

В.С. Кропотов, С.А. Колесов, Е.А. Васильева, И.В. Маянская, В.И. Ашкинази

Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии, Российская Федерация

Спектр белков, продуцируемый дермальными фибробластами, у детей с болезнью Крона

Contacts:

Kropotov Vasily Sergeevich, Candidate of Biological Science, Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Immunology and Cell Technologies of Nizhny Novgorod Research Institute of Pediatric Gastroenterology FSBI, MH RF

Address: 22 Semashko Str., Nizhny Novgorod 603095, Tel.: (831) 436-01-13, e-mail: niidg@bk.ru

Article received: 20.11.2013, Accepted for publication: 23.12.2013

Представлены данные по исследованию продукции дермальными фибробластами спектра протеинов у условно здоровых детей и детей с болезнью Крона в ходе последовательных пассажей. **Цель исследования:** установить особенности белкового спектра супернатантов, полученных при многократном культивировании фибробластов в норме и при патологии. **Пациенты и методы:** объектом исследования были супернатанты 4 культур фибробластов, полученные из биоптатов кожи двух условно здоровых детей и двух детей с болезнью Крона в возрасте 14–17 лет. Оценка белкового спектра проводилась на времяпролетном спектрометре Bruker Autoflex (США) методом масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF, фенотипирование — на проточном цитофлуориметре FACS Cantu II (США). **Результаты:** методами статистического анализа в протеограммах были выделены 5 кластеров распределения протеинов по молекулярной массе — от 0,8 до 3,3 кДа, от 3,3 до 6,00 кДа, от 6 до 11 кДа, от 11 до 16,6 кДа и более 16,6 кДа. При сравнении протеограмм больных и условно здоровых детей обнаружены различия. **Выводы:** установлены определенные особенности протеомного профиля, характерные для супернатантов культур фибробластов детей с болезнью Крона. Зарегистрированные показатели протеомного спектра секреторных компонентов культур фибробластов могут быть использованы для характеристики их активности на различных сроках культивирования.

Ключевые слова: дети, белковый спектр, фибробласты, болезнь Крона.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (6): 120–122)

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Крона — хроническое рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта неясной этиологии, характеризующееся трансмуральным сегментарным распространением воспалительного процесса с развитием местных и системных осложнений [1]. К настоящему времени в научной среде сформировался устойчивый интерес к роли фибробластов при этом заболевании. Фибробласты как «сторожевые клетки», «резидентные охранники» могут играть свою негативную роль, являясь проводниками и источниками сигналов, стимулирующих воспалительную реакцию [2, 3]. С другой стороны, обладая уникальным потенциалом к дифференцировке и являясь продуцентами спектра биологически активных

веществ, эти клетки могут и должны способствовать процессу выздоровления и длительной ремиссии [4].

Спектр веществ, продуцируемых фибробластами, достаточно широк; в табл. представлены лишь основные компоненты. Исходя из такого разнообразия продуцируемых веществ и роли фибробластов в воспалительных заболеваниях, представлялось интересным оценить белковый спектр дермальных фибробластов у условно здоровых детей и детей с болезнью Крона с помощью методов протеомного анализа. Указанный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, что характеризует исследуемый объект в целом. Предметом протеомных исследований являются

V.S. Kropotov, S.A. Kolesov, E.A. Vasil'eva, I.V. Mayanskaya, V.I. Ashkinazi

Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Pediatric Gastroenterology, Russian Federation

Protein Spectrum Produced by the Dermal Fibroblasts in Children with Crohn's Disease

The results of the study on production of the protein spectrum by the dermal fibroblasts in relatively healthy children and children with Crohn's disease during consecutive passages are shown in this article. **Aim:** to establish characteristics of protein spectrum of supernatants derived from the repeated cultivation of fibroblasts under normal and pathological conditions. **Patients and methods:** supernatants of 4 fibroblast cultures obtained from cutaneous tissue samples of 2 relatively healthy and 2 children with Crohn's diseases aged from 14 to 17 years old were examined. The assessment of protein spectrum was performed by time-of-flight mass spectrometry MALDI-TOF (Bruker Autoflex, USA); phenotyping was performed by flow cytometry assay (FACS Cantu II, USA). **Results:** 5 clusters of protein distribution according to the molecular weight were distinguished by the methods of statistical analysis: from 0,8 to 3,3 kDa, from 3,3 to 6,0 kDa, from 6,0 to 11,0 kDa, from 11,0 to 16,6 kDa and > 16,6 kDa. Proteinograms of patients with Crohn's disease and relatively healthy children differ from each other. **Conclusions:** certain special features of proteomic profile, characterizing supernatants of fibroblastic cultures of children with Crohn's disease were found. The established characteristics of proteomic spectrum of fibroblast secretory components can be used as marker of their activity at different stages of cultivation.

