

*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, прaimировать 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; Haydout 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 БЗК среди детей (Benchimol E.I. et al., 2017). В западных странах заболеваемость БЗК 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 фибробlastы, 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 $\beta$ , IL-4, IL-15, INF $\gamma$ , CXCL-10, TNF $\alpha$ , 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., Ferara 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 фибробласти 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 стимулируемого индуктором воспаления липополисахаридом грамотрицательных бактерий секретома культивируемых фибробластов кожи в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника.

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

**Объект и предмет исследования** – фибробласти 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 потенциальному, поверхностным маркерам и молекулам секретома.

Впервые показано, что фибробласты кожи предплечья вовлечены в системный ответ на хроническое локальное воспаление в кишечнике, продуцируют провоспалительный секретом с повышенным содержанием IL-1 $\beta$ , FAP, PDGF-BB, фибронектина, но сниженным содержанием IL-10, FGFb и макромолекул коллагена IV типа, отсутствием изменений в секреции TGF $\beta$ 1, снижением соотношения IL-1RA/IL-1 $\beta$ .

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 фибробласти 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 секретома фибробластов кожи детей высказано предположение о том, что фибробласти 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 мембранны, 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**

Методологическая 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 культурируемыми 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 источников, 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.

Фибробlastы 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% CO<sub>2</sub> (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 μm (GE Osmonics, США) и аликовтировали 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 фибробласти на каждом пассаже засевали с плотностью 1,5x10<sup>4</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup> поверхности культурального флакона и культивировали до достижения культурой 90%-100% конфлюэнтности, клетки снимали с поверхности пластика методом трипсинизации. Подсчёт клеток проводили в камере Горяева.

**Иммунофенотипирование 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 (В-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 гибридизационно-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 тиогликоловую 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 секретома дермальных фибробластов и выявление маркеров воспаления в сыворотке крови.** Уровень цитокинов (интерлейкин 1,  $\beta$ -IL-1 $\beta$ , антагонист рецептора интерлейкина 1 – IL-1RA, интерлейкин 10 – IL-10), факторов роста (трансформирующий фактор роста – TGF $\beta$ 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 ChemiDoc<sup>TM</sup> 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  $\mu\text{m}$  (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 процентили). 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, Ме [25-й – 75-й процентили]**

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 фибробlastы детей с ВЗК обладали меньшей площадью, занимаемой клеткой на поверхности пластика, хотя известно, что фибробlastы 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**

Фибробласти 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).

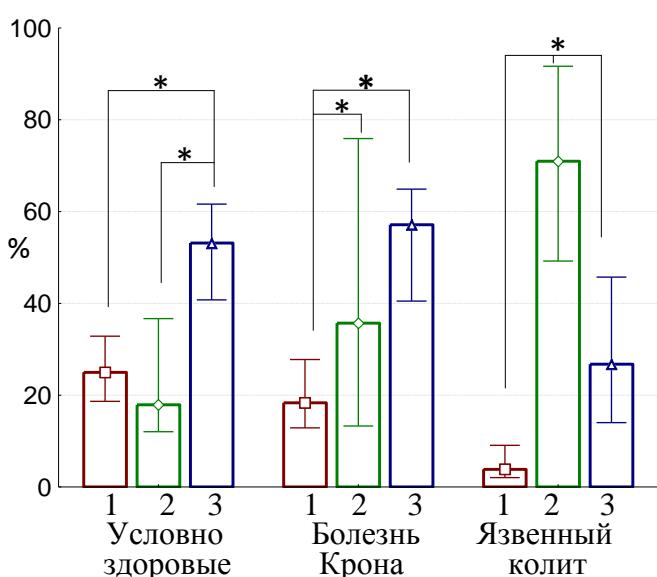


Рисунок 1. Распределение типов колоний, образованных дермальными фибробластами детей в культуре, Me [25-й – 75-й процентили]; 1 – плотные колонии; 2 – рыхлые колонии; 3 – смешанные колонии; \* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ , критерий Mann-Whitney)

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

ВЗК у детей вызывали снижение эффективности колониеобразования дермальных фибробластов в культуре на первом пассаже (рис. 2). С третьего пассажа разница в эффективности колониеобразования 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 фибробласти детей с БК (рис. 3).

