

## Стволовые и прогениторные клетки в патогенезе пневмофиброза

Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Хмелевская Е.С., Ермакова Н.Н., Резцова А.М., Крупин В.А., Резцова В.М., Степанова И.Э.

ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, г.Томск, 634028, пр. Ленина, 3

На модели необратимого блеомицин-индуцируемого пневмофиброза показано, что одновременно с воспалительными клетками (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, плазматические клетки) в интерстициальной ткани лёгкого у мышей C57BL/6 выявляются клетки с фенотипом  $CD34^-$ , ( $CD3$ ,  $CD45R$  (B220),  $Ly6C$ ,  $Ly6G$  (Gr1),  $CD11b$  (Mac1),  $TER-119$ ),  $Sca-1^+$ ,  $c-Kit^+$  (гемопоэтические стволовые клетки (ГСК)) и прогениторные гемопоэтические клетки ( $CD3$ ,  $CD45R$  (B220),  $Ly6C$ ,  $Ly6G$  (Gr1),  $CD11b$  (Mac1),  $TER-119$ ),  $Sca-1^+$ ,  $c-Kit^+$ ). В фазу воспаления для ГСК блеомициновых лёгких характерны высокая митотическая активность и способность дифференцироваться в миелоидные клетки. Инфильтрация интерстиция альвеол и альвеолярных ходов незрелыми гемопоэтическими клетками сопровождается увеличением уровня гранулоцито-эритроидно- макрофагально- мегакариоцитарных и гранулоцитарных прекурсоров в костном мозге и циркулирующей крови. При отложении коллагена и поступлении прогениторных фибробластных клеток в паренхиме блеомициновых лёгких определяются две субпопуляции мезенхимальных стволовых клеток (МСК):  $МСК_1$  ( $CD45^-$ ,  $CD73^+$ ,  $CD90^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD106^+$ ) и  $МСК_2$  ( $CD31^-$ ,  $CD34^-$ ,  $CD45^-$ ,  $CD73^+$ ,  $CD90^+$ ). МСК свойственны высокая митотическая активность и дифференцировка в направлении фибробластных клеток, при этом хондрогенез и остеогенез нарушается. Такие характеристики МСК определяются на фоне увеличения клональной активности костномозговых и циркулирующих в крови прогениторных фибробластных клеток. Мы полагаем, что фармакологическая модуляция функций эндогенных стволовых клеток может быть перспективным подходом в лечении фиброзных заболеваний лёгких.

**Ключевые слова:** необратимый токсический пневмофиброз, гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, пролиферация, дифференцировка

### Введение

Идиопатический фиброз лёгкого является хроническим активно прогрессирующим заболеванием неизвестной этиологии. Прогноз заболевания в большинстве своём неблагоприятный, состояние пациентов ухудшается быстрыми темпами. Продолжительность жизни с момента постановки диагноза составляет от 2 до 4 лет [66], по данным других авторов, 3—5 лет [41]. Существующий набор лечебных мероприятий для лёгочного фиброза ограничен и неэффективен. Клиническая практика сосредоточена преимущественно на лечении осложнений и поддерживающей терапии [26, 32, 33, 45].

В последнее время огромное внимание уделяется такому направлению лечения как терапия стволовыми клетками (СК) [59, 67]. Трансплантация гемопоэтических СК (ГСК) используется для лечения взрослого Т-клеточного лейкоза, лимфомы, множественной миеломы и др. Направления клеточной терапии, связанные с применением мезенхимальных СК (МСК), разделяют на 3 группы:

- 1) поддержка кроветворения при котрансплантации с ГСК;
- 2) замещение и восстановление функций повреждённых негемопоэтических тканей (кости, хрящ, скелетные мышцы, сердечная мышца, нервная ткань, печень, поджелудочная железа и др.);
- 3) подавление иммунных конфликтов.

Известны случаи лечения донорскими МСК нейродегенеративных и гастроинтерстициальных заболеваний, инфарктов и инсультов, лейкозов, лимфом, реакции трансплант против хозяина, диабета, костных (хрящевых) заболеваний [64]. Клеточная терапия с использованием СК мезенхимального происхождения рассматривается как перспек-

тивный подход лечения хронических заболеваний лёгких, в том числе лёгочного фиброза [40, 48, 51, 59, 59].

Помимо лечебных эффектов донорские стволовые клетки оказывают неспецифическое иммуносупрессивное действие. У пациентов, получающих МСК-терапию, повышается риск развития вирусных, грибковых и бактериальных инфекционных заболеваний, аллергических реакций [16, 22]. Возможен рецидив лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза» [26]. В клинике для клеточной терапии применяются прекультированные мононуклеары. В некоторых случаях это может привести к изменению фенотипа и функций СК [14, 15], в том числе, приобретению неопластических свойств [36]. Выделенные из костного мозга реципиентов МСК в различные сроки после трансплантации демонстрируют черты частичного, а чаще полного химеризма [37, 39]. Существуют данные о достаточно большой вариабельности иммуномодулирующих свойств МСК [65]. Ряд авторов придерживается мнения, что эффекты трансплантированных МСК связаны с паракринными механизмами [31]. В связи с этим, можно говорить о том, что при клеточной терапии донорские мезенхимальные стволовые клетки не реализуют свой регенераторный потенциал.

До сих пор не ясно, с какими из СК связаны лечебные эффекты клеточной терапии. Отдельно взятые клоны МСК отличаются друг от друга по экспрессии генов, фенотипу, способности к дифференцировке и экспансии [50, 63]. Такая нестабильность эффектов клеточной терапии, отсутствие стандартизированных и эффективных методов получения достаточного количества клеточного материала с заданными свойствами для трансплантации выступают серьёзным препятствием для развития СК-те-

рапии [23]. Есть сомнения в том, что индуцированные донорские плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма эквивалентны эмбриональным стволовым клеткам по свойствам [57]. Вышеизложенные негативные эффекты трансплантации предопределили поиск новых подходов лечения стволовыми клетками.

Практически во всех органах и тканях существуют так называемые регионарные СК (РСК) [35, 44, 56]. Фармакологическая модуляция РСК может явиться более безопасным методом лечения многих хронических заболеваний по сравнению с трансплантацией СК. Однако на сегодняшний день нет понимания роли РСК различных тканей и органов в патогенезе хронических заболеваний и процессах регенерации. Это затрудняет разработку тактики медикаментозного лечения с использованием эндогенных СК взрослого организма.

На первом этапе исследований пневмофиброза нами проводился поиск стволовых и прогениторных клеток-мишеней для избирательного фармакологического воздействия. К возможным мишеням можно отнести сосудистые МСК-подобные клетки [44], СК бронхиол (CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, SCA-1low, AF-low) [62, 69], МСК-подобные клетки бронхо-альвеолярного пространства [17, 69]. Интерес представляют клетки, экспрессирующие пан-гемопоэтический маркер CD45 [61]. Предположительно, рекрутируемые из костного мозга в лёгкие пан-гемопоэтические клетки поддерживают инициируемую блеомицином продукцию коллагена за счёт выделения профибротических цитокинов [69, 70].

Существует определённый пробел в понимании механизма увеличения в паренхиме лёгких коллаген синтезирующих клеток — фибробластов. В качестве потенциального источника фибробластов в лёгочной ткани могут выступать эндотелиальные клетки, которые могут потенцироваться в фибробластоподобные клетки мезенхимального типа в процессе эндотелиально-мезенхимального перехода [33, 34, 71]. В то же время убедительных доказательств существования эндотелиально-мезенхимального перехода при заболеваниях лёгких на сегодняшний день не предоставлено. Некоторые авторы предполагают участие в легочном фиброгенезе циркулирующих фиброцитов, возможно, костномозгового происхождения [25, 60, 74]. Нами не исключается возможность расширения пула легочных фибробластов за счёт реализации дифференцировочного потенциала мезенхимальных СК. Известно, что костномозговые, циркулирующие в крови, полученные из жировой ткани МСК в определённых условиях дифференцируются в клетки стромальных линий [27, 42, 50, 54, 55, 68, 72].

Таким образом, на сегодняшний день вопросы о потенциальных мишенях для лечения пневмофиброза и терапевтическом потенциале регионарных СК далеки от решения. В свете этого, на модели блеомицин-индуцируемого пневмофиброза нами предпринята попытка изучения свойств стволовых и прогениторных клеток различных тканей у мышей линии C57BL/6.

Наши исследования позволили выявить участие костномозговых ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в развитии воспалительной реакции в лёгких у мышей линии C57BL/6 при необратимом блеомицин-индуцированном пневмофиброзе. Рекрутируемые в лёгкие ГСК *in vitro* демонстрируют высокую митотическую активность и способность к дифференцировке в миелоидные

клетки. В увеличении пула легочных фибробластов после инсталляции блеомицина участвуют костномозговые и циркулирующие в крови прогениторные фибробластные клетки. Одновременно с отложением коллагена в паренхиме лёгких возрастает интенсивность дифференцировки МСК в направлении фибробластов.

## Материалы и методы

### Животные

Мыши линии C57BL/6 в возрасте 10—12 недель были получены из питомника Отдела Биомоделирования ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (Томск, квалификационный сертификат №188-05). Животных размещали по 5 в клетке (VELAZ) в стандартных лабораторных условиях, т.е. комнатная температура (22±2°С), относительная влажность 55±10%, 12/12-часовой свето-темный цикл. Еда и вода в свободном доступе. Все экспериментальные процедуры с животными проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Март, 18, 1986; Strasburg; ETS 123). Все эксперименты с животными были утверждены Комитетом по контролю за использованием и содержанием лабораторных животных ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН. В исследовании было использовано 316 мышей.

### Реагенты

Блеомицин сульфат был получен из Бристольского Myers-Squibb (Blenoxane®; Sao Paulo, Brazil).

### Моделирование пневмофиброза

Первое введение NaCl и блеомицина приняли за 0-й день опыта. Для моделирования частично обратимого пневмофиброза мышам линии C57BL/6 однократно интратрахеально (и.т.) вводили блеомицин 80 мкг/мышь в 30 мкл NaCl 0,9% [51]. Контрольным животным однократно и.т. вводили 30 мкл NaCl 0,9%.

Для моделирования необратимого пневмофиброза мышам однократно и.т. вводили блеомицин 80 мкг/мышь в 30 мкл NaCl 0,9%. На 7, 14, 21, 28-й день опыта блеомицин вводили интраназально (и.н.) в дозе 80 мкг/мышь в 15 мкл NaCl 0,9%. Контрольным животным в 0 день опыта NaCl 0,9% (30 мкл) вводили и.т., на 7, 14, 21, 28-й день опыта NaCl 0,9% вводили и.н. в объёме 15 мкл.

Исследовали костный мозг, периферическую кровь и лёгкие.

### Дизайн исследования стволовых и прогениторных клеток

1. Иммунофенотипическая оценка костномозговых, легочных и циркулирующих в крови ГСК (Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119)<sup>-</sup>) и субпопуляций МСК: МСК<sub>1</sub> (CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>) и МСК<sub>2</sub> (CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>).

2. Оценка CD45neg клеток и CD45pos клеток (пан-гемопоэтические клетки) в костном мозге, периферической крови, лёгких.

3. Изучение клональной активности костномозговых, легочных и циркулирующих в крови CD45<sup>-</sup>-клеток и CD45<sup>+</sup>-клеток.

4. Изучение пролиферативного потенциала ГСК и МСК.

5. Оценка мультилинейного потенциала дифференциации стволовых клеток: ГСК в гемопоэтические клетки, МСК — в клетки стромальных линий.

