

КРУПИН ВЯЧЕСЛАВ АНДРЕЕВИЧ

**РОЛЬ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК
В ПАТОГЕНЕЗЕ И РЕГЕНЕРАЦИИ
ПРИ ФИБРОЗЕ И ЭМФИЗЕМЕ ЛЁГКИХ**

(экспериментальное исследование)

3.3.3. Патологическая физиология

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
заслуженный деятель науки РФ

Дыгай Александр Михайлович

доктор медицинских наук, профессор

Скурихин Евгений Германович

Официальные оппоненты:

Кокорев Олег Викторович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Сибирский физико-технический институт имени академика В.Д. Кузнецова, Научно-исследовательский институт медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, лаборатория медицинских сплавов и имплантов с памятью формы, старший научный сотрудник

Рачина Светлана Александровна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра госпитальной терапии № 2, заведующий кафедрой

Чурина Елена Георгиевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург.

Защита состоится «___»_____ 2022 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», по адресу: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://www.tnimc.ru>

Автореферат разослан «___»_____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Минакова Мария Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последнее время огромное внимание уделяется заболеваниям лёгких, приводящим к инвалидизации населения. К таковым можно отнести идиопатический легочной фиброз (ИЛФ) и хроническую обструктивную болезнь лёгких (ХОБЛ). Идиопатический легочной фиброз является хроническим прогрессирующим заболеванием неизвестной этиологии. Прогноз ИЛФ в большинстве случаев неблагоприятный, состояние пациентов ухудшается быстрыми темпами. С момента постановки диагноза продолжительность жизни составляет от 2 до 4 лет [Raghu G. et al., 2018; Richeldi L. et al., 2020]. ХОБЛ характеризуется персистирующим ограничением воздушного потока, развитием обструктивного бронхита и эмфиземы лёгких [Ovali C. et al., 2018]. В 2015 году ХОБЛ затронула примерно 299 миллионов человек, что на 174 миллиона человек или 44% больше в сравнении с 1990 годом, а смертность от ХОБЛ составила более 3 миллионов человек во всем мире, что на 12% больше по сравнению с 1990 г. [Ruvuna L. et al., 2021]. В настоящее время ХОБЛ занимает 4 место в мире в структуре смертности населения. Предполагается, что к 2030 году ХОБЛ переместится на третье место [De Cunto G. et al., 2020].

Этиологические факторы ИЛФ и ХОБЛ во многом сходные: это генетические предрасположенности, курение, побочное действие лекарственных препаратов, воздействие на лёгкие пыли, которая в большом количестве образуется в воздухе при нынешних темпах урбанизации населения [Roche N. et al., 2016]. Существующий в практике набор лекарственных средств не приносит ожидаемого положительного результата – полного выздоровления или длительной ремиссии. При длительном применении эти препараты вызывают различные побочные эффекты, а хирургические методы лечения приводят к снижению качества жизни пациентов, к значительным ограничениям физической нагрузки и неустойчивости к инфекционным заболеваниям [Calverley P.M. et al., 2007].

В последние 10-15 лет огромное внимание уделяется терапии стволовыми клетками (СК) [Ahmadian-Moghadam H. et al., 2020; Biressi S. et al., 2020; Gauthier-Fisher A. et al., 2020; Götherström C. et al., 2020; Pixley J.S., 2020; Rehakova D. et al., 2020; Vasanthan J. et al. 2020; Yamanaka S., 2020; Watanabe Y. et al., 2021; Zeng X. et al., 2021]. Трансплантация гемопоэтических СК (ГСК) используется в настоящее время для лечения Т-клеточного лейкоза у взрослых, множественной миеломы, лимфомы и др. Также известны случаи лечения донорскими мезенхимальными СК (МСК) гастроинтерстициальных и нейродегенеративных заболеваний, инсультов и инфарктов, лейкозов, лимфом, реакции «трансплантат против хозяина», костных (хрящевых) заболеваний, диабета [Tounson A. et al., 2011]. Терапия с использованием МСК может рассматриваться как новый перспективный подход лечения хронических заболеваний лёгких, в том числе ИЛФ и ХОБЛ [Moodley Y. et al., 2009; Shukla M.N. et al., 2009; Huh J.W. et al., 2011; Guan X.J. et al., 2012; Gu W. et al., 2015].

Несмотря на тот огромный путь, который проделала клеточная терапия, до настоящего времени не совсем понятно, с какими из СК связаны её лечебные эффекты. Отдельно взятые клоны СК, составляющие одну популяцию, отличаются друг от друга по фенотипу, экспрессии генов, пролиферативной активности и способности к дифференцировке [Muraglia A. et al., 2000; Tremain N. et al., 2001]. Кроме лечебных эффектов клеточная терапия СК повышает риск развития аллергических реакций, бактериальных, вирусных и грибковых инфекционных заболеваний [Benjamin D.K. et al., 2002; Engelhard D. et al., 2002]. В клинической практике для клеточной терапии применяются прекультивированные моноклеары. Эти манипуляции

приводят к изменению фенотипа и функций стволовых клеток [Banfi A. et al., 2000; Banfi A. et al., 2002], в том числе, к приобретению неопластических свойств [Lalu M.M. et al., 2012]. После проведения клеточной терапии выделенные из костного мозга пациентов МСК доноров демонстрируют черты частичного или полного химеризма [Lee S.T. et al., 2002; Le Blanc K. et al., 2007]. Имеются данные об иммуномодулирующих свойствах МСК: в зависимости от ситуации одна популяция может демонстрировать провоспалительную и противовоспалительную активности [Tse W.T. et al., 2003]. Общеизвестно, что время жизни СК донора в организме пациента ограничен часами. Как известно, процессы регенерации требуют значительного времени. В этой связи, трудно ожидать от клеточной терапии существенного ускорения регенерации повреждённых и утраченных клеток. В этой связи, иммуномодулирующие и другие кратковременные эффекты клеточной терапии можно объяснить исключительно паракринной активностью клеток [Kang S.K. et al., 2012].

Альтернативой клеточной терапии может оказаться фармакологическая регуляция костномозговых и регионарных СК, как потенциально более безопасный подход лечения с целевой направленностью на регенерацию клеток и тканей. Между тем, на сегодняшний день роль СК различных органов и тканей в патогенезе заболеваний, в том числе хронических заболеваний лёгких, и процессах регенерации остается мало изученной. Это серьезно затрудняет разработку тактики медикаментозного лечения ИЛФ и ХОБЛ с использованием СК. Не решён вопрос с подходами фармакологической регуляции СК. Известна регуляция СК хемокинами и ростовыми факторами, которая продемонстрирована *in vitro*. Однако при трансляции результатов *in vivo* ожидаемых положительных эффектов в большинстве своем не наблюдается.

В легочной ткани существуют островки нейроэндокринных клеток, секретирующие биогенные амины и пептиды. В норме и при патологии эти биологически активные молекулы оказывают регуляторное влияние на эпителиоциты [Reynolds S.D. et al., 2000]. Легочная ткань также богата дофаминовыми рецепторами [Amenta F. et al., 2002]. Так, рецепторы к дофамину обнаружены в легочной артерии человека [Ricci A. et al., 2006], на альвеоцитах II типа [Helms M.N. et al., 2006], на мезенхимальных и эндотелиальных прогениторных клетках [Home S. et al., 2012; Mirones I. et al., 2014]. Общеизвестно, что развитие эмфиземы лёгких сопровождается разрывом межалвеолярных перегородок, разрушением альвеолярных ацинусов, в области эмфизематозно расширенных участков количество сосудов микроциркуляторного русла значительно уменьшается, что закономерно приводит к нарушению кровоснабжения альвеол [Washko G.R., 2012]. Ряд авторов объясняют угнетение ангиогенеза в лёгких «дофаминовой» концепцией [Vohra P.K. et al., 2012; Hoeppner L. et al., 2015]. Предполагается, что дофаминовые рецепторы, расположенные на мембране эндотелиальных клеток и связанные с рецепторами к VEGF (англ. vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов), при активации дофамином нарушают ответ клеток эндотелия на стимуляцию VEGF.

Фиброзные заболевания лёгких имеют в своей основе серотониновую составляющую. Продукция серотонина тромбоцитами и тучными клетками может локально сужать просвет легочной артерии после травмы [MacLean M.R. et al., 2010]. Вместе с тромбоцитами и тучными клетками серотонин секретируют и нейроэндокринные клетки лёгких [Johnson D.E. et al., 1989]. Серотонин вызывает бронхоспазм и стимулирует гиперплазию в клетках гладких мышц и миофибробластах. Данный эффект серотонина вызывает склеротическое ремоделирование в легочных сосудах и дыхательных путях. У пациентов с ИЛФ также наблюдается повышенная экспрессия 5-HT_{2A} рецепторов на фибробластах и 5-HT_{2B} рецепторов на эпителиальных клетках

в лёгких. В исследованиях, проведенных *in vitro*, серотонин оказывал митогенное и профибротическое воздействие на некоторые клоны мезенхимальных клеток. В частности, в культуре легочных артерий крыс при гипоксии серотонин увеличивал пролиферацию фибробластов и миофибробластов [Welsh D.J. et al., 2004]. Исходя из этого, нами выдвинуто предположение о существовании дофаминовых и серотониновых механизмов регуляции регенерации легочной ткани с участием стволовых и прогениторных клеток. Использование антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов может оказаться перспективным подходом лечения ХОБЛ и ИЛФ.

Принимая во внимание вышеизложенное, несомненный интерес представляет изучение механизмов регуляции стволовых и прогениторных клеток различных классов при фиброзе и эмфиземе лёгких, а также поиск новых подходов их фармакологической регуляции для коррекции нарушений и ускорения регенерации утраченных и повреждённых клеток лёгких.

Степень разработанности проблемы. По данным Всемирной организации здравоохранения лекарственная терапия ИЛФ ограничена, неэффективна и направлена в основном на лечение осложнений. Новые препараты для лечения ИЛФ (пирфенидон и нинтеданиб) не проявили ожидаемой высокой противофибротической активности и способны замедлить, но не остановить прогрессирование заболевания [Sgalla G. et al., 2020]. При длительном применении этих препаратов у пациентов с ИЛФ наблюдаются побочные эффекты [Gulati S. et al., 2020; Richeldi L. et al. 2020]. Отсутствие эффективного и недорогого фармакологического лечения характерно и для ХОБЛ. Основными рекомендациями для таких пациентов остаются отказ от курения и прием лекарственных средств, которые лишь облегчают течение болезни, но их применение не восстанавливает повреждения и функцию лёгких. Разработанные в эксперименте (прежде всего в условиях *in vitro*) другие подходы для лечения ИЛФ и ХОБЛ интересны и объяснимы для применения с патогенетической точки зрения: использование иммунорегуляторных цитокинов [Hisatomi K. et al., 2012], клеточная терапия МСК [Glassberg M.K. et al., 2017]. Однако в условиях целостного организма и в клинической практике результат их применения не оправдывает ожиданий [Averyanov A. et al., 2020]. Проведение такого тяжелого для больного лечебного мероприятия, как трансплантация лёгких сдерживается прежде всего отсутствием необходимого донорского материала [Togel F. et al., 2011]. Таким образом, поиск новых эффективных, нетоксичных и малозатратных подходов лечения ИЛФ и ХОБЛ жизненно необходим. Прогресс в лечении этих хронических заболеваний лёгких нам видится в фармакологической регуляции стволовых и прогениторных клеток.

Цель исследования

Выявить роль стволовых и прогениторных клеток при фиброзе и эмфиземе лёгких. Дать патогенетическое обоснование использования антагонистов серотониновых и дофаминовых рецепторов для ускорения регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия.

Задачи исследования

1. Изучить закономерности формирования изменений мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных стволовых и прогениторных клеток, и их роль в фиброзе и регенерации лёгких в условиях введения блеомицина.
2. Исследовать роль мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных стволовых и прогениторных клеток в воспалении, формировании эмфизематозных нарушений и регенерации

лёгких при введении эластазы, ЛПС и экстракта табачного дыма, эластазы и D-галактозамин гидрохлорида.

3. Изучить особенности реакций Notch1⁺ стволовых и прогениторных клеток при моделировании фиброза и эмфиземы лёгких.

4. В условиях введения эластазы, ЛПС и экстракта табачного дыма, эластазы и D-галактозамин гидрохлорида исследовать возможность коррекции антагонистом D₂-дофаминовых рецепторов спипероном воспаления и эмфиземы лёгких.

5. Изучить возможность коррекции спипероном воспаления и фибротических изменений в лёгких в условиях введения блеомицина.

6. Исследовать возможность коррекции антагонистом C₂-серотониновых рецепторов кетансерином воспаления и фибротических изменений в лёгких, индуцированных блеомицином.

7. В условиях введения эластазы, ЛПС и экстракта табачного дыма, эластазы и D-галактозамин гидрохлорида изучить возможность коррекции кетансерином воспаления и эмфиземы лёгких.

8. На моделях фиброза и эмфиземы лёгких оценить регенераторную активность спиперона и кетансерина, а также механизмы, лежащие в её основе.

Научная новизна работы. Впервые в сравнительном аспекте показана роль костномозговых, циркулирующих в крови и резидентных (лёгкие) мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных стволовых и прогениторных клеток в развитии типовых патологических процессов и регенерации внеклеточного матрикса, альвеолярного эндотелия и эпителия при экспериментальном фиброзе и эмфиземе лёгких. Представлены данные, демонстрирующие участие Notch1-сигнального пути, дофаминовой и серотониновой систем в регуляции стволовых и прогениторных клеток при экспериментальной патологии лёгких.

На моделях эмфиземы лёгких и фиброза лёгких показана неспецифическая стимуляция различных популяций мезенхимальных клеток предшественников с профибротической активностью. В развитии блеомицин-индуцированного фиброза лёгких участвуют прогениторные фибробластные клетки и МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), а также эпителиальные прогениторные клетки (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺), продуцирующие TGF-1 β . Профибротическая активность МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) и фибробластных прогениторных клеток (CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD90⁺) в случае введения эластазы, МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) под влиянием эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, миелоидных фиброцитов (CD31⁻CD34⁺CD45⁺Nectin2⁺) при введении ЛПС и экстракта табачного дыма направлена на восстановление поврежденного коллагенового и эластинового каркаса лёгких.

Показано, что независимо от модели патологии лёгких гуморальные факторы воспаления (в частности ФНО- α , ИЛ-1 β) снижают активность рекрутируемых в лёгкие и резидентных стволовых клеток эндотелия и эпителия.

Продемонстрирована ведущая роль микрососудистого русла в регенерации легочной ткани при экспериментальном фиброзе и эмфиземе лёгких. Так, значительное повреждение системы эндотелия лёгких (блеомицин, эластаза) влечет за собой нарушение миграции клеток глубокого резерва регенерации из костного мозга и крови в лёгкие. В этом случае восстановление альвеолярного эпителия и эндотелия происходит за счет регионарных стволовых и прогениторных клеток. При сохранении большей части микрососудистого русла (введение эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, ЛПС и экстракта табачного дыма)

дополнительно к регионарным незрелым клеткам в поврежденную ткань мигрируют костномозговые и циркулирующие в крови стволовые и прогениторные клетки.

Подтверждена гипотеза о различной реакции стволовых и прогениторных клеток, экспрессирующих Notch1, на моделирование фиброза и эмфиземы лёгких. При эмфиземе лёгких увеличивается содержание Notch1⁺ клеток в популяциях резидентных VEGF⁺ эндотелиальных клеток, предшественников ангиогенеза, эндотелиальных прогениторных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺), мезенхимальных клеток предшественников и эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺), при этом возрастает уровень экспрессии Notch1 на клетках. Для фиброза лёгких характерна противоположная реакция Notch1 рецепторов стволовых и прогениторных клеток.

На моделях эмфиземы лёгких антагонист D₂-дофаминовых рецепторов спиперон оказывает противовоспалительное и противоэмфизематозное действие, стимулирует регенерацию альвеолярного эпителия и эндотелия. В основе регенераторного эффекта спиперона лежит активация резидентных эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺) и мигрирующих из костного мозга и крови в лёгкие эндотелиальных прогениторных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺), VEGF⁺ эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза, в том числе экспрессирующих Notch1. При разрушении микрососудистой сети эластазой в регенерацию вовлекаются резидентные стволовые и прогениторные клетки.

Фармакологическая блокада D₂-дофаминовых рецепторов спипероном снижает индуцируемую дофамином пролиферативную активность CD31⁺CD34⁺CD146⁺Nectin2⁺ эндотелиальных прогениторных клеток в культуре CD31⁺ клеток, выделенных из лёгких мышей в условиях введения ЛПС и экстракта табачного дыма.

При фиброзе лёгких фармакологическая блокада C₂-серотониновых рецепторов кетансерином уменьшает секрецию медиаторов воспаления и фиброза, снижает функциональную активность рекрутируемых в лёгкие костномозговых МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) и прогениторных фибробластных клеток, понижает концентрацию гиалуроновой кислоты в лёгких, что приводит к угнетению активности воспаления и сокращению площади соединительной ткани в лёгких, и, как следствие, к ускорению регенерации эпителия и эндотелия.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание закономерностей формирования специфической для фиброза и эмфиземы лёгких программы регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия с участием костномозговых, циркулирующих в крови и резидентных стволовых и прогениторных клеток эндотелия и эпителия. Показана важная роль различных популяций мезенхимальных клеток предшественников в фибропластическом процессе при разрушении альвеолярного эпителия блеомицином, внеклеточного матрикса эластазой, моделировании дефицита альфа1-антитрипсина D-галактозамин гидрохлоридом и в условиях хронического токсического действия экстракта табачного дыма на эпителий.

Продемонстрирована необходимость использования циркулирующих в крови стволовых и прогениторных клеток, в том числе экспрессирующих Notch1, а также вспомогательных клеток эндотелиогенеза (сосудистых клеток просвета зарождающегося сосуда, перицитов, гладкомышечных клеток) в качестве диагностических биомаркеров фиброза, разрушения эндотелия и эпителия в лёгких, и биомаркеров эффективности проводимого лечения (регенерация).

Результаты исследования позволили предложить новые подходы фармакологической коррекции фибропластического процесса и воспаления, ускорения регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия при экспериментальных заболеваниях лёгких. Так, введением антагониста D₂-дофаминовых рецепторов спиперона достигается усиление регенерации эндотелия лёгких в условиях эмфиземы лёгких, при этом биомишёнью выступают эндотелиальные прогениторные клетки (CD45⁻CD31⁺CD34⁺). При блокаде С₂-серотониновых рецепторов кетансерином снижается активность пролиферации и дифференцировки профибротических МСК и фибробластных прогениторных клеток.

