

## ЭФФЕКТЫ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЧЕНИИ ЭМФИЗЕМЫ ЛЕГКИХ

А.В. Аверьянов<sup>1</sup>, А.Г. Коноплянников<sup>2</sup>, В.Н.Петров<sup>2</sup>,  
О.А. Коноплянникова<sup>2</sup>, Е.В. Агаева<sup>2</sup>, А.Ф. Цыб<sup>2</sup>, О.П. Кузовлев<sup>1</sup>, А.С. Брюховецкий<sup>3</sup>,  
Н.С. Кулагина<sup>1</sup>, А.Е. Трусов<sup>4</sup>, К.С. Войтковская<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Клиническая больница №83 ФМБА России, Москва

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр Минздравсоцразвития России, Обнинск

<sup>3</sup>ЗАО "Нейровита", Москва

<sup>4</sup>Клиническая больница №57 Департамента здравоохранения г. Москвы

Цель исследования: оценить морфологические и морфометрические изменения ткани легких и активность перитонеальных макрофагов после трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в острой эластазной модели эмфиземы легких (ЭЛ) у крыс.

Материал и методы: 40 крыс линии Вистар в возрасте 3-х месяцев были рандомизированно разделены на 4 равные группы. Животным 1-й группы интратрахеально вводилось 0,4 мл 0,9% NaCl, остальные (2-4 группа) получили эндотрахеально 20 Ед свиной панкреатической эластазы в 0,4 мл 0,9% NaCl. На следующий день (3 группа) и на 7-й день эксперимента (4 группа) крысы получили однократную в/в инъекцию культуры МСК в количестве  $2 \times 10^6$  клеток суспендированных в 0,5 мл физиологического раствора. Крысы 2-й группы использовались в качестве контроля эмфиземы. Перед забоем на 21-й день эксперимента крысы подвергались перитонеальному лаважу с анализом хемилюминесцентной активности перитонеальных макрофагов (ПМ) в лаважной жидкости.

Результаты: у животных 2-4 групп выявлено развитие ЭЛ разной степени выраженности. Ширина альвеолярных ходов в группе 2 экспериментальной эмфиземы увеличивалась на 231% по отношению к контрольной группе. При введении МСК через сутки после эластазы ширина альвеолярных ходов уменьшалась в среднем на 50,3% по сравнению с эмфиземой в контрольной группе. У животных, которым МСК вводили на 7-е сутки эксперимента, этот показатель снижался более значительно – на 64,5%, но был выше на 40,7% по сравнению с первой контрольной группой. Другой количественный показатель выраженности ЭЛ – альвеолярный индекс (АИ) – достоверно возрастал на 149% в группе 2 по отношению к контролю. При введении МСК на 1-е и 7-е сутки эксперимента, АИ уменьшался соответственно на 163,4 и 237%. Индекс пиковой хемилюминесцентной активности ПМ (Мв/10<sup>6</sup> клеток) составил 28,8±1,1 (1 группа), 57,3 ±1,3 (2 группа), 35,8±1,6 (3 группа), 31,9±1,9 (4 группа).

Выводы: Исследование подтвердило возможность регенерации ткани легких после системной (в/в) трансплантации МСК в острой модели ЭЛ у крыс.

*Ключевые слова:* эмфизема легких, мезенхимальные стволовые клетки (МСК), системная трансплантация МСК, крысы

## EFFECTS OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS IN EXPERIMENTAL TREATMENT OF PULMONARY EMPHYSEMA

A. Averyanov, A. Konoplyannikov, V. Petrov, O. Konoplyannikova, E. Agaeva, O. Kuzovlev,  
A. Bruhovetsky, N. Kulagina, A. Trusov, K. Voitkovskaya

The aim of the study was to assess morphologic and morphometric lung tissue changes and peritoneal macrophages activity (MA) after allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) systemic transplantation in acute elastase model of pulmonary emphysema (PE) in rats.

Methods: Forty Wistar rats, 3-months old, were randomized into 4 groups. Control group (1 group) was injected intratracheally 0,4 ml of normal saline, other animals (2-4 groups) received one intratra-

cheal injection of 20 units (U) porcine pancreatic elastase in 0,4 ml of saline. Next day (3 group) and 7 day (4 group) rats were intravenously injected  $2 \times 10^6$  autologous MSCs in 0,5 ml of saline. 2 group was used as emphysema control. Before euthanizing at the 21<sup>st</sup> day rats were undergone peritoneal lavage with analysis of hemi-luminescent macrophages activity in the obtained fluid.

Results: the lungs of 2-4 groups had various degrees of PE. The width of alveolar ducts (VAD) in group 2 experimental emphysema increased by 231% versus the control group. The transplantation of MSCs in a day after elastase decreased VAD by an average of 50.3% compared to the control of experimental emphysema. In animals MSCs injected at the 7<sup>th</sup> day of study, this sizes decreased more greater – by 64,5%, but was higher by 40.7% compared to the first control group. Another quantitative measure of PE – alveolar index – was significantly increased by 149% in group 2 compared to control. The transplantation of MSCs at 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> day of experiment led to alveolar index decreasing, respectively on 163.4 and 237% .

