

На правах рукописи

Васильева Екатерина Александровна

**ЦИТОФИЗИОЛОГИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ДЕТЕЙ
ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Мухина Ирина Васильевна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией клеточной биологии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук,

Воротеляк Екатерина Андреевна

Кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией функциональной геномики, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,

Брускин Сергей Александрович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины (119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1)

Защита диссертации состоится _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru//>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 секретом 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 сетеобразующего 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 секрета 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили фибробласты, полученные из биоптатов кожи предплечья 5 детей с болезнью Крона, 5 детей с язвенным колитом и от 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 локальным этическим комитетом при ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол №4 от 25.03.2015). Критериями включения пациентов были возраст, отсутствие аутоиммунных заболеваний (кроме БК, ЯК), педиатрический индекс активности и продолжительность заболевания.

Иссеченный биоптат кожи предплечья размером 3x3 мм помещали в герметичную стерильную пробирку с транспортной средой 199 с солями Хэнкса и глутамином, пенициллином и стрептомицином. Одновременно со взятием биоптата у всех участников исследования был проведен забор периферической крови из локтевой вены для оценки наличия маркеров системного воспаления. Образцы сыворотки аликвотировали и хранили в замороженном состоянии при -20°C в течение 2 месяцев.

Фибробласты кожи были культивированы до шестого пассажа в пяти повторах с целью увеличения клеточности и изучения стабильности фенотипа фибробластов кожи в культуре.

Выделение и культивирование дермальных фибробластов. Фибробласты кожи получали путем ферментативной обработки трипсином.

Культивирование осуществляли при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ (Thermo scientific, Германия). Замену культуральной среды проводили каждые 3 дня. Супернатанты каждого пассажа культур дермальных фибробластов отбирали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 μм (GE Osmonics, США) и аликвотировали для хранения при -80°C в течение 2 месяцев.

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 светооптического микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония).

Клоногенный анализ. Клоногенный анализ проводили после каждого пассажа по эффективности колониеобразования фибробластов. В ходе подсчёта учитывали колонии, содержащие более 50 клеток, также изучали морфологию составляющих их клеток.

Определение времени удвоения популяции фибробластов. Дермальные фибробласты на каждом пассаже засевали с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на 1 см² поверхности культурального флакона и культивировали до достижения культурой 90%-100% конфлюэнтности, клетки снимали с поверхности пластика методом трипсинизации. Подсчёт клеток проводили в камере Горяева.

Имунофенотипирование клеток. Оценку экспрессии специфических поверхностных клеточных маркеров проводили иммунофенотипированием дермальных фибробластов на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США). В работе использовали CD73-APC (экто-5'-нуклеотидаза), CD90-FITC (антиген дифференцировки тимоцитов 1), 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), CD13-PE (аминопептидаза N), CD44-PE (трансмембранный гликопротеин), CD10-FITC (нейтральная эндопептидаза), CD166-PE (молекула адгезии), CD29-PE (субъединица β1 интегрина) (BD Bioscience, США). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva 6.1.3 (Becton Dickinson, США).

Полимеразная цепная реакция. Методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации была проанализирована клеточная суспензия на отсутствие микоплазмы, вируса Эпштейна-Барр, вирусов герпеса 1, 2, 6 типов, цитомегаловируса человека, *Candida spp.*

Микробиологический посев на стерильность. Клеточную суспензию высевали на чашки Петри с 5% кровяным агаром, в жидкую тиогликолевую среду и среду Сабуро. Инкубировали при оптимальной температуре в течение 8 дней в аэробных и анаэробных условиях. Заключение о

стерильности культуральной среды делали при отсутствии роста микроорганизмов.

Иммуноферментный анализ секрета дермальных фибробластов и выявление маркеров воспаления в сыворотке крови. 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 внеклеточного матрикса (ВКМ) (макромолекул фибронектина и коллагена IV) в супернатанте дермальных фибробластов (1-6 пассаж) и сыворотке крови определяли методом ELISA, используя методику производителя. Результаты определяли на фотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм, с использованием программного обеспечения Magellan v. 1.2 (Tecan, Австрия).

Иммуноблоттинг. В работе использованы антитела: monoclonal anti-fibrinectin antibody (Sigma, США), anti-collagen type I monoclonal antibody (Millipore, 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). Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью реактива Luminata Classico Western HRP Substrate (Millipore, США). Детекцию хемилюминесценции осуществляли на приборе ChemiDocTM MP Imaging System (Bio-Rad, США). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab 4.1 (Bio-Rad, США).

Вызванная секреторная активность дермальных фибробластов. Клетки после третьего пассажа стимулировали липополисахаридом «Lipopolysaccharides из *Escherichia coli*, серотип O55:B5» (Sigma, Германия) в концентрации 10 мкг/мл. LPS стимуляцию дермальных фибробластов в культуре проводили в течение 24 часов. Супернатанты отбирали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 μ m (GE Osmonics, США).

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. 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. Оценку корреляционных связей осуществляли методом Спирмена (R). Нулевые гипотезы отвергали при уровне значимости критерия $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфология дермальных фибробластов

Культуры изолированных дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с БК и ЯК имели характеристики, соответствующие культуре типичных фибробластов как представителей мезенхимальных стромальных клеток. Морфометрические различия выявлены в длине дермальных фибробластов: длина дермальных фибробластов детей с ВЗК меньше данного показателя условно здоровых детей на 10%, а также в площади ядра и цитоплазмы: у дермальных фибробластов детей с ЯК были ниже на 5,8% и 5,3% соответственно, чем у дермальных фибробластов контрольной группы (табл. 1).

Таблица 1
Морфологические характеристики культивируемых фибробластов предплечья детей, Me [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, $\mu\text{м}$ | 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, $\mu\text{м}^2$ | 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, $\mu\text{м}^2$ | 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

Кроме того, дермальные фибробласты детей с ВЗК обладали меньшей площадью, занимаемой клеткой на поверхности пластика, хотя известно, что фибробласты взрослых людей достигают большего размера на твёрдых субстратах по сравнению с более эластичными субстратами (Fisher G.J. et al., 2016).