Высокая практическая значимость диссертационной работы подтверждается результатами интеллектуальной деятельности: патент RU № 2479312; патент RU № 2497523; патент RU № 2554843; патент RU № 2530651; патент RU № 2714679, патент RU № 2740378.

Методология и методы исследования. Настоящая диссертация является экспериментальным исследованием. В соответствии с поставленными задачами были выбраны современные высокоинформативные методы и технические решения с использованием оборудования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН.

В НИР использовали мышей линии C57BL/6 обоего пола. Различными по механизму действия повреждающими агентами (блеомицин, эластаза, экстракт табачного дыма, D-галактозамин гидрохлорид) моделировали фиброз лёгких или эмфизему лёгких. Объектом исследования выступали костномозговые, циркулирующие в крови и резидентные (лёгкие) стволовые и прогениторные клетки, блокатор D₂-дофаминовых рецепторов спиперон, блокатор С₂-серотониновых рецепторов кетансерин.

В исследовании использовались морфологические и иммуногистохимические методики для оценки воспаления и повреждения лёгких, эмфиземы и площади соединительной ткани в легочной ткани, клеточной и тканевой регенерации. Иммуноферментным анализом определяли уровни медиаторов воспаления и противовоспалительных цитокинов, а также молекул фибропластического процесса в биологических пробах. Метод проточной цитофлуориметрии позволил определить иммунофенотип клеток и содержание стволовых и прогениторных клеток эндотелиальной, эпителиальной и мезенхимальной природы в костном мозге, крови и лёгких, а также представительство Notch1⁺ клеток в общей популяции СК.

Культуральными методами с использованием магнитной сепарации и проточной цитофлуориметрии из общей фракции моноклеаров изолировали необходимые стволовые и прогениторные клетки, получали первичные культуры клеток и оценивали их функциональную активность (клональная активность, пролиферация, потенциал к самообновлению, дифференцировка).

На моделях фиброза лёгких и эмфиземы лёгких исследованы эффекты и механизмы действия (в том числе связанные со стволовыми и прогениторными клетками) кетансерина и спиперона. Результаты исследования обработаны методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. При индуцированном блеомицином фиброзе лёгких мигрирующие из костного мозга в лёгкие прогениторные фибробластные клетки и резидентные МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) секретируют профибротические и провоспалительные медиаторы (TGF-1 β , ФНО- α), формируют профибротический гиалуроновый матрикс и дифференцируются в продуцирующие коллаген фибробласты. В основе профибротической активности резидентных

эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) лежит секреция ФНО- α .

2. На различных моделях эмфиземы лёгких показана неспецифическая активация МСК ($CD45^-CD31^-CD34^-CD73^+CD90^+$), фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов миелоидного происхождения ($CD31^-CD34^+CD45^+$ Nectin2 $^+$). В зависимости от выраженности эмфиземы в восстановлении коллагенового и эластинового матрикса лёгких участвуют отдельные мезенхимальные предшественники (введение ЛПС и экстракта табачного дыма) или весь резерв регенерации (введение эластазы, эластазы и D-галактозамин гидрохлорида).

3. При фиброзе лёгких воспаление (в частности ФНО- α и ИЛ-1 β) выступает фактором, ингибирующим функциональную активность мигрирующих в лёгкие костномозговых эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$; $CD45^-CD31^+CD34^+CD73^-CD90^-$) и предшественников ангиогенеза, а также стволовых клеток лёгких.

4. Причиной низкой активности регенерации эндотелия в условиях введения эластазы выступает нарушение миграции костномозговых и циркулирующих в крови эндотелиальных прогениторных клеток, предшественников ангиогенеза и VEGF $^+$ эндотелиальных клеток в лёгкие, обусловленное разрушением микроциркуляторного русла. В случае сохранения целостности большей части микроциркуляторного русла (введение эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, ЛПС и экстракта табачного дыма) факторы воспаления (ФНО- α , ИЛ-1 β) снижают активность рекрутируемых в лёгкие СК эндотелия, в том числе их взаимодействие с перицитами, клетками просвета зарождающего сосуда и сосудистыми гладкомышечными клетками.

5. При эмфиземе лёгких, индуцированной эластазой, ингибция резидентных мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток выступает основой нарушения регенерации альвеолярного эпителия. В условиях введения эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, или сочетания ЛПС и экстракта табачного дыма реализуется программа патологической регенерации эпителия: при системном дефиците альфа1-антитрипсина в процесс вовлечены СК лёгких, эпителиальные прогениторные клетки ($CD45^-TER119^-CD49f^+$; $CD45^-TER119^-CD49f^+CD326^+$) и мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки, при хроническом токсическом действии смол и никотина – эпителиальные прогениторные клетки ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$; $CD45^-TER119^-CD49f^+CD326^+$; $CD326^+CD45^-CD49f^+$).

6. Резидентные мезенхимальные, эндотелиальные и эпителиальные Notch1 $^+$ стволовые и прогениторные клетки участвуют в развитии экспериментального фиброза и эмфиземы лёгких. Если на моделях эмфиземы лёгких содержание Notch1 $^+$ клеток увеличивается и при этом возрастает уровень экспрессии Notch1, то при фиброзе лёгких число Notch1 $^+$ клеток в общей фракции стволовых и прогениторных клеток уменьшается.

7. На моделях эмфиземы лёгких продемонстрированы уменьшение площади эмфиземы, противовоспалительный и регенераторный эффекты спиперона. Ускорение регенерации альвеол антагонистом D₂-дофаминовых рецепторов находится в зависимости от целостности микрососудистого русла, мобилизации и миграции эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$), VEGF $^+$ эндотелиальных клеток, предшественников ангиогенеза.

8. При введении блеомицина блокада D₂-дофаминовых рецепторов препятствует развитию воспаления и фиброза, увеличивает количество эндотелиальных и эпителиальных клеток в лёгких. Регенераторный эффект спиперона обусловлен миграцией костномозговых эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$) в лёгкие и стимуляцией резидентных эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-Ter119^-CD49f^+$), противфибротический эффект – снижением активности мезенхимальных клеток.

9. При введении блеомицина кетансерин нарушает серотониновый механизм секреции медиаторов воспаления и фиброза, дифференцировку МСК (CD45⁺CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) и прогениторных фибробластных клеток в клетки мезенхимального ряда, формирование гиалуронового матрикса, что приводит к уменьшению активности воспаления и площади соединительной ткани в лёгких, ускорению регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов диссертационного исследования подтверждается значительным количеством экспериментальных исследований, использованием оригинальных современных методов и технологических решений для исследования стволовых и прогениторных клеток, высокотехнологичного оборудования и адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на II Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины: возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2012), IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (Dalian, 2013), 5th International Conference on Drug Discovery & Therapy (Dubai, 2013), 1-м национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013), 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2014 (Haikou, 2014), международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014), 1st Annual Translational Medicine Partnership Summit-2014 (Dalian, 2014), 8th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2015 (Busan, 2015), международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2015), II международном симпозиуме «Век регенеративной медицины» (Ставрополь, 2015), 8th World of regenerative Medicine and Stem Cell (Shanghai, 2015), II национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015), XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2017), II всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018), XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2018), Восьмой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2018), Всероссийской научной конференции "Патофизиология и фармакология системы крови", посвященная 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск, 2019).

По теме диссертации опубликовано 40 работ, из них 13 статей в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов кандидатских и докторских диссертаций, в том числе 12 – в изданиях, входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science, а также 2 монографии. Получено 6 патентов (RU) на изобретение.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в изучении разработанности проблемы и анализе литературы по обозначенной теме; разработке концепции диссертации; планировании, организации и выполнении экспериментальных

исследований; в получении, статистической обработке, анализе и интерпретации полученных результатов исследования; в подготовке публикаций (монографии, статьи) в зарубежных и отечественных изданиях, а также в выступлениях с докладами на конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 426 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 рисунками, 87 таблицами и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, включающего 1058 источника, из них 40 отечественных и 1018 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы, посвященной эпидемиологии, этиологии и патогенезу идиопатического легочного фиброза (ИЛФ) и хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ). Рассмотрены основные подходы к лечению этих заболеваний: медикаментозное, хирургическое, клеточная терапия. Представлены общие сведения о стволовых клетках, их функциях и роли в регенерации, в том числе при ИЛФ и ХОБЛ. Обсуждены Notch1 сигнальный путь и возможность его участия в легочной патологии. Проанализированы эффекты и механизм действия серотонина, возможность участия амина в воспалении и фиброзе лёгких. Рассмотрен дофамин и его роль в регуляции сосудистого гомеостаза. Представлена краткая характеристика кетансерина и спиперона.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. Экспериментальная часть работы выполнена на 800 мышах линии C57BL/6 в возрасте 8-10 недель. Животные 1 категории (конвенциональные линейные мыши) получены из питомника НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (ветеринарный сертификат имеется). Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ.

При проведении исследований фиброз лёгких моделировали однократным интратрахеальным введением блеомицина в дозе 80 мкг/мышь в 30 мкл NaCl 0,9% («Блеоцин», «Nippon Kayaku Co», Япония) [Ortiz L.A. et al., 2003; Degryse A.L. et al., 2011]. Эмфизему лёгких вызывали эластазой («Elastase from porcine pancreas», «Sigma», США), экстракт табачного дыма (ЭТД) (получали из сигарет марки L&M RED LABEL 2 сигареты на/мл (состав 1 сигареты: смола 10 мг/сиг, никотин 0,8 мг/сиг, СО 10 мг/сиг)) или D-галактозамин гидрохлоридом (ДГГ) («D-(+)-Galactosamine hydrochloride», «Sigma», США). Эластазу вводили однократно интратрахеально в дозе 0,6 Ед/мышь в 30 мкл NaCl 0,9% [Kim Y.S. et al., 2014]. Для индукции воспаления мышам вводили интраназально курсом липополисахарид (ЛПС) в дозе 3 мкг/мышь в 50 мкл NaCl 0,9% на 0 и 3 сутки эксперимента ЭТД вводили 50 мкл ЭТД на 1, 4, 7, 10, 13 и 16 сутки эксперимента [Chen Y. et al., 2009; Hanaoka M. et al., 2011]. ДГГ вводили интраперитонеально курсом в дозе 100 мг/кг в 100 мкл NaCl 0,9% по следующей схеме: 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 часов от начала эксперимента, на 24 ч одновременно с ДГГ интраназально вводили свиную панкреатическую эластазу в дозе 0,3 Ед/мышь в 50 мкл NaCl 0,9% [Blackwood

R.A. et al., 1979; Bolmer S.D. et al., 1987]. В качестве интактного контроля (ИК) выступали животные в оптимальных жизненных условиях. Эвтаназия мышей проводилась в соответствии с требованиями, принятыми в институте, передозировкой CO₂.

Для оценки влияния антагониста C₂-серотониновых и D₂-дофаминовых рецепторов на развитие фиброзных и эмфизематозных заболеваний лёгких в экспериментах использовали кетансерин («Ketanserine», «Sigma», США) и спиперон («Spiperone», «Sigma», США), дофамина гидрохлорид («Dopamine hydrochloride», «Sigma», США) соответственно. Изучение эффектов спиперона и кетансерина проводили *in vivo*. Для этого на модели фиброза лёгких спиперон и кетансерин вводили мышам внутривентрально (в/б) курсом в дозе 1,5 мг/кг в 100 мкл NaCl 0,9% через 3 ч после введения блеомицина и на 1, 3, 6, 7, 13-21-е сутки эксперимента (профилактический режим). На моделях эмфиземы лёгких спиперон и кетансерин вводили мышам в/б курсом в дозе 0,15 мг/кг в 100 мкл NaCl 0,9% (для обоих препаратов): в условиях введения эластазы на 1-14-е сутки, ЛПС и ЭТД – на 3-16-е сутки; эластазы и ДГГ – на 1-3-и сутки.

В экспериментах *in vitro* изучалось влияние спиперона (10⁻⁷ М), дофамина (10⁻⁷ М), ФНО-α (10⁻⁷ М) и ИЛ-1β (10⁻⁷ М) на эндотелиальные клетки мышей в условиях введения блеомицина или ЛПС и ЭТД.

Гистологическое исследование лёгких выполняли по стандартной методике, препараты окрашивали гематоксилином и эозином для оценки воспаления, капилляров и повреждений лёгких, и пикрофуксином по Ван-Гизону для изучения соединительной ткани [Лилли Р., 1969; Меркулов Г.А., 1969]. Иммуногистохимически на препаратах лёгких исследовали нейтрофильную эластазу, матричные металлопротеиназы 9 и 12 (MMP9 и MMP12), альфа-1-антитрипсин, пан-цитокератин (AE1/AE3), Е-кадгерин, CD16 и CD31 [Эллиниди В.Н. и др., 2011].

Иммуноферментным твердофазным методом с использованием наборов для лабораторной диагностики мышей (Cusabio Biotech CO., LTD) оценивали уровни интерлейкинов (ИЛ) 1β, 2, 5, 10, 13, 17, трансформирующего фактора роста β (TGF-β), фактора некроза опухоли α (ФНО-α), коллагена I типа, гидроксипролина, общего коллагена, гиалуроновой кислоты в сыворотке крови и гомогенате лёгких, а также ИЛ-4, ИЛ-1β, фибронектина, ИЛ-12, коллаген I типа, γ-интерферона (γ-IFN) в кондиционных средах МСК лёгких, и TGF-β, ИЛ-10, ИЛ-23 в кондиционных средах эпителиальных клеток лёгких.

По результатам исследования экспрессии поверхностных антигенов CD31, CD34, CD44, CD45, CD49f, CD73, CD90, CD106, CD112 (Nectin2), CD117 (c-kit), CD146, CD309, CD326, Flk-1 (CD309), TER119 и внутриклеточного маркера Notch1 на мононуклеарах лёгких, крови и костного мозга методом проточной цитофлуориметрии делали вывод, во-первых, о количестве зрелых эпителиальных и эндотелиальных клеток; МСК, фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов; эпителиальных прогениторных клетках и стволовых клетках лёгких; эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза; сосудистых гладкомышечных клеток, клеток просвета зарождающегося сосуда и перицитов у мышей. Во-вторых, получены данные о содержании Nectin2⁺ клеток и Notch1⁺ клеток в популяции СК лёгких. Для проведения этих работ использовали прибор FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences») [Walker L. et al., 2001; Pershina O. et al., 2012; Дыгай А.М. и др., 2013; Skurikhin E.G. et al., 2013; 2014; 2016].

Культуральные методы исследования позволили получить первичные культуры предшественников мезенхимальных [Гольдберг Е.Д. и др., 1992; Mensing N. et al., 2011;

Скурихин Е.Г. и др., 2012; Pershina O. et al., 2012], эпителиальных [Skurikhin, E.G. et al., 2019] и эндотелиальных [Kalyuzhny A.E., 2005; McQualter J.L. et al., 2010; McCormack N. et al., 2013] клеток лёгких, и оценить их функциональную активность (клональная активность, пролиферация, дифференцировка) *in vitro* [Okuno M. et al., 2007; Skurikhin E.G. et al., 2014].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием программы статистики SPSS 12,0. Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному (тест Шапиро-Вилка). В случаях нормального распределения для статистической обработки применяли параметрический t-критерий Стьюдента. При больших отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых совокупностей считали статистически значимыми в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5% ($p < 0,05$) [Гланц С., 1999; Гмурман В.Е., 2002].

В третьей главе диссертации представлены результаты собственных исследований. Числовые данные представлены в виде таблиц и рисунков.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов с привлечением данных литературы. На первом этапе настоящей работы в сравнительном аспекте изучены СК и прогениторные клетки крови, костного мозга и лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких и эмфиземы лёгких. В таблице 1 представлены иммунофенотипы СК и прогениторных клеток, изученных в диссертации.

Таблица 1 – Стволовые клетки и прогениторные клетки у мышей линии C57BL/6

Клетки	Иммунофенотип
1. Смешанная популяция незритроидных и нелейкоцитарных зрелых и незрелых эпителиальных клеток	CD45 ⁻ TER119 ⁻ CD49f ⁺ CD326 ⁺
2. Зрелые эпителиальные клетки	CD326 ⁺
3. Зрелые эпителиальные клетки	CD45 ⁻ CD326 ⁺
4. Зрелые эпителиальные клетки	CD45 ⁻ CD49f ⁺ CD326 ⁺
5. Смешанная популяция зрелых и незрелых эпителиальных клеток	CD326 ⁺ CD45 ⁻ CD49f ⁺
6. Эпителиальные прогениторные клетки	CD45 ⁻ TER119 ⁻ CD49f ⁺
7. Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки	CD326 ^{hi}
8. Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки	CD326 ^{hi} CD49f ⁺ CD45 ⁻
9. Стволовые клетки лёгких	CD45 ⁻ CD117 ⁺
10. Эндотелиальные клетки	CD31 ⁺
11. VEGF2 ⁺ эндотелиальные клетки	CD45 ⁻ CD309 ⁺
12. Предшественники ангиогенеза	CD45 ⁻ CD309 ⁺ CD117 ⁺
13. Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла	CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁺
14. Эндотелиальные прогениторные клетки	CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺
15. Мезенхимальные стволовые клетки	CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD34 ⁻ CD73 ⁺ CD90 ⁺
16. Мезенхимальные стволовые клетки	CD45 ⁻ D106 ⁺ CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺
17. Фибробластные прогениторные клетки	CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD34 ⁺ CD90 ⁺
18. Фиброциты миелоидного происхождения	CD31 ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁺
19. Фиброциты немиелоидного происхождения	CD31 ⁻ CD34 ⁻ CD45 ⁺

В классическом понимании токсический пневмофиброз – это разрушение альвеолярного эпителия с последовательно развивающимися воспалением и фиброзом в паренхиме лёгких, с дисфункцией эндотелия и нарастающим нарушением микроциркуляторной сети (Рисунок 1). Его картина во многом сопоставима с таковой у пациентов с ИЛФ. При проведении гистологических и иммуногистохимических исследований препаратов лёгкого, иммуноферментного анализа (ИФА) биологических проб было получено подтверждение сложности и стадийности развития фиброза лёгких, вызванного введением блеомицина (патологический контроль, ПК).