The peak Index of hemi-luminescent macrophages activity (Mv/ $10^6$  cells) was 28,8+1,1 (1 group), 57,3 +1,3 (2 group), 35,8+1,6 (3 group), 31,9+1,9 (4 group).

Conclusions: our study confirmed the possibility of regenerative lung tissue effect of autologous MSCs intravenous injected in experimental rat models of PE.

*Keywords:* pulmonary emphysema, mesenchymal stem cells (MSCs), systemic transplantation MSC, rats.

Эмфизема легких (ЭЛ) – один из наиболее частых клиничко-морфологических синдромов в патологии органов дыхания. По данным мета-анализа R. J. Halbert et al. ЭЛ встречается у взрослого населения с частотой 0,5-5,7% [1]. Большой проблемой является не только высокая заболеваемость ЭЛ, обусловленная, прежде всего, распространенностью табакокурения, но и фактическое отсутствие медицинских инструментов влияния на прогрессирование процесса. Согласно общепринятому определению, ЭЛ – необратимое увеличение воздушного пространства, дистальнее терминальных бронхиол, сопровождающееся деструкцией стенок ацинуса, без сопутствующего их фиброза [2]. Однако это устоявшееся представление о необратимости эмфизематозных изменений ткани легких было подвергнуто сомнению после ряда экспериментов, доказывающих возможность регенерации поврежденных структур экстрацеллюлярного матрикса легочной паренхимы под влиянием ретиноевой кислоты [3, 4]. Было также показано, что в сохранившихся элементах ткани легких идет активный синтез эластина и коллагена [5]. В нашем исследовании у больных, оперированных по поводу тяжелой эмфиземы, обнаружена гиперэкспрессия фактора роста эндотелия (VEGF) в паренхиме легких, что свидетельствовало в пользу активного ангиогенеза [6]. Одна из гипотез патогенеза ЭЛ предполагает, что в его основе лежит нарушение баланса повреждения-регенерации альвеолярных структур.

Естественный интерес к проблеме регенерации в легких вызывают активно развивающиеся технологии трансплантации стволовых клеток (СК). Тем не менее, до последнего времени опубликованы результаты единичных исследований, оценивающих возможные эффекты различных видов СК на патологический процесс в экспериментальных моделях ЭЛ. В 2008 г. G. Zhen et al. показали, что введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) крысам с папаин-индуцированной эмфиземой приводит к миграции СК в легкие с последующей дифференцировкой в альвеолоциты II типа, ингибирует процессы апоптоза и предотвращает развитие ЭЛ [7]. K. Schweitzer et al. (2011) доказали снижение активности воспаления в дыхательных путях и уменьшение числа погибших альвеолоцитов и эндотелиоцитов после трансплантации МСК жировой ткани мышам с эмфиземой, вызванной хронической экспозицией табачного дыма или блокадой рецепторов VEGF [8].

Однако H. Kubo (2010) не подтверждает регенеративный эффект экзогенных МСК костного мозга в экспериментальной модели ЭЛ у мышей [9]. Таким образом, результаты известных исследований эффектов МСК на разных животных моделях ЭЛ недостаточны и противоречивы, а их зависимость от сроков трансплантации ранее не изучалась. Имея предшествующий опыт экспериментов с МСК в животных моделях при патологии кишечника, сердца, печени, выполненных в медицинском радиологическом научном центре Минздрава союзр-

вития России [10], мы попытались воспроизвести острую модель эмфиземы легких у крыс с последующей трансплантацией СК и морфологическим анализом полученного материала.

**Цель исследования:** изучить эффекты трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в разные сроки на ткань легких у крыс с эмфиземой, индуцированной интратрахеальным введением панкреатической эластазы.

**Дизайн исследования:** открытое, рандомизированное, сравнительное контролируемое исследование (рис. 1).

Исследование проводилось в соответствии с Приложением № 8. (Правила гуманного обращения с лабораторными животными) к Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 6 апреля 1973 г. № 1045-73.

#### Материал и методы исследования

40 крыс самок линии Wistar в возрасте 3-х месяцев, массой 180-200 г, были рандомизированы в 2 группы: животным 1-й группы (10

крыс) интратрахеально вводили 0,4 мл 0,9% раствора NaCl; остальные животные (30 крыс) получили эндотрахеально 20 ЕД свиной панкреатической эластазы ("Sigma", USA) в 0,4 мл 0,9% NaCl. После инстилляций крыс поворачивали в разные стороны в течение 1 минуты для равномерного распределения жидкости в дыхательных путях. Для обездвиживания животных во время интратрахеальных инъекций предварительно внутрибрюшинно вводился раствор нембутала в дозе 40 мг/кг массы тела.