Снижение адгезивной способности фибробластов и уменьшение размера фибробластов, вероятно, связано со снижением функциональной

активности клеток, в частности со снижением продукции компонентов ВКМ (Arora P.D., Narani N., McCulloch C.A., 1999; Kessler D. et al., 2001; Quan T. et al., 2013).

Клоногенный потенциал дермальных фибробластов

Фибробласты дермы детей формировали в культуре различные типы колоний, подобно описанному разнообразию колониальных структур фибробластов взрослых обследуемых людей (Зорин В.Л. и др., 2014).

Однако в ходе анализа клоногенного потенциала выявлены различия в формировании различных типов колоний как межгрупповые, так и в рамках исследуемых групп (рис. 1).

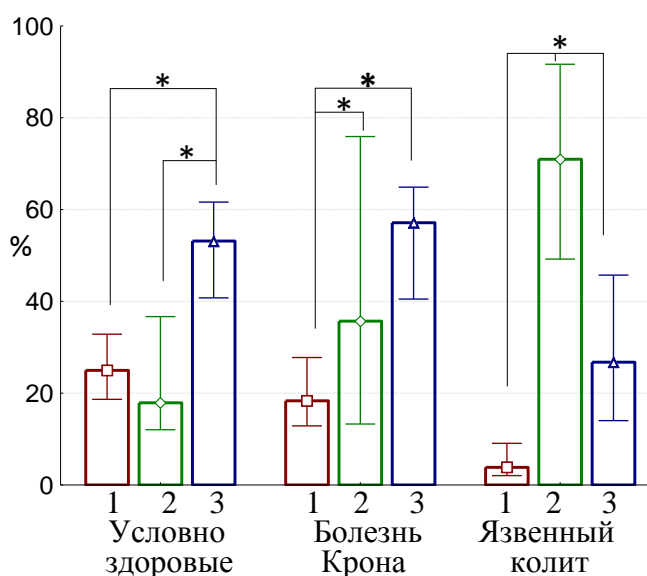


Рисунок 1. Распределение типов колоний, образованных дермальными фибробластами детей в культуре, Me [25-й – 75-й процентиля]; 1 – плотные колонии; 2 – рыхлые колонии; 3 – смешанные колонии; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Дермальные фибробласты детей с ЯК интенсивнее формировали рыхлые колонии, чем дермальные фибробласты детей с БК в 2,3 раза. Одновременно наблюдалось снижение количества плотных и смешанных колоний дермальных фибробластов при ЯК по сравнению с формированием колоний при БК.

ВЗК у детей вызывали снижение эффективности колониообразования дермальных фибробластов в культуре на первом пассаже (рис. 2). С третьего пассажа разница в эффективности колониообразования между дермальными фибробластами здоровых детей и детей с ВЗК исчезала, что, вероятно, обусловлено условиями культивирования фибробластов *in vitro*.

Время удвоения популяций дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с ЯК статистически значимо не отличалось в течение шести пассажей. Более медленным ростом колоний характеризовались только дермальные фибробласты детей с БК (рис. 3).

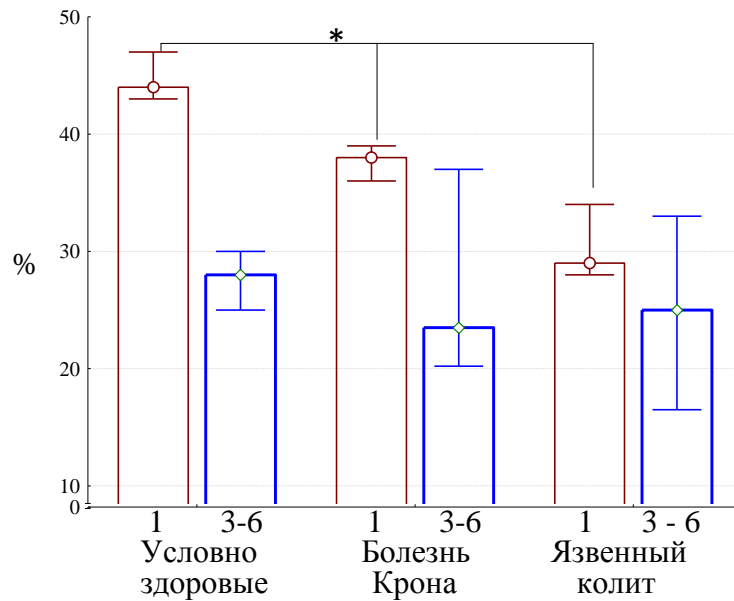


Рисунок 2. Эффективность образования колоний дермальными фибробластами в зависимости от пассажа, Ме [25-й – 75-й процентиля]; 1, 3-6 – номер пассажа; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

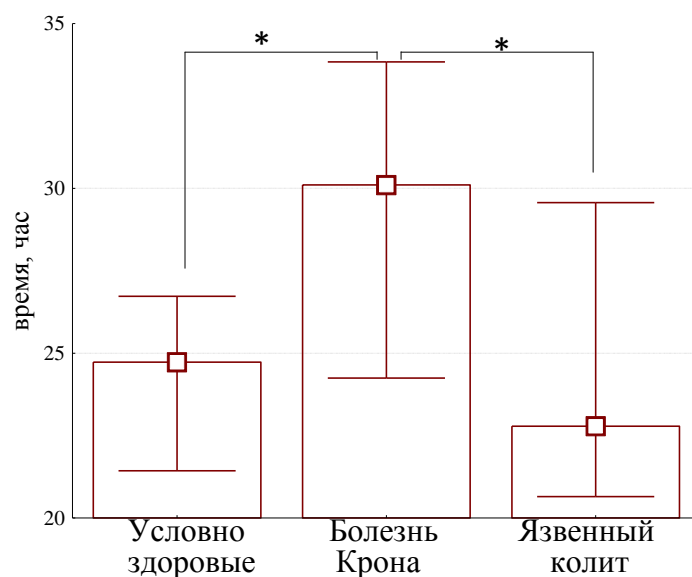


Рисунок 3. Время удвоения популяции дермальных фибробластов, Ме [25-й – 75-й процентиля]; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Преобладание в наших исследованиях колоний рыхлого типа в популяции дермальных фибробластов детей с БК в сочетании с более медленным ростом, вероятно, отражают способность фибробластов в составе ткани к структурным и физиологическим изменениям не только в дерме, но