Различные коллективы авторов обсуждают противовоспалительную активность (паракринный механизм [Kotton D.N., Fine A., 2008; Gimble J.M. et al., 2010; Garcia-Gomez I. et al., 2010]) и регенераторный эффект МСК (мезенхимально-эпителиальный переход [Tzouvelekis A, et al., 2011; Huleihel L. et al., 2013]). При этом МСК не рассматривают в качестве фактора патогенеза ИЛФ. Между тем, уже сама мультипотентность (дифференцировка в адипоциты, остеобласты, хондроциты и фибробласты) предполагает участие МСК в фибропластическом процессе.

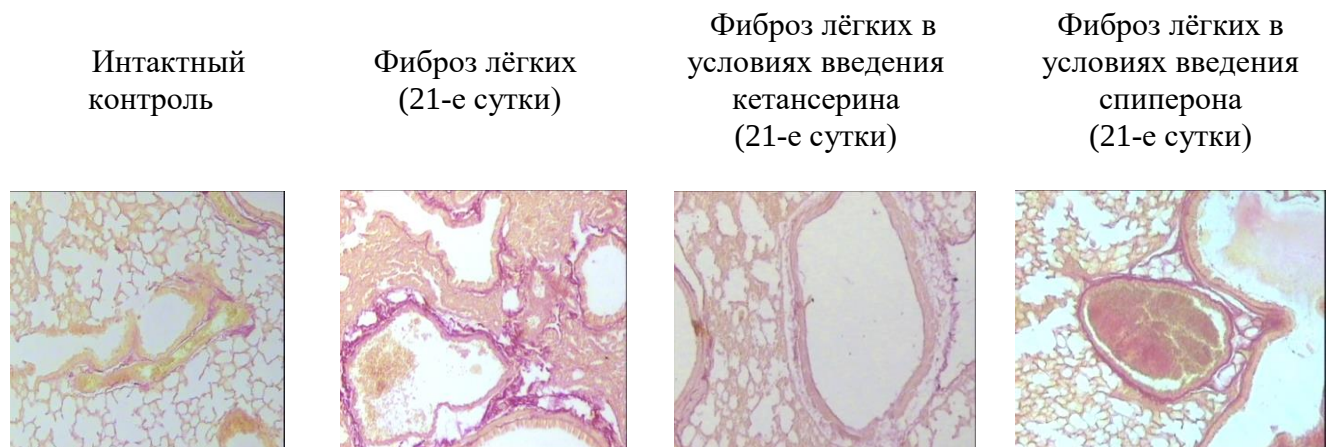


Рисунок 1 – Морфологическая картина легочной ткани мышей линии C57BL/6 интактного контроля; мышей линии C57BL/6 с фиброзом лёгких, вызванным блеомицином; и мышей линии C57BL/6 с фиброзом лёгких, вызванным блеомицином, в условиях введения кетансерина или спиперона. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Отвечая на вопрос о роли МСК в патогенезе при фиброзе лёгком, первоначально мы оценили содержание МСК ($CD45^-CD31^-CD34^-CD73^+CD90^+$) в лёгких. Цитофлуометрический анализ показал увеличение (более чем в 3,8 раза, по сравнению с ИК) количества МСК в лёгких мышей в условиях введения блеомицина в сроки наиболее интенсивного отложения коллагеновых масс (21-е сутки) (Таблица 2).

Культуральные методы и проточная цитофлуометрия позволили выявить высокий потенциал к самоподдержанию и продукцию γ -IFN МСК (21-е сутки). При исследовании дифференцировки МСК обнаружилось снижение интенсивности остеогенной дифференцировки и увеличение дифференцировки в направлении фибробластов, при этом активность адипогенной и хондрогенной дифференцировки не изменялась (21-е сутки). Позднее (40-е сутки) МСК животных с фиброзом лёгких демонстрировали повышенную секрецию TGF- 1β и ФНО- α (Таблица 3).

Таблица 2 – Содержание стволовых и прогениторных клеток в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Фиброз лёгких
Мезенхимальные стволовые клетки / CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD34 ⁻ CD73 ⁺ CD90 ⁺	0,158 $\pm$ 0,021	0,601 $\pm$ 0,065 $p_1=0,021$
Фibroциты миелоидного происхождения / CD31 ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁺	2,761 $\pm$ 0,189	1,919 $\pm$ 0,115 $p_1=0,029$
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 ⁺ TER119 ⁻ CD49f ⁺	1,936 $\pm$ 0,201	2,601 $\pm$ 0,376 $p_1=0,029$
Стволовые клетки лёгких / CD45 ⁻ CD117 ⁺	1,437 $\pm$ 0,153	14,435 $\pm$ 1,551 $p_1<0,001$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁺	1,187 $\pm$ 0,124	3,068 $\pm$ 0,336 $p_1=0,021$
Эндотелиальные прогениторные клетки / CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD73 ⁻ CD90 ⁻	0,256 $\pm$ 0,032	0,487 $\pm$ 0,045 $p_1=0,032$
Предшественники ангиогенеза / CD45 ⁻ CD309 ⁺ CD117 ⁺	0,158 $\pm$ 0,024	0,706 $\pm$ 0,073 $p_1=0,012$

Примечание – Здесь (и далее в Таблицах): p_1 – уровень статистической значимости различий относительно показателей интактного контроля, ИК.

Таблица 3 – Уровень цитокинов в кондиционных средах МСК лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21, 40-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Показатель	Интактный контроль	Фиброз лёгких	
		21-е сутки	40-е сутки
γ -IFN (пг/мл)	15,9 $\pm$ 1,8	23,6 $\pm$ 1,9 $p_1=0,027$	14,4 $\pm$ 0,9
TGF-1 β (нг/мл)	0,7 $\pm$ 0,09	1,0 $\pm$ 0,3	2,24 $\pm$ 0,4 $p_1=0,011$
ФНО- α (пг/мл)	16,3 $\pm$ 2,1	14,1 $\pm$ 1,6	24,6 $\pm$ 2,7 $p_1=0,015$

Таким образом, при пневмофиброзе резидентные (лёгкие) МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), дифференцируясь в направлении фибробластов и хондроцитов, увеличивают число фибробластов (продуценты коллагена) в лёгких. Паракринный механизм поддержания МСК фиброза и воспаления связан с продукцией TGF- β 1 и ФНО- α .

Благодаря активной репликации и продукции коллагена фибробластами, отложению коллагена в интерстиции лёгких, происходит сокращение воздушного пространства лёгких. Считается, что происхождение фибробластов внутрилегочное. Наше внимание привлекли циркулирующие в крови фиброциты, как один из возможных источников фибробластов. Эти клетки обладают фибробластоподобными свойствами, способны мигрировать в поврежденную ткань [Abe R. et al., 2001]. Есть предположение о том, что циркулирующие фиброциты при развитии патологии мигрируют в лёгкие, «оседают» в формирующемся очаге воспаления и участвуют в фибротических изменениях [Hardie W.D. et al., 2009; Wilson M.S., Wynn T.A., 2010]. По нашим данным при введении блеомицина циркулирующие фиброциты мигрировали в лёгкие и вовлекались в фибропластический процесс (Таблица 2).

В качестве потенциального источника фибробластов в лёгких могут выступать фибробластные прогениторные клетки костного мозга. При изучении клональной активности

этих предшественников мы обнаружили, что интенсивному отложению коллагеновых волокон в легочной ткани мышей в условиях введения блеомицина (21-е сутки) предшествовало увеличение клональной активности прогениторных фибробластных клеток костного мозга (3, 7-е сутки) с последующей их мобилизацией в кровь (7, 21-е сутки) и рекрутированием в травмированные лёгкие (7, 14, 21-е сутки) (Таблица 4).

Таблица 4 – Клональная активность (КОЕ-Ф, $\times 10^5$ адгезирующих моноклеаров) CD45⁺ клеток, полученных из костного мозга, крови и лёгких мышей линии C57BL/6 интактного контроля, при фиброзе лёгких, вызванного блеомицином, и при фиброзе лёгких, вызванного блеомицином, в условиях введения спиперона на 3, 7, 14 и 21-е сутки эксперимента (M $\pm$ m)

Сроки исследования, сутки	Костный мозг	Кровь	Лёгкие
Интактный контроль			
	4,83 $\pm$ 0,75	0	0
Фиброз лёгких			
3	30,17 $\pm$ 9,01 $p_1 < 0,001$	0	0
7	28,33 $\pm$ 3,62 $p_1 < 0,001$	0,17 $\pm$ 0,17 $p_1 < 0,001$	3,00 $\pm$ 0,40 $p_1 < 0,001$
14	3,17 $\pm$ 0,60	0	11,00 $\pm$ 0,80 $p_1 < 0,001$
21	1,83 $\pm$ 0,54 $p_1 = 0,021$	0,67 $\pm$ 0,33 $p_1 < 0,001$	18,30 $\pm$ 1,70 $p_1 < 0,001$
Фиброз лёгких в условиях введения спиперона			
3	19,83 $\pm$ 2,05 $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,025$	0	0
7	37,67 $\pm$ 3,48 $p_1 < 0,001$	0,17 $\pm$ 0,15 $p_1 < 0,001$	1,00 $\pm$ 0,28 $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,021$
14	2,17 $\pm$ 0,28 $p_1 = 0,029$	0,33 $\pm$ 0,25 $p_1 < 0,001$	3,00 $\pm$ 0,58 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
21	0,50 $\pm$ 0,25 $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,011$	0 $p_2 < 0,001$	22,50 $\pm$ 0,87 $p_1 < 0,001$
Фиброз лёгких в условиях введения кетансерина			
14	0	6,25 $\pm$ 0,45 $p_1 < 0,001$	2,84 $\pm$ 0,47 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
21	0	15,24 $\pm$ 1,25 $p_1 < 0,001$	5,75 $\pm$ 0,75 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примечание – Здесь (и далее в Таблицах): p_2 – уровень статистической значимости различий относительно показателей патологического контроля, ПК.

Таким образом, в условиях введения блеомицина в фиброз лёгкого вовлекаются резидентные МСК (CD45⁺CD31⁺CD34⁺CD73⁺CD90⁺), фибробластные прогениторные клетки костного мозга и циркулирующие в крови фиброциты.

В ходе проведения гистологических исследований мы показали, что моделирование

фиброза лёгких приводило к разрушению альвеолярного эпителия и микрососудистой сети. По современным представлениям в регенерации утраченных и поврежденных клеток участвуют СК. Однако при фиброзе лёгких механизмы регенерации с участием СК изучены недостаточно. Работая в этом направлении, нами выявлена причина задержки восстановления эпителия и эндотелия при фиброзе лёгких. По нашим данным введение блеомицина увеличивало число стволовых клеток лёгких ($CD45^+CD117^+$) и эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^+TER119^+CD49f^+$) в лёгких мышей по отношению к ИК (21-е сутки) (Таблица 2).

В экспериментах *in vitro* предшественники эпителиальных клеток ПК демонстрировали повышение секреции профибротического медиатора TGF- 1β и противовоспалительного ИЛ-10 относительно ИК, при этом секреция провоспалительных ИЛ-12 и ИЛ-23 снижалась (Таблица 5).

Таблица 5 – Уровень цитокинов в кондиционных средах эпителиальных клеток, полученных из лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21, 40-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

GF-1 β (нг/мл)	ИЛ-10 (пг/мл)	ИЛ-23 (пг/мл)	ИЛ-12 (пг/мл)
Интактный контроль			
$0,53 \pm 0,4$	$1,98 \pm 0,4$	$36,3 \pm 4,3$	$5,4 \pm 0,4$
Фиброз лёгких (21-е сутки)			
$1,43 \pm 0,3$ $p_1=0,039$	$5,29 \pm 0,6$ $p_1=0,011$	$11,8 \pm 2,1$ $p_1<0,001$	$5,4 \pm 0,8$
Фиброз лёгких (40-е сутки)			
$1,05 \pm 0,4$	$2,45 \pm 0,6$	$7,8 \pm 1,2$ $p_1<0,001$	$1,7 \pm 0,4$ $p_1<0,001$

Таким образом, в условиях введения блеомицина стволовые клетки лёгких и эпителиальные прогениторные клетки вовлекаются в патогенез фиброза лёгких.

При изучении предшественников эндотелиальных клеток нами было выявлено достоверно большее число эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла ($CD45^+CD31^+CD34^+$), эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^+CD31^+CD34^+CD73^+CD90^+$) и предшественников ангиогенеза ($CD45^+CD309^+CD117^+$) в лёгких ПК, чем в ИК (Таблица 2).

Исследование первичных культур предшественников эндотелиальных клеток лёгких позволило выявить снижение потенциала к самоподдержанию эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^+CD31^+CD34^+CD73^+CD90^+$) и увеличение его у эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла ($CD45^+CD31^+CD34^+$) в ПК по сравнению с ИК (Таблица 6).

Представленные выше результаты указывают на участие различных предшественников эндотелиальных клеток в восстановлении микрососудистой сети лёгких в условиях введения блеомицина. На гистологических препаратах лёгких таких животных участки фиброза имели малое количество кровеносных сосудов, в то время как области здоровой ткани были избыточно насыщены капиллярами. Ранее M. Ebina и соавт. показали, что в области между фиброзированными участками ткани рекрутируются большое количество эндотелиальных прогениторных клеток [Ebina M., 2004]. При этом эндотелиальные прогениторные клетки дифференцировались в гладкомышечные клетки, но не в эндотелиальные. Такое проявление плейотропной активности эндотелиальных прогениторных клеток может приводить к утолщению интимы, сужению сосудов и повышению сосудистого сопротивления [Zhu P. et al., 2006; Arciniegas E., 2007; Barbera J.A., 2011], и прогрессии фиброза лёгких. Этот механизм во

многом объясняет низкую активность ангиогенеза и малое количество капилляров в лёгких мышцах в условиях введения блеомцина на фоне значительного рекрутирования в лёгкие эндотелиальных прогениторных клеток.

Таблица 6 – Влияние культивирования на эндотелиальные прогениторные клетки, полученные из лёгких мышечной линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Этап исследования	Интактный контроль	Фиброз лёгких
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / $CD45^+CD31^+CD34^+$		
До культивирования	$1,187 \pm 0,126$	$3,068 \pm 0,335$ $p_1=0,012$
После культивирования	$6,463 \pm 0,653$ $p_3<0,001$	$21,085 \pm 2,556$ $p_1<0,001$ $p_3<0,001$
Эндотелиальные прогениторные клетки / $CD45^+CD31^+CD34^+CD73^+CD90^+$		
До культивирования	$0,256 \pm 0,031$	$0,487 \pm 0,057$ $p_1=0,023$
После культивирования	$0,601 \pm 0,052$ $p_3=0,011$	$0,634 \pm 0,073$

Примечание – Здесь (и далее в Таблицах): p_3 – уровень статистической значимости различий относительно результатов до культивирования.

ХОБЛ характеризуется персистирующим уменьшением воздушного потока вследствие формирования обструктивного бронхолита и эмфиземы лёгких с постоянными респираторными симптомами [Ong J.J.Y., DeFelice M., 2018]. Заболевание обычно прогрессирует [Чучалин А.Г., 2008; Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease, 2014], в лёгких пациентов выявляется деструкция межальвеолярных перегородок, уменьшение васкуляризации альвеол [Washko G.R., 2012], системная дисфункция эндотелия, преждевременное «старение» легочных сосудов и апоптоз эндотелиальных клеток [Green C.E., Turner A.M., 2017]. В своей работе мы рассмотрели СК и прогениторные клетки в условиях эмфиземы лёгких, индуцированной различными повреждающими агентами.

Для моделирования эмфиземы лёгких у мышей использовались свиная панкреатическая эластаза, ЛПС, ЭТД и ДГГ. Механизм действия представленных агентов значительно различается. Эластаза вызывает сдвиг баланса между протеазами и антипротеазами в сторону протеаз [Kim Y.S. et al., 2014]. ЭТД содержит большое количество вредных и канцерогенных веществ, его действие на лёгкие активизирует выброс протеолитических ферментов, мобилизацию нейтрофилов и макрофагов, индукцию оксидативного стресса [Hanaoka M. et al., 2011]. ДГГ повреждает гепатоциты, результатом чего выступает падение уровня α_1 -антитрипсина в крови и лёгких [Bolmer S.D. et al., 1987]. Нами показано, что все указанные повреждающие факторы приводили к деструкции межальвеолярных перегородок, воспалительной инфильтрации легочной паренхимы и формированию эмфиземы. Выявлены нарушение структуры микрососудистого русла и разрушение альвеолярного эпителия. Наиболее значительная эмфизема, выраженные повреждения альвеол и эндотелия выявлены у мышей в условиях введения эластазы (Рисунок 2).

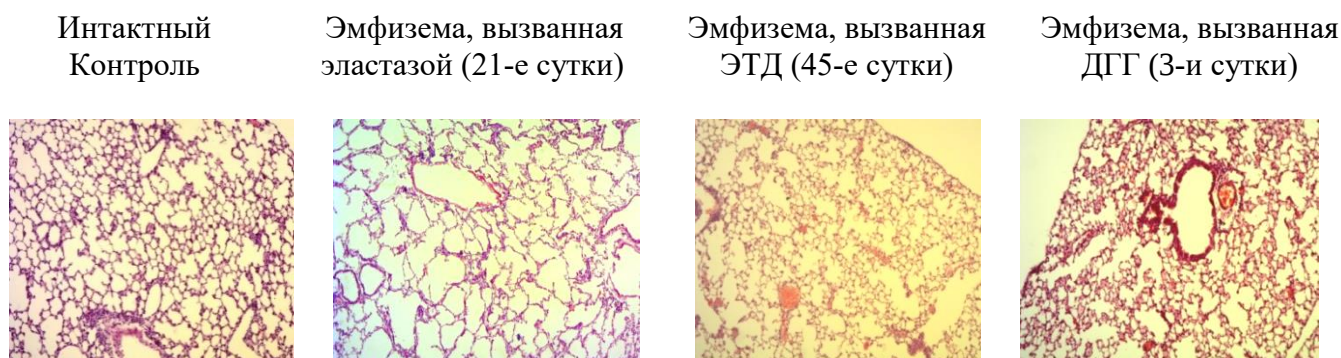


Рисунок 2 – Морфологическая картина легочной ткани у мышей самок линии C57BL/6 ИК и мышей самок линии C57BL/6 в условиях экспериментальной эмфиземы лёгких, вызванной введением эластазы (21-е сутки), ЭТД (45-е сутки) или ДГТ (3-и сутки исследования). Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Изучение предшественников эндотелиальных клеток на моделях эмфиземы лёгких позволило выявить ряд закономерностей. Так, при воспроизведении хронического повреждения альвеолярной ткани ЛПС и ЭТД изменений в содержании предшественников эндотелиальных клеток в лёгких мышей не отмечалось (Таблица 7). Наблюдаемое в этих условиях уменьшение числа циркулирующих в крови эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+CD73^-CD90^-$) и предшественников ангиогенеза ($CD45^-CD309^+CD117^+$), вероятно, обусловлено обратным их депонированием в костномозговую «нишу» после мобилизации.

