

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-4-88-96

## ЭФФЕКТЫ ИНГАЛЯЦИОННОГО И ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У КРОЛИКОВ

*А.В. Аверьянов<sup>1, 3</sup>, А.Г. Коноплянников<sup>2</sup>, Ф.Г. Забозлаев<sup>3</sup>, О.В. Данилевская<sup>3</sup>, М.А. Коноплянников<sup>3</sup>, А.В. Сорокина<sup>3</sup>, И.А. Королева<sup>3</sup>, Н.С. Антонов<sup>1</sup>, Г.Л. Осипова<sup>1</sup>, О.С. Васильева<sup>1</sup>, Г.М. Сахарова<sup>1</sup>, А.Р. Татарский<sup>1</sup>, В.И. Кобылянский<sup>1</sup>, В.В. Романов<sup>4</sup>, И.Э. Степанян<sup>4</sup>, С.Л. Бабак<sup>1</sup>, А.В. Троицкий<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Российская Федерация

Проведен сравнительный анализ эффективности ингаляционного и внутривенного пути доставки эквивалентных доз мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у кроликов на стандартной модели блеомицинового легочного фиброза. После бронхоскопической инсталляции блеомицина в заднюю правую долю 5 кроликов получили внутривенную трансплантацию  $2 \times 10^6$  аллогенных МСК,  $5 - 2 \times 10^7$  МСК ингаляционно через компрессорный небулайзер; по 5 животных использовались в качестве здорового и блеомицинового контроля без лечения. **Результаты.** Обе группы, получавшие лечение МСК, имели достоверно более низкий индекс фиброза по морфометрической шкале Эшкрофта, чем контрольная группа блеомицинового фиброза. Экспрессия коллагена в ткани легких была существенно выше во всех группах с блеомициновой травмой, но у животных, подвергшихся внутривенной трансплантации МСК, она составила 0,79 балла, а при ингаляционном введении – 0,51 балла, тогда как группа блеомицина без лечения – 2,1 балла. Уровни TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ 1 в жидкости БАЛ имели тенденцию к уменьшению в группах лечения, но достоверно не различались от контроля. Похожая картина имела место при цитологическом анализе БАЛ. **Выводы.** В целом оба метода доставки клеточного материала в легкие продемонстрировали сходные терапевтические эффекты в отношении сдерживания развития экспериментального фиброза, существенно не отличаясь между собой, что свидетельствует о возможности использования как внутривенного, так и ингаляционного пути введения для последующих клинических исследований.

*Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; легочный фиброз, кролики, небулайзеры.*

**Для корреспонденции:** Аверьянов Александр Вячеславович. Адрес: 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28. Тел. (495) 395-05-11. E-mail: averyanovav@mail.ru

**For correspondence:** Averyanov Aleksandr Viacheslavovich. Address: 28, Orekhovyy boulevard, Moscow, 115682, Russian Federation. Tel. (495) 395-05-11. E-mail: averyanovav@mail.ru

# EFFECTS OF INHALATION AND INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL BONE MARROW STROMAL CELLS IN A BLEOMYCIN-INDUCED MODEL OF PULMONARY FIBROSIS IN RABBITS

*A.V. Averyanov<sup>1, 3</sup>, A.G. Konoplyannikov<sup>2</sup>, F.G. Zabozaev<sup>3</sup>, O.V. Danilevskaya<sup>3</sup>, M.A. Konoplyannikov<sup>3</sup>, A.V. Sorokina<sup>3</sup>, I.A. Koroleva<sup>3</sup>, N.S. Antonov<sup>1</sup>, G.L. Osipova<sup>1</sup>, O.S. Vasilyeva<sup>1</sup>, G.M. Sakharova<sup>1</sup>, A.R. Tatarsky<sup>1</sup>, V.I. Kobylanskiy<sup>1</sup>, V.V. Romanov<sup>4</sup>, I.E. Stepanyan<sup>4</sup>, S.L. Babak<sup>1</sup>, A.V. Troitsky<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Pulmonology Research Institute under FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> National Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Federal Research Clinical Center under FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

**Aim:** to perform a comparative analysis of the efficacy of the inhaled and intravenous delivery of equivalent doses of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) in rabbits according to the standard model of bleomycin pulmonary fibrosis. **Materials and methods.** After bronchoscopic instillation of bleomycin, 5 rabbits received intravenous transplantation of  $2 \times 10^6$  allogeneic BMMSCs, other 5 rabbits –  $2 \times 10^7$  MSCs inhaled via compressor nebulizer; control healthy and bleomycin group included 5 animals each. **Results.** Both groups treated with BMMSCs had a significantly lower Ashcroft fibrosis index than the bleomycin control group. Expression of collagen in lung tissue in all groups with bleomycin injury was superior to healthy controls, but in animals underwent intravenous BMMSC transplantation collagen score was 0.74 points, and in inhaled treated group – 0.51 points, while in bleomycin controls – 2.1 point. Levels of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in BAL fluids tended to decrease in treatment groups, but did not differ significantly from control. A similar picture was observed in the cytological analysis of BAL. **Conclusion.** In general, both methods of delivering of BMMSCs to the lungs demonstrated similar therapeutic effects in inhibiting the development of experimental fibrosis, indicating that both intravenous and inhalational way of introduction can be used for subsequent clinical studies.