также в эпидермисе. Действительно, по данным литературы уменьшение подкожно-жировой клетчатки и снижение тургора тканей наблюдалось у 40,3% детей с ЯК и 54,2% детей с БК (Тутина О.А. и др., 2008).

Антигенный фенотип дермальных фибробластов

Результаты иммунофенотипирования дермальных фибробластов в культуре клеток свидетельствовали о наличии поверхностных CD-кластеров, характерных для мезенхимальных стромальных клеток (Dominici M. et al., 2006).

Поверхностные маркеры дермальных фибробластов соответствовал фенотипу мезенхимальных стволовых клеток. Отличия между популяциями дермальных фибробластов детей с ЯК и клетками условно здоровых детей и детей с БК выявлены по количеству CD10 и CD29-положительных клеток и уровню экспрессии CD10, CD13 CD44 на клеточной поверхности, что, вероятно, связано с быстрым переходом стадий нормальной дифференцировки фибробластов.

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

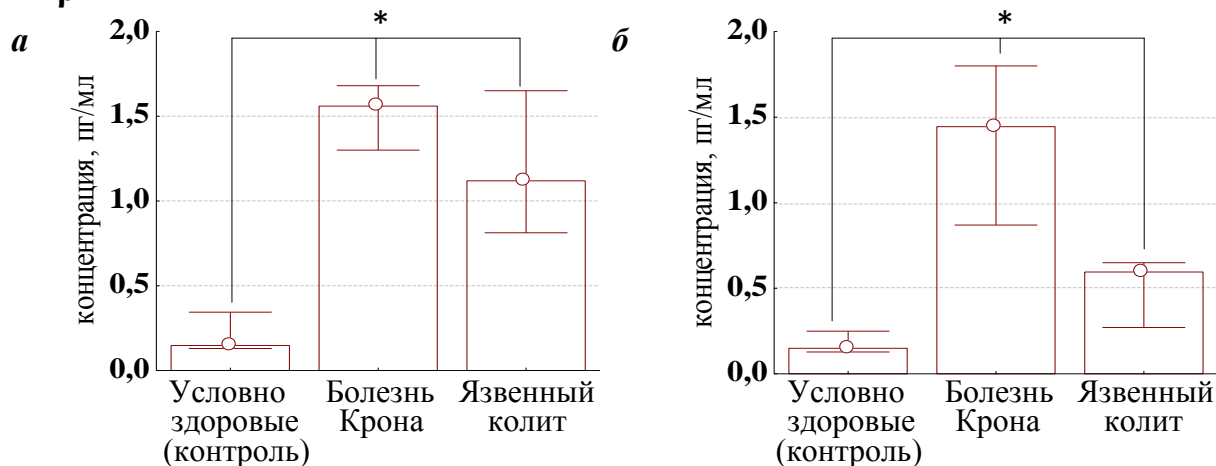
IL-1 β . У детей с БК и ЯК наблюдалась гиперпродукция IL-1 β на системном уровне и в супернатанте дермальных фибробластов по сравнению с условно здоровыми детьми (рис. 4). По данным литературы IL-1 β является центральным эффектором воспалительного ответа и может быть причиной снижения общего объёма ВКМ (Kim M.S. et al., 2014).

IL-1RA. На системном уровне концентрация IL-1RA в сыворотке крови имела тенденцию к снижению в 1,2 раза у детей с БК и была достоверно ниже в 3,7 раза у детей с ЯК относительно условно здоровых детей. Было показано, что соотношение IL-1RA/IL-1 β в сыворотке детей с БК и ЯК относительно контрольной группы снижено в 8 раз и в 12 раз соответственно, что свидетельствовало о развитии системного ответа на хроническое воспаление в кишечнике, активации провоспалительной системы и недостаточности активности противовоспалительной системы организма.

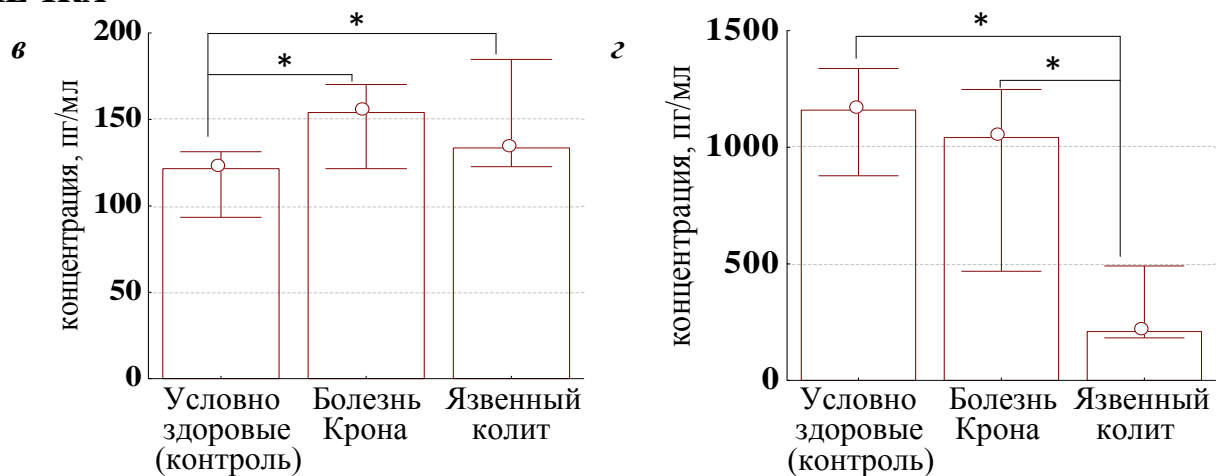
В то же время дермальные фибробласты детей с ВЗК секретировали в супернатант достоверно больше IL-1RA, чем у здоровых детей. В результате в супернатантах дермальных фибробластов детей с БК и ЯК соотношение IL-1RA/IL-1 β было ниже, соответственно, только в 5,6 раз и в 4,3 раза по сравнению с данным показателем условно здоровых детей. Таким образом, дермальные фибробласты детей вовлекаются в системный ответ на воспаление, активируя собственную систему синтеза противовоспалительных факторов, одним из которых является антагонист рецептора интерлейкина-1, препятствующий активации внутриклеточного сигнального каскада провоспалительным цитокином IL-1 β .