Крысы с моделированной эмфиземой случайным образом были распределены на 3 группы по 10 животных в каждой (рис.1). Одна из групп (группа 2) использована в качестве контроля эмфиземы. Другой группе (группа 3) через сутки после инстилляций эластазы в хвостовую вену вводили по  $2 \times 10^6$  суспензии аутологичных МСК, содержащихся в 0,5 мл физиологического раствора. Животные 4-й группы получили ту же дозу МСК через 7 суток после введения эластазы.

Культура МСК (пассаж 5) была выращена из костного мозга крыс линии Вистар, самок по модифицированной методике [10]. У крыс-до-

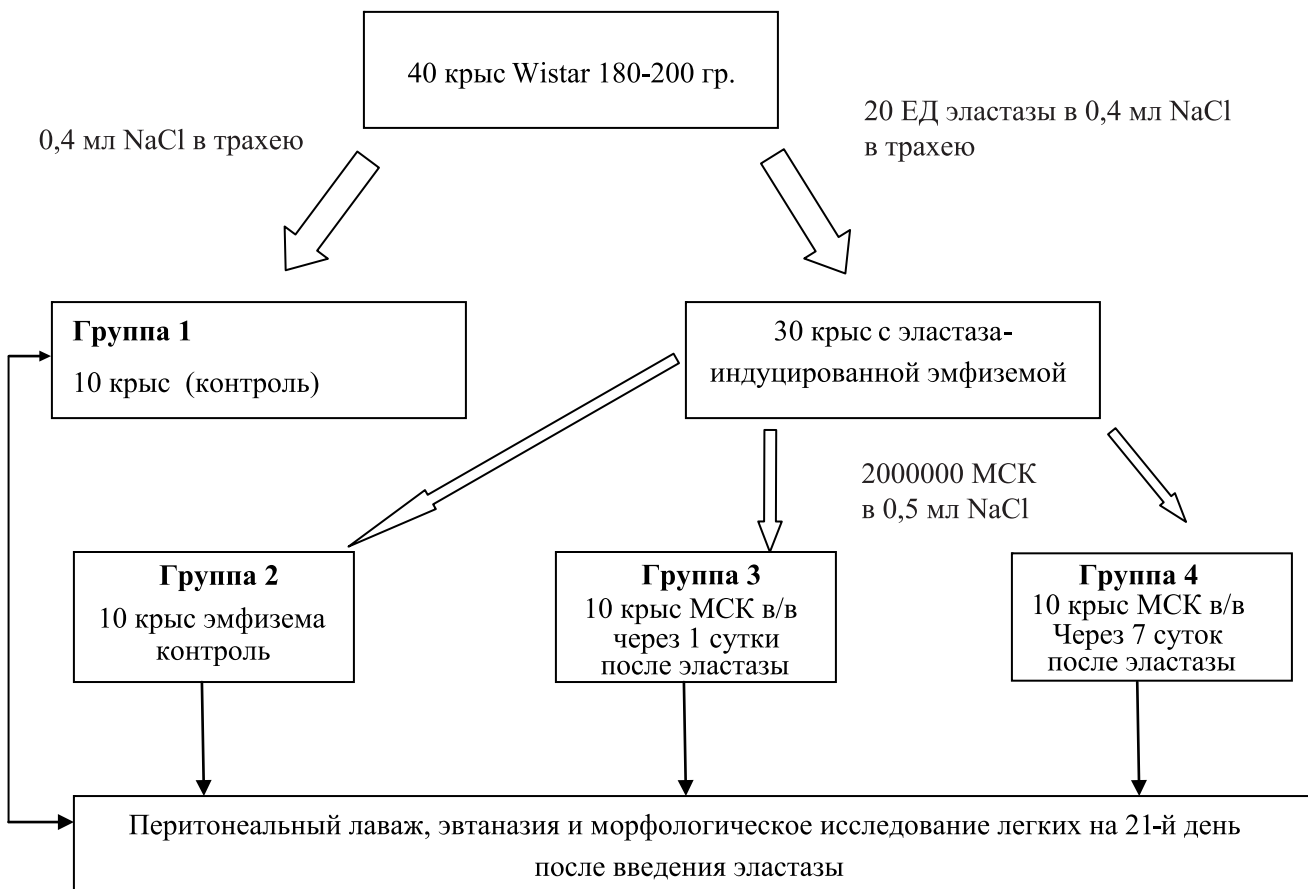


Рис. 1. Схема исследования

норов клетки костного мозга для посева в культуру получали из бедренной кости после введения им для эвтаназии раствора нембутала (70 мг/кг). Полученные в строго стерильных условиях примерно  $10^7$  костномозговых клеток помещали в пробирки с гепарином (100 ЕД/мл пункта). После отстаивания эритроцитов в течение 1-2 часов при комнатной температуре супернатант отсасывали пастеровской пипеткой, выделенные клетки отмывали в среде 199 ("Sigma", USA), центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в ростовой среде. В качестве ростовой среды служила среда RPMI-1640 ("Sigma", USA), содержащая пенициллин (100 ЕД/мл), амфотерицин (100 нг/мл), L-глутамин 2 мМ, 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Культивирование проводилось в пластиковых флаконах Карреля ("Sigma", USA) с площадью дна  $25 \text{ см}^2$ , в которые вносили  $5 \times 10^6$ - $10^7$  клеток костного мозга в 8 мл ростовой среды. Флаконы продували газовой смесью, содержащей 5% углекислого газа и 95% воздуха, и помещали их в обычный термостат  $37^\circ\text{C}$ . Продувание флаконов такой газовой смесью проводили каждый раз, когда меняли среду или пересеивали клетки в новые культуральные флаконы. При достижении сливного (конфлюэнтного) монослоя клетки пересеивали с использованием 0,25% раствора трипсина ("Sigma", USA) в новые флаконы в начале с той же площадью дна ( $25 \text{ см}^2$ ), а по мере нарастания клеточной массы – в большие культуральные флаконы с площадью дна  $175 \text{ см}^2$ . Такой метод позволял к концу 5-6 недели добиться получения популяции МСК в количестве  $(1-2) \times 10^8$  клеток, достаточных для трансплантации в организм крыс-реципиентов. При изучении методом проточной цитофлуорометрии специфических маркеров полученных культур МСК было показано, что они относятся к популяции  $\text{CD}10^{\text{low}} \text{CD}34^- \text{CD}45^- \text{CD}90^+ \text{CD}105^+$  клеток, что характерно для клеток происходящих из мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток взрослого организма. Это заключение было подтверждено способностью полученной культуры клеток при изменении условий культивирования и использования соответствующих индукторов к дифференцировке в четырех исследованных в нашей работе направлениях – в остециты, хондроциты, адипоциты и кардиомиоциты (в последнем случае при применении деметилирующего агента – 5-азациитидина).