*Key words:* mesenchymal stem cells, pulmonary fibrosis, rabbits, nebulizer.

Фиброз легочной ткани представляет собой конечную стадию многих диффузных паренхиматозных заболеваний легких, таких как идиопатические интерстициальные пневмонии, саркоидоз, экзогенный аллергический альвеолит, системные заболевания соединительной ткани и др. Среди них особое место занимает идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) в связи с его наибольшей распространенностью, а также неуклонным прогрессирующим течением со средней выживаемостью не более 3–5 лет, сопоставимой с таковой при раке легкого [1]. Современная концепция патогенеза ИЛФ строится на гипотезе неконтролируемой продукции коллагена миофибробластами, вызываемой хроническим повреждением эпителия дыхательных путей табачным дымом, аэрополлютантами, микроаспирацией желудочного сока и пр. На сегодняшний день для терапии ИЛФ в мире используется только 2 антифиброзных препарата – пирфенидон и нинтеданиб, однако высокая стоимость (в среднем 30 тысяч долларов в год) при необходимости пожизненного приема существенно ограничивают их доступность для

пациентов. Трансплантация легких у таких больных проводится редко – с одной стороны, в силу сравнительно невысокой выживаемости после операции, а с другой – в связи с поздним началом заболевания (большинство больных старше 60 лет). Одним из перспективных подходов к лечению фиброзных заболеваний легких рассматривается трансплантация различных видов стволовых клеток (чаще мезенхимальных), которые за счет паракринных эффектов способны предотвратить или замедлить развитие фиброза в экспериментальных моделях [2–4].

В одном из недавних исследований мезенхимальные клетки жировой ткани демонстрировали антифиброзный эффект, превосходящий таковой у эталонного препарата пирфенидон [5]. Тем не менее выявлены и потенциальные профиброзные свойства стволовых клеток, вероятность индукции ими медиаторов фиброгенеза, в частности трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ 1) [6]. Следует заметить, что подавляющее большинство доклинических исследований было выполнено на мышинной модели блеомицин-индуцированного ле-

гочного фиброза, а клеточный препарат имел ксеногенное происхождение (от человеческих доноров) и вводился чаще всего внутривенно. Между тем, для перехода к клиническим исследованиям всегда требуется приблизить условия эксперимента к потенциальному клиническому применению. Наша работа ставила задачу изучения эффектов аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) на модели легочного фиброза у более крупных животных – кроликов при разных путях доставки клеточного материала в легкие – ингаляционном и внутривенном.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Клеточный препарат

В исследовании были использованы аллогенные МСК костного мозга кроликов. МСК извлекали из костного мозга животных, согласно традиционному протоколу [7]. Кролики были эвтаназированы передозировкой пентобарбитала натрия (раствор Nebutal, Boehringer Ingelheim, Германия). Костный мозг выделяли из большеберцовой и бедренной костей кролика и ресуспендировали в 2 мл PBS (Invitrogen-Gibco, США). Суспензию костного мозга наслаивали на 3 мл раствора фиколла (плотность: 1,077 г/мл, Histopaque-1077, Sigma-Aldrich Co., США) с последующим градиентным центрифугированием при 400 g в течение 30 мин в 15-мл центрифужной пробирке (Corning, США). Моноядерный средний слой собирали и затем дважды промывали с использованием среды DMEM-F12 (Invitrogen-Gibco, США), с добавлением антибиотика/антимикотика (1% v/v, Invitrogen-Gibco). Затем изолированные мононуклеарные клетки культивировали в ростовой среде DMEM-F12 (Invitrogen-Gibco, США), с до-

бавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen-Gibco), антибиотика / антимикотика (1% v/v, Invitrogen-Gibco) и GlutaMAX-I (1% v/v, Invitrogen-Gibco, США) в культуральных флаконах T75 (Nunc, США). Клетки инкубировали при 5% CO<sub>2</sub> и 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе SANYO (Япония). Смену среды производили на 3-й день от начала культивирования, для удаления неадгезивных клеток. Последующие смены среды проводили с интервалом в 3 дня. При достижении 90% конfluenceности клетки пассировали, с использованием 0,25% трипсина-ЭДТА (Invitrogen-Gibco, США). Полученные МСК кролика демонстрировали фенотип, характерный для МСК взрослого организма: CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, по результатам проточной цитофлуориметрии, с использованием соответствующих антител (BD Biosciences, США) и проточного цитометра Partec CyFlow Space (Германия).

*Протокол исследования:* мы сравнивали эффекты различных способов введения МСК в отношении развития локального фиброза легких, индуцированного эндобронхиальным введением блеомицина (рис. 1). В качестве животной модели были использованы 20 4-месячных здоровых кроликов весом 2,5–3,4 кг породы шиншилла; 15 из них после внутрибрюшинного введения нембутала в дозе 50 мг/кг в положении лежа на спине была выполнена бронхоскопия ультратонким фибробронхоскопом с наружным диаметром дистального конца 2,5 мм, модель Karl Storz 6000V (Германия). Каждому животному в заднюю долю правого легкого был инстиллирован раствор блеомицина (Веро-блеомицин, ЛЭНС ФАРМ, Россия) в дозе 2,5 мг/кг в 3 мл 0,9% натрия хлорида. На следующий день 5 животных получили внутривенное введение в ушную вену 2 млн МСК в 5 мл 0,9% NaCl; еще 5 кроликов подверглись ингаляционному введению 20 млн МСК в