#### **Гистопатологические исследования лёгких**

Лёгкие фиксировали в 10%-ном формалине. Фиксированные образцы дегидратировались в спиртах с восходящей концентрацией. После обработки они помещались в парафин, нарезались на 4–5 мкм секции и окрашивались гематоксилин-эозином. Для подсчета коллагеновых волокон в легочной паренхиме гистологические слайды были окрашены пикрофуксином [52]. Для каждого экспериментального животного делалось минимум 10 микрофотографий без перекрытия по всей поверхности среза легочной ткани при 400-кратном увеличении. Используемая система состоит из микроскопа (Axio Lab.A1, Carl Zeiss Microimaging GmbH; Gettlingen, Germany) с видеокamerой (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss; Gttingen, Germany), подключенной к персональному компьютеру. Полученные изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения AxioVision Rel.4.8.2. Содержание коллагеновых волокон в лёгких определялось с использованием специальной функции для подсчета площади объекта на изображении. Бронховаскулярные тяжи были тщательно изъяты из анализируемых областей. Средние значения были подсчитаны и их уровни были отображены в процентах [7, 10].

#### **Морфологическое исследование крови и костного мозга**

##### *Кровь*

Изучение общего количества лейкоцитов, подсчет гранулоцитов и лимфоцитов осуществляли стандартными гематологическими методами [1]. Фиксация препаратов крови производилась по Май-Грюнвальду в течение 5–7 мин. Окраска препаратов производилась по методу Нохта—Максимова в течение 25 мин (азур II-эозином). Гемограмму подсчитывали на 100 клеток, после чего определяли абсолютное содержание гранулоцитов и лимфоцитов в крови. Ретикулоциты — эритроциты, содержащие зернисто-нитчатую субстанцию (substantia granulofilamentosa), выявляли при суправитальной окраске бриллианткрезильблау.

##### *Костный мозг*

Для изучения клеточности костного мозга выделяли бедренную кость мыши, очищали ее от мягких тканей и промывали центральный канал 1 мл 3%-ного раствора уксусной кислоты. Костный мозг ресуспендировали шприцем через иглы уменьшающегося диаметра. Общее количество миелокариоцитов подсчитывали в камере Горяева. Для приготовления мазков костного мозга содержимое бедренной кости выдавливали на обезжиренное стекло, затем разводили аутологичной сывороткой и делали мазок с помощью шлифованного стекла. Фиксация препаратов костного мозга производилась по Май-Грюнвальду в течение 3–5 мин. Окраска препаратов производилась по методу Нохта—Максимова в течение 20 мин (азур II-эозином). Миелограмму подсчитывали на 400 клеток, после чего определяли абсолютное содержание незрелых и зрелых нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов и эритрокариоцитов в костном мозге.

#### **Длительные культуры адгезирующих мононуклеаров легких**

Мононуклеары легких в количестве  $0,5–1,0 \times 10^8$  ресуспендировали в 7 мл подогретой до  $37^\circ\text{C}$  культуральной среды, состоящей из 90% DMEM-LG («HyClone», США), 10% инактивированной FBS («HyClone», США), 2 mM L-глутамин («Sigma», США), раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин 100 Ед/мл и 100 мкг /мл; «HyClone», США). Затем клеточную суспензию вносили в культуральный флакон с вентилируемой крышкой и площадью  $25 \text{ cm}^2$  («Techno Plastic Products AG», Швейцария) и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  и 100% влажности воздуха. Через 48–72 ч удаляли надосадочную жидкость с неадгезирующими клетками, проводили замену базовой культуральной среды на новую порцию. В последующем среду меняли каждые 3–4 дня до достижения 70–90% покрытия поверхности флакона клетками.

После достижения максимального слияния (70–90% от общей площади флакона) клеточную культуру дважды отмывали фосфатным буфером («Sigma», США). Клетки снимали с поверхности пластика с использованием клеточного силиконового шпателя со свободным вращением лезвия шириной 13 мм («Techno Plastic Products AG», Швейцария). Открепленные клетки смывали PBS («HyClone», США) для последующего использования (второй пассаж). Концентрация мононуклеаров при повторном пассировании составляла  $0,5–1,0 \times 10^7$  в 7 мл базовой культуральной среды. По окончании цикла культивирования клеточную культуру дважды отмывали фосфатным буфером в культуральном флаконе и снимали с поверхности силиконовым шпателем. Взвесь мононуклеаров переносили в пробирки и 5–7 мин центрифугировали при 1500 об/мин. Заменяли супернатант на 1–2 мл базовой культуральной среды, подсчитывали количество мононуклеаров и оценивали их иммунный профиль.

При каждой смене базовой среды и по достижении максимального слияния клеток проводили морфологическую оценку состояния клеточной культуры. Рассчитывалось время удвоения (tD) эндотелиальных и эпителиальных клеток, и фибробластных клеток по формуле:

$$tD = \frac{(\log 2 \times t)}{(\log Nh - \log N_0)}$$

где:

$N_0$  — количество клеток во время второй смены среды;

$Nh$  — количество клеток в изучаемый период культивирования  $t$  [11, 12, 46, 53].

#### **Изучение мультилинейного потенциала дифференциации МСК-подобных клеток лёгких**

Для подтверждения остеогенной дифференцировки клетки, полученные после длительного культивирования, внесли в 6-луночный культуральный планшет ( $2,5 \times 10^5$  клеток/луночку) в среде, содержащей 90% DMEM-LG («HyClone», США), 10% FBS («HyClone», США) и дополненную 0,2 mM 2-фосфат L-аскорбиновой кислоты («Sigma», США), 10 mM  $\beta$ -глицерофосфата («Sigma», США),  $1 \times 10^{-8}$  M дексаметозона («Sigma», США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («HyClone», США). Среда менялась каждые 3–4 дня. 21 дневные культуры дважды промывали фосфатным буфером и фиксировали в 4% формальдегиде («Pancreas», США) в течение 10 мин.



Минерализация внеклеточного матрикса была визуализирована с помощью окрашивания по вон Коссу и служила показателем остеогенной дифференциации [6, 8, 9, 11, 53].

Для изучения *адипогенной дифференцировки* МСК-подобные клетки высевали в 6-луночных культуральные планшеты ( $2,5 \times 10^5$  клеток/луночку) и культивировали в среде, содержащей 90% DMEM-LG («HyClone», США), 10% инактивированной FBS («HyClone», США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («HyClone», США), 0,5 мкМ гидрокортизона («Sigma», США), 60 мкМ индометацина («Sigma», США), 1 мкг/мл инсулина («Sigma», США). Смену среды проводили каждые 4 дня. Полный цикл культивирования составил 21 день. Адипогенная дифференциация оценивалась окрашиванием внутриклеточного накопления липидов 0,5% жировым красным О («Sigma», США) [6, 8, 9].

Гранулярные культуры МСК-подобных клеток для исследования хондрогенеза были подготовлены из  $4 \times 10^5$  клеток, помещенных в 15 мл полипропиленовые пробирки («Techno Plastic Products AG», Швейцария) в среде следующего состава: 95% DMEM-HG («HyClone», США), 2 мМ L-глутамин («Sigma», США), 1% раствор 1xITS plus («Sigma», США), 1% раствор антибиотиков (пенициллин/стрептомицин 100 Ед/мл и 100 мкг/мл («HyClone», США), 100 мкг/мл sodium pyruvate («Sigma», США), 50 мкг/мл 2-фосфат L-аскорбиновой кислоты (AsAP) («Sigma», США), 40 мкг/мл L-пролина («Sigma», США), 0,1 мкМ дексаметазона («Sigma», США) и 10 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF- $\beta_1$  («Sigma», США). Клетки культивировались в течение 14 дней, среда менялась каждые 3 дня. На 14 день клеточные гранулы фиксировали в 10% растворе формалина в течение 24 ч, и заливали в парафин. Для выявления сульфатированных протеогликанов срезы гранул окрашивали толудиновым синим [6, 8, 9].

Фибробластную дифференцировку МСК-подобных клеток изучали в 50% среды DMEM-HG («HyClone», США) с фактором роста фибробластов 2 мкг/мл («Sigma», США), дополненной 20% инактивированной FBS («HyClone», США), 280 мг/л L-глутамин («Sigma», США), 50 мг/л гентамицина («Seriva», Германия). Концентрация клеток составила  $6 \times 10^5$  клеток в 2 мл. 18-е дневные культуры фиксировали и окрашивали основным красителем Май-Грюнвальда [11, 12, 53].

#### ***Длительные культуры неадгезирующих мононуклеаров лёгких***

Процедуру разделения мононуклеаров лёгких на адгезирующую и неадгезирующую фракции проводили в соответствии с методом *длительного культивирования адгезирующих мононуклеаров лёгких*. Полученные неадгезирующие клетки лёгких в концентрации  $\times 10^6$ /мл вносили в базовую культуральную среду на основе Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, «Sigma», США) с 25%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), 1% бычьим сывороточным альбумином (V-фракция) («Sigma», США),  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанолом («Sigma», США), эритропоэтином 2 ЕД/мл («Sigma», США), 4 нг/мл интерлейкином-3 («Sigma», США), 3 нг/мл фактором роста стволовых клеток (фактор Стила) («Sigma», США), 10 нг/мл инсулиноподобного фактора роста-1 («Sigma», США), 280 мг/л L-глутамином («Sigma», США), 100 Ед/мл пенициллина («Sigma», США), 100 мкг/мл

стрептомицина («Sigma», США),  $10^{-6}$  дексаметазоном («Sigma», США). Инкубация производилась при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере с абсолютной влажностью. Последующие смены среды производились каждые 7 дней в течение одного месяца. При каждой смене базовой среды проводили морфологическую оценку состояния клеточной культуры.

После окончания первого цикла культивирования образцы дважды отмывали фосфатным буфером («Sigma», США) для последующего использования (второй пассаж). Концентрация мононуклеаров при повторном пассировании составляла  $\times 10^5$  в 1 мл базовой культуральной среды. Процедуру пассирования проводили трижды. Взвесь мононуклеаров переносили в пробирки и 5–7 мин центрифугировали при 1500 об/мин. Заменяли супернатант на 1–2 мл базовой культуральной среды, подсчитывали количество мононуклеаров и оценивали их иммунный профиль ГСК.

#### ***Изучение дифференциации ГСК-подобных клеток лёгких***

Полученную в результате длительного культивирования взвесь легочных неадгезирующих мононуклеаров, обогащенную ГСК, исследовали на способность формировать колонии гранулоцитарного (КОЕ-Г) и эритроидного типа (КОЕ-Э) [10]. Для этого мононуклеары вносили в базовую культуральную среду с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором 4 нг/мл («Sigma», США) либо с 0,5 Ед/мл рекомбинантным эритропоэтином («Sigma», США), инкубировали при 37°C и в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере с абсолютной влажностью в первом случае течение 7 дней, во втором — 3 дня.

Базовая среда для роста КОЕ-Г была на основе RPMI-1640 («Sigma», США) с 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), 280 мг/л L-глутамином («Sigma», США), 50 мг/л гентамицином («Seriva», Германия),  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанолом («Sigma», США) и 0,9% раствором метилцеллюлозы («Sigma», США). Концентрация клеток составила  $2 \times 10^5$ /мл. По окончании наблюдения подсчитывали КОЕ-Г ( $\geq 50$  клеток в колонии) с использованием инвертирующего микроскопа, проводили морфологический анализ колоний.