Крыс забивали на 21-й день эксперимента внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 70 мг/кг веса. При достижении наркотизации проводили перитонеальный лаваж путем промывания брюшной полости 5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР, рН 7,4). Модифицирующие эффекты МСК на уровень зимозан-индуцируемой продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами (ПМ) оценивали в тесте люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [11]. Пул ПМ выделяли на градиенте Histo-raque 1077/1119 ("Sigma"). Для определения продукции АФК в кюветы люминометра "LKB-Wallac 1251" вносили по  $10^6$  выделенных ПМ в 600 мкл ЗФР, содержащей  $10^{-4}$  М люминола (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; "Serva"). Затем в термостатируемую при  $37^\circ\text{C}$  кювету в кюветодержателе люминометра автоматически по специальной программе "LKB-Wallac 1254-124 Phagocytosis Program" добавляли суспензию опсонизированного зимозана ("Serva" до конечной концентрации 1,25 мг/мл). Регистрация зимозан-индуцированной ХЛ-активности в миллиВольтах/ $10^6$  клеток продолжалась в течение 30 мин. через каждые 2-3 минуты. Данные представляли как средние величины показаний пика ХЛ-активности макрофагов от 12 параллельных измерений.

После забора материала для определения ХЛ активности макрофагов для фиксации легких интратрахеально через катетер вводили фиксатор Буэна под давлением 12 см водного столба до полного расправления легких, заполнявших всю плевральную полость. После этого перевязывали трахею, извлекали комплекс легкие-сердце из плевральной полости и помещали его в жидкость Буэна в 5-кратном размере превышающую объем легких на 3-е суток. Затем из каждого легкого вырезали пластины толщиной 0,4 см перпендикулярно к воротам легкого через все отделы легкого. Полученные срезы обезвоживали в восходящих по крепости спиртах, заливали в парафин и приготавливали срезы толщиной 0,4-0,5 мкм по общепринятой методике. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван-Гизон. С помощью объект-микрометра проводили измерение ширины альвеолярных ходов между замыкательными пластинками входа в альвеолы, ширину и глубину альвеол, открывающихся в альвеолярные ходы. Все измерения проводили строго перпендикулярно к

продольной оси альвеолярных ходов. Вычисляли также соотношение ширины к глубине альвеол (альвеолярный индекс), характеризующий степень выраженности ЭЛ [12].

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи пакета прикладных программ "Statistica for Windows StatSoft Inc. Версия 6.0". Данные таблиц представлены как выборочное среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Достоверность различий оцениваемых показателей между исследуемыми группами вычислялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

В течение эксперимента в группах 2–4 погибли 11 животных: в группе 2 осталось 5 крыс; в группе 3 – 8 крыс, группе 4 – 6 крыс. Большинство подопытных животных погибло в первые двое суток после инстиляции эластазы. Причиной смерти во всех случаях было острое

повреждение легких. В расчеты настоящего исследования включены выжившие крысы.

Основные результаты морфометрического анализа альвеолярной ткани в разных группах животных представлены в таблице 1.