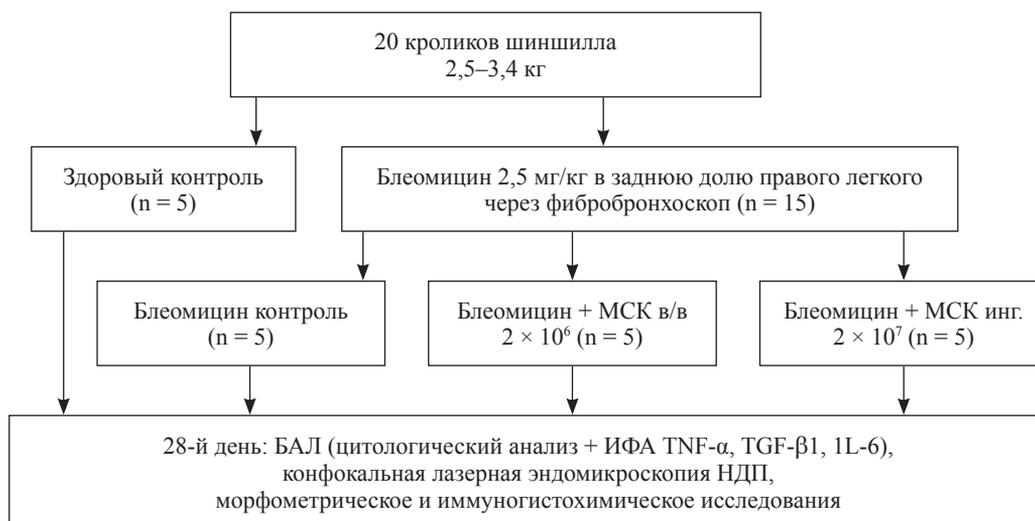


Рис. 1. Дизайн исследования

Fig. 1. The study design

5 мл 0,9% NaCl распыленных через компрессорный небулайзер CompAir NE-C24 (OMRON Healthcare, Япония) с использованием неонатальной маски. Оставшиеся 5 животных использованы в качестве здорового контроля.

На 28-й день всем кроликам перед эвтаназией проводилась фибробронхоскопия описанным ранее методом с бронхоальвеолярным лаважом (БАЛ) заднедолевого бронха справа 3 мл 0,9% NaCl, полученная жидкость отправлялась на цитологический и серологический анализ. Для цитологического исследования проводилось цитоцентрифугирование подготовленного образца БАЛ с покраской по Романовскому–Гимзе и световой микроскопией. Оценивался общий цитоз (число всех клеток в 1 мкл) и процентные фракции клеток.

Уровень цитокинов TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-6 в жидкости БАЛ оценивался при помощи иммуноферментного анализа на автоматическом планшетном ИФА-анализаторе ВЕР 2000 (Германия).

### **Морфологическое и иммуногистохимическое исследование**

Забор легких производился незамедлительно после эвтаназии животных. После вскрытия грудной полости на трахею и крупные кровеносные сосуды шейной области были наложены лигатуры с целью минимизации контаминации легочной паренхимы кровью. Легкие извлекали из грудной полости, проводили краевую резекцию около 1 см<sup>3</sup> ткани из задней доли правого легкого для исследования конфокальной лазерной эндомикроскопией, накладывали зажим на место отсечения, наполняли через трахею под давлением 25 см вод. ст. 10% раствором формалина, а затем заднюю правую долю помещали в отдельные емкости с 10% нейтральным формалином объемом, 5-кратно превышающим объем фиксируемых органов. После 72-часовой фиксации исследуемого материала легочная ткань была помещена в парафиновые блоки с последующим приготовлением срезов толщиной 5 мкм и окраской гематоксилином и эозином по стандартной методике. Микроскопическое исследование производилось с помощью светового микроскопа (Nicon Eclipse 50i). Морфологические признаки фиброза легких оценивали полуколичественным методом при помощи 9-балльной шкалы Эшкрофта от (0 баллов – отсутствие признаков фиброза до 8 баллов – тотальный фиброз без сохраненных альвеолярных пространств) [8]. Оценивалось 20 случайных полей зрения из препаратов каждого животного с определением средней величины степени фиброза в баллах.

Для приготовления препаратов для иммуногистохимического исследования из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые

монтировали на высокоадгезивные стекла (Polysine Slides, «Menzel GmbH & Co KG»; Германия). Депарафинирование, регидратацию, демаскировку антигена, окраску производили при помощи специализированной автоматизированной системы Ventana BenchMark<sup>®</sup> ULTRA (USA). Для оценки степени аккумуляции коллагена как маркера легочного фиброза в качестве первичных антител использовали моноклональные кроличьи антитела против Collagen IV (GTX). Оценку иммуногистохимической реакции оценивали по 10 случайным полям зрения полуколичественным методом (до 5% экспрессии – 0 баллов; 5–39% – 1 балл; 40–69% – 2 балла; более 70% – 3 балла).