Для изучения эритроидного колониобразования клетки в концентрации  $0,3 \times 10^6$  клеток/мл вносили в среду следующего состава: 70% среды RPMI-1640 («Sigma», США), 1% метилцеллюлозы («Sigma», США), 19% ЭТС («Sigma», США), 280 мг/мл L-глутамин («Sigma», США), 50 мг/л гентамицина («Sigma», США). После инкубации подсчитывали количество выросших колоний. Под колониями подразумевали образовавшиеся в культуре очаги гемопоэза, содержащие более 50 элементов эритроидного ряда, проводили морфологический анализ колоний.

#### ***Определение экспрессии мембранных рецепторов мононуклеаров***

Экспрессия мембранных рецепторов мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и лёгких анализировалась с использованием ВД поверхностных маркёров («BD Biosciences», США). Полученные мононуклеары разделили на аликвоты по 200 000 в 1,5 мл центрифужной пробирки и культивировали при 4°C в течение 30 мин со следующими антителами: anti-rat CD90 (Thy-1)/mouse CD90.1 (PerCP), CD34 FITS, CD45 PE/Cy5, CD 73 (PE), CD106 (VCAM-1) FITS, CD44 (Pgp-1, Ly-24) APC и an-

ti-mouse CD31 (PECAM-1) APC (BD Biosciences, США). Также использовались следующие контрольные группы изотипа: FITS Rat IgG2a, PerCP Mouse IgG1, APC Rat IgG2b, APC-Cy7 Rat IgG2b, PE Rat IgG2a. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 1 минуты при 2000 об./мин, супернатант удаляли. Потом повторно ресуспендировали в 1 мл PBS. Далее клетки осаждали, дважды промывали PBS и анализировали при помощи проточной цитометрии. Для анализа использовался прибор FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США).

Экспрессия мембранных рецепторов гемопоэтических клеток костного мозга и легких анализировалась с использованием протокола для гемопоэтических СК BD Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Isolation Kit («BD Biosciences», США). Клетки разделили на аликвоты по 200 000 в 1,5 мл центрифужной пробирки и культивировали при 4°C в течение 30 минут со следующими антителами: APC Mouse Lineage Antibody Cocktail (CD3, CD45R (B220), Ly6C and Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119) (BD Pharmingen), PE-Cy7 Anti-Mouse Sca-1 (BD Pharmingen), PE Anti-Mouse c-Kit (BD Pharmingen), FITS Anti-Mouse CD34 (BD Pharmingen). Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 1 минуты при 2000 об./мин, супернатант удаляли. Потом повторно ресуспендировали в 1 мл PBS. Далее клетки осаждали, дважды промывали фосфатным буфером и анализировали при помощи проточной цитометрии.

#### **Клональная активность мононуклеаров**

##### *Клонирование недифференцированных гемопоэтических колониеобразующих единиц (КОЕ-Н)*

Культуры были выполнены в 96-луночных планшетах и в 6-луночных планшетах («Costar», США) с  $5 \times 10^5$  неприлипающими клетками костного мозга или крови / на 1 мл базовой культуральной среды на основе Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, «Sigma», США) с 25%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), 1% бычьим сывороточным альбумином (V-фракция) («Sigma», США),  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанолом («Sigma», США), эритропоэтином 2 ЕД/мл («Sigma», США), 4 нг/мл интерлейкином-3 («Sigma», США), 3 нг/мл фактором роста стволовых клеток (фактор Стила) («Sigma», США), 10 нг/мл инсулиноподобного фактора роста-1 («Sigma», США), 280 мг/л L-глутамином («Sigma», США), 100 Ед/мл пенициллина («Sigma», США), 100 мкг/мл стрептомицина («Sigma», США),  $10^{-6}$  дексаметазоном («Sigma», США). Инкубация производилась при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере с абсолютной влажностью, на 7-й день осторожно удаляют 50% супернатанта и добавляют свежую базовую культуральную среду того же объема. По окончании 14-го дня инкубации клетки первичной культуры собирают, отмывают дважды D-MEM и в известной базовой культуральной среде вносят в 96-луночные планшеты и инкубируют в известных условиях. Концентрация неприлипающих клеток при пассировании составляет  $5 \times 10^5$  клеток/ в 1 мл базовой культуральной среды. Пассирование проводят дважды. По окончании последнего цикла культивирования подсчитывают КОЕ-Н с использованием инвертирующего микроскопа ( $\geq 500$  клеток в колонии), проводят морфологический анализ колоний, изучают иммунный профиль клеток, входящих в состав КОЕ-Н [3, 10].

##### *Клонирование гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГЭММ)*

Культуры были выполнены в 24-луночных планшетах («Costar», США) с  $1 \times 10^5$  неприлипающими клетками костного мозга или крови / на 1 мл базовой культуральной среды на основе Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, «Sigma», США) с 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), эритропоэтином 2 ЕД/мл («Sigma», США), 2 нг/мл интерлейкином-3 («Sigma», США), 0,2 нг/мл гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором («Sigma», США),  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанолом («Sigma», США), 1% бычьим сывороточным альбумином («Sigma», США), 280 мг/л L-глутамином («Sigma», США), 50 мг/л гентамицином («Serva», Германия). Инкубация производится при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере с абсолютной влажностью, 7-й день осторожно удаляют 50% супернатанта и добавляют свежую базовую культуральную среду того же объема. По окончании 12-го дня инкубации подсчитывают КОЕ-ГЭММ ( $\geq 500$  клеток в колонии) с использованием инвертирующего микроскопа и проводят морфологический анализ колоний [10].

##### *Клонирование гранулоцитарных колониеобразующих единиц (КОЕ-Г)*

Культуры были выполнены в 24-луночных планшетах (диаметр чашки 15 мм) («Costar», США) с  $2 \times 10^5$  неприлипающими клетками костного мозга или крови на 1 мл базовой культуральной среды на основе RPMI-1640 («Sigma», США) с 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), 280 мг/л L-глутамином («Sigma», США), 50 мг/л гентамицином («Serva», Германия),  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанолом («Sigma», США), гранулоцитарным колониестимулирующим фактором 4 нг/мл («Sigma», США) и 0,9% раствором метилцеллюлозы («Sigma», США). Инкубация производится при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере с абсолютной влажностью. На 7 дней подсчитываются КОЕ-Г ( $\geq 50$  клеток в колонии) с использованием инвертирующего микроскопа, проводят морфологический анализ колоний [1].

##### *Клонирование фибробластных колониеобразующих единиц (КОЕ-Ф)*

Культуры были выполнены в 24-луночных планшетах с  $1 \times 10^5$  прилипающими клетками костного мозга, крови или лёгких / на 1 мл базовой культуральной среды на основе D-MEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой («Bioclot», Германия), 280 мг/л L-глутамина («Sigma», США), 50 мг/л гентамицина («Serva», Германия), с 25 нг/мл фактора роста фибробластов (FGF-basic) («Sigma», США),  $10^{-6}$  дексаметазоном («Sigma», США). Инкубация производится при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере с абсолютной влажностью 10 дней. По окончании исследования подсчитываются КОЕ-Ф ( $\geq 50$  клеток в колонии) с использованием инвертирующего микроскопа и проводят морфологический анализ колоний [1, 2, 53].

#### **Морфологическое исследование препаратов колониеобразующих единиц**

Цитологические препараты КОЕ-Н подвергают морфологическому анализу с использованием окраски по Май-Грюнвальду [3, 10]. Цитологические препараты



КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г окрашиваются по Райту, исследованы пероксидазой (миелоидная линия) и неспецифической эстеразой (моноцитарно-макрофагальная линия) [10]. Клетки эритроидной линии препаратов КОЕ-ГЭММ и КОЕ-Э идентифицируют окраской Райта и подвергают окрашиванию бензидин дигидрохлоридом. Препарат КОЕ-Ф окрашивают азур П-эозином [53].

#### Статистический анализ

Данные отображены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения. Статистические вариации были определены вариационным анализом (ANOVA) и *t*-тестом Стьюдента. Уровни  $P < 0,05$  были почитаны как значимые.

### Результаты

#### Гистопатологическое исследование лёгких

В гистопатологических исследованиях в сравнительном аспекте нами было оценено влияние однократной и повторяющихся травм блеомицином альвеолярного эпителия. При однократном введении цитостатика повреждение лёгочной ткани у мышей C57BL/6 протекало поэтапно. Так, на 3-й день после инсталляции цитостатика наблюдалась инфильтрация интерстиция альвеол и альвеолярных ходов лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами, плазматическими клетками (рис. 1 на 3-й странице обложки). Одновременно регистрировалось венозное полнокровие и кровоизлияния в стенках альвеол. В эти сроки, согласно [69], отмечается апоптоз эпителиальных клеток, массивная инфильтрация ткани лёгкого, выделение медиаторов и цитокинов [69]. В нашем исследовании наибольшая выраженность воспалительной реакции достигалась к 14-му дню опыта. Разрастание соединительной ткани начиналось с 7-го дня и прослеживалось до 60-го дня. Картина пневмофиброза наиболее выражена на 21-й день после введения блеомицина (рис. 2). К 60-му дню интенсивность воспалительной реакции в лёгких падала, более чем на 50% сокращалось содержание коллагена.

Животная модель лёгочного фиброза, вызванная однократным интратрахеальным введением блеомицина (частично обратимый пневмофиброз), гистологически, во многом, имитирует особенности идиопатического фиброза лёгкого (ИФЛ). В частности, у блеомицин-леченных животных аналогично больным ИФЛ присутствуют воспаление, интрамуральные включения коллагена и закрытие альвеолярного пространства. Однако такие особенности человеческого ИФЛ как прогрессия и необратимость состояния в условия однократного токсического повреждения альвеолярного эпителия не воспроизводились. В связи с этим нами разработана модель необратимого пневмофиброза, основанная на повторяющихся травмах альвеолярного эпителия.

При курсовом введении блеомицина инфильтрация интерстиция альвеол и альвеолярных ходов воспалительными клетками более выражена по отношению к мышам, получавшим цитостатик однократно. Активная воспалительная реакция подобно той, что выявлена на 14-й день в условиях частично обратимого пневмофиброза, поддерживалась до конца наблюдения — 60-й день. Следует отметить, что уже на 14-й день эксперимента активность от-

ложения коллагена в лёгких мышей, получавших блеомицин курсом, превосходила таковую у мышей в условиях частично обратимого пневмофиброза. Далее (40, 60-й день) отмечалось лишь прогрессирование фиброза. Начиная с 40-х суток опыта, наблюдалась гибель животных, получавших блеомицин курсом. К окончанию эксперимента популяция мышей в опытной группе сократилась на 30%. Таким образом, на модели повторяющихся травм альвеолярного эпителия нами воспроизведена прогрессия фиброза и необратимость состояния (необратимый пневмофиброз).

#### Иммунофенотипическая характеристика тканевых мононуклеаров

##### Гемопоэтические стволовые клетки

Используя протокол для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (BD Biosciences, US), изучали содержание ГСК в неадгезирующей фракции костного мозга, периферической крови и лёгких у интактных мышей (контрольная группа) и у мышей с необратимым пневмофиброзом (опытная группа). В контрольных и опытных образцах определялись мононуклеары негативные по маркерам зрелых гемопоэтических клеток (CD3, CD45R (B220), Ly6C и Ly6G (Gr1), CD11b, TER-119), положительные для маркеров Sca-1, c-Kit и отрицательные по CD34 маркеру (рис. 3). Количественный анализ показал, что на 7-й день эксперимента число ГСК в блеомициновых лёгких животных достоверно снижалось в 2 раза по сравнению с контрольной группой. На 28-й день количество ГСК, напротив, увеличивалось.