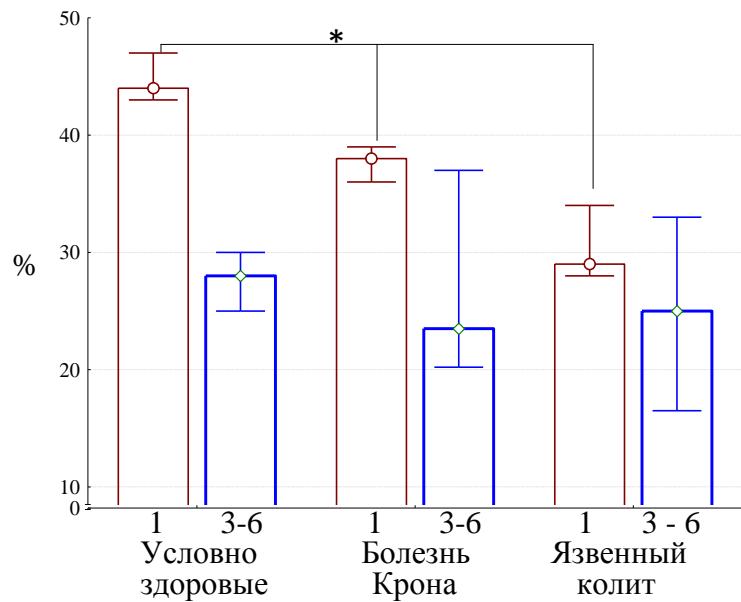


Рисунок 2. Эффективность образования колоний дермальными фибробластами в зависимости от пассажа, Ме [25-й – 75-й процентили]; 1, 3-6 – номер пассажа; \* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ , критерий Mann-Whitney)

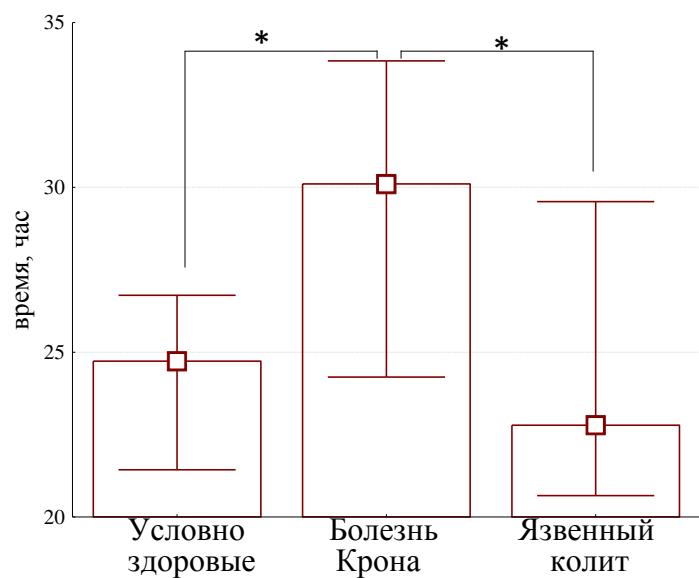


Рисунок 3. Время удвоения популяции дермальных фибробластов, Ме [25-й – 75-й процентили]; \* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ , критерий Mann-Whitney)

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-клusterов, 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 $\beta$ .** У детей с БК и ЯК наблюдалась гиперпродукция IL-1 $\beta$  на системном уровне и в супернатанте дермальных фибробластов по сравнению с условно здоровыми детьми (рис. 4). По данным литературы IL-1 $\beta$  является центральным эффектором воспалительного ответа и может быть причиной снижения общего объема 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 $\beta$  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 фибробlastы детей с ВЗК секretировали 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 $\beta$  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 $\beta$ .