### **Конфокальная лазерная эндомикроскопия**

Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) нижних дыхательных путей выполнялась через 4 часа после эвтаназии животных на нефиксированной ткани легких. Для этого метода использовалась диагностическая система Cellvizio<sup>®</sup> (Mauna Kea Technologies, Париж, Франция) с мини-зондом Alveoflex (наружный диаметр 1,4 мм), длина волны 488 нм. Было установлено, что естественных флюорофоров легочной ткани кроликов недостаточно для визуализации альвеолярных структур данным методом, поэтому исследуемые фрагменты легочной паренхимы непосредственно перед выполнением КЛЭМ на 10 секунд пинцетом погружали в 10% раствор флюоресцеина. Это позволило добиться четкой эндомикроскопической картины. Для каждого фрагмента выполнена запись фильма в формате MKT с дальнейшей оценкой информативных изображений в режиме стоп-кадра. Далее выполнялись измерения величины альвеол и толщины межальвеолярных перегородок с помощью инструментов программы Cellvizio Viewer, версия 1.6.2. Количество альвеолярных макрофагов оценивалось полуколичественно по разработанной нами 6-балльной шкале: 0 баллов – отсутствие признака, 1 балл – единичные клетки в поле зрения, 2 балла – клетки занимают менее половины поля зрения, 3 балла – половину поля зрения, 4 балла – более половины поля зрения занято флюоресцирующими клетками, 5 баллов – все поле зрения занимают клетки.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи пакета прикладных программ «Statistica for Windows StatSoft Inc. Версия 7.0». 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

При оценке морфологических изменений ткани легких в исследуемых группах у всех животных с эндобронхиально введенным блеомицином наблюдалось утолщение межальвеолярных перегородок, инфильтрация их и стенок сосудов нейтрофилами и лимфоцитами, а также частичная деградация структуры ацинуса (рис. 2). В группах, получивших внутривенное или ингаляционное лечение МСК, эти изменения хотя и присутствовали, но были выражены существенно меньше, чем в контрольной группе, подвергшейся введению блеомицина без клеточной терапии. Здесь помимо описанных изме-

нений выявлены массивные поля фиброза, участки полной облитерации альвеол и сосудистого русла. При полуколичественной оценке степени фиброза у животных, получивших лечение МСК, выраженность фиброза была достоверно меньше, чем в контрольной группе блеомицинового фиброза – 2,34 и 2,11 против 4,15 балла (табл. 1). Похожая картина наблюдалась в степени экспрессии коллагена – максимальная в группе блеомицинового повреждения без лечения (2,1 против 0,15 балла в здоровой группе), в то время как у животных, получивших МСК, данный показатель был существенно ниже – 0,79 балла при внутривенной терапии и 0,51 балла

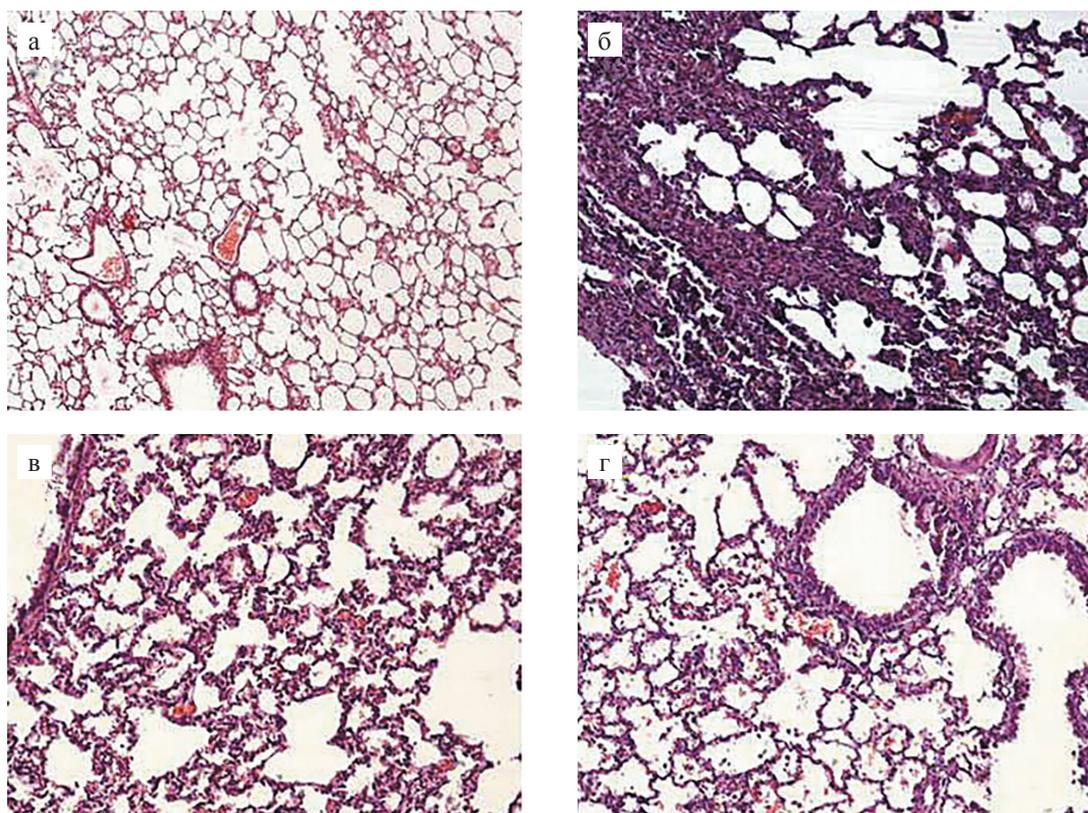


Рис. 2. Репрезентативные гистологические срезы ткани легкого в группах исследования

