71-18,67] p=0,0015* p<0,0001**	7023,10 [4595,15-8022,30]	21,78 [18,67-23,47] p<0,0001*	6276,60 [5824,47-11428,57]
FGFb	6,14 [5,0-7,9]	6,33 [4,49-7,90]	4,72 [3,88-5,92] p<0,0001*	5,96 [2,21-9,69]	4,75 [3,73-5,93] p<0,0001*	3,84 [3,14-3,84] p=0,019*
TGFβ1	805,51 [595,0-900,0]	8191,66 [5860,90-10829,0]	853,56 [651,0-1056,20]	33278,40 [30626,0-37518,0] p=0,009*	713,0 [440,58-951,69]	23592,41 [15165,24-32714,37] p=0,009*

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Язвенный колит», p<0,05 (критерий Mann-Whitney)

Таблица 9

**Компоненты внеклеточного матрикса, продуцируемые дермальными
фибробластами, Ме [25-й – 75-й процентиля]**

Структурные макромолекулы внеклеточного матрикса	Условно здоровые (контроль)		Болезнь Крона		Язвенный колит	
	Супер- натант	Сыво- ротка	Супер- натант	Сыво- ротка	Супер- натант	Сыво- ротка
Коллаген IV типа, мкг/л	3,99 [2,90- 9,89]	130,39 [122,37- 191,84]	4,19 [3,27-5,33] p=0,015**	101,32 [69,02- 151,16]	3,27 [2,28- 4,19] p=0,016*	103,81 [103,81- 136,63]
Фибронектин, мкг/мл	1,04 [0,92- 1,63]	114,87 [80,05- 145,25]	1,50 [1,05-1,98] p=0,013*	81,65 [63,51- 178,42]	1,59 [1,11- 1,92] p=0,014*	112,95 [95,86- 147,48]

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Язвенный колит», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таблица 10

**Секретом дермальных фибробластов (цитокины – IL-1 β , IL-1RA, IL-10, факторы роста – TGF β , FGFb, PDGF-
BB, FAP, макромолекулы ВКМ – коллаген IV типа, фибронектин в супернатанте) в течение 6 пассажей,
Me [25-й – 75-й процентиля]**

Секретируемый фактор	Заболевание	Номер пассажа					
		1	2	3	4	5	6
IL-1 β , пг/мл	Условно здоровые (контроль)	0,15 [0,13-0,18]	0,14 [0,13-0,17]	0,15 [0,14-0,54]	0,16 [0,14-0,42]	0,15 [0,13-0,35]	0,14 [0,12-0,20]
	Болезнь Крона	1,66 [0,87-1,82]	1,36 [1,15-1,64]	1,25 [1,09-1,56]	1,60 [1,41-1,73]	1,59 [1,52-1,72]	1,64 [1,56-1,68]
	Язвенный колит	1,10 [0,81-1,46]	1,14 [0,81-1,15]	1,25 [0,81-1,25]	1,029 [0,98-1,95]	0,86 [0,81-1,65]	1,30 [0,76-2,55]
IL-1RA, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	129,66 [76,70-137,76]	101,65 [80,74- 121,56]	121,56 [101,20- 129,66]	133,02 [112,89- 153,98]	103,60 [77,85- 129,66]	129,66 [113,04- 153,98]
	Болезнь Крона	166,11 [153,97- 170,18]	153,84 [121,56- 188,03]	118,67 [103,46- 153,97]	146,47 [125,15- 191,33]	162,79 [129,19- 170,18]	138,37 [129,66- 184,75]