Как видно из табл. 1, ширина альвеолярных ходов в группе 2 экспериментальной эмфиземы увеличивалась в среднем на 231% по отношению контрольной группы (рис. 2a,b), что свидетельствовало об успешном моделировании ЭЛ. При введении МСК на первые сутки после панкреатической эластазы ширина альвеолярных ходов уменьшалась в среднем на 50,3% (до 66,5 мкм) по сравнению с контрольной экспериментальной эмфиземой (рис. 2c). У животных, которым МСК вводили на 7 сутки развития эмфиземы, этот показатель снижался в большей степени – на 64,5%, но был выше на 40,7% в сравнении со здоровыми животными группы 1 (рис. 2d).

Другой количественный показатель выраженности ЭЛ – альвеолярный индекс, досто-

Таблица 1

### Морфометрические характеристики ацинуса в контрольной и экспериментальных группах (n – количество исследованных кусочков легких)

Экспериментальная группа	Ширина альвеолярного хода (мкм)	Альвеолярный индекс (отношение ширины к глубине альвеол)
Группа 1 (контроль)	(n=65) 43,2 $\pm$ 2,0	(n=59) 0,78 $\pm$ 0,04
Группа 2 (эмфизема контроль)	(n=76) 100,0 $\pm$ 2,0	(n=73) 1,16 $\pm$ 0,04
Группа 3	(n=60) 66,5 $\pm$ 3,8	(n=57) 0,71 $\pm$ 0,04
Группа 4	(n=38) 60,8 $\pm$ 4,3	(n=41) 0,49 $\pm$ 0,06

Ширина альвеолярного хода	Альвеолярный индекс:
Гр 1 - Гр 2, 3, 4 $p < 0,001$	Гр 1 - Гр 2, 4 $p < 0,001$
Гр 2 - Гр 3,4 $p < 0,001$	Гр 2 - Гр 3, 4 $p < 0,001$
Гр 3 - Гр 4 $p > 0,05$	Гр 3 - Гр 4 $p < 0,001$
	Гр 1 - Гр 3 $p > 0,05$

верно возрастал на 149% в группе 2 по отношению к контролю.

При введении МСК на 1-е и 7-е сутки после эластазы альвеолярный индекс достоверно уменьшался соответственно на 63,3% и 236% по отношению к значению данного показателя в группе контрольной ЭЛ.

Исследуя показатели хемилюминисцентной активности перитонеальных макрофагов, мы получили данные, в целом отражающие морфологические изменения в эксперименталь-