Fig. 2. Representative microscopic sections of the lung tissue in the studied groups

Таблица 1

### Морфометрические показатели, экспрессия коллагена и уровень цитокинов в жидкости БАЛ в группах исследования

### Morphometric indicators, an expression of a collagen and level of cytokines in BAL liquid in the studied groups

	Здоровый контроль	Блеомицин-контроль	Блеомицин + МСК в/в	Блеомицин + МСК инг.
Шкала фиброза Эшкрофта, баллы	0,24 ± 0,11	4,15 ± 1,8**	2,34 ± 1,6*	2,11 ± 1,3*
Экспрессия коллагена, баллы	0,15 ± 0,20	2,1 + 0,65**	0,79 + 0,55	0,51 + 0,29*
TNF-α, пг/мл	Не определен	122 ± 65	95 ± 77	101 ± 36
TGF-β1, пг/мл	26 ± 11	56 ± 32	44 ± 24	51 ± 18
IL-6, пг/мл	Не определен	44 ± 36	Не определен	Не определен

Примечание. \*p < 0,05 в сравнении с группой блеомицина без лечения; \*\*p < 0,01 в сравнении со здоровым контролем.

при ингаляционной доставке (рис. 3). Цитокиновый профиль жидкости БАЛ оказался менее информативным в связи с тем, что TNF- $\alpha$  и IL-6 (пг/мл) у здоровых кроликов не определялись, а показатели TGF- $\beta$ 1 хотя и были количественно выше в группах, получивших блеомицин, но не отличались достоверно между собой.

Результаты цитологического анализа жидкости бронхоальвеолярного лаважа представлены в табл. 2. Общий цитоз в группе блеомицина без лечения был достоверно выше, чем у здорового контроля (567 против 365 кл/мкл), однако данный показатель в группах лечения МСК хотя и имел тен-

денцию к снижению, не достиг статистически значимых величин. Подобные изменения наблюдались и в клеточных фракциях.

КЛЭМ-картина у животных контрольной группы характеризовалась четкой визуализацией структур альвеол с округлой формой полостей, толщиной межальвеолярных перегородок  $4,8 \pm 1,2$  мкм, единичными альвеолярными макрофагами (рис. 4, а). Величина альвеол составила  $123 \pm 25$  мкм.

Во второй группе животных с блеомициновым контролем альвеолярные структуры практически не дифференцировались, различимы были лишь отдельные фрагментированные межальвеолярные

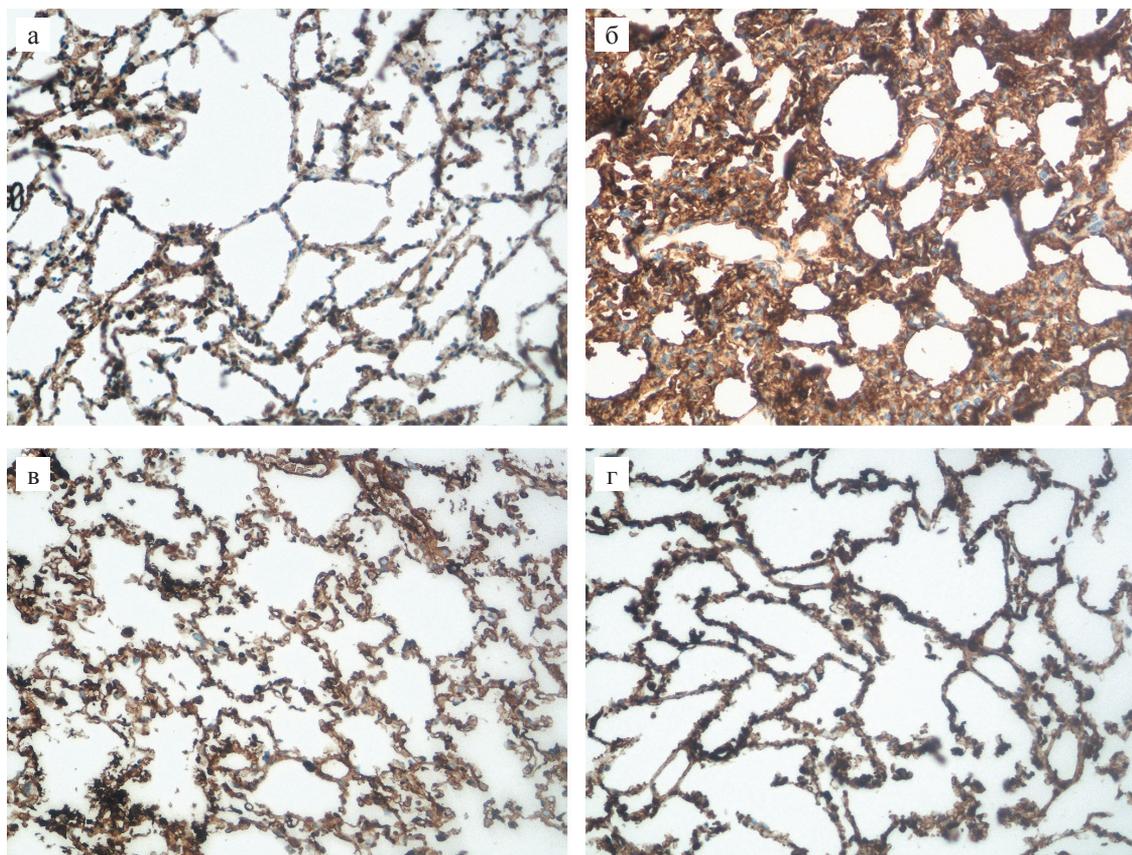


Рис. 3. Иммуногистохимические маркеры коллагена IV типа в исследуемых группах

Fig. 3. Immunohistochemical markers of a collagen of type IV in the studied groups