Таблица 7 – Влияние кетансерина и спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, на 16-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких в условиях введения кетансерина	Эмфизема лёгких в условиях введения спиперона
$VEGF^+$ эндотелиальные клетки / $CD45^-CD309^+$	$0,847 \pm 0,067$	$0,918 \pm 0,055$	$2,250 \pm 0,256$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$1,127 \pm 0,068$ $p_2 = 0,029$
Предшественники ангиогенеза / $CD45^-CD309^+CD117^+$	$1,296 \pm 0,114$	$1,101 \pm 0,096$	$3,570 \pm 0,225$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$1,892 \pm 0,178$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,031$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла $CD45^-CD31^+CD34^+$	$16,255 \pm 1,388$	$19,491 \pm 1,739$	$17,991 \pm 1,748$	$25,522 \pm 2,229$ $p_1 < 0,001$
Эндотелиальные клетки / $CD31^+$	$62,588 \pm 5,938$	$82,318 \pm 7,394$ $p_1 = 0,021$	$64,011 \pm 4,522$	$44,314 \pm 3,598$ $p_1 = 0,019$ $p_2 < 0,001$

В отличие от действия ЛПС и ЭТД совместное введение эластазы и ДГТ увеличивало число $VEGF^+$ эндотелиальных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$) и предшественников ангиогенеза в крови и лёгких (3-и сутки) (Таблицы 8). Такие изменения объясняются нами мобилизацией предшественников ангиогенеза из костного мозга в

кровь, миграцией циркулирующих VEGF⁺ эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза в лёгкие, и усилением деления резидентных эндотелиальных прогениторных клеток.

Таблица 8 – Влияние кетансерина и спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы ДГТ на 3 сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких в условиях введения кетансерина	Эмфизема лёгких в условиях введения спиперона
VEGF ⁺ эндотелиальные клетки / CD45 ⁺ CD309 ⁺	0,906 ± 0,088	2,182 ± 0,188 $p_1 < 0,001$	1,385 ± 0,131 $p_1 = 0,023$ $p_2 < 0,001$	1,319 ± 0,142 $p_1 = 0,027$ $p_2 < 0,001$
Предшественники ангиогенеза / CD45 ⁺ CD309 ⁺ CD117 ⁺	1,913 ± 0,165	5,730 ± 0,445 $p_1 < 0,001$	5,054 ± 0,452 $p_1 < 0,001$	3,703 ± 0,225 $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,017$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 ⁺ CD31 ⁺ CD34 ⁺	1,884 ± 0,112	3,133 ± 0,289 $p_1 = 0,01$	2,719 ± 0,256 $p_1 = 0,019$	2,741 ± 0,312 $p_1 = 0,018$

В условиях введения эластазы значительное повреждение микрососудистой сети лёгких животных являлось основным фактором, сдерживающим миграцию в лёгкие из крови мобилизованных костномозговых предшественников ангиогенеза и циркулирующих VEGF⁺ эндотелиальных клеток (14-е сутки). В этих условиях повышение числа эндотелиальных прогениторных клеток (CD45⁺CD31⁺CD34⁺) в лёгких может быть обусловлено их пролиферацией (Таблица 9).

Таблица 9 – Влияние кетансерина и спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной эластазой, на 14-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких в условиях введения кетансерина	Эмфизема лёгких в условиях введения спиперона
VEGF ⁺ эндотелиальные клетки / CD45 ⁺ CD309 ⁺	4,204 ± 0,276	2,546 ± 0,224 $p_1 < 0,001$	2,274 ± 0,199 $p_1 < 0,001$	2,113 ± 0,209 $p_1 < 0,001$
Предшественники ангиогенеза / CD45 ⁺ CD309 ⁺ CD117 ⁺	8,024 ± 0,668	7,943 ± 0,672	6,585 ± 0,554	7,016 ± 0,619
Эндотелиальные клетки / CD31 ⁺	57,647 ± 4,889	59,103 ± 5,115	55,008 ± 4,319	64,291 ± 5,551
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 ⁺ CD31 ⁺ CD34 ⁺	18,665 ± 1,783	26,839 ± 2,672 $p_1 = 0,011$	27,471 ± 1,719 $p_1 = 0,011$	31,388 ± 2,995 $p_1 = 0,009$

Таким образом, не зависимо от модели эмфиземы повреждается микрососудистой сети лёгких, в регенерацию утраченных эндотелиальных клеток вовлекаются эндотелиальные прогениторные клетки ($CD45^-CD31^+CD34^+$), предшественники ангиогенеза ($CD45^-CD309^+CD117^+$) и $VEGF^+$ эндотелиальные клетки. Нами показано, что эффективность ангиогенеза зависит от целостности микроциркуляторной сети лёгких. Так, при его значительном разрушении миграция незрелых эндотелиальных клеток в поврежденный участок легочной ткани ограничена. Это наблюдается на эластазной модели эмфиземы. В случае введения эластазы и ДГГ или ЛПС и ЭТД нарушения микроциркуляции в лёгких менее выражены, но усиливается апоптоз эндотелиальных клеток. В таких условиях реализуется механизм регенерации с участием зрелых клеток эндотелия. Возможно, предшественники эндотелиальных клеток мигрируют в лёгкие. Однако факторы воспаления оказывают ингибирующее действие на эти клетки и препятствуют реализации их регенеративного потенциала. Подтверждением этому выступает снижение активности эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$) лёгких мышей в условиях введения ЛПС и ЭТД *in vitro* при обработке их ФНО- α ($10^{-7}M$) и ИЛ-1 β ($10^{-7}M$).

По данным ВОЗ из всех факторов риска курение является основным и выступает индуктором развития ХОБЛ [Eisner M.D. et al., 2010; Lamprecht B. et al, 2011]. В этой связи на модели эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, мы провели более детальный анализ клеток, участвующих в ангиогенезе. В частности, была проведена оценка активно пролиферирующих Nectin2⁺ клеток (Таблица 10).

Таблица 10 – Содержание Nectin2⁺ предшественников эндотелиальных клеток в лёгких, костном мозге и крови у мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, на 16-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Группы	Эндотелиальные прогениторные клетки $CD45^-CD31^+CD34^+ / Nectin2^+$	Эндотелиальные прогениторные клетки $CD31^+CD34^+CD146^+ / Nectin2^+$	Предшественники ангиогенеза $CD45^-CD309^+CD117^+ / Nectin2^+$
Лёгкие			
Интактный контроль	$3,498 \pm 0,351$	$8,514 \pm 0,882$	$0,152 \pm 0,16$
Эмфизема лёгких	$2,699 \pm 0,307$	$14,123 \pm 1,369$ $p_1 < 0,001$	$0,569 \pm 0,063$ $p_1 < 0,001$
Костный мозг			
Интактный контроль	$0,156 \pm 0,017$	$0,714 \pm 0,068$	$0,038 \pm 0,004$
Эмфизема лёгких	$0,569 \pm 0,063$ $p_1 < 0,001$	$0,257 \pm 0,024$ $p_1 < 0,001$	$0,034 \pm 0,003$
Кровь			
Интактный контроль	$0,446 \pm 0,042$	$1,188 \pm 0,109$	-
Эмфизема лёгких	$0,157 \pm 0,016$ $p_1 < 0,001$	$0,115 \pm 0,009$ $p_1 < 0,001$	-

По нашим данным, несмотря на сохранение числа незрелых эндотелиальных клеток в лёгких мышей, получавших ЛПС и ЭТД, на уровне ИК, количество Nectin2⁺ клеток во фракциях эндотелиальных прогениторных клеток ($CD31^+CD34^+CD146^+$) и предшественников ангиогенеза возросло (Таблица 10). Результаты цитофлуометрического анализа пролиферирующих Nectin2⁺ клеток в тканях указывали на активацию процессов их мобилизации из костного мозга в кровь с последующей миграцией в поврежденные лёгкие. С

нашей точки зрения, увеличение количества пролиферирующих незрелых эндотелиальных клеток в легочной ткани мышей с эмфиземой на фоне сохранявшегося повреждения микрососудистой сети связано с угнетением дифференцировки факторами воспаления (Таблица 10).

Межклеточные контакты вспомогательных клеток ангиогенеза (клетки просвета зарождающегося сосуда, перициты, сосудистые гладкомышечные клетки), в том числе с эндотелиальными прогениторными клетками, лежат в основе восстановления нормальной структуры и функций поврежденных сосудов лёгких [Campbell H.K. et al., 2017]. В нашей работе мы обнаружили уменьшение числа перицитов в лёгких мышей в условиях введения ЛПС и ЭТД по сравнению с ИК (Таблица 11). При этом значительно сокращалось число перицитов, сосудистых гладкомышечных клеток и клеток просвета зарождающегося сосуда в крови.

Таблица 11 – Содержание сосудистых гладкомышечных клеток, клеток просвета зарождающегося сосуда и перицитов в лёгких, костном мозге и крови мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, на 16-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Группы	Сосудистые гладкомышечные клетки $CD31^-CD34^+CD146^+$	Клетки просвета зарождающегося сосуда $CD31^+CD34^-$	Перициты $CD31^-CD34^-CD146^+$
Лёгкие			
Интактный контроль	$2,959 \pm 0,301$	$16,215 \pm 1,705$	$2,826 \pm 0,234$
Эмфизема лёгких	$3,159 \pm 0,322$	$17,801 \pm 1,687$	$1,983 \pm 0,187$ $p_1=0,01$
Костный мозг			
Интактный контроль	$1,3029 \pm 0,123$	$31,6131 \pm 3,224$	$1,415 \pm 0,155$
Эмфизема лёгких	$0,927 \pm 0,084$ $p_1=0,01$	$9,9817 \pm 0,911$ $p_1<0,001$	$1,715 \pm 0,146$
Кровь			
Интактный контроль	$1,743 \pm 0,169$	$15,161 \pm 1,428$	$0,268 \pm 0,024$
Эмфизема лёгких	$0,659 \pm 0,064$ $p_1<0,001$	$8,378 \pm 0,811$ $p_1<0,001$	$0,168 \pm 0,015$ $p_1=0,01$

Таким образом, в условиях введения ЛПС и ЭТД несостоятельность механизмов регенерации микрососудистой сети лёгких вызвано нарушением миграции перицитов в лёгкие и снижением межклеточных контактов.

Следующая часть исследования была посвящена сравнительной оценке реакций различных популяций предшественников эпителиальных клеток на моделирование эмфиземы лёгких. Так, эластаза снижала количество мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$) и сокращала общую фракцию зрелых и незрелых эпителиальных клеток ($CD326^+CD45^-CD49f^+$) в лёгких по сравнению с ИК (14-е сутки) (Таблица 12). При этом число стволовых клеток лёгких, напротив, возрастало (Таблица 12). Считается, что стволовые клетки лёгких являются глубоким резервом регенерации альвеолярного эпителия, при повреждении альвеолярного эпителия дифференцируются в альвеоциты I порядка [Brody J.S et al., 1992; Rawlins E.L. et al., 2008]. В крови мышей, получавших эластазу, наблюдалось сокращение популяции зрелых и незрелых эпителиальных клеток ($CD326^+CD45^-CD49f^+$) и накопление мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток.

Таблица 12 – Влияние кетансерина на содержание зрелых эпителиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной эластазой, на 14-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных моноклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких в условиях введения кетансерина
Смешанная популяция зрелых и незрелых эпителиальных клеток / $CD326^+CD45^-CD49f^+$	$5,782 \pm 0,673$	$1,433 \pm 0,096$ $p_1 < 0,001$	$1,582 \pm 0,112$ $p_1 < 0,001$
Зрелые эпителиальные клетки / $CD326^+$	$17,898 \pm 2,54$	$6,701 \pm 0,522$ $p_1 < 0,001$	$7,489 \pm 0,615$ $p_1 < 0,001$
Зрелые эпителиальные клетки / $CD45^-CD326^+$	$15,646 \pm 1,27$	$4,162 \pm 0,366$ $p_1 < 0,001$	$4,848 \pm 0,336$ $p_1 < 0,001$
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$	$3,210 \pm 0,233$	$0,817 \pm 0,057$ $p_1 < 0,001$	$1,582 \pm 0,127$ $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,025$
Стволовые клетки лёгких / $CD45^-CD117^+$	$17,074 \pm 1,94$	$24,414 \pm 2,986$ $p_1 = 0,019$	$23,602 \pm 1,989$

Введение ЛПС и ЭТД вызывало иную реакцию предшественников эпителиальных клеток по сравнению с эластазой. Так, в легочной ткани мышей ПК было обнаружено значительно большее количество незрелых эпителиальных клеток ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$, $CD45^-TER119^-CD49f^+CD326^+$, $CD326^+CD45^-CD49f^+$), чем у мышей ИК (16-е сутки) (Таблица 13). В противоположность этому, содержание эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) у мышей, получавших ЭТД, было меньше, чем в ИК (Таблица 13). В крови мышей, получавших ЛПС и ЭТД, отмечался прирост числа незрелых эпителиальных клеток ($CD326^+CD45^-CD49f^+$) и сокращение фракции стволовых клеток лёгких.

Таблица 13 – Влияние кетансерина на содержание зрелых эпителиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, на 16-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных моноклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких в условиях введения кетансерина
Эпителиальные прогениторные клетки / $CD45^-TER119^-CD49f^+$	$17,281 \pm 1,22$	$12,534 \pm 1,034$ $p_1 = 0,023$	$13,937 \pm 1,214$
Смешанная популяция зрелых и незрелых эпителиальных клеток / $CD326^+CD45^-CD49f^+$	$1,402 \pm 0,121$	$4,320 \pm 0,511$ $p_1 < 0,001$	$1,332 \pm 0,122$ $p_2 < 0,001$
Зрелые эпителиальные клетки / $CD45^-CD326^+$	$8,278 \pm 0,794$	$16,093 \pm 1,456$ $p_1 < 0,001$	$3,837 \pm 0,216$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Зрелые эпителиальные клетки / $CD326^+$	$9,869 \pm 0,876$	$19,382 \pm 0,968$ $p_1 < 0,001$	$3,592 \pm 0,278$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$	$0,462 \pm 0,023$	$2,084 \pm 0,117$ $p_1 < 0,001$	$0,457 \pm 0,027$ $p_2 < 0,001$

Введение эластазы и ДГГ вызывало увеличение числа стволовых клеток лёгких и эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) и мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток в лёгких мышей по сравнению с ИК (3-и сутки) (Таблица 14). В тоже время в крови наблюдалось увеличение числа стволовых клеток лёгких, зрелых и незрелых эпителиальных клеток с общим фенотипом $CD326^+CD45^-CD49f^+$, популяция циркулирующих мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток сокращалась.

Таблица 14 – Влияние кетансерина и спиперона на содержание зрелых эпителиальных клеток и их предшественников в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы и ДГГ на 3 сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема лёгких	Эмфизема лёгких, леченная кетансерином
Зрелые эпителиальные клетки/ $CD326^+$	$30,619 \pm 2,81$	$53,965 \pm 4,312$ $p_1=0,01$	$52,402 \pm 4,442$ $p_1=0,012$
Зрелые эпителиальные клетки/ $CD45^-CD326^+$	$10,499 \pm 0,99$	$22,665 \pm 2,112$ $p_1<0,001$	$26,789 \pm 2,467$ $p_1<0,001$
Эпителиальные прогениторные клетки / $CD45^-TER119^-CD49f^+$	$11,126 \pm 2,12$	$20,531 \pm 1,887$ $p_1<0,001$	$19,774 \pm 1,549$ $p_1<0,001$
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / $CD326^{hi}$	$4,067 \pm 0,376$	$8,565 \pm 0,768$ $p_1<0,001$	$6,323 \pm 0,540$ $p_1=0,019$
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клеток / $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$	$0,192 \pm 0,013$	$0,144 \pm 0,011$	$0,235 \pm 0,021$ $p_1=0,041$ $p_2=0,017$
Стволовые клетки лёгких / $CD45^-CD117^+$	$13,157 \pm 1,23$	$36,002 \pm 2,419$ $p_1<0,001$	$28,958 \pm 1,999$ $p_1<0,001$

Из представленных выше результатов следует, что механизм действия повреждающего фактора во многом определяет реакцию незрелых эпителиальных клеток. Так, массивное разрушение альвеолярных перегородок, альвеол, нарушение капиллярной сети легочной ткани после введения эластазы вызывало сокращение числа всех предшественников эпителиальных клеток в ткани лёгких. Примечательно, что все эти клетки экспрессируют маркер $CD326$. Исключение составили стволовые клетки лёгких ($CD45^-CD117^+$), содержание которых возрастало. В отличие от эластазы, ЛПС и ЭТД приводили к избирательному накоплению в крови и лёгких зрелых эпителиальных клеток и их предшественников, экспрессирующих $CD326$ и, напротив, к сокращению пула стволовых клеток лёгких ($CD45^-CD117^+$) и эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$). Индукция эмфиземы лёгких ДГГ не была связана с прямым повреждающим действием на лёгкие, как в случае эластазы и ЭТД. ДГГ повреждает, в первую очередь, клетки печени, что приводит к системному дефициту антипротеаз, в том числе в лёгких. В этой модели эмфиземы регистрировалась активация предшественников, не экспрессирующих $CD326$ (стволовые клетки лёгких ($CD45^-CD117^+$), эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$)), и экспрессирующих $CD326$ (смешанная популяция неэритроидных и нелейкоцитарных зрелых и незрелых эпителиальных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+CD326^+$), мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток ($CD326^{hi}$)).