	Язвенный колит	136,97 [125,35-158,88]	140,66 [119,90-151,49]	125,35 [122,63-136,25]	128,075 [125,35-155,19]	156,41 [122,63-192,14]	158,74 [117,18-206,92]
IL-10, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	2,69 [1,76-3,86]	2,22 [1,21-2,64]	2,53 [1,21-2,64]	2,30 [0,99-3,04]	1,50 [1,37-2,45]	2,22 [1,78-2,53]
	Болезнь Крона	2,16 [1,30-2,30]	1,66 [0,26-2,61]	1,67 [0,36-2,53]	1,56 [0,60-2,30]	2,53 [1,04-2,84]	1,84 [1,10-2,61]
	Язвенный колит	1,25 [0,91-1,30]	1,12 [0,73-1,60]	0,82 [0,73-2,16]	1,079 [0,91-1,69]	1,079 [0,82-2,34]	0,91 [0,82-2,29]
TGFβ1, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	805,51 [630,0-840,0]	853,50 [607,05-900,0]	885,0 [641,49-976,31]	854,51 [553,99-942,32]	570,0 [371,46-915,0]	747,0 [690,0-810,0]
	Болезнь Крона	759,28 [635,51-1042,33]	866,31 [700,0-1053,09]	805,10 [588,99-1103,55]	867,99 [687,96-1077,69]	852,36 [589,0-1167,40]	806,01 [770,0-899,01]
	Язвенный колит	635,81 [348,77-1168,62]	647,44 [411,37-744,0]	683,51 [447,14-930,0]	790,50 [509,74-930,0]	851,93 [527,01-951,69]	738,05 [402,99-1428,93]
FGFb, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	6,27 [4,69-8,57]	5,59 [4,41-8,21]	5,51 [4,90-7,90]	6,12 [5,67-7,65]	6,27 [5,31-7,29]	7,55 [4,90-8,02]
	Болезнь Крона	4,42 [4,08-5,25]	4,77 [3,47-6,44]	5,12 [4,13-6,39]	4,72 [3,88-8,21]	5,65 [4,24-6,12]	3,58 [2,86-5,34]
	Язвенный колит	4,53 [3,72-4,75]	5,76 [3,49-7,33]	3,87 [3,56-4,41]	4,76 [4,30-5,93]	4,76 [4,58-5,70]	4,92 [4,53-5,08]

PDGF-BB, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	11,85 [11,49-12,87]	11,65 [11,44-12,87]	12,69 [11,03-13,10]	11,49 [11,03-15,60]	17,47 [12,87-18,30]	14,97 [13,79-16,40]
	Болезнь Крона	16,69 [12,87-18,10]	17,53 [15,84-18,51]	18,67 [15,27-19,55]	16,69 [16,69-17,05]	16,69 [14,71-18,67]	18,38 [17,05-18,67]
	Язвенный колит	24,039 [21,78-28,50]	21,78 [17,82-22,06]	20,64 [18,66-24,039]	19,23 [18,67-22,98]	22,06 [20,93-22,06]	19,51 [18,67-22,06]
FAP, пг/мл	Условно здоровые (контроль)	212,08 [110,56-249,98]	100,30 [61,24-133,78]	123,23 [90,34-227,39]	123,98 [73,55-249,33]	135,05 [113,65-170,62]	174,12 [130,26-187,74]
	Болезнь Крона	455,83 [386,51-469,16]	215,84 [189,55-280,82]	419,89 [398,58-477,32]	294,24 [232,43-431,18]	447,49 [321,64-471,34]	307,96 [226,065-415,14]
	Язвенный колит	233,01 [154,0-575,73]	198,56 [125,40-217,75]	143,018 [107,93-212,57]	180,40 [137,75-252,83]	238,37 [140,88-267,41]	286,94 [71,70-326,75]
Коллаген IV типа, мкг/л	Условно здоровые (контроль)	4,72 [3,99-6,85]	3,99 [3,80-10,27]	3,63 [2,90-8,75]	3,63 [3,04-9,89]	5,71 [2,54-12,17]	2,90 [2,54-4,57]
	Болезнь Крона	3,80 [2,54-6,09]	4,19 [2,90-4,19]	4,95 [3,27-4,95]	4,19 [3,27-4,95]	4,35 [3,80-4,57]	4,57 [3,42-5,33]
	Язвенный колит	3,42 [3,27-4,19]	2,54 [2,28-4,19]	2,18 [1,90-4,19]	3,42 [3,04-3,99]	3,27 [2,28-4,19]	3,04 [1,90-3,63]