Таблица 2

**Цитологический состав жидкости БАЛ в группах исследования**  
**Cytologic compound of BAL liquid in the studied groups**

	Здоровый контроль	Блеомицин-контроль	Блеомицин + МСК в/в	Блеомицин + МСК инг.
Общее число, клеток/мкл	$365 \pm 72$	$567 \pm 112^*$	$495 \pm 122$	$528 \pm 129$
Нейтрофилы, %	$3 \pm 3$	$13 \pm 5^{**}$	$10 \pm 5^*$	$10 \pm 9$
Макрофаги, %	$85 \pm 11$	$65 \pm 18$	$78 \pm 15$	$76 \pm 17$
Лимфоциты, %	$10 \pm 4$	$21 \pm 12^*$	$12 \pm 11$	$14 \pm 9$
Эозинофилы, %	$2 \pm 4$	$3 \pm 3$	$1 \pm 4$	$1 \pm 3$
Эритроциты, %	$2 \pm 5$	$2 \pm 4$	$2 \pm 2$	$1 \pm 1$

Примечание. \* $p < 0,05$  в сравнении со здоровым контролем; \*\* $p < 0,01$  в сравнении со здоровым контролем.

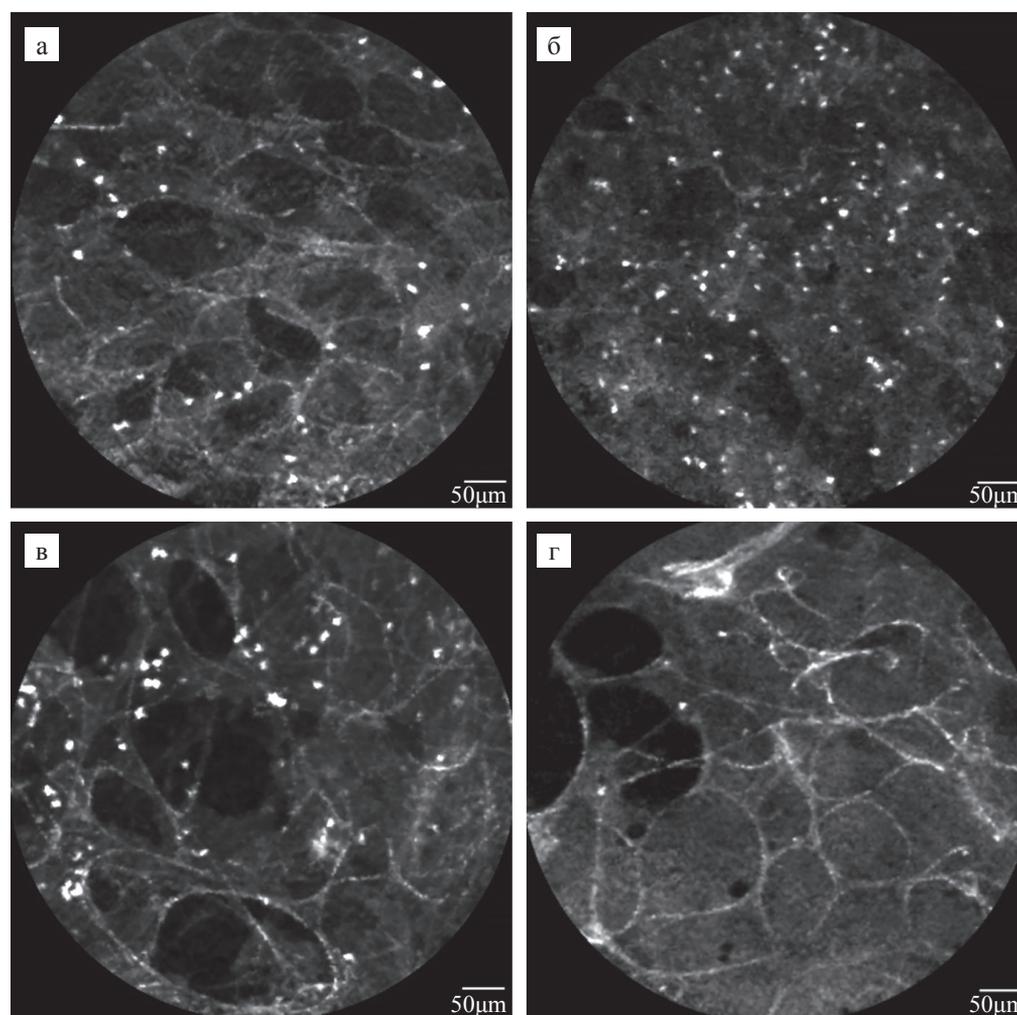


Рис. 4. Изменения альвеолярных структур в исследуемых группах по данным КЛЭМ. Конфокальная лазерная эндомикроскопия дистальных дыхательных путей *ex vivo* у кроликов: а – контрольная группа; б – группа с блеомициновым контролем; в – группа блеомицин + МСК в/в; г – блеомицин + МСК инг. Комментарии в тексте

Fig. 4. The changes of alveolar structures in the studied groups on data of pCLE. Probe-based confocal laser endomicroscopy of distal airways *ex vivo* at rabbits: а – control group; б – group of bleomycin control; в – bleomycin + BMMSCs i.v.; г – bleomycin + BMMSCs inh. The comments are in the text

перегородки, количество альвеолярных макрофагов составило 2–3 балла (рис. 4, б).