**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.

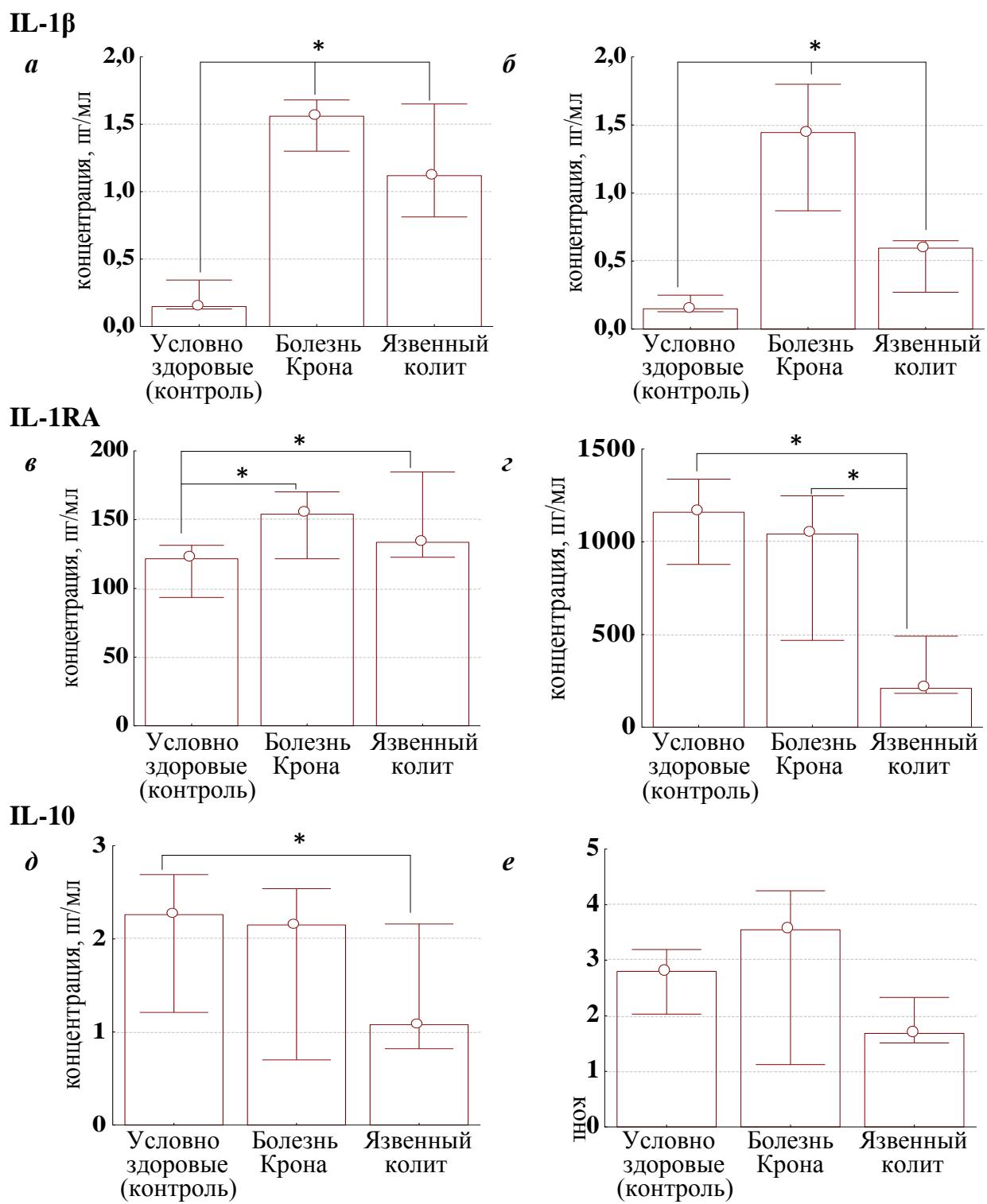


Рисунок 4. Содержание цитокинов, спонтанно секрецируемых дермальными фибробластами (а, в, д) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г, е), Мe [25-й – 75-й процентили]; \* – статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , критерий Mann-Whitney)

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 фибробласти 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 фибробласти 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 фиброзирования, 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 reparативной 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 reparативной регенерации в условиях хронического воспаления.

**TGF $\beta$ 1.** Статистически значимых различий в супернатанте дермальных фибробластов в содержании TGF $\beta$ 1 обнаружено не было (рис. 5ж), в то время как на системном уровне наблюдается значимое увеличение данного показателя у детей с ВЗК (рис. 5з).