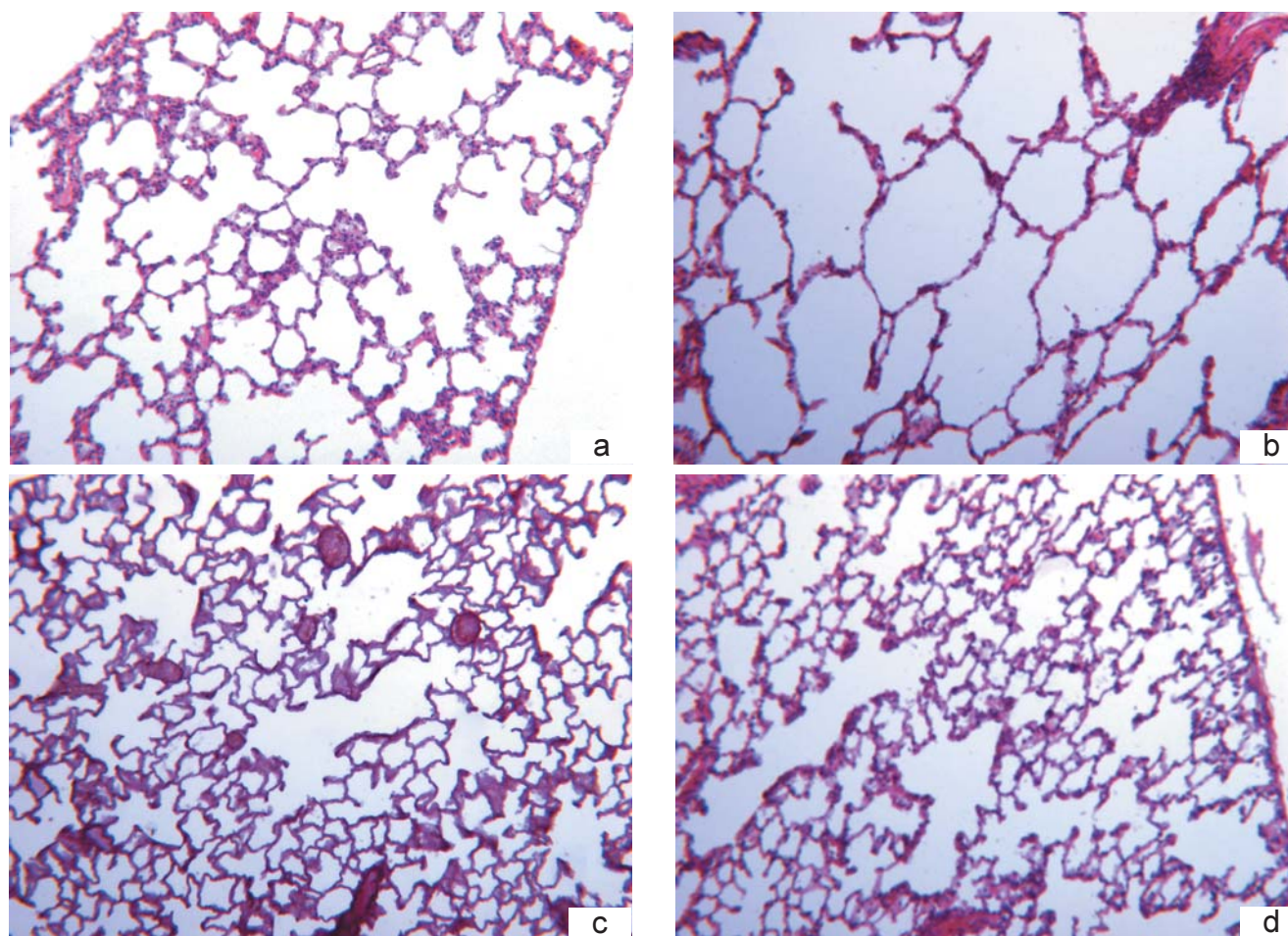


Рис. 2. Ткань легких. Окраска гематоксилином и эозином, X 100. а) альвеолярные ходы и альвеолы контрольной группе (группа 1), б) расширение альвеолярных ходов при эмфиземе (группа 2), с) альвеолярные ходы и альвеолы на 21 сутки после введения МСК с 1 суток (группа 3), д) альвеолярные ходы и альвеолы на 21 сутки после введения МСК на 7 суток эксперимента (группа 4)

ных группах (табл. 2). Высший пик ХЛ-активности ПМ пришелся на животных группы 2 ( $57,3 \pm 1,3$  мВ/106 клеток), что практически в 2 раза выше, чем в группе здорового контроля. В группах лечения МСК показатель ХЛ-активности ПМ снижался в среднем на 60% (группа 3) и 79,6% (группа 4), но не достигал уровня крыс без эмфиземы.

### Обсуждение результатов

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о положительных морфологических и иммунологических эффектах трансплантации МСК в острой эластазной модели ЭЛ. По-видимому, МСК оказали сдерживающее влияние на развитие ЭЛ после эластазного повреждения. Несмотря на то, что видимые морфологические изменения находят обычно к концу 2-й недели после введения эластазы в нижние дыхательные пути, биохимиче-

Таблица 2

### Пиковые значения хемилуминисцентной активности перитонеальных макрофагов в контрольной и экспериментальных группах

Экспериментальная группа	Средние величины показаний пика ХЛ-активности макрофагов (миллиВольт/10 <sup>6</sup> клеток)
Группа 1	$28,8 \pm 1,1^*$
Группа 2	$57,3 \pm 1,3$
Группа 3	$35,8 \pm 1,6^*$
Группа 4	$31,9 \pm 1,9^*$

\* -  $p < 0,001$  в сравнении с группой 2

мические процессы деградации экстрацеллюлярного матрикса паренхимы легких наблюдаются уже в первые часы после эндотрахеальных инъекций эластазы [13]. Гибель альвеолоцитов и эндотелиоцитов, снижение содержания эластина, коллагена и ламинина в альвеолярных стенках имеет место с первого дня эластазного повреждения [13, 14]

В нашем исследовании более выраженный регенеративный эффект наблюдался в группе, получившей МСК на 7-й день эксперимента (группа 4). Данный факт требует объяснения, поскольку, как правило, раннее вмешательство приводит к лучшим результатам. Возможно, полученные нами результаты связаны с тем, что в ближайший период от повреждения легких часть МСК «отвлекалась» на нейтрализацию острого воспалительного ответа, развивающегося на введение эластазы. Известно, что острое повреждение и отек легких, вызванные бактериальными липополисахаридами, блокируются внутривенной инъекцией МСК [15]. В нашей работе причиной гибели животных было острое эластазное повреждение легких, а большая выживаемость наблюдалась в 3-й группе, что свидетельствует об участии трансплантированных в ранние сроки МСК в преодолении этого критического состояния. Доказательством противовоспалительной активности МСК могут являться результаты оценки индуцированной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов. Массированный выброс активных радикалов кислорода (синглетный кислород, перекись водорода, гипохлорит, супероксидный анион-, гидроксильный и гидроперекисный радикалы, оксид азота и т.д.) в результате «метаболического взрыва» является одним из основных и начальных звеньев цитостатической и цитотоксической активации моно- и полиморфонуклеарных фагоцитов, естественных киллеров в отношении микробных, опухолевых и переживающих клеток [16, 17]. В настоящее время благодаря появлению хемилюминесцентных зондов (люминол и люцигенин) стало возможным количественное измерение активных радикалов кислорода в биологических жидкостях и культуральных средах с помощью хемилюминесцентного метода, который до сегодняшнего дня остается наиболее специфическим и высокочувствительным тестом оценки функциональной активности фагоцитов [18]. Используя ХЛ тест, мы увидели, что с одной стороны введение эластазы и раз-