IL-10. Сывороточный уровень противовоспалительного цитокина IL-10 имел тенденцию к снижению относительно группы здоровых детей, однако из-за небольшой выборки не имел статистически значимых различий между исследуемыми группами.

IL-1 β



IL-1RA



IL-10

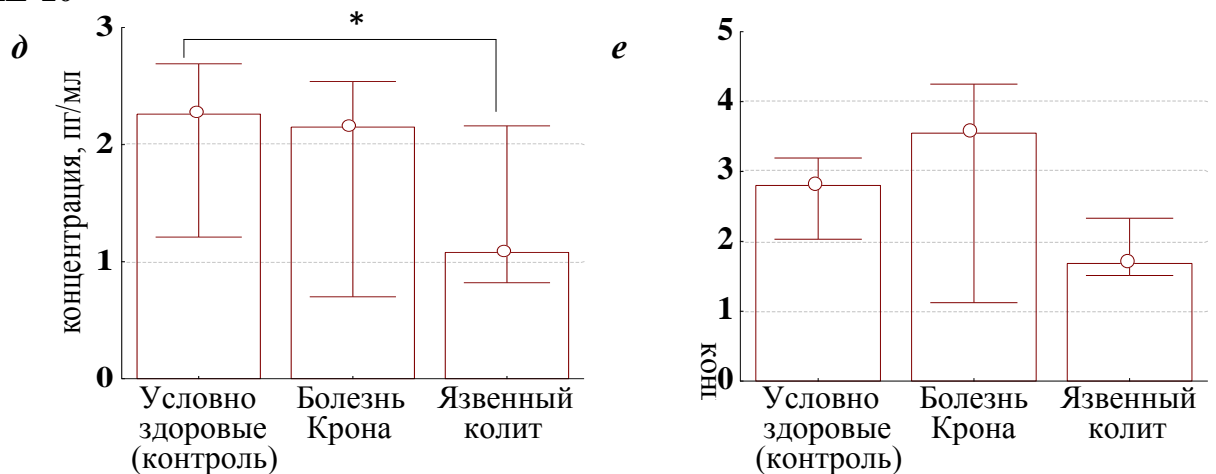


Рисунок 4. Содержание цитокинов, спонтанно секретируемых дермальными фибробластами (а, в, д) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г, е), Me [25-й – 75-й процентиля]; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 супернатанте дермальных фибробластов детей с БК и ЯК также снижалась относительно его уровня в группе с условно здоровыми детьми.

Таким образом, при развитии ВЗК у детей снижено содержание противовоспалительных факторов в сыворотке крови, способствующих заживлению повреждения (Sabat R. et al., 2010), что отражает активный системный ответ иммунной системы при хроническом воспалении. Дермальные фибробласты предплечья, не относящиеся пространственно к кишечнику, были вовлечены в системный усиленный воспалительный ответ на ВЗК, продуцируя провоспалительный секретом.

Спонтанная секреция дермальными фибробластами ростовых факторов и их содержание в сыворотке крови

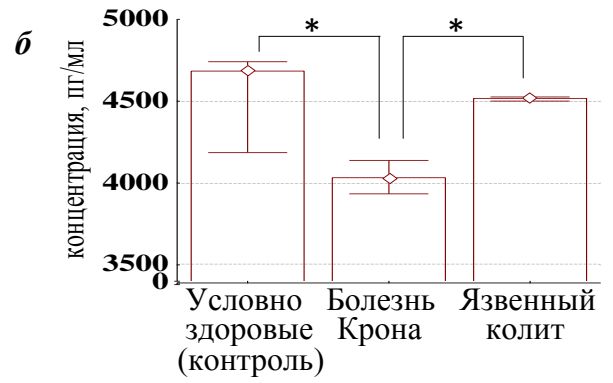
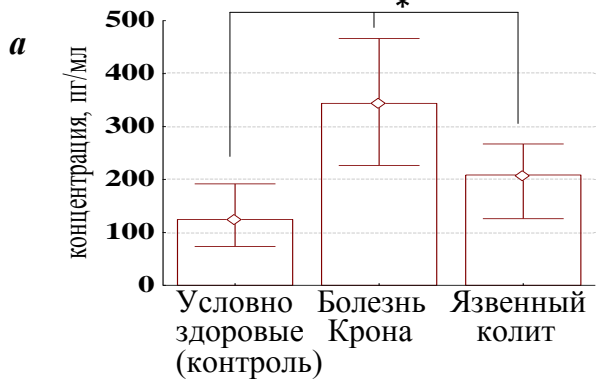
FAP. Физиологическая роль белка активации фибробластов заключается в облегчении клеточной инвазии и роста клеток (Kelly T. et al., 2012). Дермальные фибробласты детей с БК и ЯК проявляли повышенную в 2,5 раза и 1,6 соответственно раз секрецию FAP по сравнению с дермальными фибробластами здоровых детей в супернатантах (рис. 5а), но не в сыворотке крови (рис. 5б). В ряде работ показана роль FAP в развитии хронического воспаления и создании условий, способствующих процессам фиброобразования, так у пациентов с БК обнаруживалась экспрессия FAP в фибробластах, граничащих с зоной фиброза (Scharl M. et al., 2015). Кроме того, более интенсивная экспрессия FAP в группе детей с ВЗК свидетельствует о более активном функциональном состоянии клеток по сравнению с фибробластами контрольной группы.