Key words: children, protein spectrum, fibroblasts, Crohn's disease.

(Voprosy sovremennoy pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (6): 120–122)

Таблица. Биологически активные компоненты, продуцируемые фибробластами [5]

Класс веществ	Основные представители
Коллаген	Коллагены типа I, III, IV, V, VI, VII
Гликопротеины	Фибронектин, фибриллин, тромбоспондин, ламинин, тенасцин
Гликозаминогликаны	Гиалуроновая кислота, гепарансульфат, хондроитинсульфат
Протеогликаны	Версикан, декорин
Белки, модифицирующие матрикс	Матриксные металлопротеиназы, тканевой ингибитор металлопротеиназ
Цитокины	ИЛ 1, 6, 10; ФНО α
Факторы роста	ТФР β , КСФ 1, ГМ-КСФ, PDGF, bFGF, IGF 1, 2, NGF, KGF, HGF, SCF, VEGF
Хемокины	ИЛ 8, MCP 1, GRO 1, MIP 1, 2, RANTES, ENA 78
Медиаторы воспаления	Фосфолипаза A ₂ , ПГ E ₂ , простагландин, HETE, PAF, NO

Примечание. ФНО α — фактор некроза опухоли α , ТФР β — трансформирующий фактор роста β , КСФ 1 — колониестимулирующий фактор, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, PDGF — фактор роста тромбоцитов, bFGF — основной фактор роста фибробластов, IGF 1, 2 — инсулиноподобный фактор роста 1, 2, NGF — фактор роста нервов, KGF — фактор роста кератиноцитов, HGF — фактор роста гепатоцитов, SCF — убиквитинлигаза, VEGF — фактор роста васкулярных эндотелиоцитов, MCP 1 — хемоаттрактантный протеин для моноцитов, GRO 1 — фактор, стимулирующий рост меланомы, MIP 1, 2 — макрофагальный воспалительный протеин, RANTES — хемокин, выделяемый Т клетками при активации, ENA 78 — активационный протеин эпителиальных нейтрофилов, ПГ E₂ — простагландин эпителиальных клеток, HETE — гидроксизикозатетраеновые кислоты, PAF — серин-треониновые протеинкиназы, NO — монооксид азота.

синтез, модификация, декомпозиция и замена белков исследуемого объекта. Развитие протеомики обусловлено использованием высокотехнологичных методов, позволяющих определить количество того или иного белка в образце, идентифицировать белок, его первичную структуру и посттрансляционные модификации [6].

В настоящее время перед протеомикой ставится глобальная задача идентификации всех белков организма. Однако, несмотря на успехи генетиков в расшифровке генома человека и наличие серьезной методической и технологической базы, эта задача вряд ли выполнима в ближайшем или даже отдаленном будущем. Более реален медицинский аспект проблемы — определение уникального протеомного профиля патологических состояний, установление корреляции между наличием определенного спектра белков и состоянием больного. Этот подход приносит ощутимые плоды уже сейчас [7].

В протеомном анализе точная идентификация белков не всегда возможна, и, что главное, не всегда необходима. Например, для биотипирования бактерий, превентивной диагностики некоторых заболеваний уже используют т. н. молекулярные сигнатуры или штрих-коды, не требующие идентификации каждого белка.

Понятие о молекулярной сигнатуре возникло относительно недавно в качестве альтернативного направления протеомного анализа и активно развивается [8, 9]. Сигнатура включает в себя набор качественно или количественно оцениваемых молекулярных параметров, например генетических полиморфизмов, уровня экспрессии транскриптов, белков, содержания липидов или других метаболитов, измерение которых обеспечивает высокую точность диагностики заболевания [10]. Для получения мультиплексного (многопараметрического) штрих-кода клинического образца могут использоваться различные методы. Если речь идет о протеомном (белковом) штрих-коде, то это в первую очередь иммунный анализ и масс-спектрометрия [9]. В литературе отсутствуют сведения о белковом спектре компонентов, секретируемых фибробластами в процессе многократного культивирования, у условно здоровых детей и детей с болезнью Крона.

Цель исследования: установить особенности белкового спектра супернатантов, полученных при многократном культивировании фибробластов в норме и при патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования

Объектом исследования были супернатанты 4 культур фибробластов, полученных из биоптатов кожи двух условно здоровых и двух детей с болезнью Крона в возрасте 14–17 лет. Диагноз ставили на основании комплексного обследования, включавшего в себя клинико-лабораторные данные, эндоскопическое исследование слизистой оболочки кишечника с морфологическим анализом биоптатов. Протокол обследования был одобрен Этическим комитетом. У всех детей и их родителей получено информированное согласие на участие в исследовании.