Фибронектин, мкг/мл	Условно здоровые (контроль)	1,08 [0,78-1,33]	0,96 [0,93-1,70]	1,25 [1,04-1,91]	1,04 [0,99-1,25]	1,0 [0,94-1,37]	1,0 [0,81-1,63]
	Болезнь Крона	1,45 [1,32-1,50]	1,25 [0,80-2,44]	1,50 [1,05-1,97]	1,50 [1,05-1,76]	1,98 [1,55-2,24]	1,45 [1,04-1,66]
	Язвенный колит	1,40 [1,33-1,65]	1,06 [0,83-2,17]	1,28 [1,19-1,34]	1,72 [1,65-1,87]	1,92 [1,63-2,05]	1,55 [0,96-1,88]

* - статистически значимые различия между пассажами в группах заболеваний, $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таблица 11

Влияние LPS *E. coli* O55:B5 на секрецию дермальными фибробластами цитокинов (IL-1 β , IL-1RA, IL-10), факторов роста (TGF β , FGFb, PDGF-BB, FAP), компонентов ВКМ (фибронектин), Ме [25-й – 75-й процентиля]

Секретируемый фактор	Условия	Заболевание		
		Условно здоровые (контроль)	Болезнь Крона	Язвенный колит
IL-1 β , пг/мл	Контроль	0,25 [0,20-0,35]	1,45 [1,29-1,88]	1,33 [0,75-1,50]
	LPS	0,15 [0,14-0,17]	1,72 [1,43-1,90]	1,20 [0,87-1,80]
IL-1RA, пг/мл	Контроль	109,0 [87,76-119,66]	163,15 [89,93-230,34]	135,11 [117,18-141,75]
	LPS	101,56 [94,10-105,86]	201,80 [137,20-257,35]	151,61 [117,18-181,75]
IL-10, пг/мл	Контроль	2,26 [2,16-3,0]	1,57 [0,67-2,44]	1,25 [0,78-1,92]
	LPS	2,54 [2,44-3,66]	1,70 [1,079-2,11]	1,39 [0,89-2,21]
TGF β 1, пг/мл	Контроль	720,0 [395,11-840,0]	605,44 [399,59-867,32]	726,99 [486,17-812,99]
	LPS	600,0 [480,0-780,0]	712,029 [589,83-795,0]	721,13 [550,40-765,0]
FGFb, пг/мл	Контроль	6,79 [6,57-6,89]	5,19 [3,44-5,22]	3,94 [3,78-5,21]
	LPS	6,39 [4,90-6,39]	4,49 [3,82-5,56]	4,78 [3,97-4,79]
PDGF-BB, пг/мл	Контроль	11,49 [10,95-11,95]	13,49 [12,41-19,23]	20,36 [17,53-21,49]
	LPS	11,49 [10,57-11,95]	14,029 [13,11-19,51]	19,99 [17,82-21,95]
FAP, пг/мл	Контроль	155,11 [141,11-165,60]	407,34 [291,44-525,71]	242,34 [242,049-275,44]
	LPS	129,46 [96,031-133,41]	362,88 [219,89-398,04]	196,42 [174,60-227,81]
Фибронектин, мкг/мл	Контроль	0,43 [0,41-0,58]	1,49 [1,01-1,54]	1,42 [0,99-1,77]
	LPS	0,51 [0,49-0,56]	1,43 [1,03-1,54]	1,53 [1,15-1,67]

* - статистически значимые различия между условиями «Контроль» и «LPS», $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

Таблица 12

Влияние LPS *E. coli* O55:B5 на продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами, Me [25-й – 75-й процентиля] и M $\pm$ SD

Заболевание	Коллаген IV типа мкг/л	
	Контроль	LPS
Условно здоровые (контроль)	5,60 [4,36-5,80] 5,34 $\pm$ 0,93	5,08 [4,84-5,80] 5,16 $\pm$ 0,9
Болезнь Крона	3,65 [3,46-5,095] 4,27 $\pm$ 1,51	2,18 [1,67-2,60] 2,13 $\pm$ 0,55 p=0,021*
Язвенный колит	3,16 [2,78-3,81] 3,72 $\pm$ 1,98 p=0,028**	2,04 [1,86-2,36] 2,28 $\pm$ 0,83 p=0,027*

* - статистически значимые различия с группой «Контроль», p<0,05 (критерий Mann-Whitney);

** - статистически значимые различия с группой «Условно здоровые (контроль)», p<0,05 (критерий Mann-Whitney)