PDGF-BB. Продукция тромбоцитарного фактора роста, являющегося мощным стимулятором репаративной регенерации тканей, пролиферации клеток, дермальными фибробластами детей с БК и ЯК достоверно повышена в 1,2 раза и 1,5 раза в супернатантах (рис. 5в) по сравнению с дермальными фибробластами условно здоровых детей. Подобная тенденция наблюдалась и в сыворотке крови (рис. 5г), что свидетельствовало о стимуляции системного ответа клеток на хроническое воспаление в кишечнике, в том числе дермальных фибробластов. Тромбоцитарного фактора роста усиливает пролиферацию фибробластов и продукцию ВКМ, гиалуроновой кислоты и участвует в разрушении старого коллагена (Lin H. et al., 2006; Kim M.S. et al., 2014).

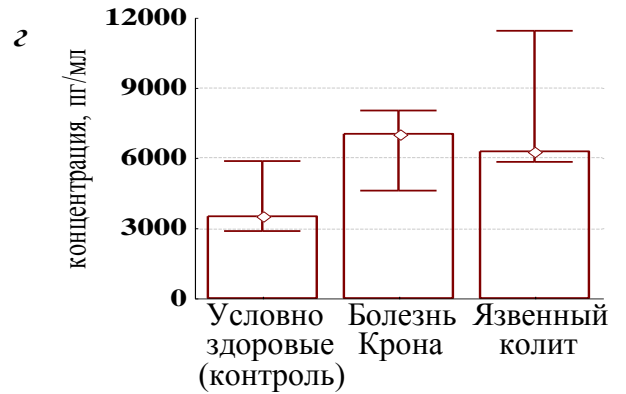
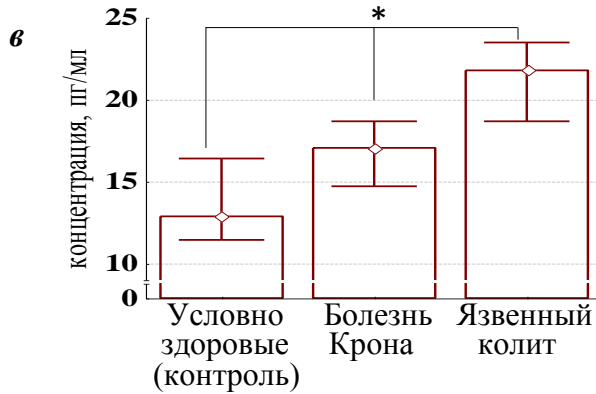
FGFb. Содержание фактора роста фибробластов, играющего ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки широкого спектра клеток и тканей, в супернатантах дермальных фибробластов детей с БК и ЯК достоверно снижено в 1,3 раза и 1,3 раза относительно уровня условно здоровых детей (рис. 5д), что отражается в его снижении на системном уровне (рис. 5е) и вносит вклад в нарушение репаративной регенерации в условиях хронического воспаления.

TGFβ1. Статистически значимых различий в супернатанте дермальных фибробластов в содержании TGFβ1 обнаружено не было (рис. 5ж), в то время как на системном уровне наблюдается значимое увеличение данного показателя у детей с ВЗК (рис. 5з).

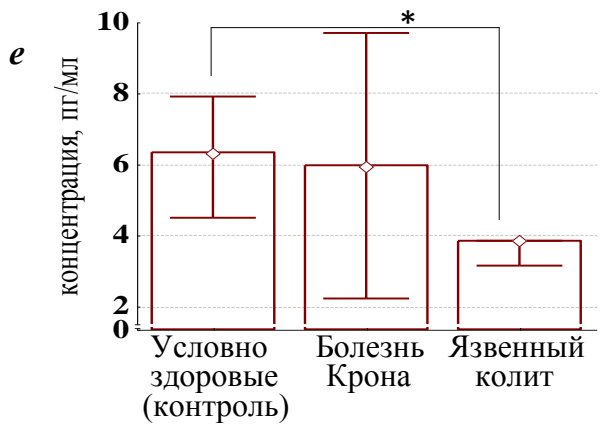
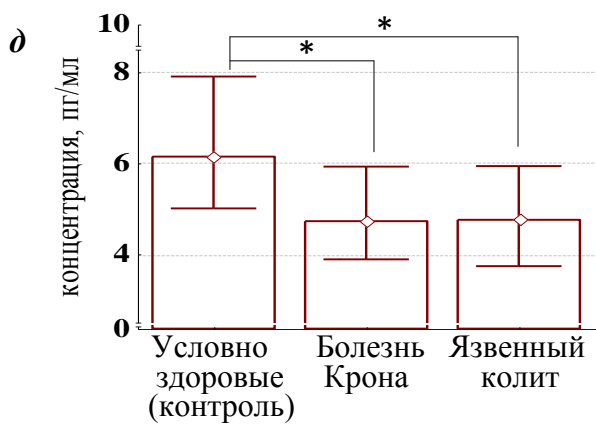
FAP