В третьей группе животных с внутривенным введением МСК структура альвеол прослеживалась достаточно четко, однако многие альвеолярные полости были существенно увеличены в диаметре, достигая размеров 232 мкм, средний размер составил  $154 \pm 43$  мкм (рис. 4, в). Толщина межальвеолярных перегородок была близка к таковой в группе контроля –  $4,7 \pm 1,5$  мкм. Количество альвеолярных макрофагов не превышало 1–2 баллов.

В последней группе с ингаляционным введением МСК КЛЭМ-картина демонстрировала нормальные по форме альвеолы, так же, как в предыдущей группе, несколько увеличенные в размере, однако это было менее выражено. Величина альвеол составила  $122 \pm 30$  мкм, толщина межальвеолярных перегородок –  $4,9 \pm 1,1$  мкм (рис. 4, г). Альвеолярные макрофаги были единичными в поле зрения – 0–1 балл.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе проведена сравнительная оценка эффектов клеточной терапии при внутривенном и ингаляционном пути введения аллогенных МСК. В качестве экспериментальных животных мы использовали кроликов породы шиншилла. Следует отметить, что кролики филогенетически ближе к человеку, имеют строение бронхиального дерева и особенности функционирования иммунной системы, схожие с приматами, в отличие от мелких грызунов [9]. Еще одним преимуществом кроличьей модели легочного фиброза является возможность выполнения у них прицельного бронхоальвеолярного лаважа из пораженной зоны. В качестве индуктора фиброза легких был выбран цитостатик блеомицин, наиболее часто используемый в доклинических исследованиях [10]. Из возможных путей введения блеомицина (инъекционный, интраперитонеальный, интратрахеальный, эндобронхиаль-

ный) мы использовали последний, единственный позволяющий получить локальный фиброз одной и той же области с минимальной травматизацией остальных отделов легких и сниженным уровнем системной воспалительной реакции. Это достижимо только путем выполнения фибробронхоскопии, невозможной у мелких животных.

Как показали результаты морфологического, иммуногистохимического и цитологического исследований, оба пути введения оказались одинаково эффективными в отношении сдерживания развития фиброза легких и отложения коллагена в интерстициальном пространстве. Уровни провоспалительных и профиброгенного цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа хотя и имели тенденцию к уменьшению у животных, получивших лечение МСК, но не достигли статистической разницы, что предположительно связано как с ограниченным числом образцов для тестирования, так и достаточно большим сроком после блеомицинового повреждения (4 недели). Анализ клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) выявил достоверное увеличение общего цитоза с увеличением фракций нейтрофилов и лимфоцитов у животных с блеомициновой травмой, не получивших лечения. В группах клеточной терапии достоверного отличия от здорового контроля не установлено, за исключением повышенного содержания нейтрофилов у кроликов с внутривенным введением клеточного препарата (хотя и более низкого, чем у животных без лечения). Эти данные в целом свидетельствуют о местных противовоспалительных эффектах как ингаляционного, так и внутривенного пути введения МСК. Практически во всех образцах, как в контроле, так и в группах лечения, мы выявили небольшое присутствие эритроцитов, нетипичное для клеточного состава БАЛ, которое связываем с локальной травмой слизистой оболочки фибробронхоскопом во время его проведения по воздухоносным путям.

Весьма интересными представляются результаты конфокальной лазерной эндомикроскопии нижних дыхательных путей. Мы первыми провели подобное исследование на животной модели легочного фиброза. Как и в клиническом испытании, которое было нами ранее выполнено у 5 пациентов с идиопатическим легочным фиброзом, у кроликов, получивших только блеомициновое повреждение, наблюдалось деструктурирование альвеолярного компартмента, «размытость» альвеолярных стенок, исчезновение эластических и сосудистых элементов. Все эти изменения нивелировались, если животные получили лечение МСК. Неожиданным и не вполне понятным феноменом, обнаруженным у кроликов с ингаляционным введением клеточного продукта, является почти полное исчезновение из альвеол макрофагов. По-видимому, имело место

торможение миграции макрофагов в зону поражения, но лишь в том случае, если клетки поступали через дыхательные пути. Возможно, это связано с ремоделированием сигнальных путей макрофагов экзогенными МСК, которое ранее было описано на модели острого повреждения легких при сепсисе [11].

В целом наше исследование подтвердило противовоспалительные и антифиброзные эффекты при трансплантации МСК, которые наблюдались в других экспериментальных работах на более мелких животных [4, 12–14].

