

© Коллектив авторов, 2014

*Е.А. Васильева, И.В. Маянская, Н.И. Толкачева, Э.Н. Федулова,  
В.И. Ашкинази, В.С. Кропотов*

## СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

ФГБУ «Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии» МЗ РФ, г. Нижний Новгород, РФ

*Vasilyeva E.A., Mayanskaya I.V., Tolkacheva N.I., Fedulova E.N.,  
Ashkinazi V.I., Kropotov V.S.*

## SECRETORY ACTIVITY OF DERMAL FIBROBLASTS IN CHILDREN WITH CROHN'S DISEASE

Nizhny Novgorod Federal Research Institute of Pediatric Gastroenterology, Russia

Эффективное лечение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (БК), является одной из актуальных проблем детской гастроэнтерологии. БК характеризуется прогрессирующим течением с развитием осложнений в виде стенозов, свищей, перфорации кишечника, кровотечения и малигнизации. В настоящее время ее этиология окончательно не установлена, но предполагают, что важной причиной может быть неадекватная и продолжительная воспалительная реакция на комменсальную микрофлору, которая протекает на фоне дисрегуляции иммунных и неиммунных механизмов у генетически предрасположенных организмов.

У пациентов с БК важно учитывать функциональное состояние основных элементов соединительной ткани, участвующих в регенерации ткани – фибробластов. Они активно секретируют факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса, обладают сильнодействующим иммуномодулирующим эффектом. От функциональной активности фибробластов зависит способность ткани завершить воспалительный ответ, реконструировать внеклеточный матрикс.

Традиционная терапия ВЗК, направленная на элиминацию воспалительного процесса, не всегда оказывается эффективной и часто приводит к возникновению резистентности. Возникает необходимость поиска новых технологий, способствующих репарации ткани с восстановлением ее функциональности. В последнее время разрабатываются и применяются новые способы лечения с применением аллогенных и аутогенных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга у взрослых пациентов с ВЗК. Однако их использование в педиатрической практике осложняется травматичной процедурой их получения. В то же время показано, что иммуносупрессия является

общим свойством стромальных клеток. В связи с этим альтернативу МСК из костного мозга могут составить собственные дермальные фибробласты, что позволит избежать побочных реакций со стороны иммунной системы организма.

Целью исследования явилась оценка уровня секреторной активности дермальных фибробластов детей с БК.

В исследовании использованы дермальные фибробласты, полученные от 4 детей с БК и 4 здоровых детей (контрольная группа) в возрасте 12–16 лет. От всех участников и их родителей было получено письменное информированное согласие на предоставление биологического материала, исследование одобрено этическим комитетом и ученым советом института. Критериями включения пациентов были возраст и педиатрический индекс активности БК. Первичные культуры дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи предплечья по стандартной методике, пассировали до 6-го пассажа. Морфологически клетки культур здоровых детей и пациентов с БК имели фибробластоподобную форму. Жизнеспособность культур клеток составила  $\geq 97\%$ . Иммунофенотипирование фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII с помощью программного обеспечения FACSDiva 6.1.3 (Becton Dickinson, США). Результаты иммунофенотипирования свидетельствовали о наличии поверхностных CD-кластеров, характерных для МСК: CD90+, CD73+, CD105+, в то время как экспрессия маркеров гемопоэтических клеток – CD45–, CD34–, CD11b–, CD19–, HLA-DR – отсутствовала (BD Bioscience, США).

Для оценки функциональной активности дермальных фибробластов здоровых детей и детей с БК исследовали секрет, полученный в процессе культивирования

(1–6-й пассаж), с определением цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса методом ELISA с применением тест-систем Bender Medsystems (Австрия), R&S (США), Technoclone (Австрия), EKF diagnostics (Япония), Invitrogen (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Statistica 6.0. Различия в уровне признака выявляли по U-критерию Манна–Уитни; оценку корреляционных связей осуществляли методом Спирмена (R), при уровне значимости критерия  $p < 0,05$ .