PDGF-BB



FGFb



TGFβ1

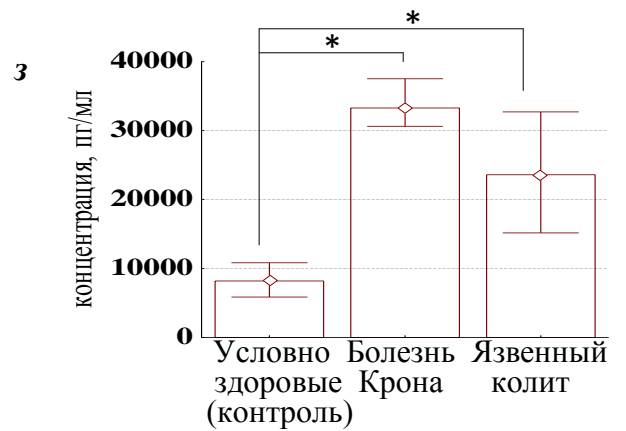
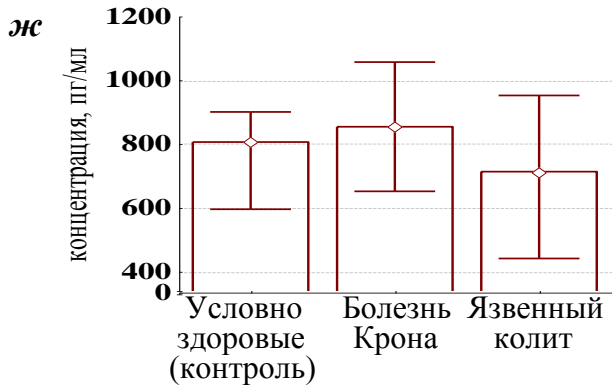


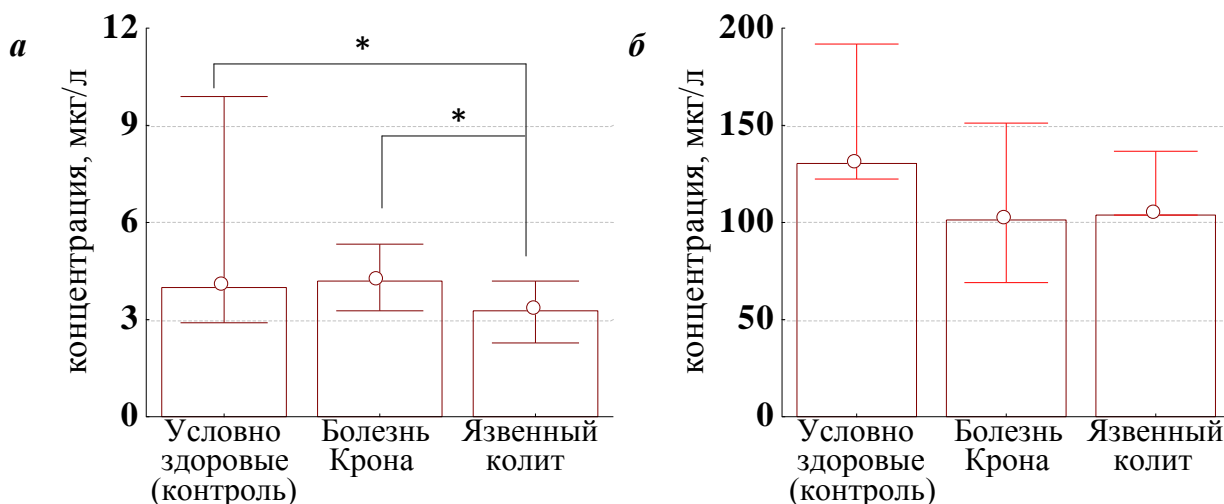
Рисунок 5. Факторы роста, секретируемые дермальными фибробластами (а, в, д, ж) и их содержание в сыворотке крови (б, г, е, з), Me [25-й – 75-й процентиля]; * – статистически значимые различия (p<0,05, критерий Mann-Whitney)

Таким образом, дермальные фибробласты у детей с ВЗК проявляли не только провоспалительный фенотип, но и дисбаланс в продукции факторов, регулирующих репаративную регенерацию клеток при воспалении.

Спонтанная продукция дермальными фибробластами растворимых компонентов внеклеточного матрикса (макромолекул коллагена IV типа, фибронектина) и их содержание в сыворотке крови

Коллаген IV типа. Продукция макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами детей с ЯК достоверно снижена в супернатанте (рис. 6а), а у детей с БК имела тенденцию к снижению по сравнению с условно здоровыми детьми.

Коллаген IV типа



Фибронектин

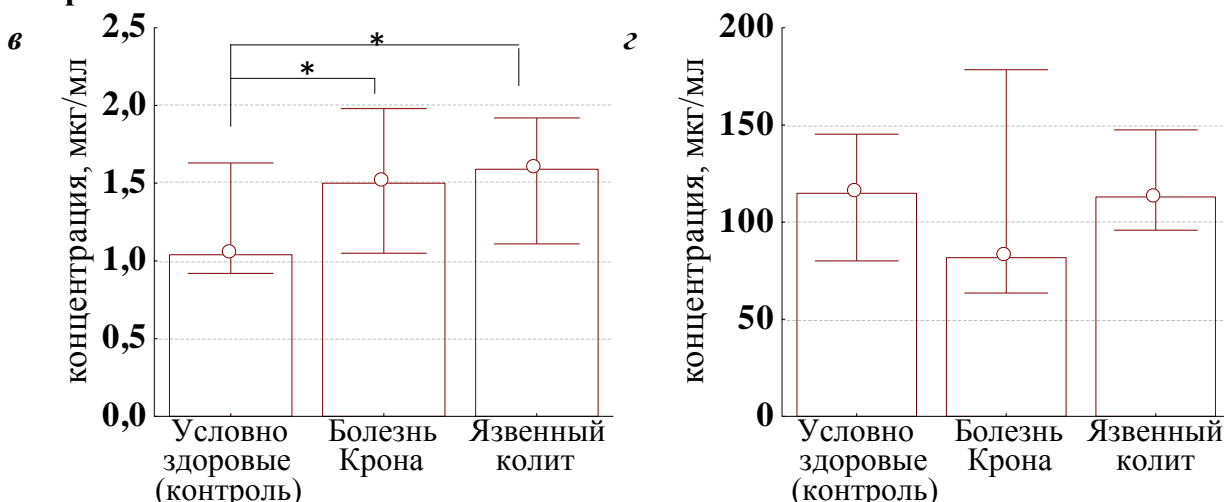


Рисунок 6. Компоненты внеклеточного матрикса, продуцируемые дермальными фибробластами (а, в) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г), Me [25-й – 75-й процентиля]; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$, критерий Mann-Whitney)