При необратимом пневмофиброзе уровень ГСК в костном мозге увеличивался на 7-й день, в крови — на 7, 28-й день (рис. 3 на 3-й странице обложки).

##### Гемопоэтические прогениторные клетки

Блеомицин инициировал инфильтрацию лёгких незрелыми гемопоэтическими клетками (CD3<sup>-</sup>, CD45R<sup>-</sup> (B220), Ly6C<sup>-</sup>, Ly6G<sup>-</sup> (Gr1), CD11b<sup>-</sup>, TER-119<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>), Активность процесса в фазу воспаления была ме-

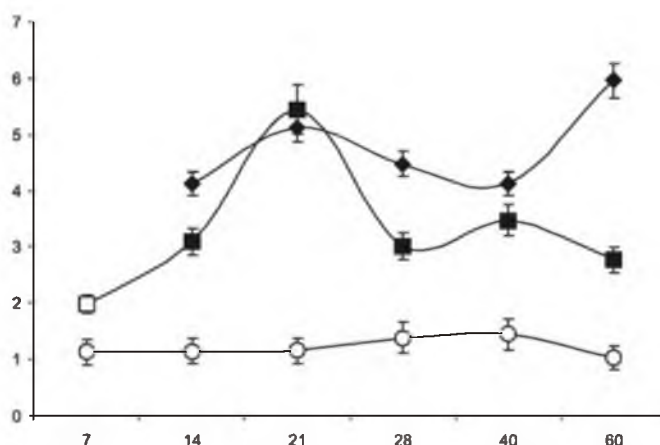


Рис. 2. Содержание соединительной ткани в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях однократного введения блеомицина и курсового введения блеомицина. По оси абсцисс сроки исследования (сутки), по оси ординат содержание коллагеновых волокон в лёгких (% от площади лёгочной ткани) ( $M \pm m$ ). Исследуемые группы: 1 — интактный контроль; 2 — однократное введение блеомицина; 3 — курсовое введение блеомицина. Окрашенным символом обозначена достоверность различия с животными интактного контроля ( $P < 0,05$ )

ныше (7-й день), чем в фазу отложения коллагена (28-й день) (рис. 4). Достоверное увеличение количества незрелых гемопоэтических клеток в периферической крови наблюдалось на 7, 28-й день, в костном мозге — на 28-й день.

#### Мезенхимальные стволовые клетки

Используя ранее представленный протокол [53] во фракции адгезирующих мононуклеаров костного мозга, периферической крови и лёгких определялась популяция CD45neg клеток. После этого в соответствии с фенотипическими стандартами МСК лёгких мышей линии C57BL/6 [Jung D. et al., 2011] CD45neg клетки исследовались на предмет экспрессии на поверхности CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), CD34 (стволовые / предшественники гемопоэтических клеток), CD44 (Hyaluronate receptor), CD73 (Ecto-5'- nucleotidase), CD90 (Thy-1 glycoprotein) и CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1).

Под влиянием блеомицина популяция CD45neg клеток в лёгких у мышей достоверно увеличивалась во все сроки исследования. Наиболее выраженные изменения отмечались на 7-й день: показатель в опыте на 74% превосходил таковой в интактном контроле. Количество CD45neg клеток в костном мозге (7, 28-й день) и периферической крови (28-й день) у мышей с пневмофиброзом, напротив, уменьшалось соответственно до 75 и 80% от интактного контроля.

Далее изучались поверхностные маркёры МСК. Выделенные из лёгких мышей C57BL/6 контрольной и опытной групп CD45neg клетки были позитивны по маркёрам CD44, CD73, CD90, CD106, были негативными по маркёрам CD31, CD34. При этом у мышей контрольной группы количество клеток с мезенхимальным фенотипом было меньше (5,41% от общего числа исследуемых клеток), чем в блеомициновых лёгких (7,38% от общего числа исследуемых клеток) (28-й день). Следует отметить, что в общей популяции легочных МСК нами выявлены две «самостоятельные» субпопуляции. МСК<sub>1</sub> характеризовались как CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>. МСК<sub>2</sub> были негативны не только по маркёру CD45, но и по маркёрам CD31 и CD34, но экспрессировали на поверхности CD73, CD90. МСК<sub>1</sub> и МСК<sub>2</sub> определялись в костном мозге и крови.

Действие блеомицина на МСК<sub>2</sub> было супрессирующим: на протяжении всего эксперимента во всех тканях у мышей опытной группы наблюдалось уменьшение количества клеток экспрессирующих на поверхности CD73, CD90, но не экспрессирующих CD45, CD31, CD34 (рис. 5). Для МСК<sub>1</sub> была характерна иная картина распределения в тканях. Как видно из рисунка, на 7-й день эта субпопуляция определялась только в лёгких больных мышей. В лёгких мышей интактного контроля она не обнаружена. В костном мозге и крови животных опытной группы уровень МСК<sub>1</sub> падал. Для 28-го дня было характерно сокращение числа клеток в фиброзированных лёгких и повышение в костном мозге и крови.

#### Характеристика длительных культур адгезирующих мононуклеаров лёгких

В культурах адгезирующих клеток лёгких здоровых мышей и мышей с необратимым пневмофиброзом выявлялись клетки с морфологическими особенностями фиб-

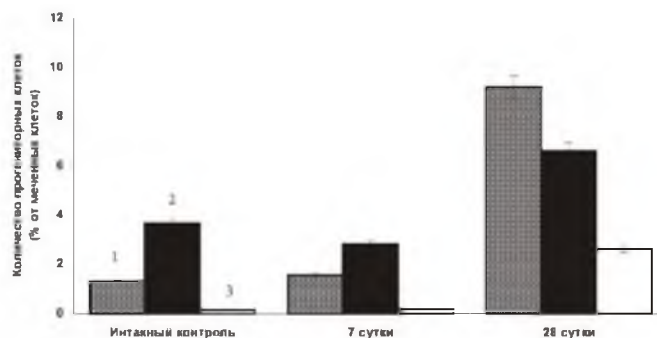


Рис. 4. Динамика содержания прогениторных гемопоэтических клеток, с фенотипом Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119) — в лёгких (1), костном мозге (2), периферической крови (3) мышей линии C57BL/6 при необратимом пневмофиброзе. По оси абсцисс сроки исследования (сутки), по оси ординат количество прогениторных гемопоэтических клеток (% от всех меченных неадгезирующих клеток)

робластов (длинные и тонкие, веретенообразный вид), эндотелиальных клеток (форма булжника) и эпителиальных клеток (кубические) (рис. 6). На протяжении первых 6—7 смен среды основное наращивание клеточного материала во флаконе осуществлялось за счёт эндотелиоподобных и эпителиоподобных клеток. Количество клеток с морфологией фибробластов, составило 5—10% от общей клеточности флакона. Начиная с 8-й смены среды, наблюдалось обогащение культуры фибробластоподобными и небольшими по размерам круглыми клетками, количество эндотелиоподобных и эпителиоподобных клеток поступательно снижалось. К окончанию исследования (19 смена среды) в образцах выявлялись круглые клетки и клетки преимущественно с фибробластной морфологией. Следует отметить, что по скорости формирования монослоя и времени удвоения клеток отдельных популяций опытная группа существенно превосходила контрольную группу.

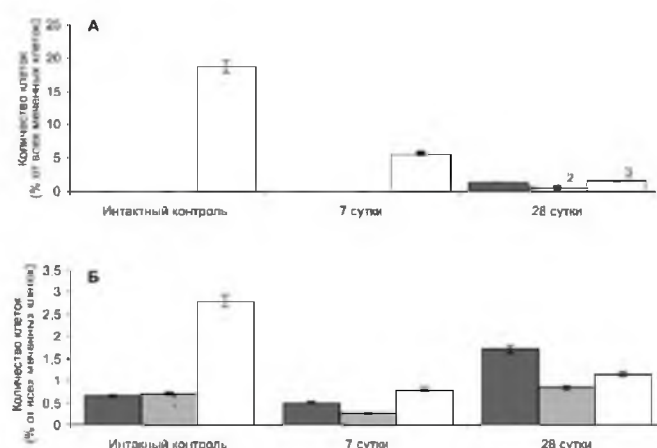


Рис. 5. Динамика содержания мезенхимальных стволовых клеток в лёгких (1), костном мозге (2), периферической крови (3) мышей линии C57BL/6 при необратимом пневмофиброзе. А — динамика содержания популяции МСК<sub>1</sub>, определяемых как CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>. Б — динамика содержания популяции МСК<sub>2</sub>, определяемых как CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>. По оси абсцисс сроки исследования (сутки), по оси ординат количество МСК (% от всех меченных адгезирующих клеток)

После достижения слияния 40 и 90% у клеток соответственно контрольной и опытной групп исследовался иммунный профиль. Оказалось, что после процедуры культивирования количество клеток, экспрессирующих на поверхности CD44, CD73, CD90, CD106 и не экспрессирующих CD31, CD34, CD45, увеличивалось. Если в легочной ткани у мышей контрольной группы количество клеток с мезенхимальным фенотипом составило 5,41% от общего числа исследуемых клеток, в блеомициновых лёгких — 7,38% от общего числа исследуемых клеток, то после культивирования показатель достоверно возрастал соответственно в 1,35 и 1,7 раза.

### Дифференцировка мезенхимальных СК лёгких

С использованием разработанных ранее протоколов изучали *in vitro* дифференцировку МСК-подобных клеток интактных мышей и мышей с необратимым пневмофиброзом в направлении клеток стромальных линий (остеогенез, липогенез, хондрогенез, фиброгенез) [53]. Подтверждением дифференцировки МСК-подобных клеток в зрелые адипоциты, хондроциты, остеобласты и фибробласты выступают результаты гистологических исследований, представленные на рис. 7 на 4-й странице обложки.