Методы исследования

Фибробласты культивировали до 5 пассажей в среде ДМЭМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиками (55 ед/мл пенициллина и 55 мкг/мл стрептомицина), дополненной L-глутамином (150 мг) в культуральных флаконах объемом 75 см² при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ согласно стандартному протоколу. Фенотип клеток определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Cantu II (Becton, Dickinson & Company, США) с помощью набора для идентификации мезенхимальных клеток Human MSC Analysis Kit (США). После каждого пассажа супернатанты отбирали и определяли белковый спектр. Масс-спектры (диапазон масс от 1000 до 17 000 Да) получены на масс-спектрометре MALDI MS Autoflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, США), работающем в положительном линейном режиме. Калибровка масс-спектрометра осуществлялась с помощью белковых стандартов (Peptide Calibration Standard и Protein Calibration Standard II, Bruker Daltonics, США).

По каждому спектру был получен масс-лист с указанием отношения массы к заряду (m/z) каждого пика, его площади и интенсивности (ClinProTools 2.1 Software, Bruker Daltonics, США). Эти данные экспортировали в таблицы MS Excel, и значения площадей в повторных измерениях усредняли.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США) с использованием метода К — средних МакКуина.

Рис. 1. Спектр протеинов, выделяемых фибробластами условно здоровых детей

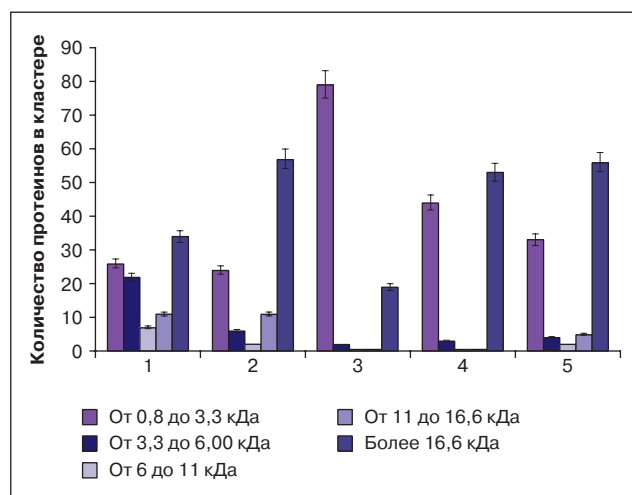
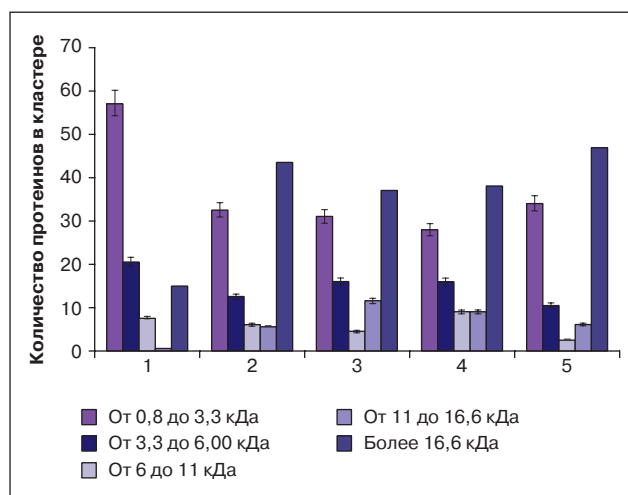


Рис. 2. Спектр протеинов, выделяемых фибробластами детей с болезнью Крона



РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам исследования супернатантов было выделено 5 групп пиков, различающихся по интенсивности сигнала, характеризующего белковый спектр. На основании данных статистического анализа выделили 5 кластеров распределения протеинов в зависимости от их молекулярной массы. Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2.

У больных детей протеиновый спектр отличался от такового у условно здоровых. В 1-м пассаже наиболее выделялась разница в кластерах от 0,8 до 3,3 кДа и более 16,6 кДа — более чем в 2 раза. Во 2-м пассаже: в кластерах от 3,3 до 6,00 кДа и от 11 до 16,6 кДа — в 2 раза; в кластере от 6 до 11 кДа — в 3 раза. В 3-м пассаже в кластере от 0,8 до 3,3 кДа различие составляло 2,6 раза, в кластере от 3,3 до 6,00 кДа — 8 раз, в кластере более 16,6 кДа — 1,94 раза. К 4-му пассажу разница была не столь существенна и сохраняла высокие значения только в кластере от 3,3 до 6,00 кДа (в 5 раз). К 5-му пассажу она была зарегистрирована только в кластере от 3,3 до 6,00 кДа (в 2 раза). Наблюдаемая повышенная активность дермальных фибробластов больных детей, вероятно, может быть объяснена тем, что болезнь Крона является системным заболеванием, затрагивающим многие органы [11].