В сыворотке исследуемых пациентов также наблюдалось снижение содержания макромолекул коллагена IV типа (рис. 6б), что могло

свидетельствовать о деструктивных процессах, протекающих в коже при ВЗК. Снижение продукции фибробластами макромолекул коллагена IV типа, вероятно, способствует изменению структуры базальной мембраны и эпителиально-мезенхимальному переходу, что в свою очередь может инициировать фиброз (Randles M., Humphries M.J., Lennon R., 2016).

Фибронектин. Дермальные фибробласты детей с БК и ЯК секретировали фибронектин в супернатант достоверно интенсивнее относительно условно здоровых детей (рис. 6в). В сыворотке же содержание фибронектина не менялось по сравнению с условно здоровыми детьми (рис. 6г), что свидетельствует об активном вовлечении именно дермальных фибробластов в системную реакцию организма на местное воспаление в кишечнике.

Таким образом, важным результатом исследования продукции фибробластами белков внеклеточного матрикса было заключение о том, что при ВЗК дермальные фибробласты снижали секрецию макромолекул коллагена IV типа, определяющего целостность базальной мембраны, структурность расположения и взаимодействия слоев кожи, но повышало продукцию фибронектина, участвующего в адгезии и миграции клеток.

Влияние различных сроков культивирования на стабильность секрета дермальных фибробластов

При попарном сравнении концентрации исследуемых показателей (IL-1 β , IL-1RA, IL-10, TGF β 1, FGF β , PDGF-BB, FAP, макромолекул коллагена IV типа и фибронектина) в супернатантах первых шести пассажей дермальных фибробластов внутри контрольной группы, детей с БК и ЯК в пределах нашей выборки статистически значимых различий не выявлено ни по одному из параметров. Таким образом, в ходе исследования была показана стабильность нормального секрета дермальных фибробластов здоровых детей и провоспалительного секрета детей с ВЗК в течение 6 пассажей.

Индукцированная секреция дермальных фибробластов

В ответ на добавление LPS *E. coli* O55:B5 дермальные фибробласты снижали секрецию макромолекул коллагена IV типа (рис. 7).

Снижение концентрации макромолекул коллагена IV типа в супернатанте дермальных фибробластов под влиянием LPS на 50,2% у детей с БК, на 38,7% - у детей с ЯК было статистически значимо, в отличие от группы условно здоровых детей.

Полученные результаты согласуются с данными Li (Li X. et al., 2016), который впервые выявил роль лизосомальной протеазы в регуляции экспрессии коллагенов III и IV типов фибробластами через активацию сигнального пути TLR2/NF κ B, последующее повреждение белков в процессе окисления и снижение их продукции клетками.

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 уровнем в результате хронического воспаления у детей с БК и ЯК.

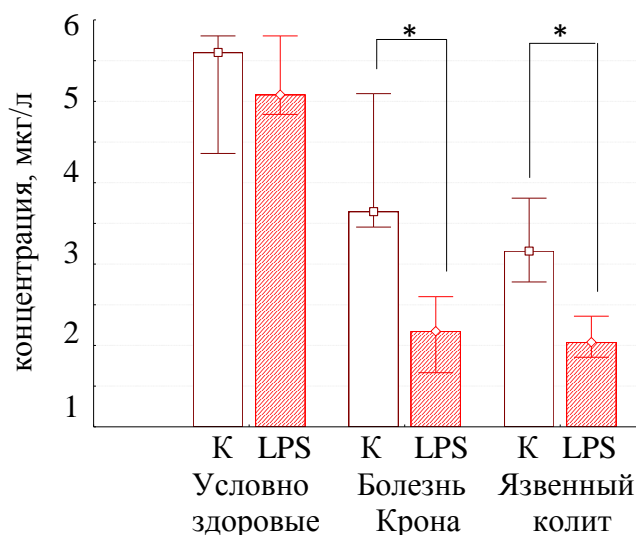


Рисунок 7. Влияние LPS *E. coli* O55:B5 на продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами, Me [25-й – 75-й процентиля]; К – контроль (без добавления LPS), LPS – с добавлением LPS; * - статистически значимые различия, $p < 0,05$ (критерий Mann-Whitney)

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 β 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 секрета, 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 β 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из Перечня РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук:

1. Vasilyeva, E. Serum Cytokine Profiles in Children with Crohn's Disease / E. Vasilyeva, S. Abdulkhakov, G. Cherepnev, E. Martynova, I. Mayanskaya, A. Valeeva, R. Abdulkhakov, D. Safina, S. Khaiboullina, A. Rizvanov // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–8.

2. Васильева, Е. А. Секреторная активность дермальных фибробластов у детей с болезнью Крона / Е. А. Васильева, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Э. Н. Федулова, В. И. Ашкинази, В. С. Кропотов // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. – 2015. – № 3. – С. 221–222.

3. Ашкинази, В. И. Растворимые молекулы адгезии в патогенезе болезни Крона у детей / В. И. Ашкинази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Н. Ю. Широкова, Э. Н. Федулова, Е. А. Васильева, В. С. Кропотов, О. А. Тутина, О. В. Шумилова // *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. – 2014. – № 6. – С. 31–35.