При исследовании реакции предшественников клеток мезенхимального ряда в ответ на действие различных факторов, вызывающих эмфизему лёгких, нами выявлен ряд закономерностей. Так, эластаза увеличивала число МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) и фибробластных прогениторных клеток в лёгких мышей ПК по сравнению с ИК, при этом количество фиброцитов миелоидного происхождения уменьшалось (14-е сутки). В то же время содержание фиброцитов немиелоидного происхождения и МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) в крови возрастало. Выявленное увеличение содержания мезенхимальных предшественников в лёгких объясняется пролиферацией резидентных клеток и миграцией клеток из костного мозга. В экспериментах с использованием ИФА мы получили данные о возросшей концентрации коллагена и гидроксипролина в гомогенатах лёгких мышей в условиях введения эластазы по сравнению с ИК (Таблица 15). Объяснение этому нам видится в повышении синтетической активности фибробластов, которые получены в результате дифференцировки мезенхимальных предшественников.

Таблица 15 – Уровни интерлейкинов в гомогенате лёгких у мышей самок линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной эластазой, на 14-е сутки эксперимента (M ± m)

Показатель	Интakтный контроль	Эмфизема лёгких, индуцированная эластазой	
		7-е сутки	14-е сутки
Коллаген I типа (нг/лёгкое)	52,7 ± 5,2	90,0 ± 8,3 p ₁ =0,011	48,7 ± 2,3
Гидроксипролин (мкг/лёгкое)	1,83 ± 0,21	4,28 ± 0,51 p ₁ <0,001	2,07 ± 0,12

Результатом действия ЛПС и ЭТД являлось уменьшение числа МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺; CD45⁻CD106⁺CD44⁺CD73⁺CD90⁺) и увеличение количества фиброцитов миелоидного происхождения в лёгких мышей ПК по сравнению с ИК (16-е сутки). В крови выявлено повышение содержания МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺) и фиброцитов немиелоидного происхождения. Деградация внеклеточного матрикса при введении ЛПС и ЭТД значительно уступала таковой при действии эластазы и не требует вовлечения в регенерацию МСК и фибробластных прогениторных клеток. В этих условиях для восстановления коллагенового и эластинового матрикса достаточно рекрутирования в лёгкие костномозговых фиброцитов миелоидного происхождения, в том числе фракции пролиферирующих Nectin2⁺ фиброцитов миелоидного происхождения.

Введение эластазы и ДГГ нарушало мобилизацию фиброцитов миелоидного происхождения из костного мозга в кровь и миграцию циркулирующих в крови фиброцитов немиелоидного происхождения в лёгкие. При этом наблюдалось повышение содержания МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺), дифференцирующихся в фибробласты, в лёгких и крови мышей по отношению к ИК (3-и сутки). С нашей точки зрения, в условиях моделирования дефицита α1-антитрипсина только МСК вовлекаются в регенерацию внеклеточного матрикса.

Сопоставление результатов исследования СК и прогениторных клеток на моделях патологии лёгких позволило обнаружить некоторые закономерности. Так, при очевидно разном течении и исходе фиброза лёгких, вызванном блеомицином, и эмфиземе лёгких, вызванной эластазой, наблюдалось повреждение CD326⁺ эпителиальных клеток и мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток (CD326^{hi}CD49f⁺CD45⁻). С другой стороны, при введении блеомицина или эластазы увеличивалось число стволовых клеток лёгких (CD45⁻CD117⁺), эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45⁻CD31⁺CD34⁺),

мезенхимальных стволовых клеток ($CD45^-CD31^-CD34^+CD73^+CD90^+$) и фибробластных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^-D34^+CD90^+$) в лёгких. В этой связи, можно предположить, что указанные популяции предшественников являются универсальными для регенерации при значительном повреждении эпителия, эндотелия и внеклеточного матрикса. Картина изменений СК и прогениторных клеток при сочетанном введении ЛПС и ЭТД или эластазы и ДГГ была отличной от приведённой выше. Всё это открывает определенную перспективу в дифференциальном использовании СК и прогениторных клеток в качестве потенциальных терапевтических мишеней, маркеров диагностики и прогноза для пациентов с ИЛФ, ХОБЛ и эмфиземой лёгких. Позволяет приблизиться к решению вопроса разработки персонализированной терапии этих заболеваний.

До настоящего момента изучение Notch1-сигналинга в подавляющем случае исследований проводилось на зрелых клетках [Mack J.J. et al., 2017; Yin Q. et al., 2017; Zong D. et al., 2018]. На результатах изучения Notch-сигнального пути зрелых клеток базируется одна из парадигм различий патогенеза ХОБЛ и ИЛФ [Chilosi M. et al., 2012]. Между тем, представления о Notch-сигналинге эпителиальных, мезенхимальных и эндотелиальных предшественников при ИЛФ и ХОБЛ весьма ограничены. С нашей точки зрения, Notch-сигнальный путь стволовых клеток, возможно, является «водоразделом» между ИЛФ и ХОБЛ. Для оценки этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов, направленная на изучение фенотипически разных популяций $Notch1^+$ стволовых клеток при эмфиземе лёгких или фиброзе лёгких.

Первоначально были изучены резидентные $Notch1^+$ незрелые эндотелиальные клетки. Так, при фиброзе лёгких представительство $Notch1^+$ клеток в популяции эндотелиальных прогениторных клеток больше, а в популяции предшественников ангиогенеза меньше, чем в ИК (21-е сутки) (Таблица 16). Моделирование эмфиземы эластазой увеличивало число $Notch1^+$ предшественников ангиогенеза в лёгких животных относительно ИК (Таблица 16). После введения эластазы и ДГГ количество $Notch1^+$ эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$) в лёгких снижалось, а число $Notch1^+$ предшественников ангиогенеза ($CD45^-CD309^+CD117^+$) повышалось. Результатом сочетанного действия ЛПС и ЭТД являлось уменьшение содержания $Notch1^+$ клеток в общей фракции эндотелиальных прогениторных клеток ($CD45^-CD31^+CD34^+$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Сводная таблица результатов исследования реакции легочных предшественников ангиогенеза, $VEGF^+$ эндотелиальных клеток и эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла, экспрессирующих Notch1, мышей линии C57BL/6 при фиброзе лёгких и эмфиземе лёгких

Клетки/ иммунофенотип	Фиброз лёгких	Эмфизема лёгких, вызванная эластазой	Эмфизема лёгких, вызванная ЭТД	Эмфизема лёгких, вызванная ДГГ
Эндотелиальные прогениторные клетки ($CD45^-CD31^+CD34^+$)	+	0	–	–
$VEGF^+$ эндотелиальные клетки	–	+	0	+
Предшественников ангиогенеза ($CD45^-CD309^+CD117^+$)	–	+	0	+

Примечание – Символ + обозначает увеличение содержания стволовых клеток, – значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений.

Таким образом, во всех моделях эмфиземы лёгких и при фиброзе лёгких $Notch1$ -

сигнальная система вовлекается в регуляцию незрелых эндотелиальных клеток. Реакция Notch1⁺ клеток при фиброзе лёгких была противоположной той, которую мы наблюдали при эмфиземе лёгких. Из этого следует, что известная парадигма различий патогенеза ИЛФ и ХОБЛ на уровне Notch-сигналинга распространяется и на незрелые эндотелиальные клетки.

Общеизвестно, что активация Notch1-рецепторов тормозит дифференцировку СК, в частности клеток гемопоэтического ряда [Stier S. et al., 2002]. Ингибирование Notch1-сигнального пути, напротив, приводит к снижению пролиферации клеток [Patel J. et al., 2016]. В этой связи, объяснение полученным результатам мы видим в том, что в условиях введения блеомицина Notch1-сигнальная система участвует в дифференцировке VEGF⁺ эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза, способствует пролиферации эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла. При моделировании эмфиземы лёгких имеет место обратная закономерность.

Лиганды, контролирующие сигнальную систему Notch, весьма разнообразны. К примеру, лиганд DLL-4 принимает участие в ангиогенезе [Chessa D. et al., 2014]. Через DLL-4 осуществляется взаимовлияние Notch и VEGF сигнальных систем. Взаимодействие VEGF с рецептором VEGFR2 вызывает фосфорилирование своего внутриклеточного домена и активацию сигнального пути MAPK/ERK [Blanco R. et al., 2013], что приводит к индукции синтеза фактора транскрипции ERG и повышение транскрипции DLL-4. Взаимодействие лиганда DLL-4 с рецептором Notch1 способствует отщеплению внутриклеточного домена Notch1-рецептора при участии γ -секретазы и протеаз семейства ADAM. Домен транслоцируется в ядро, где меняет активность факторов транскрипции, что приводит к повышению экспрессии VEGFR2 и формированию двух типов эндотелиальных клеток: клетка «наконечника» и клетка «стебля» [Blanco R. et al., 2013]. Если клетки «наконечника» образуют филоподии и мигрируют под влиянием ангиогенных стимулов, то клетки «стебля» активно пролиферируют и это способствует удлинению сосуда.

С позиции необходимости разработки новых подходов регуляции VEGF⁺ эндотелиальных клеток в целях ускорения ангиогенеза при ИЛФ и ХОБЛ (эмфиземе лёгких) нами проведена серия экспериментов по оценке экспрессии молекул Notch1 на VEGF⁺ эндотелиальных клетках мышей при моделировании фиброза лёгких и эмфиземы лёгких. В ходе исследования в лёгких животных ПК со значительным разрушением микрососудистого русла (введение эластазы, эластазы и ДГГ) было обнаружено существенное увеличение количества Notch1⁺VEGF⁺ эндотелиальных клеток по сравнению с ИК (Таблица 16). Мы полагаем, что в таком случае в регенерацию эндотелия лёгких вовлекается Notch1-механизм стимуляции VEGF⁺ эндотелиальных клеток, реализующийся через рост и ветвление сосудов. При незначительном повреждении тканей лёгких (введение ЛПС и ЭТД) изменения числа эндотелиальных клеток, экспрессирующих маркеры Notch1 и VEGF, были не существенны (Таблица 16).

По реакции VEGF⁺Notch1⁺ эндотелиальных клеток модель фиброза легкого стоит отдельно в ряду изучаемых в настоящей работе легочных патологий. Как видно из результатов исследования, введение блеомицина уменьшало содержание VEGF⁺Notch1⁺ эндотелиальных клеток в лёгких (Таблица 16). Таким образом, у мышей с фиброзом лёгких механизм ангиогенеза, опосредованный взаимодействием VEGF и Notch1 сигналинга, не реализуется.

В период эмбрионального развития Notch1-сигнальный путь предопределяет станет ли стволовая клетка секреторной или реснитчатой клеткой [Guseh J. et al., 2009; Shi Y. et al., 2013]. В постнатальный период развития организма Notch1 сигналинг также регулирует деление предшественников бокаловидных клеток и выбор ими дифференцировки в сторону

реснитчатых или секреторных клеток [Gusch J. et al., 2009; Boucherat O. et al., 2012]. Нами не исключается участие Notch1 сигналинга в эпителиогенезе при заболеваниях лёгких. В этой связи мы оценили Notch1⁺ эпителиальные клетки при эмфиземе лёгких. В ходе проведенных экспериментов было показано, что введение эластазы, ЛПС и ЭТД, эластазы и ДГГ увеличивало число CD45⁺TER119⁺CD49f⁺Notch1⁺ эпителиальных прогениторных клеток в лёгких мышей по сравнению с ИК, что указывает на их дифференцировку в секреторные клетки (Таблица 17). В противоположность этому, блеомицин уменьшал количество CD45⁺TER119⁺CD49f⁺Notch1⁺ эпителиальных прогениторных клеток в лёгких мышей (Таблица 17). Как известно, блеомицин избирательно разрушает эпителиальные клетки и унипотентные предшественники эпителиальных клеток, в число которых входят эпителиальные прогениторные клетки (CD45⁺TER119⁺CD49f⁺). Вероятно, в условиях экспериментального фиброза лёгких, в первую очередь, необходимо восполнение поврежденных унипотентных предшественников.

Стволовые клетки лёгких более резистентны к действию токсических агентов, чем унипотентные предшественники эпителиальных клеток. Этим объясняется повышение содержания Notch1⁺ клеток в общей популяции стволовых клеток лёгких при действии повреждающих факторов (Таблица 17).

Таблица 17 – Сводная таблица результатов исследования реакции легочных МСК и предшественников эпителиальных клеток, экспрессирующих Notch1, мышей линии C57BL/6 при фиброзе лёгких и эмфиземе лёгких

Клетки/ иммунофенотип	Фиброз лёгких	Эмфизема лёгких, вызванная эластазой	Эмфизема лёгких, вызванная ЭТД	Эмфизема лёгких, вызванная ДГГ
Мезенхимальные стволовые клетки (CD45 ⁺ CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺)	–	+	–	+
Стволовые клетки лёгких (CD45 ⁺ CD117 ⁺)	–	0	–	–
Эпителиальные прогениторные клетки (CD45 ⁺ TER119 ⁺ CD49f ⁺)	–	+	0	+

Примечание – Символ + обозначает увеличение содержания стволовых клеток, – значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений.

В условиях введения блеомицина мы регистрировали уменьшение количества легочных Notch1⁺ МСК и Notch1⁺ фиброцитов немиелоидного происхождения, что, с нашей точки зрения, указывает на вовлечение Notch1 сигналинга в дифференцировку мезенхимальных клеток-предшественников в синтезирующие коллаген клетки (Таблица 17). При введении эластазы, эластазы и ДГГ, в первую очередь, необходимо восстановление обширных повреждений внеклеточного матрикса легочной ткани. Для этого требуется значительная популяция фибробластов. В этой связи увеличение Notch1⁺ клеток в популяции резидентных МСК, фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов закономерно и указывает на активацию Notch1-опосредованной пролиферации мезенхимальных клеток (Таблица 17). Как было уже выше сказано, в условиях введения ЛПС и ЭТД эмфизема лёгких менее выражена, чем при использовании эластазы или эластазы совместно с ДГГ. Было ожидаемо, что в условиях действия никотина, смол и других негативных факторов из всех предшественников мезенхимальных клеток Notch1-сигналинг поддерживал дифференцировку только резидентных МСК.

Таким образом, при моделировании эмфиземы и фиброза лёгких Notch1-сигналинг регулирует активность МСК и предшественников эпителиальных клеток. Мы обнаружили различия в реакции Notch1⁺ МСК и Notch1⁺ эпителиальных прогениторных клеток при эмфиземе и фиброзе лёгких, и эти данные поддерживают парадигму различий патогенеза ИЛФ и ХОБЛ на уровне Notch-сигналинга (Таблица 17). С другой стороны, независимо от моделированной патологии существует общий запрос на клетки альвеолярного эпителия, регенерация которых осуществляется с участием Notch1⁺ стволовых клеток лёгких.

Рецепторы к дофамину обнаружены на различных клетках лёгких [Ricci A. et al., 2006; Chakroborty D. et al., 2008]. Дофамин ингибирует ангиогенез у лабораторных животных с карциномой Льюис [Ноеррнер L.H. et al., 2015], усиливает апоптоз зрелых эндотелиальных клеток в лёгких и сокращает популяцию циркулирующих в крови эндотелиальных прогениторных клеток [Ноеррнер L.H. et al., 2015]. Негативные эффекты дофамина на клетки ангиогенеза реализуются через D₂-рецепторы. В литературе отмечается функциональная связь между D₂-рецепторами и VEGFR2, которая объясняется общим внутриклеточным эффектором тирозинфосфатазой-2 (SHP-2). Взаимодействие VEGF с рецептором VEGFR2 снижает ассоциацию последнего с D₂-рецептором на мембране эндотелиальной клетки [Helms M.N. et al., 2006] и индуцирует миграцию SHP-2 из цитоплазмы на мембрану клетки с образованием комплекса D₂-рецептор / VEGFR2 / SHP-2. Воздействие VEGF на рецептор VEGFR2 способствует диссоциации комплекса D₂-рецептор / VEGFR2. Дальнейшее фосфорилирование остатков тирозина в составе внутриклеточного домена рецептора VEGF приводит к пролиферации эндотелиальных клеток [Helms M.N. et al., 2006]. Предварительная обработка дофамином, согласно S. Sinha и соавт., увеличивает прочность ассоциации D₂-рецептора с рецептором VEGFR2, что нарушает фосфорилирование внутриклеточного домена VEGFR2 и приводит к угнетению VEGF опосредованного ангиогенеза [Sinha S. et al., 2009]. Нами не исключается, что блокада дофаминовых рецепторов может устранить негативные эффекты дофамина и ускорить регенерацию эндотелия лёгких при эмфиземе. В фармакологическом разделе диссертации мы оценили эффекты селективного антагониста дофаминовых D₂-рецепторов спиперона на модели эмфиземы лёгких, индуцированной ЛПС и ЭТД.

Блокада D₂-рецепторов спипероном снижает активность воспаления, препятствует разрушению межальвеолярных перегородок и уменьшает площадь эмфиземы в лёгких мышей, получавших ЛПС и ЭТД (опытная группа, ОГ) по сравнению с ПК (Рисунок 2). При этом число капилляров (в 2 раза), CD31⁺ клеток (в 2,37 раза) и пан-цитокератин⁺ клеток (на 29%) в лёгких и уровень α_1 -антитрипсина в сыворотке крови (на 20,7%) увеличивались.

Из представленных выше результатов мы сделали вывод о стимуляции спипероном регенерации эпителиальных и эндотелиальных клеток у животных в условиях введения ЛПС и ЭТД. Регенеративный эффект спиперона во многом обусловлен вазодилатацией: сосудистая реакция на блокаду дофаминовых рецепторов улучшает миграцию и трансэндотелиальный переход СК, о чём свидетельствовало увеличение содержания эндотелиальных прогениторных клеток, VEGF⁺ эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза в лёгких мышей ОГ по отношению к мышам ПК. Дополнительно в крови мышей ОГ увеличивалось число предшественников ангиогенеза в силу их мобилизации из костного мозга (Таблица 7).

В литературе указывают на взаимосвязь между Notch-сигналингом и VEGF-сигналингом [Fish J.E. et al., 2017; Kühn C., Chesa S., 2019]. Дофамин способствует ассоциации D₂-рецептора и VEGFR2. Возникающая ассоциация нарушает фосфорилирование внутриклеточного домена VEGFR2 и приводит к снижению активности ангиогенеза, опосредованного VEGF и Notch

[Sinha S. et al., 2009]. Возможно, что в условиях введения ЛПС и ЭТД ускорение регенерации сосудов спипероном обусловлен диссоциацией D₂-рецептора и VEGFR2 в результате чего наступает диссоциация Notch и VEGF и восстановление процесса фосфорилирования. Фосфорилирование остатков тирозина в составе внутриклеточного домена рецептора VEGF стимулирует дифференцировку VEGF⁺ эндотелиальных клеток. Косвенным подтверждением этой гипотезы выступало уменьшение числа незрелых VEGF⁺Notch1⁺ эндотелиальных клеток и повышение количества зрелых CD31⁺ клеток в лёгких мышей ОГ по сравнению с ПК (Таблица 16).