При сравнении исследуемых показателей между 1–6-м пассажами фибробластов внутри контрольной группы и детей с БК в пределах нашей выборки статистически значимых различий выявлено не было. Исходя из полученных данных, значения показателей от 1–6-го пассажа были объединены и в дальнейшем при описании результатов использованы их средние значения.

В ходе исследования установлено статистически значимое увеличение уровня провоспалительного цитокина IL1 $\beta$  и его антагониста IL1RA в супернатантах фибробластов детей с БК по сравнению с контрольной группой, средние значения концентраций которых составили соответственно 1,6 пг/мл, 168,33 пг/мл и 0,59 пг/мл, 97,13 пг/мл ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ). Поскольку IL1 $\beta$  и IL1RA являются антагонистами и конкурируют между собой за связывание с одним и тем же клеточным рецептором, соотношение IL1RA/IL1 $\beta$  может оказывать влияние на исход воспалительного процесса. В ряде исследований показано, что баланс между IL1 $\beta$  и IL1RA играет важную роль в ограничении дальнейшего повреждения пораженных тканей. В наших исследованиях соотношение IL1RA/IL1 $\beta$  в супернатантах фибробластов составило  $105,69 \pm 14,34$  у пациентов с БК и  $169,05 \pm 14,88$  в контрольной группе ( $p = 0,001$ ). Снижение данного показателя может быть обусловлено гиперпродукцией IL1 $\beta$ : фибробласты пациентов с БК секретируют его в 2,7 раза интенсивнее относительно здоровых. В ходе культивирования фибробластов детей с БК отмечено, что к 6-му пассажу происходит повышение показателя соотношения цитокинов, достигающего уровня контрольной группы (174,3) вследствие увели-

чения продукции IL1RA, что следует рассматривать как баланс между конкурирующими цитокинами. Супернатанты фибробластов здоровых детей сохраняют подобный баланс на протяжении всего периода культивирования. Наши данные свидетельствуют о том, что физиологический уровень IL1 $\beta$ , секретируемый фибробластами здоровых детей, находится в прямой корреляционной зависимости с ростовыми факторами – TGF $\beta$ , EGF, G-CSF, FGFb ( $R = 0,62$ ,  $p = 0,0058$ ;  $R = 0,67$ ,  $p = 0,0023$ ;  $R = 0,57$ ,  $p = 0,013$ ;  $R = 0,63$ ,  $p = 0,039$  соответственно). Напротив, обратная корреляционная связь между IL1 $\beta$  и факторами роста выявлена для фибробластов детей с БК. Вероятно, гиперпродукция IL1 $\beta$  фибробластами пациентов с БК оказывает супрессивное действие, подавляя экспрессию EGF, G-CSF, VEGF ( $R = -0,52$ ,  $p = 0,008$ ;  $R = -0,42$ ,  $p = 0,04$ ;  $R = -0,44$ ,  $p = 0,028$  соответственно), нарушая баланс цитокиновой сети, что может приводить к изменению взаимодействий между клетками, снижению их пролиферативной активности.

Секреция фибронектина фибробластами детей с БК повышена, а коллагена IV типа уменьшена по сравнению с продукцией данных показателей исследуемых клеток здоровых ( $p = 0,009$ ;  $p = 0,0003$ ). Понижение уровня коллагена может быть связано с повышенной продукцией IL1 $\beta$ . Однако в процессе культивирования клеток было показано, что выработка коллагена IV типа фибробластами пациентов с БК повышается к 6-му пассажу, что, вероятно, связано с увеличением уровня IL1RA, который блокирует действие IL1 $\beta$ .

Таким образом, получены культуры дермальных фибробластов детей с БК и определена их секреторная активность. Выявлена повышенная продукция IL1 $\beta$ , IL1RA, TGF $\beta$ , фибронектина в супернатантах фибробластов больных БК по сравнению с аналогичными показателями фибробластов здоровых детей. Установлено снижение уровня коллагена IV типа и показателя соотношения IL1RA/IL1 $\beta$ , что, возможно, связано с гиперпродукцией IL1 $\beta$  и свидетельствует о нарушении баланса между данными показателями у дермальных фибробластов пациентов с БК. Полученные данные позволяют рассматривать фибробласты детей с БК в качестве кандидатов для клеточной терапии.