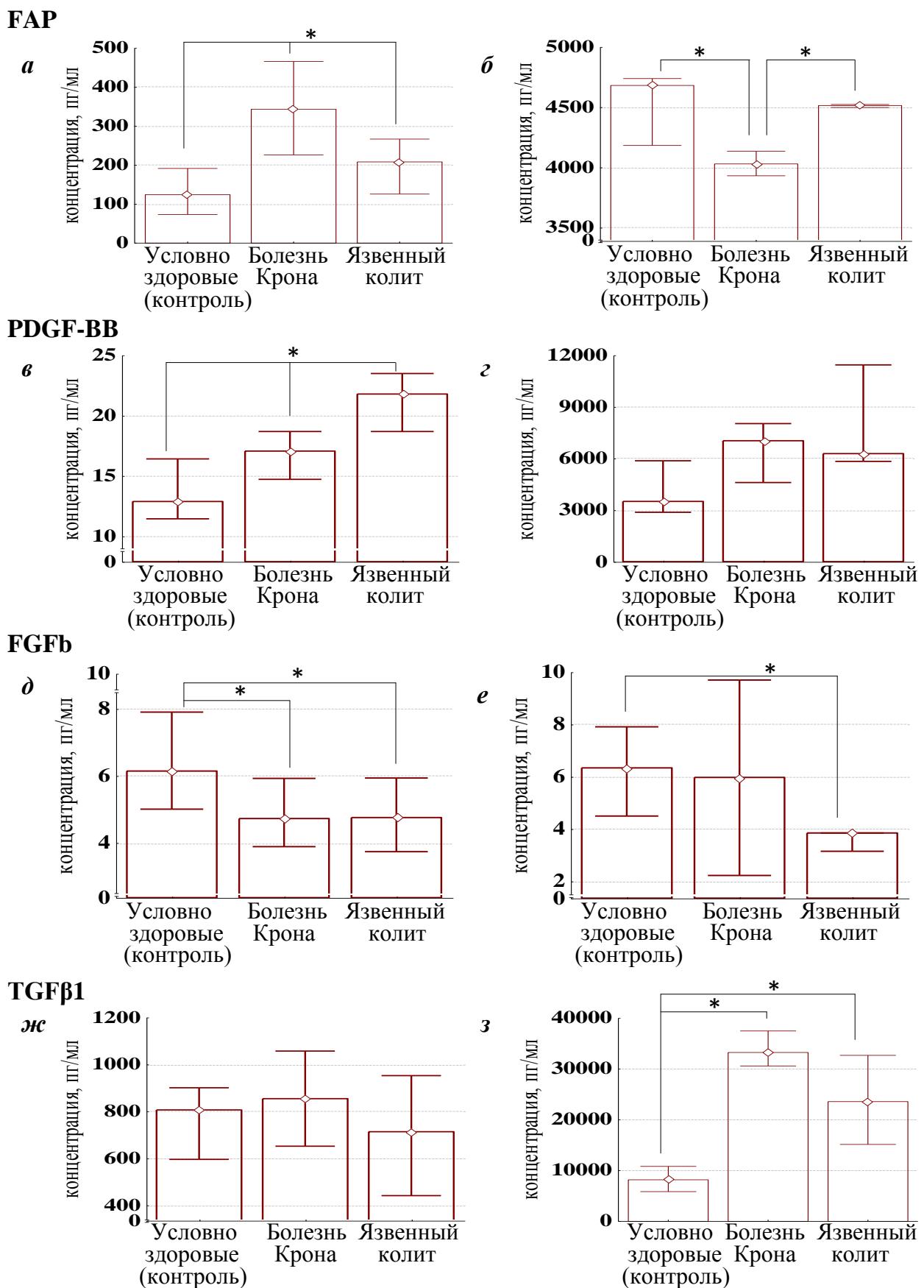


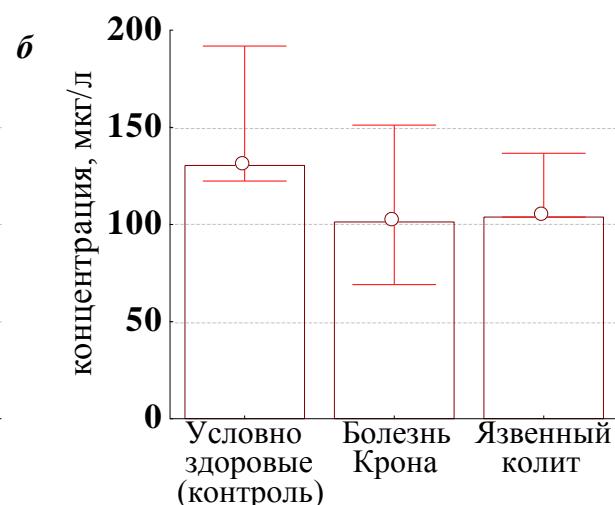
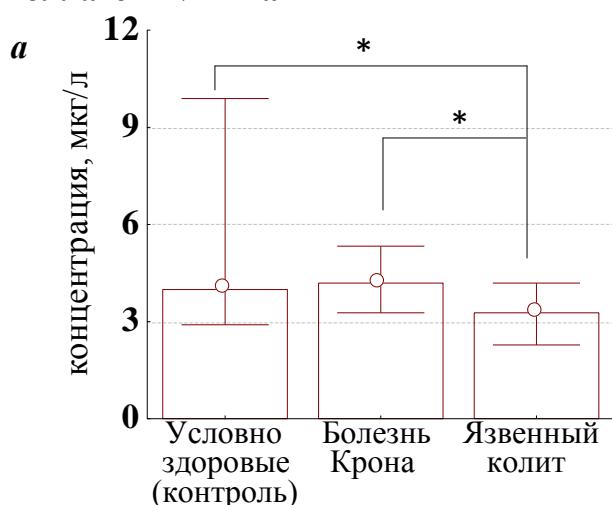
Рисунок 5. Факторы роста, секреируемые дермальными фибробластами (*а*, *в*, *д*, *ж*) и их содержание в сыворотке крови (*б*, *г*, *е*, *з*), Me [25-й – 75-й процентили]; \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ , критерий Mann-Whitney)

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**

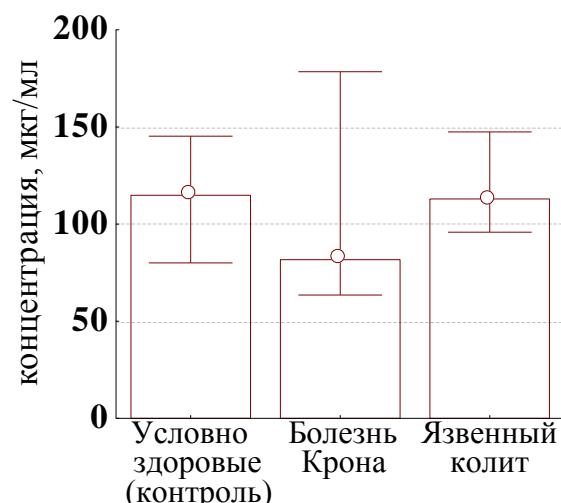
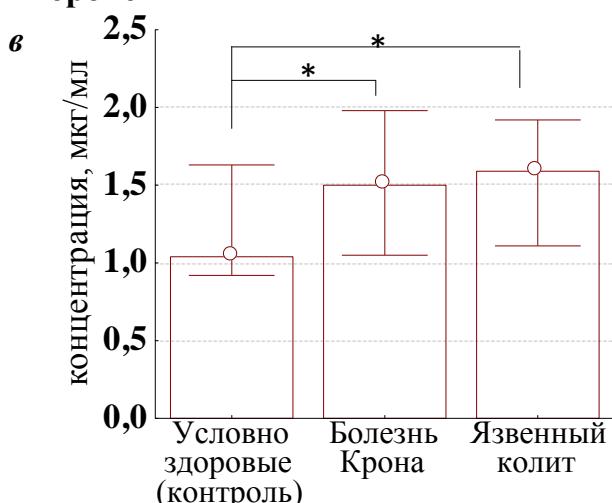


Рисунок 6. Компоненты внеклеточного матрикса, продуцируемые дермальными фибробластами (а, в) в сравнении с их содержанием в сыворотке крови (б, г), Мe [25-й – 75-й процентили]; \* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ , критерий Mann-Whitney)

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 мембранны 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, определяющую целостность базальной мембранны, структурность расположения и взаимодействия слоев кожи, но повышало продукцию фибронектина, участвующего в адгезии и миграции клеток.