Дофаминовые D₂-рецепторы экспрессируются на мембране эндотелиальных прогениторных клеток [Helms M.N. et al., 2006]. Это предполагает прямое регуляторное влияние дофамина на эти клетки. Результаты наших экспериментов *in vitro* показали, что в первичной культуре CD31⁺ эндотелиальных клеток лёгких, полученных от мышей в условиях введения ЛПС и ЭТД, дофамин (10⁻⁷ М) оказывал стимулирующее действие на пролиферирующие CD31⁺CD34⁺CD146⁺Nectin2⁺ эндотелиальные прогениторные клетки (Таблица 18).

Таблица 18 – Влияние дофамина и спиперона (оба 10⁻⁷ М) на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в культуре эндотелиальных клеток, выделенных из лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях введения ЛПС и ЭТД на 45-е сутки эксперимента (% от общего числа моноклеаров) (M±m)

Группы	CD31 ⁺	CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD146 ⁺ Nectin ⁺
Клетки до культивирования	7,528±0,722	4,682±0,372
Клетки после культивирования	14,307±1,504 p ₃ <0,001	10,233±0,995 p ₃ <0,001
Клетки после культивирования со спипероном	15,111±1,304 p ₃ <0,001	11,101±1,083 p ₃ <0,001
Клетки после культивирования с дофамином	77,374±8,016 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	65,383±5,912 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001
Клетки после культивирования со спипероном и дофамином	14,829±1,213 p ₃ <0,001	11,142±1,097 p ₃ <0,001

Примечание – Здесь (и далее в Таблицах): p₃ – уровень статистической значимости различий относительно результатов до культивирования; p₄ – уровень статистической значимости различий относительно результатов после культивирования.

Предварительная обработка эндотелиальных прогениторных клеток спипероном снижала индуцированную дофамином пролиферацию (Таблица 18). Между тем, в экспериментах *in vivo* спиперон уменьшал количество Notch1⁺ эндотелиальных прогениторных клеток в лёгких мышей ОГ по сравнению с ПК. Вероятно, в условиях целостного организма, подверженного действию ЛПС и ЭТД, блокада D₂-рецепторов спипероном ингибирует опосредованную дофамином пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток, а через Notch-сигналинг способствует их дифференцировке.

В условиях введения эластазы или совместного введения эластазы и ДГГ спиперон оказывал противовоспалительное действие, сокращал площадь эмфиземы лёгких, стимулировал регенерацию, прежде всего, микрососудистого русла (Рисунок 2). При изучении резидентных и циркулирующих в крови незрелых эндотелиальных клеток выявлено, что в условиях введения эластазы или эластазы и ДГГ спиперон способствовал мобилизации незрелых эндотелиальных клеток в кровь (Таблица 8, 9). Однако в силу повреждения микрососудистой сети лёгких в ОГ

клеточная миграция была затруднена.

Выше нами представлены доказательства зависимости регенерации микроциркуляторной сет лёгких при введении ЛПС и ЭТД от дофаминовой системы и Notch1-сигналинга. В условиях введения эластазы и совместного введения эластазы и ДГГ спиперон также оказывал влияние на незрелые резидентные Notch1^+ клетки. Так, на модели эмфиземы, вызванной эластазой, спиперон уменьшал содержание эндотелиальных прогениторных клеток и VEGF^+ эндотелиальных клеток, экспрессирующих Notch1 , по сравнению с ПК (Таблица 16). При введении эластазы и ДГГ блокада D_2 -рецепторов повышала количество Notch1^+ эндотелиальных прогениторных клеток и уменьшала число Notch1^+ клеток в популяциях VEGF^+ эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза (Таблица 16).

Анализ представленных результатов указывает на то, что при эмфиземе лёгких, вызванной эластазой или эластазой и ДГГ, реализуется механизм действия спиперона, описанный в условиях введения ЛПС и ЭТД: спиперон, блокируя рецепторы дофамина, облегчает диссоциацию дофаминовых рецепторов и VEGFR2 , а также фосфорилирование последнего. Таким образом, устраняется ингибирующее действие дофамина на ангиогенез. Как видно, этот механизм является неспецифичным для всех моделей эмфиземы лёгких (Рисунок 3). Дополнительно при эмфиземе со значительным повреждением лёгких регенерация эндотелиальных клеток при блокаде дофаминовых рецепторов протекает за счет механизма активного ветвления сосудов, в этом процессе участвует вся фракция VEGF^+ эндотелиальных клеток. При этом дополнительно может реализоваться сценарий формирования «кончиковых» клеток с привлечением Notch1^+ эндотелиальных прогениторных клеток.

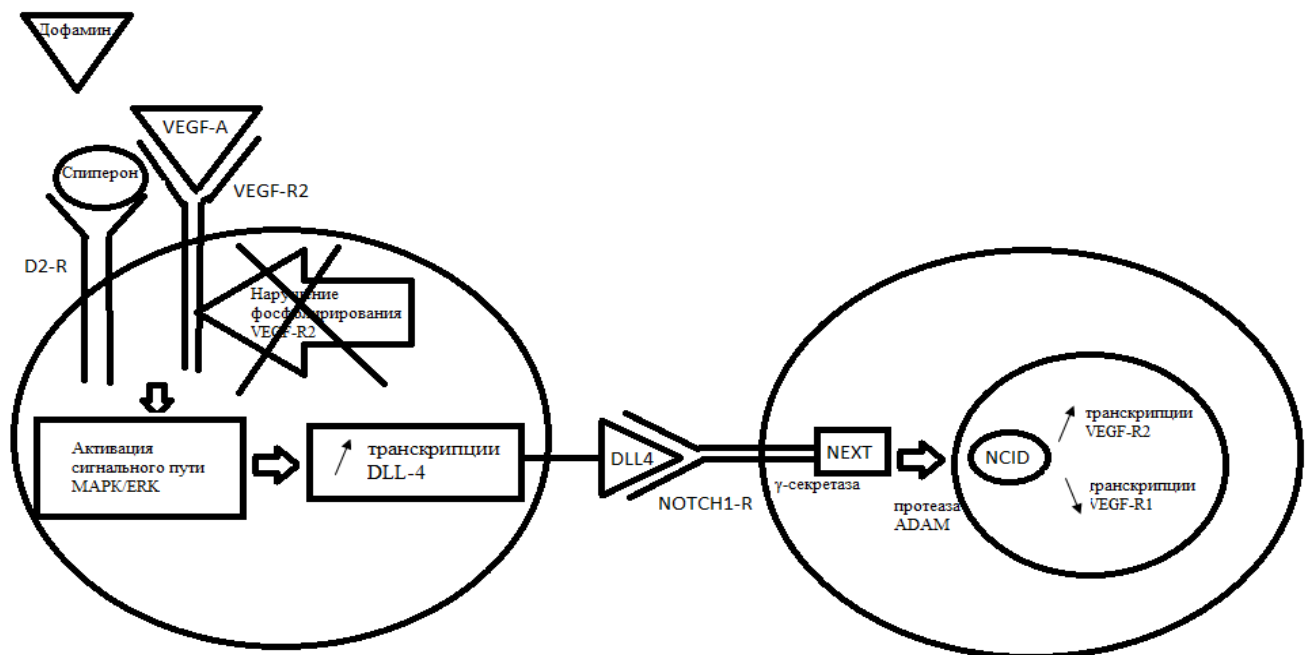


Рисунок 3 – Схема влияния спиперона на ангиогенез при эмфиземе лёгких. Спиперон устраняет ингибирующее действие дофамина на процесс фосфорилирования VEGF-R2 . Далее происходит активация сигнального пути MAPK/ERK , транскрипция DLL-4 и стимуляция ангиогенеза

На всех моделях эмфиземы спиперон не оказывал значительного влияния на предшественники мезенхимальных и эпителиальных клеток. Этот факт говорит об избирательной регуляции дофаминовой системы зрелых клеток эндотелия и их

предшественников.

Подводя итог исследованию действия спиперона при эмфиземе лёгких, можно сказать, что положительные эндотелиальные эффекты спиперона могут быть реализованы с помощью нескольких механизмов (Рисунок 4). Блокада дофаминовых D₂-рецепторов, во-первых, снижает интенсивность пролиферации и стимулирует дифференцировку предшественников эндотелиальных клеток. Во-вторых, уменьшает негативную активность дофамина в отношении VEGF и Notch сигнальной системы. В-третьих, вызывает вазодилатацию и так облегчает мобилизацию из костного мозга и миграцию в травмированный участок лёгкого предшественников эндотелиальных клеток. Следует отметить, что реализация представленных механизмов при введении спиперона во многом зависит от состояния микроциркуляторной сети. При незначительных повреждениях эндотелия в условиях введения ЛПС и ЭТД с большей долей вероятности можно говорить о мобилизации и миграции предшественников эндотелиальных клеток спипероном, а также ускорении ангиогенеза через VEGF и Notch сигналинг в их взаимодействии. Разрушение микрососудистой сети при введении эластазы или сочетании эластазы с ДГГ делает невозможным миграцию эндотелиальных прогениторных клеток при введении спиперона. В этих моделях эмфиземы ускорение ангиогенеза опосредовано сигнальными путями VEGF и Notch резидентных клеток (Рисунок 4).

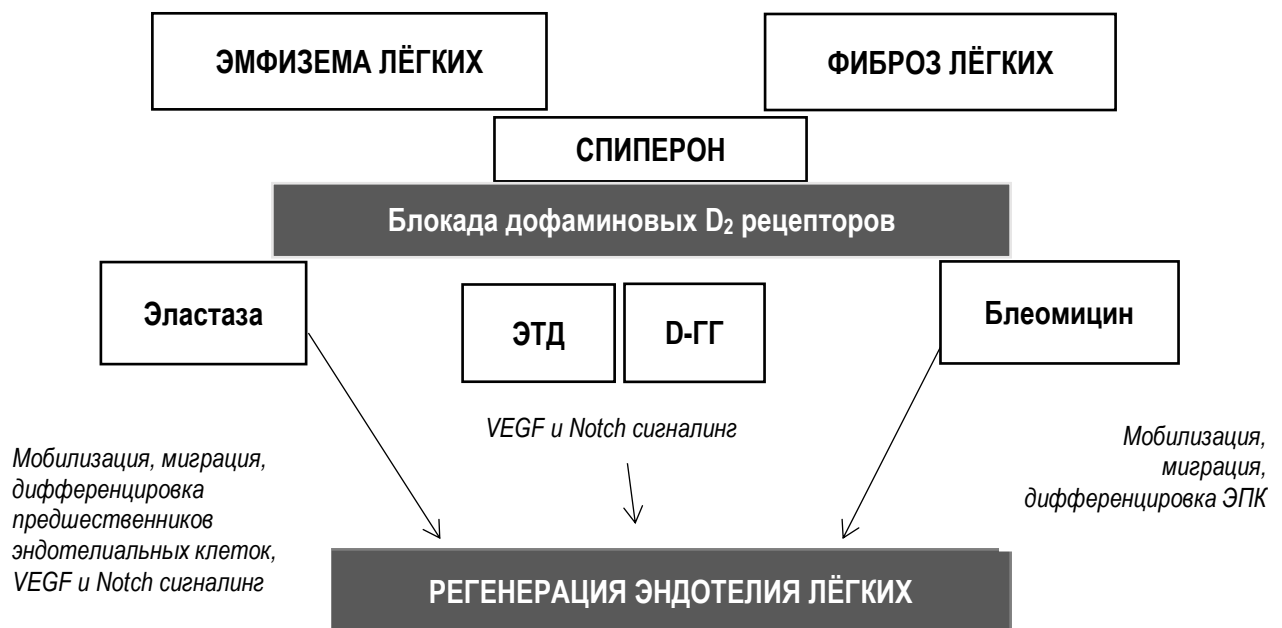


Рисунок 4 – Механизмы регенераторного эффекта спиперона при моделировании эмфиземы лёгких и фиброза лёгких. ЛПС и ЭТД – липополисахарид и экстракт табачного дыма, Д-ГГ – эластаза и D-галактозамин гидрохлорид, ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки

На модели фиброза лёгких спиперон также, как и при эмфиземе лёгких, демонстрировал положительные эффекты. По нашим данным, в условиях введения блеомицина спиперон препятствовал воспалительной инфильтрации, сокращал площадь соединительной ткани и увеличивал количество CD31⁺ клеток и пан-цитокератин⁺ клеток в лёгких мышей опытной группы (ОГ) по сравнению с ПК (Рисунок 1, Таблица 19). Если регенерация эндотелиальных клеток мы связываем с мигрирующими из костного мозга в лёгкие эндотелиальными прогениторными клетками микроциркуляторного русла (CD45⁻CD31⁺CD34⁺), то увеличение

числа клеток альвеолярного эпителия было связано с резидентными эпителиальными прекурсорами (CD45^{Ter119}CD49f⁺) (Таблица 19). Эти результаты позволяют рассматривать спиперон в качестве антифибротического и противовоспалительного агента, и средства, стимулирующего регенерацию эндотелия и эпителия при фиброзе лёгких.

Таблица 19 – Влияние кетансерина и спиперона на относительное содержание (% окрашенных клеток от общего количества клеток лёгких) и интенсивность окрашивания специфических маркеров (УЕ) в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Маркер	% окрашенных клеток	Интенсивность окрашивания
Интактный контроль		
CD31	$27,5 \pm 2,5$	$2,375 \pm 0,18$
AE1 / AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$83,67 \pm 1,453$	$2,13 \pm 0,033$
Фиброз лёгких		
CD31	$12,91 \pm 1,89$ $p_1=0,005$	$1,14 \pm 0,12$ $p_1=0,007$
AE1 / AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$68,16 \pm 1,44$ $p_1=0,012$	$1,67 \pm 1,51$ $p_1=0,045$
Фиброз лёгких в условиях введения кетансерина		
CD31	$25,6 \pm 1,91$ $p_2=0,009$	$1,93 \pm 0,18$ $p_2=0,021$
AE1 / AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$81,3 \pm 1,42$ $p_2=0,015$	$2,11 \pm 0,21$ $p_2=0,045$
Фиброз лёгких в условиях введения спиперона		
CD31	$31,4 \pm 2,21$ $p_2=0,009$	$2,12 \pm 0,25$ $p_2=0,004$
AE1 / AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$80,5 \pm 1,31$ $p_2=0,013$	$2,04 \pm 0,17$ $p_2=0,041$

Изучая реакцию предшественников мезенхимальных клеток на введение спиперона при моделировании фиброза лёгких, мы обнаружили высокое содержания МСК в лёгких мышей ОГ, как и в группе ПК, при этом число резидентных фиброцитов было больше, чем в ПК (Таблица 20). Эти эффекты спиперона мы связываем с повышением миграционной активности клеток и вазодилатацией. Можно было бы предположить, что дополнительный прирост клеток мезенхимального ряда вызовет усиление фиброза. Однако этого не наблюдалось. Результаты исследований *in vitro* показали снижение клональной активности, потенциала к самоподдержанию, дифференцировки в остеогенном, адипогенном, хондрогенном и фибробластном направлении мезенхимальных клеток (Таблица 4).

Таким образом, в условиях введения блеомицина в основе антифибротического эффекта спиперона лежит уменьшение функциональной активности мезенхимальных клеток.

Таблица 20 – Влияние кетансерина и спиперона на содержание МСК и фиброцитов в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях фиброза лёгких, вызванного блеомицином, на 21-е сутки исследования (% от всех окрашенных мононуклеаров) ($M \pm m$)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Фиброз лёгких	Фиброз лёгких в условиях введения кетансерина	Фиброз лёгких в условиях введения спиперона
Мезенхимальные стволовые клетки / CD45 ⁺ CD73 ⁺ CD106 ⁺	$0,4 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,11$ $p_1=0,032$	$6,2 \pm 0,6$ $p_1<0,001$ $p_2<0,001$	$1,0 \pm 0,080$ $p_1=0,032$
Фиброциты миелоидного происхождения / CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁺	$2,761 \pm 0,189$	$1,919 \pm 0,115$ $p_1=0,029$	$2,523 \pm 0,156$ $p_2=0,033$	$3,982 \pm 0,289$ $p_1=0,028$ $p_2=0,032$
Фиброциты немиелоидного происхождения / CD31 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁺	$13,146 \pm 1,117$	$13,662 \pm 1,035$	$9,299 \pm 0,845$ $p_1=0,029$ $p_2=0,031$	$10,078 \pm 0,972$ $p_2=0,039$

При поиске потенциальных антифибротических молекул для терапии ИЛФ мы обратили своё внимание на серотонин. Серотонин участвует в продукции цитокинов, клеточной миграции и пролиферации [Hoyer D. et al., 2002]. Известно, что блеомицин увеличивает концентрацию серотонина в интерстиции лёгких и своего максимума она достигает в сроки наибольшей инфильтрации очага повреждения клетками воспаления и фибробластами, повышает экспрессию рецепторов серотонина 5-HT_{2A} и 5-HT_{2B} фибробластами [Hoyer D. et al., 2002; Bell H.K. et al., 2005; Fabre A. et al., 2008]. Серотонин *in vitro* оказывает митогенное действие на фибробласты легочных артерий от крыс, подвергнутых гипоксии [Welsh D.J. et al., 2004]. Блокатор 5-HT₂ рецепторов кетансерин и блокатор 5-HT_{2B} рецепторов SB215505 существенно снижают содержание коллагена и проколлагена I и экспрессию мРНК проколлагена 3 в пораженных блеомицином лёгких животных [Fabre A. et al., 2008]. При этом уменьшается уровень таких ключевых молекул фиброза как TGF- β 1, CTGF и PAI-1. В связи с этим нами выдвинуто предположение, что регуляцией серотонинового звена патогенеза фиброза возможно влиять на фиброз лёгкого.