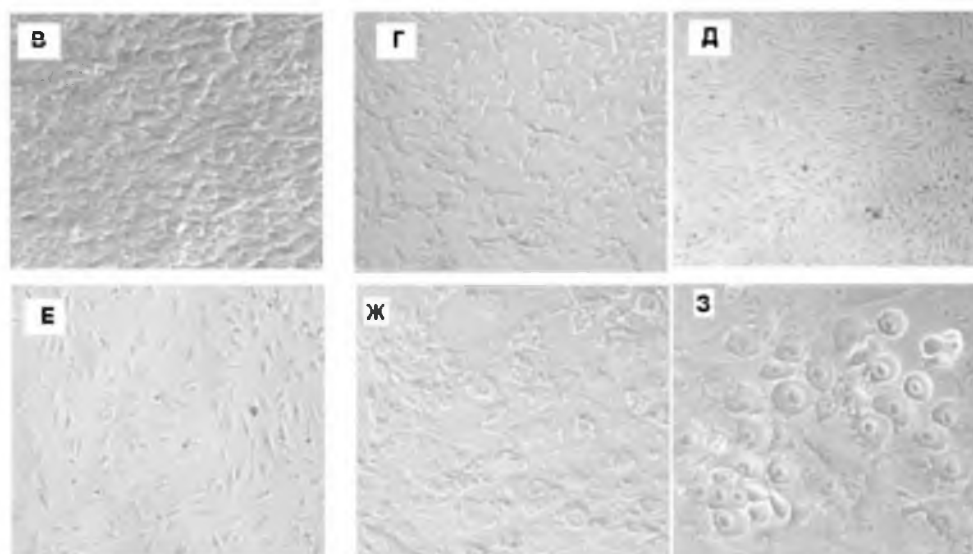
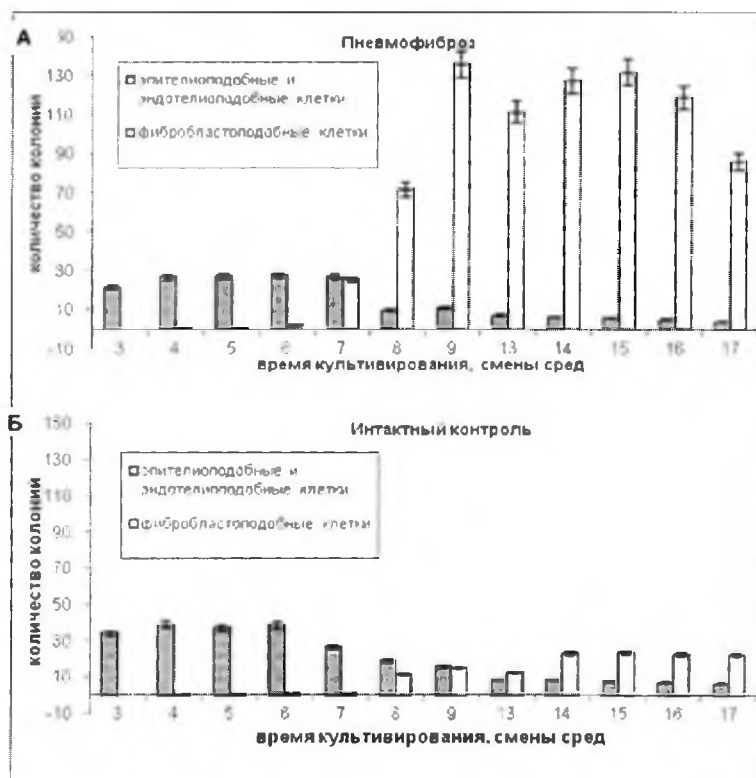


Рис. 6. Динамика и морфология клеток в длительной культуре адгезирующих мононуклеаров легкого мышей линии С57В1/6. Содержание клеток эпителиального, эндотелиального вида и фибробластоподобных клеток при образовании монослоя у животных после интратрахеального введения блеомицина (А) и в интактном контроле (Б). Г, Д, Е — клетки с фибробластной морфологией; В — клетки эпителиального типа; Ж, З — клетки эндотелиального типа. Увеличение —  $\times 100$



**Рис. 7.** Мультилинейная дифференцировка клеток первичной культуры прилипающих клеток легкого мышей линии C57Bl/6, получавших интратрахеально 0,9% NaCl либо блеомицин. А — остеогенная дифференцировка; Б — адипогенная дифференцировка; В — хондрогенная дифференцировка; Г — фибробластная дифференцировка. По оси ординат: А — площадь депозитов кальция, мм<sup>2</sup>; Б — количество клеток, содержащих липидные включения (% от общего числа мононуклеаров); В — клетки содержащие сульфатированные протеогликаны (% от общего числа мононуклеаров); Г — содержание фибробластов (% от общего числа мононуклеаров). Светлые столбики — значения, полученные при культивировании клеток без добавления ростовых факторов, темные — с добавлением ростовых факторов.

#### *Остеогенная дифференцировка*

Изучение дифференциации клеток первичной культуры позволило установить, что подавляющее количество клеток контрольной группы в остеогенной среде с β-глицерофосфатом изменили свою веретенообразную морфологию фибробластов и стали звездчатой и неправильной формы (10-й день культивирования). Вместо сливающейся культуры клеток формировались отдельные кластеры клеток, растущих в несколько слоев (15-й день культивирования). Формирование кластеров считается характерной чертой остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* [18]. Положительное окрашивание клеток по вон Коссу и ализарином красным S подтвердило фосфатное и кальциевое депонирование во внеклеточном матриксе. Видимые минерализованные узелки обнаруживались на 15 день культивирования, на 21 день площадь отложения депозитов кальция составила 136,13±24,03 мм<sup>2</sup> (рис. 7, А). В неиндуктивной культуральной среде (без β-глицерофосфата) большинство клеток сохранили типичную морфологию фибробластов и характеристики роста с минимальным образованием минерализованных рыхлых узелков во внеклеточном матриксе. Клетки блеомициновых лёгких обладали более низкой способностью образовывать кластеры в остеогенной среде с β-глицерофосфатом по сравнению с клетками контрольной группы, при этом в образцах была слабо выражено отложение депозитов кальция. В неиндуктивной среде слияние клеток не выявлено, площадь минерализованных областей составила 3,81±0,42 мм<sup>2</sup>/ на площадь лунки 6-го планшета (6,616 см<sup>2</sup>).

#### *Адипогенная дифференцировка*

В адипогенной среде с индометацином и инсулином клетки всех образцов сохранили фенотип веретена, содержали единичные липидные капли, окрашенные оранжевым цветом жировым красным O (рис. 7, Б). Вместе с тем, слияния липидных капель в большие вакуоли не выявлено. Доля клеток с липофильными включениями от общего числа клеток в образцах контрольных животных составила 11,00±2,32%, в образцах клеток блеомициновых мышей — 10,00±1,85%. Тем не менее, окончательная дифференцировка клеток первичной культуры в зрелые адипоциты, содержащие большие и слитые липидные вакуоли, не была достигнута. В адипогенной среде без индомета-

цина и инсулина клетки из всех источников не накапливали липидные капли.

#### *Хондрогенная дифференцировка*

При исследовании хондрогенной дифференцировки в трёхмерных гранулярных культурах оказалось, что искусственные гранулярные клетки не растворялись, но поддерживали свою целостность, постепенно увеличивались в размерах и к 21 дню культивирования в хондрогенной среде с TGF-β1 формировали осадочную (гранулярную) культуру (рис. 7, В). Хондрогенная дифференциация была подтверждена гистологически. В образцах обнаружено наличие хряща и связанных компонентов матрицы. При окрашивании толуидиновым синим хондрогенно индуцированные гранулы из клеток мышей, получавшие NaCl или блеомицин, показали интенсивную фиолетовую метакромазию, что указывало на высокое содержание сульфатированных протеогликанов. В контрольных гранулах (хондрогенная среда без TGF-β1) клетки были собраны в рыхлый конгломерат с несколькими структурными компонентами внеклеточного матрикса. В гистологических образцах доля клеток с окрашенными кислотными и ацетатными муцинами была ниже, чем в образцах клеток с TGF-β1.

#### *Дифференцировка в фиброциты*

Обнаруженные в фибробластной среде (с фактором роста фибробластов и без фактора роста фибробластов) клетки из всех источников имели веретенообразную морфологию (рис. 7, Г). Окрашивание основным красителем Май-Грюнвальдом подтвердило присутствие фибробластов в культуре. В культуре клеток блеомициновых мышей, количество фибробластов было достоверно (n=8, p<0,05) больше, чем в культуре клеток контрольных животных.

#### *Цитометрическая характеристика длительных культур неадгезирующих мононуклеаров лёгких и костного мозга*

Как видно из рисунка 8, прирост биомассы в длительных культурах неадгезирующих мононуклеаров костного мозга, полученных от мышей интактного контроля, осуществлялся за счёт гемопоэтических прогениторных клеток (CD3<sup>-</sup>, CD45R<sup>-</sup> (B220), Ly6C<sup>-</sup>, Ly6G<sup>-</sup> (Gr1), CD11b<sup>-</sup>, TER-119<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>) и зрелых гемопоэтических клеток. Увеличение популяции ГСК (Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119<sup>-</sup>)) к окончанию культивирования было незначительным.

В культуре костного мозга животных с необратимым пневмофиброзом наблюдался более интенсивный выход прогениторных гемопоэтических клеток, чем в группе интактного контроля (7, 28-й день) (рис. 8, 9). Кроме стимуляции прогениторных гемопоэтических клеток блеомицин существенно повышал уровень ГСК в образцах костного мозга на 28-й день.

В отличие от образцов костного мозга обогащение ГСК в культуре лёгких под влиянием блеомицина отмечалось уже на 7-й день исследования: в опытной группе популяция увеличивалась в 9 раз по сравнению с выделенными лёгкими (рис. 8). На 28-й день эксперимента биомасса в культуре лёгких животных с пневмофиброзом увеличивалась преимущественно за счёт гемопоэтических прогениторных клеток (рис. 9).

#### *Дифференцировка гемопоэтических СК лёгких*

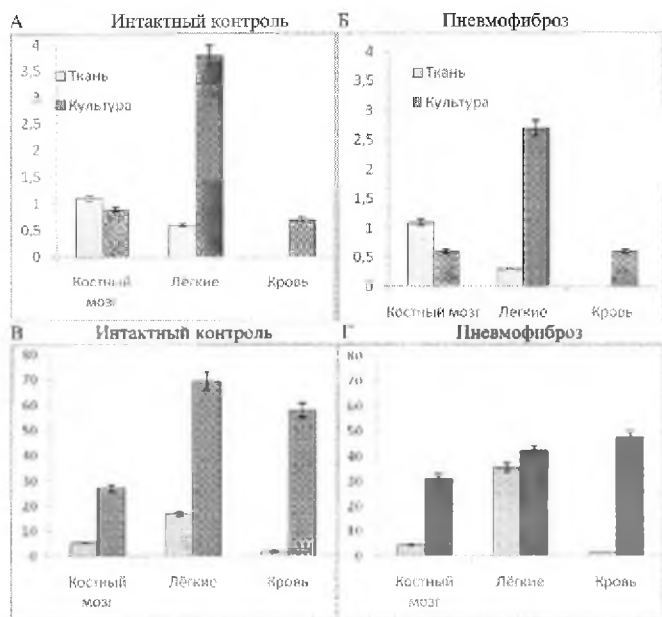


Рис. 8. Содержание ГСК (А, Б) и прогениторных гемопоэтических клеток (В, Г) в тканях (костный мозг, лёгкие и периферическая кровь) у мышей линии С57В1/6 и в культуре тканей на 7-й день эксперимента. По оси ординат количество клеток (% от меченых неадгезирующих клеток).

ГСК и прогениторные гемопоэтические клетки, полученные в длительных культурах, изолировали и с использованием ранее разработанных протоколов [3] изучали способность формировать колонии гранулоцитарного (КОЕ-Г) и эритроидного (КОЕ-Э) типа. Для этого клеточную взвесь помещали в специфические среды с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ) или эритропоэтином.

В образцах, полученных от мышей интактного контроля и мышей с пневмофиброзом на 28-й день эксперимента, рост КОЕ-Г не наблюдался. Формирование КОЕ-Г имело место в образцах, полученных от животных опытной группы на 7-й день пневмофиброза. Размер колоний, в состав которых входили миелоидные клетки (в том числе нейтрофильные гранулоциты), превышал 1000 мононуклеаров.

Под влиянием эритропоэтина рост КОЕ-Э в культурах мононуклеаров интактного контроля и опытной группы не выявлен.

#### Клональная активность тканевых мононуклеаров

##### Недифференцированные гемопоэтические колониобразующие единицы (КОЕ-Н)

Рис. 10 иллюстрирует увеличение интенсивности роста КОЕ-Н в жидких культурах неадгезирующих клеток костного мозга мышей с необратимым пневмофиброзом относительно образцов здоровых мышей на 3, 14-й день эксперимента. В культурах неадгезирующих клеток крови опытной группы КОЕ-Н регистрировались на 14-й день.