4. Маянская, И. В. Влияние секреторных факторов фибробластов на кислородзависимый метаболизм нейтрофилов / И. В. Маянская, Е. А. Васильева, В. И. Ашкинази, В. С. Кропотов, Н. И. Толкачева, Е. И. Руднева, Э. Н. Федулова, Н. Ю. Широкова, О. А. Тутина // *Иммунология*. – 2014. – Т. 3, № 35. – С. 130–133.

5. Кропотов, В. С. Спектр белков, продуцируемый дермальными фибробластами у детей с болезнью Крона / В. С. Кропотов, С. А. Колесов, Е. А. Васильева, И. В. Маянская, В. И. Ашкинази // *Вопросы современной педиатрии*. – 2013. – Т. 12, № 6. – С. 120–122.

6. Ашкинази, В. И. Молекулы адгезии при деструктивно-воспалительном процессе в кишечнике у детей с язвенным колитом / В. И. Ашкинази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Э. Н. Федулова, Н. Ю. Широкова, Е. А. Васильева, О. В. Шумилова // *Вопросы современной педиатрии*. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 52–56.

Статьи в других изданиях:

7. Кропотов, В. С. Секретом дермальных фибробластов у детей с болезнью Крона / В. С. Кропотов, Е. А. Васильева, И. В. Маянская, В. И.

Ашкинази, С. А. Колесов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – Т. 11. – С. 283–286.

Материалы конференций:

8. Васильева, Е. А. Влияние липополисахарида на продукцию коллагена IV типа фибробластами детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Е. А. Васильева, Э. Н. Федулова, И. В. Мухина // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – С. 107.

9. Васильева, Е. А. Дermalные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника: цитокиновый профиль в системе *in vitro* / Е. А. Васильева // Материалы конференции «Ломоносов-2016». Москва, 2016.

10. Васильева, Е. А. Дermalные фибробласты детей с воспалительными заболеваниями кишечника: биологические характеристики в системе *in vitro* / Е. А. Васильева // Фундаментальная наука и клиническая медицина. Материалы XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье». Санкт-Петербург, 2016. – Т. 19. – С. 119-120.

11. Васильева, Е. А. Секреция IL-1 β и факторов роста фибробластами детей с ВЗК / Е. А. Васильева, Н. И. Толкачева, О. А. Тутина, Е. А. Рожденкин // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17 (3s). – С. 84–85.

12. Васильева, Е. А. Функциональная активность фибробластов в норме и патологии у детей в системе *in vitro* / Е. А. Васильева, Н. И. Толкачева, И. В. Маянская, В. И. Ашкинази, Э. Н. Федулова, В. С. Кропотов, Г. В. Медянцева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №44: Материалы юбилейной двадцатой объединенной российской гастроэнтерологической недели. Москва, 2014. –Т. 24, №5. – С. 117.

13. Толкачева, Н. И. Фибробласт-активирующий белок и факторы роста у детей с болезнью Крона / Н. И. Толкачева, И. В. Маянская, Е. А. Васильева, В. И. Ашкинази, Э. Н. Федулова, О. А. Тутина, Е. В. Кулакова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №44 : Материалы юбилейной двадцатой объединенной российской гастроэнтерологической недели. Москва, 2014. –Т. 24, №5. – С. 97.

14. Ашкинази, В. И. Растворимые молекулы адгезии как прогностический фактор реализации репаративной (фибробластической фазы воспаления у детей с болезнью Крона / В. И. Ашкинази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Е. А. Васильева, Э. Н. Федулова, Н. Ю. Широкова, Е. В. Кулакова, О. В. Шумилова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №44: Материалы юбилейной двадцатой объединенной российской гастроэнтерологической недели. Москва, 2014. –Т. 24, №5. – С. 93.

15. Васильева, Е. А. Индуцированный синтез цитокинов клетками крови *in vitro* в норме и патологии / Е. А. Васильева, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, И. Д. Успенская, В. И. Ашкинази, В. С. Кропотов // Клиническая

лабораторная диагностика. Материалы XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России – 2014». Москва, 2014. – № 9. – С. 41.

16. Толкачева, Н. И. Аутоантитела при патологии кишечника у детей / Н. И. Толкачева, И. В. Маянская, В. И. Ашкинази, И. Д. Успенская, Е. А. Васильева, О. А. Тутина, Г. В. Медянцева, В. С. Кропотов // Клиническая лабораторная диагностика. Материалы XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России – 2014». Москва, 2014. – № 9. – С. 124.

17. Кропотов, В. С. Активность дермальных фибробластов у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / В. С. Кропотов, Е. А. Васильева, И. В. Маянская, Л. В. Коркоташвили, С. А. Колесов // Клиническая лабораторная диагностика. Материалы XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России – 2014». Москва, 2014. – № 9. – С. 123–124.

18. Ашкинази, В. И. Растворимые молекулы адгезии в патогенезе болезни Крона у детей / В. И. Ашкинази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Е. А. Васильева, В. С. Кропотов, О. А. Тутина, Е. В. Кулакова, О. В. Шумилова // Клиническая лабораторная диагностика. Материалы XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России – 2014». Москва, 2014. – № 9. – С. 122–123.

19. Маянская, И. В. Влияние продуктов дермальных фибробластов на реактивную хемилюминесценцию нейтрофилов / И. В. Маянская, Е. А. Васильева, Е. И. Руднева, В. И. Ашкинази, Н. И. Толкачева // 1-ый Национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва, 2013. С.169.

20. Кропотов, В. С. Белковый спектр, продуцируемый дермальными фибробластами у детей. / В. С. Кропотов, С. А. Колесов, Е. А. Васильева // 1-ый Национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва, 2013. С.136.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БК – болезнь Крона
- ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ЯК – язвенный колит
- ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение
- CD – кластер дифференцировки
- FAP – белок активации фибробластов
- FGFb – основной фактор роста фибробластов
- LPS – липополисахарид
- PDGF – тромбоцитарный фактор роста
- TGF – трансформирующий фактор роста

Соискатель

Е. А. Васильева