Проведенные эксперименты позволили выявить ряд положительных эффектов блокатора 5-HT₂ рецепторов кетансерина в условиях введения блеомицина: во-первых, снижение уровня ИЛ-1 β , ФНО- α , TGF- β в сыворотке крови и ИЛ-1 β , TGF- β в гомогенатах лёгких, во-вторых, нарушение инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления, в-третьих, уменьшение уровня гиалуроновой кислоты, общего коллагена и гидроксипролина в гомогенатах лёгких и сокращение площади соединительной ткани в лёгких (Рисунок 1). Кроме этого, наблюдалось увеличение экспрессии эндотелиального CD31 и эпителиального панцитокератина на препаратах лёгких мышей ОГ по сравнению с ПК (Таблица 21).

Таблица 21 – Влияние кетансерина и спиперона на относительное содержание (% окрашенных клеток от общего количества клеток лёгких) и интенсивность окрашивания специфических маркеров (УЕ) в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях эмфиземы лёгких, вызванной ЛПС и ЭТД, на 45-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Маркер	% окрашенных клеток	Интенсивность окрашивания
Интактный контроль		
CD31	$17,66 \pm 0,88$	$1,76 \pm 0,03$
AE1/AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$81,33 \pm 1,37$	$1,93 \pm 0,05$
Эмфизема лёгких, вызванная ЛПС и ЭТД		
CD31	$12,33 \pm 1,33$ $p_1=0,023$	$1,33 \pm 0,12$
AE1/AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$55,00 \pm 1,34$ $p_1=0,013$	$1,67 \pm 0,07$
Эмфизема лёгких, вызванная ЛПС и ЭТД, в условиях введения кетансерина		
CD31	$24,14 \pm 1,43$ $p_2=0,011$	$1,77 \pm 0,09$
AE1/AE3 (пан-цитокератин) в альвеолах	$79,32 \pm 0,64$ $p_2=0,015$	$1,88 \pm 0,12$

Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что в условиях введения блеомицина нарушение кетансерином серотонинового механизма продукции медиаторов воспаления и фиброза, формирования гиалуринового матрикса вызывает регенерацию эпителиальных и эндотелиальных клеток.

Другой важный аспект антифибротического действия кетансерина мы связываем с мезенхимальными предшественниками. В условиях введения блеомицина кетансерин нарушал рекрутирование из костного мозга в лёгкие фиброцитов немиелоидного происхождения, при этом наблюдалась дополнительная миграция МСК ($CD45^-CD31^-CD34^-CD73^+$) и фиброцитов миелоидного происхождения из костного мозга в лёгкие (21-е сутки) (Таблица 20). Однако *in vitro* МСК ($CD45^-CD31^-CD34^-CD73^+$), выделенные из лёгких мышей с фиброзом лёгких и получавших кетансерин, демонстрировали низкие темпы формирования монослоя клеток с фибробластоподобной морфологией по сравнению с ПК. С другой стороны, для этих МСК было характерно снижением хондрогенной и фибробластной дифференцировки.

При изучении клональной активности (КОЕ-Ф) фибробластных прогениторных клеток *in vitro* было обнаружено снижение количества КОЕ-Ф в культуре фибробластных прогениторных клеток лёгких мышей ОГ по сравнению с ПК (14, 21-е сутки) (Таблица 4).

Таким образом, в условиях введения блеомицина кетансерин нарушает рекрутирование в лёгкие немиелоидных фиброцитов и оказывает ингибирующее действие на функциональную активность МСК и фибробластных прогениторных клеток. С нашей точки зрения, эти механизмы действия одновременно с разрушением профибротического гиалуринового матрикса лёгких выступают основой антифибротических эффектов антисеротонинового препарата кетансерина.

Выявленное повышение экспрессии CD31 и пан-цитокератина в лёгких при введении кетансерина продиктовало проведение серии экспериментов, направленной на изучение в этих условиях предшественников эндотелиальных и эпителиальных клеток. Так, по нашим данным кетансерин уменьшал количество эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла ($CD45^-CD31^+CD34^+$) в костном мозге, крови и лёгких, что трактуется как нарушение

мобилизации и миграции. Как видно, результаты цитофлуометрических исследований $CD31^+$ предшественников находятся в противоречии с результатами иммуногистохимических исследований $CD31^+$ зрелых клеток. В этих условиях восстановление эндотелиальных клеток происходит за счёт дифференцировки резидентных эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла и зрелых эндотелиальных клеток.

В условиях введения блеомицина кетансерин не оказывал влияния на костномозговые и циркулирующие в крови мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$) и эпителиальные прогениторные клетки ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) в ОГ по сравнению с ПК. При этом в лёгких число клеток с фенотипом $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$ уменьшалось, а количество клеток с фенотипом $CD45^-TER119^-CD49f^+$, напротив, – увеличивалось. Полученные данные указывают, что при фиброзе лёгких кетансерин нарушает мобилизацию и миграцию мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток, но рекрутирует эпителиальные прогениторные клетки в лёгкие.

Итак, на модели фиброза лёгких мы не получили подтверждения зависимости мобилизации из костного мозга в кровь и миграции в фиброзированные лёгкие эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла ($CD45^-CD31^+CD34^+$), мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток ($CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$) и эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) от серотониновой системы. В тоже время снижение активности серотониновой системы кетансерином положительно сказывается на активности резидентных эпителиальных прогениторных клеток ($CD45^-TER119^-CD49f^+$) и резидентных прогениторных клеток микрососудистого русла ($CD45^-CD31^+CD34^+$).

На рисунке 5 представлены эффекты и механизмы действия кетансерина при индуцированном блеомицином фиброзе лёгких. По известным данным Fabre A. et al. (2008) кетансерин блокирует опосредованную серотонином продукцию $TGF-\beta$ в лёгких и синтез коллагена фибробластами. В настоящей работе продемонстрировано, что кетансерин нарушает миграцию предшественников мезенхимальных клеток в лёгкие, подавляет пролиферацию и дифференцировку резидентных (лёгкие) МСК в клетки стромальных линий (в том числе в фибробласты), возможно, усиливает дифференцировку МСК в эпителиальные клетки (мезенхимально-эпителиальный переход). В этих условиях в регенерацию эпителиальных и эндотелиальных клеток вовлекаются резидентные эпителиальные прогениторные клетки и эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла.

Известно, что серотонин участвует в вазоконстрикции [Nishihira K. Yamashita A., Tanaka N., 2006; Kekewska A., Gornemann T., Jantschak F., 2012]. Его относят к основному медиатору начала нарушения микроциркуляции в очаге воспаления и быстрого повышения сосудистой проницаемости. Вазоконстрикторное действие серотонина обусловлено его взаимодействием с $5-HT_2$ рецепторами мембран гладкомышечных клеток [Машковский М.Д., 2006; Венгеровский А.И., 2007]. Вазоконстрикторный эффект серотонина может быть частично обусловлен тромбоксаном A_2 , который высвобождается при агрегации лейкоцитов и тромбоцитов в участках сосуда с поврежденным эндотелием. Механизмом усиления сосудистого спазма под действием тромбоксанов служит активация $5-HT_2R$ серотониновых рецепторов на поверхности тромбоцитов. Учитывая это, не исключено, что в условиях введения блеомицина кетансерин может частично купировать вазоконстрикторное действие серотонина, а расширение сосудов микроциркуляторного русла и снижение давления в капиллярах привести к снижению инфильтрации лёгких клетками воспаления и уменьшению трансудации жидкости во внесосудистое легочное пространство соответственно. Возможно, что так кетансерин нарушает

миграцию предшественников клеток эндотелия и эпителия, и мезенхимальных клеток.

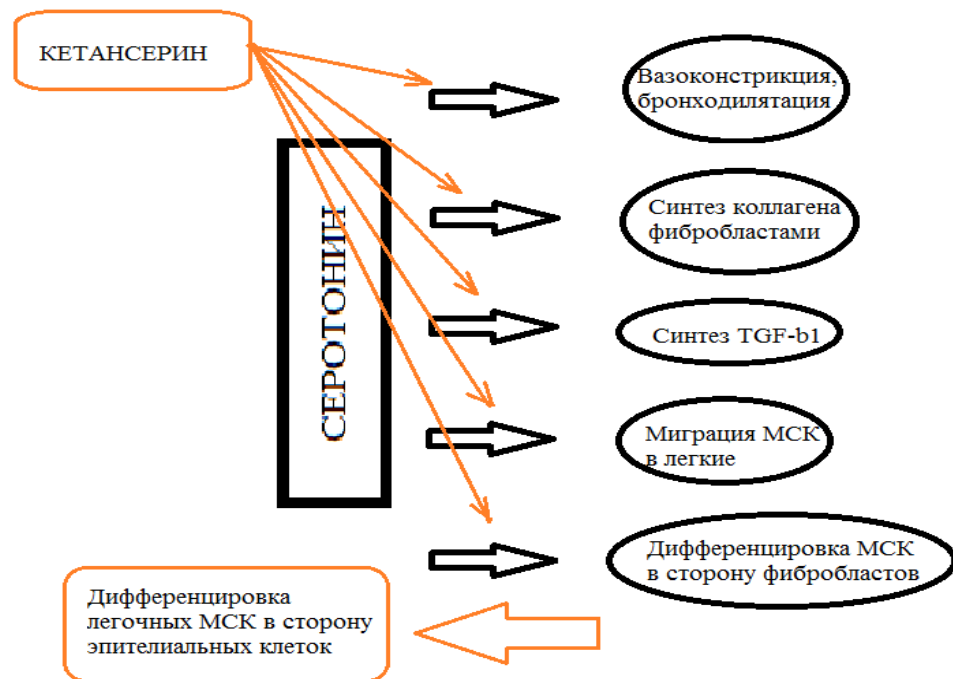


Рисунок 5 – Механизмы антифибротического действия кетансерина при фиброзе лёгких

В заключении настоящей работы нами была изучена роль серотонина в регуляции эпителиальных и эндотелиальных предшественников при эмфиземе лёгких различной этиологии. На первом этапе мы провели оценку незрелых клеток ангиогенеза на моделях эмфиземы, характеризующихся значительным разрушением микроциркуляторной сети лёгких. Так, в условиях введения эластазы кетансерин не оказывал влияние на эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла, предшественники ангиогенеза и VEGF⁺ эндотелиальные клетки в крови и лёгких у мышей ОГ по сравнению с мышами ПК (Таблица 9). При моделировании эмфиземы лёгких эластазой и ДГГ кетансерин сокращал фракцию резидентных предшественников ангиогенеза и VEGF⁺ эндотелиальных клеток в ОГ относительно ПК, при этом их число в крови, напротив, повышалось (Таблица 8). При незначительных нарушениях эндотелия в условиях введения ЛПС и ЭТД кетансерин способствовал избирательному накоплению предшественников ангиогенеза и VEGF⁺ эндотелиальных клеток в лёгких, при этом в крови их число уменьшалось (Таблица 7).

Таким образом, при эмфиземе лёгких различной этиологии имеет место ингибирующее действие серотонина на процессы мобилизации, миграции и рекрутирования в лёгкие предшественников эндотелиальных клеток. Частичное восстановление этих процессов кетансерином наблюдается при незначительных повреждениях структурной целостности микрососудов лёгких в случае введения ЛПС и ЭТД.

При моделировании эмфиземы эластазой или совместным введением эластазы и ДГГ мы не выявили изменений в содержании стволовых клеток лёгких и CD45⁺TER119⁺CD49f⁺ эпителиальных прогениторных клеток в лёгочной ткани мышей ОГ по отношению к ПК (Таблица 12, 14). Исключение составили резидентные мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки (CD326^{hi}CD49f⁺CD45⁻), содержание которых возрастало. При такой положительной реакции мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток на кетансерин

ни в одной из рассматриваемых моделей эмфиземы значительного прироста экспрессии пан-цитокератина в альвеолах не отмечалось. Отсутствие дифференцировки предшественников эпителиальных клеток мы связываем с возможным ингибирующим влиянием на этот процесс гуморальных факторов воспаления и других аминов, в том числе дофамина.

В противоположность представленным выше результатам, при введении ЛПС и ЭТД кетансерин увеличивал не только число резидентных мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток, но и количество пан-цитокератин положительных клеток в альвеолах (Таблица 13, 21). Таким образом, на модели эмфиземы, вызванной ЛПС и ЭТД, блокадой серотониновых рецепторов достигалась дифференцировка $CD326^{hi}CD49f^{+}CD45^{-}$ клеток в зрелые эпителиальные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сравнительном аспекте у мышей линии C57BL/6 в условиях экспериментального фиброза лёгких и эмфиземы лёгких были изучены СК и прогениторные клетки лёгких, костного мозга и крови (МСК, фибробластные прогениторные клетки, фиброциты, эндотелиальные прогениторные клетки, $VEGF^{+}$ эндотелиальные клетки, предшественники ангиогенеза, стволовые клетки лёгких, эпителиальные прогениторные клетки), а также сосудистые гладкомышечные клетки, клетки просвета зарождающегося сосуда, перициты и клетки воспаления.

Продемонстрирована общая реакция мезенхимальных клеток предшественников на моделирование фиброза лёгких и эмфиземы лёгких – активация. Если в условиях введения блеомицина эти клетки выступают как патогенетический фактор, то при введении эластазы, D-галактозамин гидрохлорида и эластазы, ЛПС и ЭТД участвуют в восстановлении эластинового и коллагенового матрикса.

Показано, что при фиброзе лёгких и эмфиземе лёгких гуморальные факторы воспаления оказывают ингибирующее действие на резидентные (лёгкие) предшественники эндотелиальных и эпителиальных клеток и таким образом препятствуют регенерации лёгких. Состояние микрососудистого русла во многом определяет темпы регенерации лёгких: при сохранении его целостности или незначительных повреждениях (введение ЛПС и ЭТД или D-галактозамин гидрохлорида и эластазы) имеет место мобилизация из костного мозга в кровь и миграция в поврежденную ткань СК; в случае значительного повреждения эндотелия (введение блеомицина и эластазы) наблюдается снижение активности процессов.

Получены результаты, которые указывают на целесообразность использования Notch1-сигнального пути и стволовых клеток в клинической практике в качестве диагностических и прогностических маркеров ИЛФ, эмфиземы лёгких и ХОБЛ, а также мишеней для фармакологической стимуляции регенерации поврежденных и утраченных клеток лёгких.

Предложен новый подход ускорения регенерации эндотелиальных и эпителиальных клеток при эмфиземе лёгких и фиброзе лёгких у животных, основанный на блокаде D_2 -дофаминовых рецепторов. Патогенетически обоснована необходимость нарушения серотонинового механизма формирования профибротического гиалуринового матрикса, продукции медиаторов воспаления и фиброза, синтеза и отложения коллагеновых масс в лёгких, регуляции мезенхимальных предшественников в целях коррекции фиброза лёгких и ускорения регенерации.

ВЫВОДЫ

1. Показано участие костномозговых, циркулирующих в крови и резидентных (лёгкие) стволовых и прогениторных клеток в развитии экспериментального фиброза и эмфиземы лёгких. Гуморальные факторы воспаления, микроциркуляторное русло, Notch1 сигнальный путь, дофаминовая и серотониновая системы определяют характер патологической регенерации с участием стволовых и прогениторных клеток при фиброзе и эмфиземе лёгких.

2. Введение блеомицина вызывает миграцию в лёгкие костномозговых прогениторных фибробластных клеток, пролиферацию и дифференцировку в фибробласты и хондроциты резидентных МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), секрецию профибротического TGF-1 β резидентными эпителиальными прогениторными клетками (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺), что приводит к фиброзу лёгких.

3. В условиях введения блеомицина гуморальные факторы воспаления (ФНО- α и ИЛ-1 β) оказывают ингибирующее действие на рекрутируемые в лёгкие эндотелиальные прогениторные клетки (CD45⁻CD31⁺CD34⁺CD73⁻CD90⁻; CD45⁻CD31⁺CD34⁺), предшественники ангиогенеза и резидентные стволовые клетки лёгких (CD45⁻CD117⁺), что нарушает репаративную регенерацию поврежденных и утраченных клеток альвеолярного эпителия и эндотелия.

4. В основе снижения активности регенерации легочной ткани при эмфиземе, вызванной эластазой, лежит нарушение миграции костномозговых и циркулирующих в крови эндотелиальных прогениторных клеток к поврежденным альвеолам в силу разрушения микроциркуляторного русла лёгких, а также уменьшение числа резидентных мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток (CD326^{hi}CD49f⁺CD45⁻). При этом увеличивается количество резидентных фибробластных прогениторных клеток и МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), способствующих восстановлению коллагенового и эластинового каркаса лёгких.

5. Введение D-галактозамин гидрохлорида и эластазы рекрутирует костномозговые предшественники ангиогенеза и циркулирующие в крови VEGF⁺ эндотелиальные клетки в лёгкие, увеличивает содержание резидентных эндотелиальных прогениторных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺), МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), стволовых клеток лёгких, эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺, CD45⁻TER119⁻CD49f⁺CD326⁺) и мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток. Эти изменения не приводят к регенерации альвеол, коллагенового и эластинового матрикса.

6. Введение ЛПС и экстракта табачного дыма увеличивает количество пролиферирующих Nectin2⁺ клеток в популяции фиброцитов миелоидного происхождения, эндотелиальных прогениторных клеток (CD31⁺CD34⁺CD146⁺), предшественников ангиогенеза и незрелых эпителиальных клеток (CD326^{hi}CD49f⁺CD45⁻, CD45⁻TER119⁻CD49f⁺CD326⁺, CD326⁺CD45⁻CD49f⁺). В этих условиях низкая активность регенерации альвеол и внеклеточного матрикса вызвана воспалением (ФНО- α и ИЛ-1 β), дефицитом фиброцитов немиелоидного происхождения, перицитов, клеток просвета зарождающего сосуда и сосудистых гладкомышечных клеток в лёгких.

7. Моделирование фиброза лёгких блеомицином уменьшает число резидентных Notch1⁺VEGF⁺ эндотелиальных клеток и Notch1⁺ предшественников ангиогенеза, и увеличивает количество эндотелиальных прогениторных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺). Реакция этих клеток на введение эластазы, D-галактозамин гидрохлорида и эластазы противоположная.

8. На всех моделях эмфиземы лёгких выявлено увеличение количества Notch1⁺ клеток в популяции резидентных МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), прогениторных фибробластных

клеток и фиброцитов: наиболее выраженные изменения наблюдаются при значительных повреждениях внеклеточного матрикса (эластаза, D-галактозамин гидрохлорид и эластаза). При фиброзе лёгких, напротив, отмечается уменьшение числа МСК и немиелоидных фиброцитов, экспрессирующих Notch1.