### **Влияние различных сроков культивирования на стабильность секретома дермальных фибробластов**

При попарном сравнении концентрации исследуемых показателей (IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-10, TGF $\beta$ 1, FGFb, 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 секретома дермальных фибробластов здоровых детей и провоспалительного секретома детей с ВЗК в течение 6 пассажей.

### **Индуцированная 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 $\kappa$ 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.

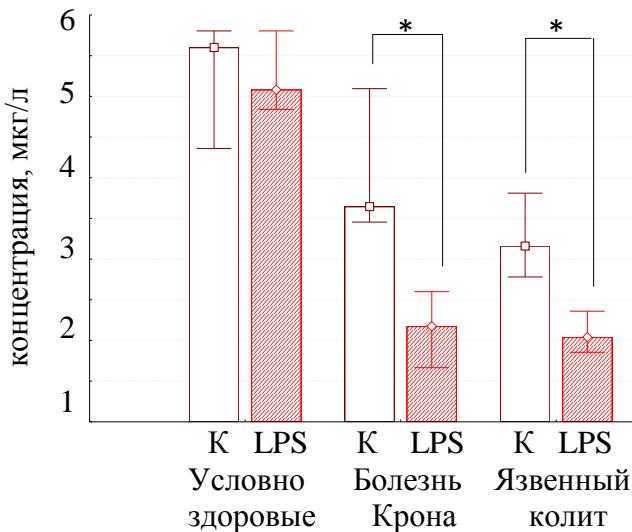


Рисунок 7. Влияние LPS *E. coli* O55:B5 на продукцию макромолекул коллагена IV типа дермальными фибробластами, Me [25-й – 75-й процентили]; К – контроль (без добавления LPS), LPS – с добавлением LPS; \* - статистически значимые различия,  $p<0,05$  (критерий Mann-Whitney)

## 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. Фибробlastы кожи детей с ВЗК характеризуются стабильно повышенной секрецией IL-1 $\beta$ , белка активации фибробластов, тромбоцитарного фактора роста, фибронектина, снижением количества основного фактора роста фибробластов, макромолекул коллагена IV типа, отсутствием изменений трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1. При культивировании они интенсивнее формируют рыхлые колонии, чем плотные. Изменение нормального секреторного фенотипа фибробластов кожи на провоспалительный у подростков с ВЗК имеет односторонний характер.

Дополнительное стимулирование фибробластов дермы (праймированных медиаторами хронического воспаления) липополисахаридом *Escherichia coli* серотип O55:B5 ингибирует образование

основного белка базальной мембранны – 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 моррофункциональных 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-клusterов, 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 мемbrane 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 $\beta$ , FAP, PDGF-BB, фибронектина, снижением соотношения IL-1RA/IL-1 $\beta$ , 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 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. Федурова, В. И. Ашкнази, В. С. Кропотов // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2015. – № 3. – С. 221–222.

3. Ашкнази, В. И. Растворимые молекулы адгезии в патогенезе болезни Крона у детей / В. И. Ашкнази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Н. Ю. Широкова, Э. Н. Федурова, 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. Ашкнази, В. С. Кропотов, Н. И. Толкачева, Е. И. Руднева, Э. Н. Федурова, 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. Ашкнази // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т. 12, № 6. – С. 120–122.

6. Ашкнази, В. И. Молекулы адгезии при деструктивно-воспалительном процессе в кишечнике у детей с язвенным колитом / В. И. Ашкнази, И. В. Маянская, Н. И. Толкачева, Э. Н. Федурова, 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. Дермальные фибробласти детей с воспалительными заболеваниями кишечника: цитокиновый профиль в системе *in vitro* / Е. А. Васильева // Материалы конференции «Ломоносов-2016». Москва, 2016.

10. Васильева, Е. А. Дермальные фибробласти 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 $\beta$  и факторов роста фибробластами детей с ВЗК / Е. А. Васильева, Н. И. Толкачева, О. А. Тутина, Е. А. Рожденкин // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17 (3с). – 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 reparative (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 ин витро 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. Ашкнази, 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. Ашкнази, В. И. Растворимые молекулы адгезии в патогенезе болезни Крона у детей / В. И. Ашкнази, 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. Ашкнази, 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**