Терапевтический механизм действия МСК при легочном фиброзе окончательно не установлен. Доминирующим на сегодняшний день является мнение о ведущей роли паракринных эффектов клеточной терапии. Миграция экзогенно введенных клеток в зону повреждения происходит через локальную продукцию хемоаттрактантов – гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего факторов [15, 16]. Достигнув места поражения, МСК экспрессируют самостоятельно или влияют на продукцию противовоспалительных, антифиброзных, ангиогенных факторов, а также подавляют экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , VEGF, IL-6, TNF- $\alpha$ , NO-синтаза), что, по-видимому, и определяет терапевтический эффект [13, 17]. В пользу паракринных механизмов действия МСК свидетельствует и факт похожих результатов, достигаемых при введении кондиционной среды от МСК и прогениторных клеток в моделях легочного фиброза [18, 19]. МСК от молодых мышей оказались более эффективными в предотвращении развития легочного фиброза, чем выделенные от старых животных, за счет более активного подавления воспаления, оксидативного стресса и апоптоза через экспрессию противовоспалительных цитокинов [20]. Еще одним возможным, хотя и мало изученным механизмом противовоспалительного и антифиброзного действия МСК является межклеточный трансфер – когда экзогенно введенные клетки прикрепляются к поврежденному эпителию дыхательных путей и через микро- и наноканалы осуществляют доставку цитоплазматического и митохондриального материала, препятствующего апоптозу и способствующего восстановлению пораженной клетки [21, 22].

Обсуждавшийся в первых работах, посвященных клеточной терапии легочного фиброза, феномен приживаемости и пластичности трансплантированных клеток с последующей регенерацией поврежденного эпителия не нашел своего подтверждения и в настоящее время не рассматривается как возможный механизм действия.

Наша работа имеет определенные ограничения, прежде всего касающиеся технологии доставки

клеток в дыхательные пути. Мы не смогли точно рассчитать респираторную фракцию (точное число клеток, оставшихся в бронхиальном дереве), а также степень их распределения в дистальных и проксимальных отделах и количество клеточного материала, достигнувшего ацинуса – основной мишени легочного фиброза. Мы также не оценивали тканевую экспрессию цитокинов и других биологически активных молекул, активность фибробластов, ограничившись морфометрией, исследованием бронхоальвеолярного лаважа и альвеоскопией.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование продемонстрировало сопоставимые положительные морфологические, иммуногистохимические и цитологические эффекты внутривенного и ингаляционного пути введения аллогенных МСК костного мозга на модели блеомицин-индуцированного легочного фиброза у кроликов. Позитивные результаты клеточной терапии на более крупных животных, чем в предшествующих исследованиях, а также приемлемая для человека технология доставки клеток в дыхательные пути позволяют надеяться на возможность перехода от доклинических к клиническим исследованиям на данном направлении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: 788–824.
2. *Toonkel RL, Hare JM, Matthay MA, Glassberg MK.* Mesenchymal Stem Cells and Idiopathic Pulmonary Fibrosis Potential for Clinical Testing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188 (2): 133–140.
3. *Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C et al.* Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182: 643–651.
4. *Murphy S, Lim R, Dickinson H et al.* Human amnion epithelial cells prevent bleomycin-induced lung injury and preserve lung function. *Cell. Transplant.* 2011; 20: 909–923.
5. *Reddy M, Fonseca L, Gowda S et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate early stage of bleomycin induced pulmonary fibrosis: comparison with pirfenidone. *Int. J. Stem. Cells.* 2016; 9: 192–206.
6. *Salazar KD, Lankford SM, Brody AR.* Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF- $\beta$ 1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2009; 297: L1002-L1011.
7. *Awad H, Butler D, Boivin G et al.* Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Engineering.* 1999; 5 (3): 267–277.
8. *Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V.* Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41: 467–470.
9. *Kamaruzaman N, Kardia E, Kamaldin N et al.* The Rabbit as a Model for Studying Lung Disease and Stem Cell Therapy *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 691830.
10. *Degryse AL, Lawson WE.* Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* 2011 Jun; 341 (6): 444–449.
11. *Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine.* 2009; 15 (1): 42–49.
12. *Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A et al.* Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin induced lung fibrosis. *Cell. Transplant.* 2009; 18: 405–422.
13. *Lee SH, Jang AS, Kim YE et al.* Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. *Respir. Res.* 2010; 11: 16.
14. *Lan YW, Choo KB, Chen CM et al.* Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis *Stem. Cell. Res. Ther.* 2015 May 20; 6: 97.
15. *Rojas M, Xu J, Woods CR et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005; 33: 145–152.
16. *Xu J, Mora A, Shim H et al.* Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2007; 37: 291–299.
17. *Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2007; 104: 11002–11007.
18. *Cargnoni A, Piccinelli EC, Ressel L.* Conditioned medium from amniotic membrane-derived cells prevents lung fibrosis and preserves blood gas exchanges in bleomycin-injured mice-specificity of the effects and insights into possible mechanisms. *Cytotherapy.* 2014 Jan; 16 (1): 17–32.
19. *Rathinasabapathy A, Bruce E, Espejo A et al.* Therapeutic potential of adipose stem cell-derived conditioned medium against pulmonary hypertension and lung fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* 2016 Oct; 173 (19): 2859–2879.
20. *Tashiro J, Elliot SJ, Gerth DJ.* Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Transl. Res.* 2015 Dec; 166 (6): 554–567.
21. *Islam MN, Das SR, Emin MT et al.* Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 2012; 18: 759–765.
22. *Sinclair K, Yerkovich S, Hopkins P et al.* Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7: 91.

Статья поступила в редакцию 25.09.2017 г.  
The article was submitted to the journal on 25.09.2017