9. Введение блеомицина уменьшает содержание Notch1⁺ клеток во фракции резидентных стволовых клеток лёгких и эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺). Моделирование эмфиземы лёгких приводит к снижению числа Notch1⁺ стволовых клеток лёгких и увеличению количества Notch1⁺ эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺).

10. При моделировании эмфиземы лёгких эластазой, D-галактозамин гидрохлоридом и эластазой, ЛПС и экстрактом табачного дыма фармакологическая блокада D₂-дофаминовых рецепторов спипероном оказывает противовоспалительное действие и уменьшает площадь эмфиземы.

11. При незначительном повреждении микроциркуляторного русла (ЛПС и экстракт табачного дыма) спиперон вызывает миграцию эндотелиальных прогениторных клеток, VEGF⁺ клеток и предшественников ангиогенеза в лёгкие, повышает содержание резидентных эпителиальных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻CD49f⁺), и таким образом ускоряет регенерацию клеток альвеолярного эпителия и эндотелия. При нарушении рекрутирования стволовых клеток эндотелия из костного мозга и крови (эластаза, D-галактозамин гидрохлорид и эластаза) регенерация лёгких при введении спиперона осуществляется за счет резидентных стволовых клеток эндотелия и эпителия.

12. При фиброзе лёгких применение спиперона препятствует воспалительной инфильтрации, сокращает площадь соединительной ткани и увеличивает количество эндотелиальных и эпителиальных клеток в лёгких. В этих условиях в процессы регенерации вовлекаются костномозговые эндотелиальные прогениторные клетки (CD45⁻CD31⁺CD34⁺) и резидентные эпителиальные прекурсоры (CD45⁻Ter119⁻CD49f⁺), противофибротический эффект вызван снижением активности мезенхимальных клеток.

13. Применение спиперона *in vitro* отменяет индуцированную дофамином стимуляцию пролиферации CD31⁺CD34⁺CD146⁺Nectin2⁺ эндотелиальных прогениторных клеток лёгких, полученных от мышей в условиях введения ЛПС и экстракта табачного дыма.

14. При введении блеомицина блокада С₂-серотониновых рецепторов кетансерином уменьшает уровень медиаторов воспаления (ИЛ-1β и TGF-β), активность хондрогенной и фибробластной дифференцировки резидентных МСК (CD45⁻CD31⁻CD34⁻CD73⁺CD90⁺), колониобразование прогениторных фибробластных клеток, разрушает профибротический гиалуроновый матрикс. В этих условиях сокращается площадь соединительной ткани и увеличивается число клеток эпителия и эндотелия в лёгких.

15. На всех моделях эмфиземы лёгких применение кетансерина увеличивает количество резидентных CD326^{hi}CD49f⁺CD45⁻ мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток. При введении ЛПС и экстракта табачного дыма, D-галактозамин гидрохлорида и эластазы блокатор С₂-серотониновых рецепторов дополнительно рекрутирует в лёгкие предшественники ангиогенеза и VEGF⁺ эндотелиальные клетки крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Дыгай, А.М. Реакции системы крови и стволовых клеток в условиях блеомициновой модели фиброза лёгких / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, Т.В. Андреева, Л.А. Ермолаева, Е.С. Хмелевская, О.В. Першина, **В.А. Крупин**, А.М. Резцова, И.Э. Степанова, В.Е. Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 8. – С. 132 – 136 (в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science: Dygai, A.M. Reactions of the blood system and stem cells in bleomycin-induced model of lung fibrosis / A.M. Dygai, E.G. Skurikhin, T.V. Andreeva, L.A. Ermolaeva, E.S. Khmelevskaya, O.V. Pershina, **V.A. Krupin**, A.M. Reztsova, I.E. Stepanova, V.E. Goldberg // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2011. – Т. 152, № 2. – С. 173 – 176).
2. Дыгай, А.М. Противофибротическая и противовоспалительная активность нейролептика при пневмофиброзе / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, Т.В. Андреева, О.В. Першина, Л.А. Ермолаева, Е.С. Хмелевская, **В.А. Крупин**, А.М. Резцова, И.Э. Степанова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 12. – С. 618 – 622 (в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science: Dygai, A.M. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of a neuroleptic drug on the model of pulmonary fibrosis / A.M. Dygai, E.G. Skurikhin, T.V. Andreeva, O.V. Pershina, L.A. Ermolaeva, E.S. Khmelevskaya, **V.A. Krupin**, A.M. Reztsova, I.E. Stepanova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2012. – Т. 152, № 6. – С. 679 – 683).
3. Скурихин, Е.Г. Влияние антисеротонинового препарата на развитие фиброза лёгких и систему крови при интратрахеальном введении блеомицина / Е.Г. Скурихин, Т.В. Андреева, Е.С. Хмелевская, Л.А. Ермолаева, О.В. Першина, **В.А. Крупин**, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, И.Э. Степанова, В.Е. Гольдберг, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 206 – 210 (в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science: Skurikhin, E.G. Effect of antiserotonin drug on the development of lung fibrosis and blood system reactions after intratracheal administration of bleomycin // E.G. Skurikhin, T.V. Andreeva, E.S. Khmelevskaya, L.A. Ermolaeva, O.V. Pershina, **V.A. Krupin**, N.N. Ermakova, A.M. Reztsova, I.E. Stepanova, V.E. Gol'Dberg, A.M. Dygai // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2012. – Т. 152, № 4. – С. 519 – 523).
4. Скурихин, Е.Г. Дифференцировка мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток лёгких при пневмофиброзе / Е.Г. Скурихин, Е.С. Хмелевская, О.В. Першина, Н.Н. Ермакова, **В.А. Крупин**, А.М. Резцова, Л.А. Ермолаева, В.Д. Якушина, И.Э. Степанова, В.М. Резцова, Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 4. – С. 192 – 199 (в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science: Skurikhin, E.G. Differentiation of mesenchymal multipotent stromal cells of the lungs in pneumofibrosis / E.G. Skurikhin, E.S. Khmelevskaya, O.V. Pershina, N.N. Ermakova, **V.A. Krupin**, A.M. Reztsova, L.A. Ermolaeva, V.D. Yakushina, I.E. Stepanova, V.M. Reztsova, N.V. Cherdyntseva, M.N. Stakheeva, A.M. Dygai // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – Т. 154, № 4. – С. 537 – 543).
5. Дыгай, А.М. Стволовые и прогениторные клетки в патогенезе пневмофиброза / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, О.В. Першина, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, **В.А. Крупин**, В.М. Резцова, И.Э. Степанова // Патогенез. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 36 – 52.

6. Скурихин, Е.Г. Противовоспалительный и антифибротический эффекты спиперона и иммобилизированной гиалуронидазы при совместном введении на моделях токсического частично обратимого и необратимого пневмофиброза / Е.Г. Скурихин, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, О.В. Першина, Е.С. Хмелевская, **В.А. Крупин**, И.Э. Степанова, В.М. Резцова, Д.В. Рейхард, А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, П.Г. Мадонов, Д.Н. Киншт, В.Е. Гольдберг, А.М. Дыгай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 7. – С. 64 – 70 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Skurikhin, E.G. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of a combination of spiperone and immobilized hyaluronidase on partially reversible and irreversible toxic pneumofibrosis / E.G. Skurikhin, N.N. Ermakova, A.M. Reztsova, O.V. Pershina, E.S. Khmelevskaya, **V.A. Krupin**, I.E. Stepanova, V.M. Reztsova, D.V. Reihard, V.E. Goldberg, A.M. Dygai, A.V. Artamonov, A.A. Bekarev, P.G. Madonov, D.N. Kinsht // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – Т. 156, № 1. – С. 53 – 58).

7. Скурихин, Е.Г. Влияние спиперона на мезенхимальные мультипотентные стромальные и гемопоэтические стволовые клетки в условиях пневмофиброза / Е.Г. Скурихин, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, О.В. Першина, А.М. Резцова, **В.А. Крупин**, И.Э. Степанова, В.М. Резцова, Д.В. Рейхард, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 1. – С. 19 – 24 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Skurikhin, E.G. Effect of spiperone on mesenchymal multipotent stromal and hemopoietic stem cells under conditions of pulmonary fibrosis / E.G. Skurikhin, E.S. Khmelevskaya, N.N. Ermakova, O.V. Pershina, A.M. Reztsova, **V.A. Krupin**, I.E. Stepanova, V.M. Reztsova, D.V. Reikhart, A.M. Dygai // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Т. 157, № 1. – С. 132 – 137).

8. Дыгай, А.М. Реакция гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на введение кетансерина при пневмофиброзе / А.М. Дыгай., Е.Г. Скурихин, О.В. Першина, И.Э. Степанова, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, **В.А. Крупин**, Д.В. Рейхарт, В.Е. Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158, № 7. – С. 25 – 30 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Dygai, A.M. Response of hemopoietic, progenitor, and multipotent mesenchymal stromal cells to administration of ketanserin during pulmonary fibrosis / A.M. Dygai, E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, I.E. Stepanova, E.S. Khmelevskaya, N.N. Ermakova, A.M. Reztsova, **V.A. Krupin**, D.V. Reikhart, V.E. Goldberg // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Т. 158, № 1. – С. 21 – 26).

9. Skurikhin, E.G. Modulation of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis by Pegylated Hyaluronidase and Dopamine Receptor Antagonist in Mice / E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, A.M. Reztsova, N.N. Ermakova, E.S. Khmelevskaya, **V.A. Krupin**, I.E. Stepanova, A.V. Artamonov, A.A. Bekarev, P.G. Madonov, A.M. Dygai // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10(4): e0125065.

10. Скурихин, Е.Г. Реакция медиаторов воспаления, белков внеклеточного матрикса, стволовых и прогениторных клеток на эмфизему лёгких / Е.Г. Скурихин, А.В. Пахомова, **В.А. Крупин**, О.В. Першина, Э.С. Пан, Л.А. Ермолаева, О.Е. Ваизова, О.Ю. Рыбалкина, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 2. – С. 85 – 90 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Skurikhin, E.G. Response of inflammatory mediators, extracellular matrix proteins and stem and progenitor cells to emphysema / E.G. Skurikhin, A.V. Pakhomova, **V.A. Krupin**, O.V. Pershina, E.S. Pan, L.A. Ermolaeva, O.E. Vaizova, O.Y. Rybalkina, A.M. Dygai // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Т. 161, № 4. – С. 566 – 570).

11. Скурихин, Е.Г. Эндотелиальные прогениторные клетки и Notch-1 сигналинг как маркеры регенерации альвеолярного эндотелия при эмфиземе лёгких / Е.Г. Скурихин, **В.А. Крупин**, О.В. Першина, Э.С. Пан, Л.А. Ермолаева, А.В. Пахомова, О.Ю. Рыбалкина, Н.Н. Ермакова, Е.С. Хмелевская, О.Е. Ваизова, М.С. Жукова, А.С. Поздеева, В.Е. Скурихина, В.Е. Гольдберг, А.М. Дыгай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166, № 8. – С. 157 – 163 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Skurikhin, E.G. Endothelial progenitor cells and notch-1 signaling as markers of alveolar endothelium regeneration in pulmonary emphysema / E.G. Skurikhin, **V.A. Krupin**, O.V. Pershina, E.S. Pan, L.A. Ermolaeva, A.V. Pakhomova, O.Y. Rybalkina, N.N. Ermakova, E.S. Khmelevskaya, O.E. Vaizova, M.S. Zhukova, A.S. Pozdeeva, V.E. Skurikhina, V.E. Goldberg, A.M. Dygai // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Т. 166, № 2. – С. 201 – 206).

12. Пахомова, А.В. Циркулирующие в крови перicyты и гладкомышечные клетки как маркеры нарушения ангиогенеза при сочетании метаболических нарушений и эмфиземы лёгких / А.В. Пахомова, О.В. Першина, Н.Н. Ермакова, **В.А. Крупин**, Э.С. Пан, О.Д. Путрова, Е.С. Хмелевская, О.Е. Ваизова, А.С. Поздеева, А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168., № 9. – С. 301 – 307 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Pakhomova, A.V. Pericytes and smooth muscle cells circulating in the blood as markers of impaired angiogenesis during combined metabolic impairments and lung emphysema / A.V. Pakhomova, O.V. Pershina, N.N. Ermakova, **V.A. Krupin**, E.S. Pan, O.D. Putrova, E.S. Khmelevskaya, A.M. Dygai, E.G. Skurikhin, O.E. Vaizova, A.S. Pozdeeva // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Т. 168, № 3. – С. 334 – 340).

13. Скурихин, Е.Г. Блокада дофаминовых D₂-рецепторов как новый подход стимуляции Notch1⁺-эндотелиальных прогениторных клеток и ангиогенеза при эмфиземе лёгких у мышей линии C57BL/6, индуцированной протеазами и дефицитом α1-антитрипсина / Е.Г. Скурихин, **В.А. Крупин**, О.В. Першина, Э.С. Пан, А.В. Пахомова, Л.А. Сандрикина, Н.Н. Ермакова, О.Е. Ваизова, М.А. Жукова, А.М. Дыгай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 12. – С. 674 – 679 (*в переводной версии журнала, входящей в Scopus и Web of Science*: Skurikhin, E.G. Blockade of dopamine D₂ receptors as a novel approach to stimulation of notch1⁺ endothelial progenitor cells and angiogenesis in c57bl/6 mice with pulmonary emphysema induced by proteases and deficiency of α1-antitrypsin / E.G. Skurikhin, **V.A. Krupin**, O.V. Pershina, E.S. Pan, A.V. Pakhomova, L.A. Sandrikina, N.N. Ermakova, A.M. Dygai, O.E. Vaizova, M.A. Zhukova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Т. 168, № 6. – С. 718 – 723).

Монографии

1. Дыгай, А.М. Роль стволовых и прогениторных клеток в патогенезе фиброза лёгких и его лечения / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, **В.А. Крупин**. – Томск: Издательство «Печатная мануфактура», 2017. – 84 с. ISBN: 978-5-94476-340-2.

2. Дыгай, А.М. Фиброз лёгких и стволовые клетки: новые подходы к лечению / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, **В.А. Крупин**. – Москва: Издательство «Российская академия наук», 2018. – 200 с. ISBN: 978-5-907036-44-4.

Патенты

1. Патент № 2479312 Российская Федерация МПК А61К31/475 (2006.01), А61Р11/00 (2006.01) «Средство, обладающее противовоспалительным и антифибротическим действием в легочной ткани при цитостатическом воздействии» [Текст] / Дыгай А.М., Скурихин Е.Г.,

Першина О.В., Хмелевская Е.С., Ермолаева Л.А., **Крупин В.А.**, Ермакова Н.Н.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU) – № 2012111024/15; заявл. 22.03.2012; опубл.: 20.04.2013.

2. Патент № 2530651 Российская Федерация МПК А61К31/438 (2006.01), А61К31/4166 (2006.01), А61Р11/00 (2006.01), А61Р35/00 (2006.01) «Средство, обладающее противовоспалительным и антифибротическим действием в легочной ткани при цитостатическом воздействии» [Текст] / Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Резцова А.М., Ермакова Н.Н., **Крупин В.А.**, Хмелевская Е.С.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU) – № 2013149751/15; заявл. 06.11.2013; опубл.: 10.10.2014.

3. Патент № 2554843 Российская Федерация МПК С12N5/02 (2006.01), С12N5/07 (2010.01) «Способ получения и индукции направленной дифференцировки культуры мультипотентных клеток лёгких» [Текст] / Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Хмелевская Е.С., **Крупин В.А.**, Ермакова Н.Н., Резцова А.М.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга) (RU) – № 2013137272/10; заявл. 08.08.2013; опубл.: 27.06.2015.

4. Патент № 2497523 Российская Федерация МПК А61К31/4515 (2006.01), А61К38/47 (2006.01), А61Р11/00 (2006.01) «Способ повышения эффективности терапии нарушений в легочной ткани при цитостатических воздействиях» [Текст] / Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Резцова А.М., Ермакова Н.Н., Хмелевская Е.С., **Крупин В.А.**, Артамонов А.В., Бекарев А.А., Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Резцова В.М.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU) – № 2012144695/15; заявл. 19.10.2012; опубл.: 10.11.2013.

5. № 2714679 Российская Федерация МПК А61К49/00 (2006.01), G09B23/28 (2006.01) «Средство моделирования сочетанной патологии метаболического синдрома и хронической обструктивной болезни лёгких» [Текст] / Першина О.В., Ермакова Н.Н., Пахомова А.В., Хмелевская Е.С., Пан Э.С., **Крупин В.А.**, Поздеева А.С., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) (RU) – № 2019108144; заявл. 21.03.2019; опубл.: 19.01.2020.

6. Патент № 2740378 Российская Федерация МПК А61К31/438 (2006.01), А61К31/4166 (2006.01), А61Р11/00 (2006.01), C07D471/10 (2006.01), «Лекарственное средство, стимулирующее регенерацию эндотелия лёгких при хронической обструктивной болезни лёгких» [Текст] / Скурихин Е.Г., Пан Э.С., Жукова М.А., **Крупин В.А.**, Першина О.В., Пахомова А.В., Ермакова Н.Н., Сандрикина Л.А., Дыгай А.М.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) (RU) – № 2020106562; заявл. 11.02.2020; опубл.: 13.01.2021.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В/б – внутрибрюшинно

ДГГ – D-галактозамина гидрохлорид

КОЕ-Ф – колониеобразующая единица фибробластов

ЛПС - липополисахарид

ИК – интактный контроль

ИЛ – интерлейкин

ИЛФ – идиопатический легочной фиброз

ИФА – иммуноферментный анализ

ПК – патологический контроль

СК (БАСК, ВСК, ГСК, МСК, РСК, ТПСК, ЭСК) – стволовые клетки (бронхоальвеолярные, взрослого организма, гемопоэтические, мезенхимальные, регионарные, тканеспецифичные прогениторные, эмбриональные)

ФНО- α (tumor necrosis factor- α) – фактор некроза опухоли α

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭПК – эндотелиальная прогениторная клетка

ЭТД – экстракт табачного дыма

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

GF (growth factor) (CTGF, EGF, HGF, IGF, PDGF, TGF- β , VEGF) – фактор роста (соединительной ткани, эпидермальный, гепатоцитов, инсулиноподобный, тромбоцитарный, трансформирующий β , сосудистого эндотелия)

MMP 9,12 (matrix metalloproteinases 9,12) – матричные металлопротеиназы 9, 12

γ -IFN (γ -interferon) – интерферон γ