Если рассматривать линейные зависимости от пассажа к пассажу, то в супернатантах и больных, и условно здоровых детей имеет место сходная тенденция снижения доли белковых фрагментов с молекулярной массой от 3,3 до 6,00 кДа. Кроме того, в супернатантах больных детей дополнительно происходило увеличение доли белковых фрагментов с массой от 11 до 16,6 кДа.

Полученные результаты позволяют говорить о некоторых особенностях протеомного профиля секреторных компонентов фибробластов у пациентов с болезнью Крона. Обнаруженный феномен представляет большой интерес и требует дальнейшего изучения. Мы полагаем, что такие исследования позволят получить новую информацию о значении белковых секреторных компонентов фибробластов в развитии патогенеза болезни Крона у детей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены определенные особенности протеомного профиля, характерные для супернатантов культур фибробластов у детей с болезнью Крона, по сравнению с аналогичными культурами клеток, полученными от здоровых детей.

Зарегистрированные показатели протеомного спектра секреторных компонентов культур фибробластов могут быть использованы для характеристики их активности на различных сроках культивирования.

REFERENCES

1. Belousova E.A. *Yazvenniy kolit i bolezнь Krona* [Ulcerative colitis and Crohn's disease]. Tver, Triada Publ., 2002. 128 p.
2. Bozo I.Ya., Deev R.V., Pinaev G.P. "Fibroblast" — spetsializirovannaya kletka ili funktsionalnoye sostoyaniye kletok mezenkhimalnogo proiskhozhdeniya [Fibroblast: A specialized cell or functional state of cells of mesenchymal origin]. *Tsitologiya — Cytology*. 2010; 2 (52): 99–109.
3. Mayanskaya I.V., Potekhin P.P., Ashkinazi V.I., Tolkacheva N.I., Goganova A.Yu. *Intestinalnye stromalnye kletki: identifikatsiya, proiskhozhdeniye, funktsii* [Intestinal stromal cells: Identification, origin and function]. *RMZh [RMJ]*. 2013; 2: 34–39.
4. Johnson L.A., Rodansky E.S., Sauder K.L., Horowitz J.C., Mih J.D., Tschumperlin D.J., Higgins P.D. Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts. *Inflamm. Bowel Dis*. 2013; 19 (5): 891–903.
5. Zorina A., Zorin V., Chekrasov V. Raznoobraznye fenotipov i fiziologicheskikh funktsiy, rol v starenii kozhi [A variety of phenotypes and physiological functions, and their role in skin aging]. *Esteticheskaya meditsina — Aesthetic Medicine*. 2010; XI (1): 15–31.
6. Zhukovskiy N.S. *Ispolzovaniye proteomnykh podkhodov dlya izucheniya gemopoeticheskikh stvolovykh kletok i ateroskleroticheskikh porazheniy aorty* [Using proteomic approaches for the study

- of hematopoietic stem cells and atherosclerotic lesions of the aorta]. *Avtoreferat-dissertatsiya doktora meditsinskikh nauk* [Autoabstract-thesis of Doctor of Medical Science]. Moscow, 2012. 36 p.
7. Archakov A.M. Postgenomnye tekhnologii i molekulyarnaya meditsina [Post-genomic technologies and molecular medicine]. *Vestnik RAN — Herald of the RAS*. 2004; 74 (5): 23–28.
8. Subramanian J., Simon R. Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use? *J. Natl. Cancer Inst.* 2010; 7 (102): 464–474.
9. Zimmer J.S., Monroe M.E., Qian W.J., Smith R.D. Advances in proteomics data analysis and display using an accurate mass and time tag approach. *Mass Spectrom. Rev.* 2006; 25 (3): 50–82.
10. Yurkovetsky Z., Skates S., Lomakin A., Nolen B., Pulsipher T., Modugno F., Marks J., Godwin A., Gorelik E., Jacobs I., Menon U., Lu K., Badgwell D., Bast R.C., Jr, Lokshin A.E. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 1 (28, 13): 2159–2166.
11. Yamashita H., Ueda Y., Kawaguchi H., Suzuki A., Takahashi Y., Kaneko H., Kano T., Mimori A. Systemic lupus erythematosus complicated by Crohn's disease: a case report and literature review. *BMC Gastroenterol.* 2012; 5 (12): 174.