витие эмфиземы усиливают способность эффекторных клеток генерировать активные формы кислорода (АФК), что свидетельствует о системном воспалительном ответе. С другой стороны, в группах, получивших клеточную терапию, пик ХЛ-активности перитонеальных макрофагов достоверно уменьшался, приближаясь к уровню здоровых контрольных крыс.

Поскольку известно, что острая гипоксия и окислительный стресс, всегда имеющие место при остром повреждении легких, являются индукторами апоптоза МСК [19, 20], мы предполагаем, что, подвергаясь ускоренному апоптозу после выполнения противовоспалительной роли, меньшее количество МСК участвовало в последующем процессе восстановления клеточных и каркасных структур, что объясняет больший регенеративный эффект в группе, получившей МСК не на следующий, а на 7-й день после эластазной травмы.

Механизмы восстановления паренхимы легких в результате введения МСК до настоящего времени окончательно не установлены. Хотя несколько исследований доказали миграцию в легкие и превращение экзогенных МСК в альвеолярный эпителий и эндотелий [21-23], более поздние работы установили, что трансформация в альвеолоциты происходит не более чем у 1% от введенного пула СК [24, 25]. Однако эти данные были получены не на модели эмфиземы, а при муковисцидозе и блеомициновом фиброзе. Вероятно, больший вклад в регенерацию ткани легких при эмфиземе вносят паракринные эффекты клеточной терапии. G. Zhen et al. продемонстрировали положительное влияние МСК на тканевую экспрессию фактора роста эндотелия (VEGF) и подавление апоптоза эпителия у крыс с эмфиземой, вызванной инстилляцией папаина в дыхательные пути [26]. В исследовании E.P. Ingenito et al. на модели ЭЛ у овец показана продукция МСК интегринов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллагена IV, ламинина и фибриллина), рецепторов фактора роста тромбоцитов и трансформирующего фактора роста  $\beta 2$  [27]. В той же работе установлено, что часть МСК встраивается в альвеолярные стенки и перибронхиальный интерстиций при эндобронхиальном введении, а часть подвергается апоптозу с захватом макрофагами и дендритическими клетками.

Вероятны также активирующие эффекты экзогенных МСК на резидентные СК легких.

Как и в других органах, в легких имеются собственные МСК, среди которых выделяют клетки протоков подслизистых желез трахеи, базальные клетки межхрящевых зон нижней части трахеи, клетки Клара бронхиол и альвеолярных ходов и альвеолоциты II типа [28]. Одним из путей активации стационарных СК легких может быть экспрессия экзогенными СК ростовых факторов, в частности фактора роста кератиноцитов [29]. По-видимому, суммация разных эффектов трансплантированных МСК как основного компонента физиологической и «аварийной» регенерации различных органов и тканей взрослого организма [30] определяет как торможение развития ЭЛ, так и восстановление поврежденных структур ткани легких в острой эластазной модели.

### Заключение

Наше исследование подтвердило принципиальную возможность сдерживающего, регенеративного и системного противовоспалительного эффекта при внутривенном введении ал-

логенных МСК в экспериментальной модели эмфиземы легких у крыс. Учитывая низкую иммуногенность МСК, можно ожидать подобного эффекта и при введении ксеногенных МСК, что наблюдалось в экспериментальных моделях других заболеваний [31]. Отдавая отчет в различии механизмов развития эмфиземы легких у животных при остром эластазном повреждении воздухоносных путей и у человека под влиянием хронической экспозиции табачного дыма, мы полагаем, что у больных с прогрессирующей эмфиземой, в основе которой лежит хроническое воспаление нижних дыхательных путей, трансплантация МСК может быть эффективным методом лечения. Следующим шагом должно стать проведение клинических исследований для оценки эффективности и безопасности данной технологии. При этом успехом можно считать не только обратное развитие патологического процесса, но даже замедление прогрессирования заболевания, которое на сегодняшний день невозможно ни консервативными, ни хирургическими методами.