Дополнительно нами изучался иммунный профиль клеток КОЕ-Н костного мозга и крови. По данным цитометрического исследования, клетки КОЕ мышей интактного контроля и мышей с пневмофиброзом имели негативный отбор на маркеры зрелых гемопоэтических клеток

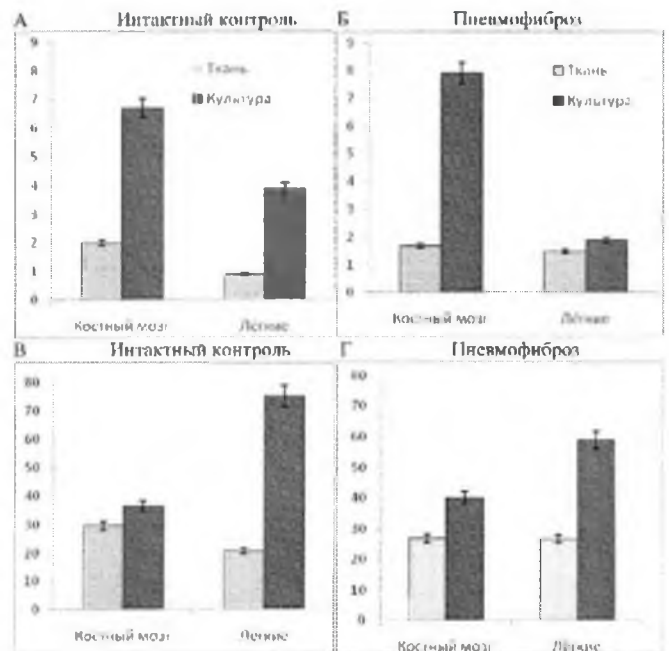


Рис. 9. Содержание ГСК (А, Б) и прогениторных гемопоэтических клеток (В, Г) в тканях (костный мозг, лёгкие и периферическая кровь) у мышей линии С57В1/6 и в культуре тканей на 28-й день эксперимента. По оси ординат количество клеток (% от меченых неадгезирующих клеток)

(CD34<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD45R<sup>-</sup> (B220), Ly6C<sup>-</sup> and Ly6G<sup>-</sup> (Gr1), CD11b<sup>-</sup>, TER-119<sup>-</sup>), положительны для маркеров Sca-1, c-Kit. Такой фенотип свойственен для ГСК.

##### Смешанные (гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные) колониобразующие единицы (КОЕ-ГЭММ)

Изучение колониобразования гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарного типа позволило выявить увеличение роста КОЕ-ГЭММ в жидких культурах неадгезирующих CD45pos клеток костного мозга (3, 21-й день) и крови (3, 7-й день) у мышей в условиях необратимого пневмофиброза (рис. 10).

##### Гранулоцитарные колониобразующие единицы (КОЕ-Г)

Введение блеомицина курсом мышам инициировало рост КОЕ-Г в метилцеллюлозных культурах неадгезирующих CD45pos клеток костного мозга (3, 7, 14, 21-й день) и крови (7, 21-й день) (рис. 10).

##### Фибробластные колониобразующие единицы (КОЕ-Ф)

Моделирование необратимого пневмофиброза вызывало последовательную генерацию фибробластных колоний адгезирующими CD45neg мононуклеарами костного мозга (3, 7, 14, 21-й день), крови (7, 21-й день) и лёгких (7, 14, 21-й день) (рис. 11). К 21-му дню исследования клональная активность легочных КОЕ-Ф превосходила интенсивность колониобразования в культуре костного мозга и крови. На 40-й и 60-й день активность образования КОЕ-Ф в образцах лёгких и костного мозга опытной группы не отличалось от соответствующего показателя в интактном контроле. Примечательно, что в интактном контроле рост КОЕ-Ф отмечался в образцах костного мозга и крови, в культуре лёгких образование колоний не наблюдалось.

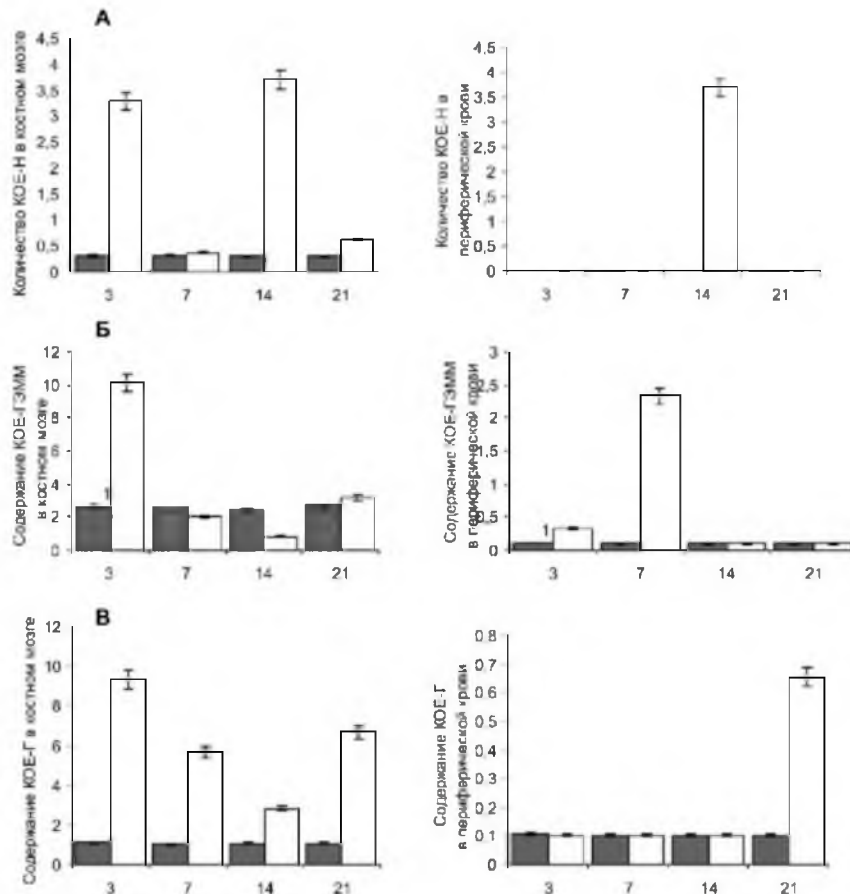


Рис. 10. Динамика содержания КОЕ-Н (А), КОЕ-ГЭММ (Б), КОЕ-Г (В) в костном мозге и периферической крови мышей линии С57ВL/6 при необратимом пневмофиброзе. По оси абсцисс сроки исследования (сутки), по оси ординат содержание предшественников ( $\times 10^5$ ). 1 – интактный контроль; 2 – животные с пневмофиброзом

### Морфологическое исследование крови и костного мозга

В фазу воспаления наблюдалось статистически достоверное увеличение абсолютного количества нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов в периферической крови и костном мозге у мышей с необратимым пневмофиброзом.

### Обсуждение

Отсутствие адекватной животной модели, отображающей процесс заболевания у людей, является одним из препятствий для изучения патогенеза самых разных заболеваний. По современным представлениям, идиопатический фиброз лёгких (ИФЛ), развивается в силу многократно повторяющихся («циклических») травм альвеолярного эпителия. Это формирует ситуацию неполной регенерации, что, в конечном итоге, приводит к прогрессирующему фиброгенезу. Независимыми группами исследователей, опираясь на положительные стороны модели однократного интратрахеального введения блеомицина, разрабатываются животные модели необратимого пневмофиброза [19, 47, 49]. В основе животной модели повторяющихся эпизодов повреждения лёгкого выступает многократное внутритрахеальное введение блеомицина через процедуру интубации. По мнению Degryse A.L. et al. [19], гистологические показатели лёгких при введении блеомицина раз в две недели более коррелирует с человеческим ИФЛ, чем однократная инсталляция цитостатика. Для

проведения процедур авторы анестезировали животных изофлураном (ингаляции). В настоящем исследовании мы отказались от повторяющихся наркотических воздействий. После первого интратрахеального последующие введения блеомицина производили интраназально (раз в

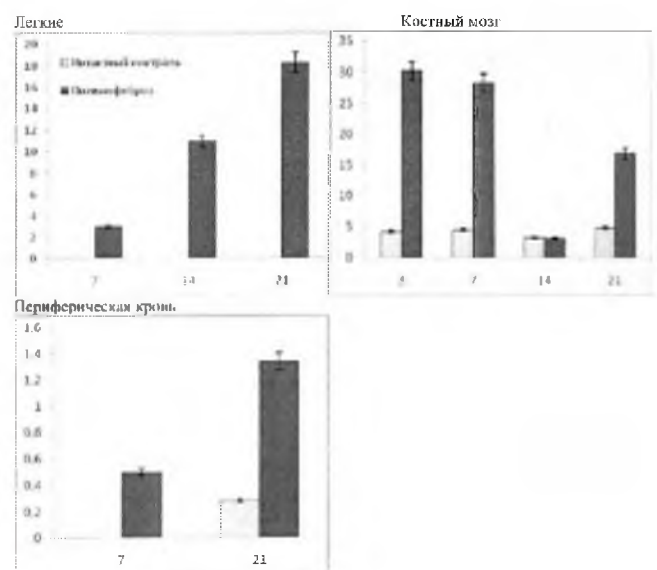


Рис. 11. Содержание КОЕ-Ф в культуре клеток легких, костного мозга и периферической крови мышей линии С57ВL/6 на фоне интратрахеального введения блеомицина. По оси абсцисс сроки исследования (сутки), по оси ординат количество КОЕ-Ф



неделю). По нашим данным такой подход гистологически более полно имитирует хронический аспект легочного фиброза у мышей и соответствует морфологической картине больных ИФЛ, в частности наличием гиперпластических альвеолярных эпителиальных клеток.

Используя подход L.S. Meirelles et al. [44], в настоящем исследовании проанализировано распределение стволовых и прогениторных клеток в костном мозге, периферической крови и лёгких у мышей интактного контроля и у мышей с необратимым пневмофиброзом. Цитометрическая характеристика стволовых и прогениторных клеток представлена в табл. 1.

Эти исследования позволили сделать нам ряд важных выводов. Во-первых, индуцированному блеомицином воспалению в лёгких (с привлечением макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов, плазматических клеток в паренхиме) сопутствует не только высокая активность костномозгового гемопоэза и лейкоцитоз в крови, но и увеличение уровня гемопоэтических прогениторных клеток в крови и лёгких (табл. 2). Высокий уровень легочных и циркулирующих в крови гемопоэтических прогениторных клеток отмечается и в фазу отложения коллагена. По мнению S. Massberg et al. [43], гемопоэтические клетки способны мигрировать по кровеносному руслу к органам. Предполагается, что рекрутируемые в лёгкие из костного мозга гемопоэтические клетки, поддерживают инициируемую блеомицином продукцию коллагена за счёт выделения профибротических цитокинов [70]. Представленные в работе данные морфологических и цитометрических исследований тканей подтверждают возможность инфильтрации лёгких не только костномозговыми зрелыми гемопоэтическими клетками, но и их предшественниками. Так, высокая клональная активность неадгезирующих клеток костномозговых и циркулирующих в крови (формирование КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г) указывает на высокую функциональную активность (пролиферация) мобилизуемых прогениторных гемопоэтических клеток.

Во-вторых, определённый вклад в патогенез необратимого пневмофиброза, с нашей точки зрения, вносят гемопоэтические СК. Как видно из табл. 2, в фазу отложе-

ния коллагена наблюдается повышение числа ГСК в костном мозге, крови и лёгких. Вероятно, такое поведение гемопоэтических стволовых клеток в условиях блеомициновой «атаки» выступает необходимым условием для пневмофиброза. Не исключено опосредованное (цитокины) влияние на фиброгенез. Между тем, в фазу воспаления в лёгких развивается дефицит ГСК, при этом их уровень в костном мозге и крови достаточно высок. Ответ на вопрос о причинах этого феномена, по всей видимости, следует искать в свойствах гемопоэтических СК лёгких. Оценка длительных культур блеомициновых лёгких, выделенных в фазу воспаления, показала, что прирост биомассы в образцах осуществлялся преимущественно за счёт клеток с ГСК-подобным фенотипом (Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119<sup>-</sup>)). Как видно, потенциал к самоподдержанию легочных ГСК в фазу воспаления увеличивается. Неожиданными для нас были результаты исследования *in vitro* дифференциации ГСК. После внесения Г-КСФ в обогащённую гемопоэтическими СК культуру лёгких регистрируется образование колоний с преимущественным содержанием миелоидных клеток. С одной стороны, входом в дифференцировку можно объяснить дефицит ГСК в лёгких. С другой стороны, данные, полученные в пробирке, трудно экстраполировать на целостный организм. «Классическое» понимание дифференцировки ГСК и прогениторных клеток основано на необходимости гемопоэз-индуцирующего микроокружения [2]. В силу особенностей гисто-архитектоники специфическое микроокружение выделяется в кровяной ткани (костный мозг, селезёнка) и отсутствует в лёгких. Вероятно, при необратимом пневмофиброзе следует говорить о потенциале ГСК в фазу воспаления: высокой митотической активности и способности дифференцироваться в клетки миелоидного ростка. Доказательств существования специфических (легочных) механизмов поддержки дифференцировки ГСК на сегодняшний день у нас нет. В связи с этим вопрос о причинах развития дефицита ГСК в паренхиме лёгких на фоне их мобилизации остаётся открытым.

Цитометрическая характеристика СК и прогениторных клеток у мышей линии C57BL/6

Таблица 1

Мезенхимальные СК1	CD45 <sup>-</sup> , CD73 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> , CD106 <sup>+</sup>
Мезенхимальные СК2	CD31 <sup>-</sup> , CD34 <sup>-</sup> , CD45 <sup>-</sup> , CD73 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup>
Прогениторные фибробластные клетки	CD45 <sup>-</sup>
Гемопоэтические СК	Sca-1 <sup>+</sup> , c-Kit <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> , (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119 <sup>-</sup> )
Прогениторные гемопоэтические клетки	CD3 <sup>-</sup> , CD45R <sup>-</sup> (B220), Ly6C <sup>-</sup> , Ly6G <sup>-</sup> (Gr1), CD11b <sup>-</sup> , TER-119 <sup>-</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , c-Kit <sup>+</sup>

Содержание СК и прогениторных клеток в тканях у мышей линии C57BL/6 в условиях необратимого пневмофиброза на 7-й и 28-й дни эксперимента (7/28)

Таблица 2

7/28	Костный мозг	Кровь	Лёгкие
МСК <sub>1</sub>	-- / +	-- / +	+ / 0
МСК <sub>2</sub>	-- / --	-- / +	-- / --
Прогениторные фибробластные клетки	-- / --	0 / --	+ / +
ГСК	0 / +	+ / +	-- / +
Прогениторные гемопоэтические клетки	0 / 0	+ / +	+ / +

Примечание. + увеличение, -- уменьшение, 0 изменения отсутствуют

Третий вывод нами был сделан на основании результатов исследования прогениторных фибробластных клеток. Считается, что происхождение фибробластов внутри лёгочное. Однако появились свидетельства о циркулирующих клетках крови (так называемые «фиброциты»), которые обладают фибробластоподобными свойствами и способны мигрировать в повреждённые ткани [13]. Циркулирующие фибробластные клетки, возможно, «оседают» в формирующемся в лёгких очаге воспаления и вовлекаются в фибротические изменения [24]. В своих исследованиях Hashimoto N. et al. (2004) показал миграцию донорских костномозговых GFP<sup>+</sup>-клеток от трансгенных мышей в блеомициновые лёгкие химерных мышей, одновременно в лёгких повышался уровень GFP<sup>+</sup>-клеток, экспрессирующих коллаген I типа [25]. Наши исследования CD45<sup>neg</sup> клеток выявили, что одновременно с отложением коллагеновых волокон в паренхиме блеомициновых лёгких наблюдается увеличение количества прогениторных фибробластных клеток с высокой митотической активностью. Этому сопутствует снижение уровней CD45<sup>neg</sup> клеток в костном мозге и периферической крови (табл. 2). Примечательно, что клональная активность этих клеток после курсового введения блеомицина превосходит показатель в интактном контроле. На основании представленных данных мы считаем, что прогениторные фибробластные клетки лёгких костномозгового происхождения.

Не следует забывать об участии МСК в патогенезе многих заболеваний. Эта идея основывается на доказательстве того, что МСК способны мигрировать к повреждённым тканям [38,59]. В настоящей работе показано наличие в костном мозге, крови и лёгких у мышей линии C57BL/6 фибробластоподобных и прилипающих к пластику клеток, демонстрирующих МСК-подобный фенотип: CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>. Моделирование необратимого пневмофиброза существенно расширяло популяцию легочных МСК (28-й день). Безусловно, увеличение количества мезенхимальных СК не обошлось без костномозгового резерва, что было продемонстрировано нами на модели частично обратимого пневмофиброза [11, 12, 53]. Не исключается расширение популяции легочных МСК за счёт митотической активности.

В длительных культурах лёгких мышей интактного контроля и опытной группы мы показали возможность наращивания клеток со свойствами МСК (морфология, фенотип). Клетки выдерживают многократное пассирование и не теряют при этом морфологические и фенотипические особенности МСК. Дополнительной характери-

стикой МСК выступает их способность к спонтанной и под влиянием ростовых факторов мультилинейной дифференциации в клетки стромальных линий: хондроциты, остеобласты, жировые клетки, фиброциты. Примечательно, что при необратимом пневмофиброзе одновременно с отложением коллагеновых волокон (28-й день) в паренхиме лёгких наблюдается избирательное увеличение дифференцировки мезенхимальных СК в направлении фибробластно-подобных клеток. Дифференциация в зрелые хондрогенные и остеогенные клетки нарушается. Таким образом, вероятно, при необратимом пневмофиброзе с участием МСК реализуется расширение пула основных клеток продуцентов коллагенов в паренхиме лёгких — фибробластов. Это четвёртый вывод настоящего исследования.

Вопрос о легочных МСК более сложен. При анализе данных цитометрических исследований оказалась, что популяция МСК состоит из двух субпопуляций. Как видно из табл. 2, фенотипически МСК<sub>1</sub> характеризуются как CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, для МСК<sub>2</sub> свойственен другой фенотип — CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>. В ответ на повторяющиеся токсические травмы в лёгких развивается дефицит МСК<sub>2</sub>, уровень МСК<sub>1</sub>, напротив, повышается. Безусловно, МСК<sub>1</sub> и МСК<sub>2</sub> участвуют в развитии необратимого пневмофиброза. Вопрос заключается в том, какая из субпопуляций способствует фиброгенезу, а какая регенерации.

Все приведенные выше аргументы дают основание для пересмотра понимания не только происхождения фибробластов в лёгких, участия стволовых клеток в патогенезе пневмофиброза, но и предложить ГСК и МСК в качестве мишеней для терапии лёгочного фиброза. В табл. 3 приведены данные собственных гистологических исследований потенциальных антифибротических соединений с нейротропной активностью. Резерпин, спиперон, кетансерин, галоперидол и ципрогептадин уменьшали токсическое повреждение лёгочной ткани и интенсивность отложения коллагена у мышей с пневмофиброзом. Примечательно, что противовоспалительное и антифибротическое действие нейротропных средств связано с мезенхимальными и гемопоэтическими стволовыми клетками лёгких, крови и костного мозга. Таким образом, мы полагаем, что модуляция функций регионарных стволовых клеток нейротропными средствами может быть перспективным подходом в лечении фиброзных заболеваний лёгких.

## Выводы

Таблица 3

### Действие нейрофармакологических агентов, обладающих противовоспалительной и антифиброзной активностями, на МСК и ГСК у мышей линии C57BL/6 в условия пневмофиброза

	Воспаление	Содержание коллагена	ГСК	МСК
Резерпин [Скурихин Е.Г. и др., 2012]	—	—	—	—
Спиперон [Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., 2012]	—	—	—	—
Галоперидол [Дыгай А.М. и др., 2011]	—	—	—	—
Кетансерин [Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., 2012]	—	—	—	—
Ципрогептадин [Скурихин Е.Г. и др., 2011]	—	—	—	—
Примечание. -- уменьшение				

На модели повторяющихся блеомициновых травм альвеолярного эпителия у мышей линии C57BL/6 апробирована методология поиска потенциальных мишеней (стволовых и прогениторных клеток) для лекарственной терапии. При необратимом пневмофиброзе инфильтрацию лёгочной паренхимы клетками воспаления (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, плазматические клетки) сопровождают ГСК и прогениторные гемопоэтические клетки. Для ГСК характерны высокая митотическая активность и способность к дифференциации в клетки миелоидного ряда. Одновременно с воспалением в лёгких увеличивается содержание прогениторных гемопоэтических клеток (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г) в костном мозге и крови. Отложению коллагеновых волокон в интерстициальной ткани лёгких сопутствует увеличение числа клеток мезенхимального происхождения (прогениторные фибробластные клетки, МСК). Для МСК характерна избирательная дифференциация в фибробластоподобные клетки.

### Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск, 1992. — 264 с.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В., Першина О.В., Скурихин Е.Г. Фармакологическая регуляция кроветворения при экспериментальных неврологических воздействиях. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. — 156 с., ил.
3. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Андреева Т.В., Хмелевская Е.С., Минакова М.Ю. Роль кроветворных предшественников различных классов в механизмах действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на кроветворение при цитостатической миелосупрессии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 2010. — Т. 148, №4. — С. 400-404.
4. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Андреева Т.В., Першина О.В., Ермолаева Л.А., Хмелевская Е.С., Крупин В.А., Резцова А.М., Степанова И.Э. Противовоспалительная и противовоспалительная активность нейрорелептика при пневмофиброзе // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — №4. — С. 206-210.
5. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г. Стволовая клетка. Новые подходы в терапии дегенеративных заболеваний // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2012. — №2. — С. 3-13.
6. Лупша Х. Основы гистохимии. — М.: Мир, 1980. — 343 с.
7. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. — СПб.: Медицина, 1969. — 423 с.
8. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. 2-е изд., перер. и доп. — М.: Иностранная литература, 1962. — 964 с.
9. Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине. — Барнаул: Азбука, 2003. — 43 с.
10. Скурихин Е.Г., Андреева Т.В., Хмелевская Е.С., Ермолаева Л.А., Першина О.В., Ермакова Н.Н., Степанова И.Э., Резцова А.М., Крупин В.А., Гольдберг В.Е., Рейхарт Д.В., Дыгай А.М. Влияние антисеротонинового препарата на развитие фиброза лёгких и систему крови при интратрахеальном введении блеомицина // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 2011. — Т. 152, №12. — С. 618-622.
11. Скурихин Е.Г., Хмелевская Е.С., Першина О.В., Андреева Т.В., Ермолаева Л.А., Крупин В.А., Ермакова Н.Н., Резцова А.М., Степанова И.Э., Дыгай А.М. Механизмы противовоспалительного и антифибротического действия симпатолитика в условиях токсического пневмофиброза // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 2012. — №5. — С. 590-595.
12. Скурихин Е.Г., Хмелевская Е.С., Першина О.В., Ермакова Н.Н., Крупин В.А., Резцова А.М., Ермолаева Л.А., Якушина В.Д., Степанова И.Э., Резцова В.М., Чердынцева Н.В., Стахеева М.Н., Дыгай А.М. Дифференцировка мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток лёгких при пневмофиброзе. // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2012. — №4. — С. 192-199.
13. Abe R., Donnelly S.C., Peng T., Bucala R., Metz C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. J. Immunol. — 2001. 166:7556-7562.
14. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. Exp Hematol. 2000; 28: 707-15.
15. Banfi A., Bianchi G., Notaro R. et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. Tissue Eng 2002;8:901-10.
16. Benjamin DK Jr, Miller WC., Bayliff S., Martel L., Alexander KA, Martin PL: Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. Pediatr Infect Dis J 2002, 21:227-234.
17. Bitencourt C.S., Pereira P. A.T., Ramos S.G., Sampaio S.V., Arantes E.C., Aronoff D.M., Faccioli L.H. Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis. Fibrogenesis & Tissue Repair. 2011. Vol. 4, №3. P. 14040-14903.
18. Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Treml S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK: Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 2010, 71:1228-1236.
19. Degryse A.L., Tanjore H., Xu X.C., Polosukhin V.V., Jones B.R., McMahon F.B., Gleaves L.A., Blackwell T.S., Lawson W.E. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis // Am J Physiol Lung Cell Physiol. 2010 October; 299(4): L442-L452.
20. Degryse A.L., Lawson W.E. Progress toward improving animal models for IPF // Am J Med Sci. 2011 June ; 341(6): 444-449.
21. Lindolfo da Silva Meirelles, Pedro Cesar Chagastelles, Nance Beyer Nardi Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // J Cell Sci. 2006 June 119(1):2204-2213.
22. Engelhard D, Cordonnier C, Shaw PJ, Parkalli T, Guenther C, Martino R, Dekker AW, Prentice HG, Gustavsson A, Numberger W, Ljungman P: Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. Br J Haematol 2002, 117:444-450.
23. Garcia-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, Peres-Simon JA, Rodriguez R, Menendez P: Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modeling tool. J Cell Mol Med 2008, 12: 2552-2565.
24. Hardie W.D. Glasser S.W., Hagood J.S. // Am. J. of Pathol. — 2009. — Vol. 175. — P. 3 — 16.
25. Hashimoto N., Jin H., Liu T., Chensue S.W., Phan S.H. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. J.Clin.Invest. 2004 Jan;113(2):243-52.
26. Horowitz M.M., Gale R.P., Sondel P.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 1990;75:555-62.
27. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. // J. Exp Cell Res. 1998 Jan 10;238(1):265-72.
28. Jung D., Garat C., West J., Thorn N., Chow K., Cleaver T., Sullivan T., Torchia E.C., Cholds C., Shade T., Tadjali M., Lara A., Nozik-Grayck E., Malkoski S., Sorrentino B., Meyrick B., Klemm D., Rojas M., Wagner Jr D.H., Majka S.M. The Pathology of Bleomycin induced Fibrosis is Associated with Loss of Resident Lung Mesenchymal Stem cells which Regulate Effector T-cell Proliferation. Stem Cells. 2011 ; 29(4):725-735.
29. Horowitz JC, and Thannickal VJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: New concepts in pathogenesis and implications for management. Treat Respir Med 2006; 5(5):325-342.
30. Horowitz JC, and Thannickal VJ. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. Semin Respir Crit Care Med 2006;27(6):600-612.
31. Kang S.K., Shin I.S., Ko M.S., Jo J.Y., Ra J.C. Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy // Stem Cells International. Volume 2012, Article ID 342968, 11 pages.
32. Khalil N., O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment // CMAJ. Jul 20;171(2):153-60.2004;
33. Kim D.S., Collard H.R., King T.E. // Jr. Proc Am Thorac Soc 2006;3(4):285-292. [PubMed: 16738191].
34. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N., Sheppard D., Chapman H.A. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix // Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Aug 29;103(35):13180-5.



35. Krampera Mauro, Franchini Massimo, Pizzolo Giovanni, Aprioli Giuseppe Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use // *Blood Transfus.* 2007 July; 5(3): 120-129.
36. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B.W. et al. (2012) Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS ONE* 7(10): e47559. doi:10.1371/journal.pone.0047559.
37. Lee S.T., Jang J.H., Cheong J.W. et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol.* 2002;118:1128-31.
38. Le Blanc K, Pittenger M: Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005, 7:36-45.
39. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21(8):1733-8.
40. Loebinger MR, Aquilar S, Janes SM: Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls. *Clin Sci (Long)* 2008, 114:99-108.
41. Mahendran S., Sethi T. Treatments in idiopathic pulmonary fibrosis: time for a more targeted approach? // *Q J Med* 2012.V.105. pp. 929-934.
42. Martin D., Cox N., Hathcock T., Niemeyer G., Baker H. // *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. pp. 879-886.
43. Massberg S., Schaeferli P., Knezevic-Maramica I. et al. // *Cell.* — 2007. — Vol. 131. — P. 994-1008.
44. Meirelles L.S., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 2006.
45. Meltzer E.B., Noble P.W. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 Mar 26;3:8.
46. Mensing N. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse [text] / N. Mensing, H. Gasse, N. Hambruch N. et al. // *BMC Veterinary Research.* — 2011. — Vol. 7. — P.
47. Moeller A., Ask K., Warburton D., Gauldie J., Kolb M. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008 : 40 (3): 362-382.
48. Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. et al. // *The Am. J. of Pathology.* — 2009. — Vol. 175. — P. 278-286.
49. Mouratis M.A., Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin // *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Sep;17 (5):355-61.
50. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113(7):1161-6.
51. Ortiz, L.A. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects [text] / L.A. Ortiz, F. Gambelli, C. McBride et. al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 8407 — 8411.
52. Padua AI, Silva CL, Ramos SG, Faccioli LH, Martinez JA: Influence of a DNA-hsp65 vaccine on bleomycin-induced lung injury. *J. Bras Pneumol* 2008, 34:891-899.
53. Pershina O., Skurikhin E., Khmelevskaya E. MSCs of pulmonary in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Antifibrotic effect of pegylated hyaluronidase // LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co, 2012, 53p.
54. Pittenger Mark F., Mackay Alastair M., Beck Stephen C., Jaiswal Rama K., Douglas Robin, Mosca Joseph D., Moorman Mark A., Simonetti Donald W., Craig Stewart, Marshak Daniel R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells // *Science* 2 April 1999: Vol. 284 №. 5411 143-147.
55. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;251:3-11.
56. Prunet-Marcassus Benedicte; Beatrice Cousin; David Caton; Mireille Andre; Luc Penicaud; Louis Casteilla // From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. // *Exp. Cell Res.* 312, 727 (2006)
57. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2012 Jan 18;481(7381):295-305. doi: 10.1038/nature10761.
58. Shukla M.N., Rose J.L. Ray R. et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 40. — P. 643-653.
59. Simiscalco D, Sullo N, Maione S, Rossi F, D'Agostino B: Stem cell therapy: the great promise in lung disease. *Ther Adv Respir Dis* 2008, 2:173-177.
60. Strieter R.M., Mehrad B. // *Chest.* 2009;136. pp. 1364-1370.
61. Summer R, Kotton DN, Sun X, Fitzsimmons K, Fine A. Origin and phenotype of lung side population cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L477-L483, 2004.
62. Teisanu RM, Lagasse E, Whitesides JF, Stripp BR: Prospective isolation of Bronchiolar stem cells based upon immunophenotypic and autofluorescence characteristics. *Stem Cells* 2009, 27:612-622.
63. Tremain N., Korkko J., Ibberson D. et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 2001;19:408-18.
64. Trounson A., Thakur R.G., Lomax G., Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies // *BMC Medicine* 2011, 9:52.
65. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389-97.
66. Tzilas V., Koti A., Papandrinopoulou D., Tsoukalas G., Prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of the Medical Sciences*, 2009. V. 338, N. 6, pp. 481-485.
67. Uccelli A, Moretta I, Pistoia V: Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:726-736.
68. Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. // *Muscle Nerve.* 1995. Vol.18. pp. 1417-1426.
69. Weiss DJ, Bertonecello I, Borok Z, Kim C, Panoskaltis-Mortari A, Reynolds S, Rojas M, Stripp B, Warburton D, Prockop DJ. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc.* 2011 Jun;8(3):223-72. doi: 10.1513/pats.201012-071DW.
70. Welsh D.J., Harnett M., MacLean M., Peacock A.J. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2004. — Vol. 170. — P. 252-259.
71. Willis B.C., Liebler J.M., Luby-Phelps K., Nicholson A.G., Crandall E.D., du Bois R.M., Borok Z. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-1. Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol.* 2005 May; 166(5): 1321-1332. Wilson M.S., Wynn T.A. // *Mucosal Immunology.* — 2010. — Vol. 2. — P. 103 — 121.
72. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P, De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.
73. Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC Jr, Reagan CR, Lucas PA, ng H. et al., 1995; Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *You Dev Dyn.* 1995 Feb;202(2):137-44.
74. Quan T.E, Cowper S., Wu S.P., Bockenstedt L.K., Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4). pp. 598-606.

## ***Stem and progenitor cells in the pneumofibrosis patogenesis***

**Digay A.M., Skurikhin E.G., Pershina O.V., Khmelevskaya E.S., Ermakova N.N., Rezcova A.M., Krupin V.A., Rezcova V.M., Stepanova I.E.**

FSBI Scientific-research institute of pharmacology of RAMS, 3, Lenina Av., 634028, Tomsk

*Model of the bleomycin-induced pneumofibrosis was used to demonstrate, that simultaneously with inflammatory cells (neutrophils, lymphocytes, macrophages, plasma cells) the CD34<sup>+</sup>, (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119)<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> (hematopoietic stem cells (HSC)) and progenitor hematopoietic cells (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b (Mac1), TER-119)<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>) appear in the lung tissue*

---

of C57BL/6 mice. Inflammatory phase in HSC bleomycin lungs is characterized by the high mitotic activity and ability to differentiate into the myeloid cells. Infiltration of alveola's and alveolar ducts' interstition with immature hematopoietic cells is accompanied by an increase in the level of granulocyte-erithriod-macrophage-megakariocyte and granulocyte precursors in bone marrow and circulating blood. During collagen precipitation and influx of progenitor fibroblast cells in the bleomycin lungs' parenchyma two subpopulations of mesenchimal stem cells (MSC) are determined: MSC<sub>1</sub> (CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>) and MSC<sub>2</sub> (CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>). MSC are characterized by the high mitotic activity and the fibroblast – oriented differentiation; at that the chondrogenesis, as well as osteogenesis become infringed. Such MSC characteristics are observed on the background of the increase in clonal activity of the progenitor fibroblast cells from the bone marrow and those circulating in blood. We suppose that pharmacological modulation of the endogenous stem cells can be a perspective approach in treatment of fibrous lung diseases.

**Key words:** irreversible toxic pneumofibrosis, hematopoietic stem cells, mesenchimal stem cells, proliferation, differentiation