### Литература

- Halbert R. J., Natoli J. L., Gano A. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2006; 28(3): 523-32.
- National Heart Lung and Blood Institute. The definition of emphysema. Report of a Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir. Dis.* 1985;132(1): 182-85.
- Massaro, G.D., Massaro, D. Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice. *Am. J Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278(5), L955-L960.
- Kaza, A.K., Kron, I.L., Kern, J.A., et al. Retinoic acid enhances lung growth after pneumonectomy. *Ann Thorac Surg.*, 2001; 71(5), 1645-50.
- Vlanovich G, Russel ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal Walls in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.*, 1999; 160(6): 2086-92.
- Аверьянов А.В., Самсонова М.В., Черняев А.Л. и др. Аспекты патогенеза эмфиземы легких у больных ХОБЛ. *Пульмонология*, 2008, (3): 35-41.
- Zhen G, Liu H, Gu N, Zhang H Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema. *Front Biosci.* 2008;13: 3415-22.
- Schweitzer KS, Johnstone BH, Garrison J et al Adipose Stem Cell Treatment in Mice Attenuates Lung

and Systemic Injury Induced by Cigarette Smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(2): 215-25.

9. Kubo H. Lung Repair and Regeneration -Animal Models. Cell therapy for lung disease. Pub. by Imperial College Press, London, 2010: 199-235.

10. Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. *Вестник Российской Академии медицинских наук*, 2004; 59(9): 71-6.

11. Петров В.Н., Конопляников А.Г., Саяпина Е.В. и др. In vitro модифицирующее воздействие мезенхимальных стволовых клеток на продукцию макрофагами активных форм кислорода в аллогенной и ксеногенной системах совместных культур. В кн.: "Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. (под редакцией В.А.Ткачука)", М., изд Литтерра, 2009; 429-48.

12. Таков Р.Г. Патологическая анатомия и патогенез хронической обструктивной эмфиземы легких. Автореферат дисс...канд.мед.наук. М.1966. 25 с.

13. Lest C.H.A., Versteeg E.M.M., Veerkamp J.H., Kuppevelt T.H. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats. *Eur Respir J.* 1995, 8, 238-245.



14. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M et al. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest*. 2004 Apr;125(4):1500-6
15. Mao M., Wang S.N., Lv X.J. et al. Intravenous delivery of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves survival and attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Shock*. 2010; 34(2):196-204.
16. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. 1989. 344 стр.
17. Tauber A.I, Babior V.M. O<sub>2</sub>- and host defense: the production and fate of O<sub>2</sub>- in neutrophils. *Photochem. Photobiol.* 1978; 28(4-5): 701-9.
18. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных. В кн.: Итоги науки и техники. Биофизика. ВИНТИ. М. 1989; т. 24. 176 с.
19. Wei H., Li Z., Hu S. et al., Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. *J Cell Biochem*. 2010 Nov 1;111(4): 967-978.
20. Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Apr;16(2):159-68
21. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001 May 4; 105(3): 369-77.
22. Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V. et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001;128(24):5181-8.
23. Wang G., Bunnell B.A., Painter R.G. et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2005; 102(1): 186-91.
24. Kotton D.N., Fabian A.J., Mulligan R.C. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 33(4):328-34.
25. Loi R., Beckett T., Goncz K.K. et al. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir. Crit Care Med*. 2006;173(2): 171-9.
26. Zhen G., Xue Z., Zhao J. et al. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells. *Cytotherapy*. 2010;12(5): 605-14.
27. Ingenito EP, Tsai L, Murthy S, Tyagi S, Mazan M, Hoffman A. Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema. *Cell Transplant*. 2011 Feb 3;1-44.
28. Roomans GM Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium. *European Cells and Materials*. 2010; 19: 284-299.
29. Gomperts B.N., Belperio J.A., Fishbein M.C., Keane M.P., Burdick M.D., Strieter R.M. Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(1): 48-56.
30. Mimeault M., Hauke R., Batra S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(3): 252-64.
31. 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(3):389-97.

Информация об авторах:

Аверьянов Александр Вячеславович – заместитель главного врача по научной работе  
ФГУЗ Клиническая больница №83 ФМБА России, д.м.н. Тел.: (495) 395-05-11, e-mail: averyanovav@mail.ru

Конопляников Анатолий Георгиевич – руководитель отделения клеточной и экспериментальной лучевой терапии ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздравсоцразвития России, проф., д.б.н. Тел.: 8-4843-99-32-90 e-mail:konopl@obninsk.ru

Петров Василий Николаевич – ведущий научный сотрудник МРНЦ Минздравсоцразвития России, к.м.н.

Конопляникова Ольга Андреевна – ведущий научный сотрудник МРНЦ Минздравсоцразвития России, к.б.н.

Агаева Екатерина Викторовна – научный сотрудник МРНЦ Минздравсоцразвития России

Цыб Анатолий Федорович – директор МРНЦ Минздравсоцразвития России, д.м.н., профессор, академик РАМН

Кузовлев Олег Петрович – главный врач ФГУЗ КБН° 83 ФМБА России, д.м.н., профессор

Брюховецкий Андрей Степанович – Ген. директор ЗАО "Нейровита", д.м.н., профессор

Кулагина Наталья Сергеевна – врач ординатор КБН°83 ФМБА России

Трусов Алексей Евгеньевич – ординатор ГКБН°57, Москва

Войтковская Ксения Сергеевна – студентка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова