

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, В.А. Крупин

**ФИБРОЗ ЛЕГКИХ  
И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ:  
НОВЫЕ ПОДХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ**

Издательство РАН  
Москва  
2018

УДК 612.119  
ББК 28.05  
Д876

Рецензенты:

*А.А. Кубатиев, академик РАН*

*В.В. Новицкий, академик РАН*

**Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Крупин В.А.** Фиброз легких и стволовые клетки: новые подходы лечения. Москва: Издательство РАН, 2018, 200 с.

ISBN 978-5-7901-0140-3

В монографии представлены современные представления об этиологии, эпидемиологии, патогенезе и лечении (медикаментозное, хирургическое, клеточная терапия) идиопатического легочного фиброза (ИЛФ). Обобщены результаты научных исследований ряда ведущих специалистов, направленные на разработку подходов усиления эффектов стволовых клеток (СК) при проведении клеточной терапии. Проведен анализ данных, полученных в последние годы при изучении роли СК и прогениторных клеток различного происхождения (мезенхимальные, гемопоэтические, эндотелиальные, эпителиальные и др.) и локализации (костномозговые, региональные) в развитии таких типовых патологических процессов как воспаление и фиброз, регенерация. Особое внимание уделено адренергическим, дофаминовым и серотониновым структурам и эндогенным молекулам в регуляции функциональной активности СК при моделировании фиброза легких. Анализ накопленного материала позволил сформулировать новые подходы лекарственной терапии ИЛФ, и экспериментально доказать состоятельность оригинальных подходов противовоспалительной и антифибротической терапии и стимуляции регенерации альвеолярной ткани, основанных на использовании нейротропных средств и средств, изменяющих структуру внеклеточного матрикса, модулирующих функциональную активность СК (мобилизация, миграция, трансэндотелиальный переход, пролиферация и дифференцировка).

Для физиологов, патофизиологов, гематологов, фармакологов, пульмонологов и других специалистов.

**Dygai A. M., Skurikhin E. G., Krupin V. A.**

# **Pulmonary Fibrosis and Stem Cells: New Approaches for the Treatment**

RAS Publishing House  
Moscow  
2018

Reviewers:

*A. A. Kubatiev, academician of the Russian Academy of Sciences*

*V. V. Novitsky, academician of the Russian Academy of Sciences*

**Dygai A. M., Skurikhin E. G., Krupin V. A. Pulmonary Fibrosis and Stem Cells: New Approaches for the Treatment.** Moscow: RAS Publishing House, 2018. 283p.

ISBN978–5–7901–0140–3

This monograph presents modern concepts of etiology, epidemiology, pathogenesis and treatment (medication, surgical and cellular therapy) of idiopathic pulmonary fibrosis (ILF). The results of scientific research of leading specialists, aimed at developing approaches for enhance the effects of stem cells (SC) in the performance of the cellular therapy are summarized. It was analyzed results obtained in recent years in the study of the SC and progenitor cells of various origins (mesenchymal, hematopoietic, endothelial, epithelial, etc.) role and localization (bone marrow, regional) in the development of such typical pathological processes as an inflammation and a fibrosis, a regeneration. The special focus we were role of adrenergic, dopamine and serotonin structures and endogenous molecules in the regulation of the SC functional activity in the pulmonary fibrosis modeling. It was analyzed the accumulated material and formulated new approaches to the drug therapy of ILF and experimentally proved the consistency of the original approaches of anti-inflammatory and antifibrotic therapy and stimulation of alveolar tissue regeneration based on the use of neurotropic agents and agents are modified the extracellular matrix structure and are modulated the SC functional activity (mobilization, migration, trans endothelial junction, proliferation and differentiation).

For physiologists, pathophysiologists, hematologists, pharmacologists, pulmonologists and other specialists.

	Стр.
<b>Список сокращений</b>	7
<b>Введение</b>	9
<b>Глава 1</b> Этиология, эпидемиология и лечение идиопатического легочного фиброза	11
1.1. Этиология и эпидемиология	11
1.2. Лечение	15
<b>Глава 2</b> Патогенез идиопатического легочного фиброза	26
2.1. Этапы фиброза легкого	26
2.2. Цитокины	30
2.3. Фибробласты и миофибробласты	35
2.4. Мезенхимальные / мезенхимные стволовые / стромальные клетки (МСК)	37
2.5. Эндотелиальные прогениторные клетки	39
2.6. Альвеолярные эпителиальные прогениторные клетки	40
<b>Глава 3</b> Стволовые клетки как потенциальные маркеры патологических процессов и мишени для лекарственных средств	43
3.1. Общие представления о стволовых клетках	43
3.2. Стволовые клетки костного мозга	43
3.3. Стволовые клетки легких	54
3.4. Подходы усиления терапевтического эффекта вовлеченных в посттравматическую регенерацию СК	56
<b>Глава 4</b> Амины и нейротропные препараты	60
4.1. Серотонин: сигнализация и эффекты	60
4.2. Посттравматическое воспаление и серотонин	62
4.3. Серотониновая сигнализация и фиброз	64
4.4. Ципрогептадин и кетансерин	69
4.5. Резерпин	73
4.6. Спиперон	75
<b>Глава 5</b> Стволовые и прогениторные клетки в патогенезе фиброза легкого и эффектах нейротропных препаратов	78
5.1. Стволовые и прогениторные клетки в воспалении и фиброгенезе	78
5.2. Симпатолитик резерпин	88
5.3. Антисеротониновые препараты кетансерин и ципрогептадин	91
5.4. Антагонисты дофаминовых рецепторов	101

<b>Глава 6</b>	Перспективы ремодуляции внеклеточного матрикса гиалуронидазой для терапии фиброза легких	107
6.1.	Гиалуроновая кислота и гиалуронидаза при пневмофиброзе	107
6.2.	Пегилирование фармакологически активных молекул как направление создания эффективных лекарственных препаратов	116
6.3.	Эффекты и механизм действия модифицированной физическим пегилированием гиалуронидазы при пневмофиброзе	122
6.4.	Мицеллярная гиалуронидаза при пневмофиброзе	135
<b>Заключение</b>		139
<b>Литература</b>		143

## Список сокращений

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж  
 ВМ-ГК – высокомолекулярная гиалуроновая кислота  
 НМ-ГК – низкомолекулярная гиалуроновая кислота  
 ГАГ – гликозаминогликан  
 ГД – гиалуронидаза  
 ГК – гиалуроновая кислота  
 ГКС – глюкокортикостероиды  
 Г-КСФ (М-КСФ, ГМ-КСФ) – гранулоцитарный (макрофагальный, гранулоцитарно-макрофагальный) колониестимулирующий фактор  
 ИЛ – интерлейкин  
 ИЛ-1 РА – антагонист рецептора ИЛ 1  
 ИЛФ – идиопатический легочный фиброз  
 КОЕ-Н, -Г, -ГЭММ, -Ф, -Э – колониеобразующая единица недифференцированная, гранулоцитарная, гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарная, фибробластов, эритроидная  
 ЛТ – лейкотриен  
 ММСК – мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки  
 МЭПК – малые эмбрионально-подобные клетки  
 ПГ – простагландин  
 СК (ВСК, ГСК, иПСК, МСК, РСК, ТПСК, ЭСК) – стволовые клетки (взрослого организма, гемопоэтические, индуцированные плюрипотентные, мезенхимальные, регионарные, тканеспецифичные прогениторные, эмбриональные)  
 ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких  
 ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход  
 ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки  
 ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс  
 АА-Мас (*alternative activation of macrophages*) – альтернативный путь активации макрофагов  
 ATS (American Thoracic Society) – Американское Торакальное Общество  
 CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки  
 CTGF (connective tissue growth factor) – фактор роста соединительной ткани  
 ERS (*European Respiratory Society*) – Европейское Респираторное Общество  
 eNOS (endothelial nitric oxide synthase) – эндотелиальная синтаза оксида азота  
 FDA (Food and Drug Administration) – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.  
 GPCR (G-protein-coupled receptors) – рецептор, сопряженный с G-белком  
 HGF (hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов  
 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) – индуцируемый при гипоксии фактор-1  
 HLA (human leucocyte antigens) – главный комплекс гистосовместимости  
 ICAM-1 – (inter-cellular adhesion molecule-1) – молекула межклеточной адгезии 1  
 IGF (insulin-like growth factor) – инсулиноподобный фактор роста

ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) – Международное общество клеточной терапии

MMPs (matrix metalloproteinase) – матриксные металлопротеиназы

Notch1 (notch-homolog 1, translocation-associated) – трансмембранный рецепторный белок 1 типа

PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) – патоген-связанные молекулярные паттерны

PDGF – (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) – стромальный клеточный фактор – 1

SHSC (sinusoidal hepatic stellate cells) – синусоидальные звездчатые клетки печени

SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) – сигнальная молекула активации лимфоцитов

TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

TGF- $\beta$  – (transforming growth factor  $\beta$ ) – трансформирующий ростовой фактор

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) – фактор некроза опухоли  $\alpha$

VEGF – (*vascular endothelial growth factor*) – сосудистый эндотелиальный фактор роста

$\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) –  $\alpha$ -гладкомышечный актин

$\gamma$ -IFN ( $\gamma$ -interferon) – интерферон  $\gamma$



## Введение

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является наиболее распространенной и преимущественно смертельной формой идиопатической интерстициальной пневмонии. Болезнь возникает как правило в среднем или старшем возрасте и проявляется в рубцевании здоровой ткани легкого, что затрудняет дыхание больных. После постановки диагноза больные живут не более 3–5 лет. В настоящее время в США более 128000 американцев больны ИЛФ. Каждый год диагностируется 48000 новых случаев и 40000 больных ежегодно умирают от этой болезни. Эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации имеет схожий тренд. Этиология этого хронического и быстро прогрессирующего заболевания недостаточно полно изучена, хотя такие факторы риска как курение и воздействия окружающей среды описаны. За последние 10 лет были достигнуты существенные успехи в понимании патогенеза ИЛФ. На данный момент акцент с преимущественно провоспалительной компоненты заболевания сместился в сторону фибробластического процесса, нефизиологического ремодулирования тканей, чрезмерного накопления белков внеклеточного матрикса (коллагена) и ангиогенеза. Активно обсуждается вопрос участия в патогенезе ИЛФ и процессах регенерации альвеолярной ткани костномозговых и тканеспецифичных стволовых клеток (СК) и прогениторных клеток.

Современная терапия ИЛФ представлена противовоспалительными (глюкокортикостероиды, цитостатики), антифиброзными (*D*-пеницилламин, тетратиомолибдат, колхицин), антиоксидантными (*N*-ацетилцистеин) и цитокиновыми ( $\gamma$ -IFN) препаратами. Эффективность лечения лекарственными средствами этого тяжелого социально-опасного заболевания не оправдывает ожиданий, поскольку назначаемые препараты способны лишь уменьшить воспалительную реакцию и притормозить прогрессирование фибротического процесса. Применение в лечении ИЛФ хирургических подходов (односторонняя или двусторонняя трансплантация легких) ограничивается типичными побочными эффектами, связанными с операцией по трансплантации органов (реакция «трансплантант против хозяина», прием иммуносупрессоров, инфекции). Клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) на короткое время может привести к снижению выраженности воспаления и фибротических процессов и способствовать увеличению числа клеток альвеолярного эпителия. Однако нельзя не учитывать того факта, что донорские МСК способны дифференцироваться в коллаген-продуцирующие клетки – фибробласты. Такая неоднозначность эффектов клеточной терапии, отсутствие стандартизированных и высокопроизводительных методов получения достаточного количества клеточного материала с заданными свойствами для трансплантации выступают серьезным препятствием для внедрения клеточной терапии в лечение ИЛФ.

Нами предложена новая парадигма лечения социально-опасных заболеваний. Мы отказались от малоэффективного использования эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток и аллогенной трансплантации клеточного материала (с большой вероятностью вызывающих спонтанную трансфор-

мацию и индукцию злокачественных опухолей, реакцию трансплантанта против хозяина, побочные эффекты) и предложили модуляцию функций костномозговых и тканеспецифичных СК и прогениторных клеток больного, основанную на принципе подражания эндогенным механизмам регуляции. Наши многолетние экспериментальные исследования, проводимые на моделях патологических процессов системы крови, нервной системы, легких, поджелудочной железы, печени, тестикулярной ткани, молочной железы подтверждают высокую эффективность подхода в ингибции воспаления и фибробластического процесса, стимуляции регенерации специализированных клеток при диабете, миелосупрессии, гепатите, эмфиземе легких, метаболических нарушениях, нарушении сперматогенеза, кахексии, раке молочной железы. В настоящей монографии представлен оригинальный материал, касающийся фенотипа, свойств и регуляции костномозговых и тканеспецифических стволовых и прогениторных клеток в норме и при фиброзе легких, вызванного травмой альвеолярного эпителия блеомицином гидрохлоридом. Использование блеомицина гидрохлорида вполне оправдано по причине избирательного накопления в альвеоцитах легких и полной сопоставимости характера моделируемого токсического фиброза легких у животных с клиническими проявлениями у больных ИЛФ.

Нами предложены для обсуждения результаты собственных исследований, свидетельствующие о целесообразности фармакологической регуляции СК и прогениторных клеток в целях регенерации легочной ткани при ИЛФ. Приведен огромный массив оригинальных научных разработок, подтверждающих эффективность терапии симпатолитиками, антагонистами дофаминовых и серотониновых рецепторов, пегилированной гиалуронидазой и комбинациями соединений в терапии экспериментального пневмофиброза. При этом особое внимание уделено анализу результатов изучения роли СК и прогениторных клеток (мезенхимальные, гемопоэтические, эндотелиальные, эпителиальные и др.) различной локализации (легкие, костный мозг, кровь) в развитии таких типовых патологических процессов как воспаление и фиброз, и в регенерации альвеолярного эпителия и микрососудистого русла.

Положения и выводы исследования были использованы нами в качестве теоретической основы для создания принципиально новых подходов коррекции воспаления и фиброза легких, основанных на снижении активности адренергического звена воспаления, нарушении серотониновой составляющей фибропластического процесса и дофаминовой регуляции трансэндотелиального перехода.

# ГЛАВА 1. ЭТИОЛОГИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЛЕЧЕНИЕ ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА

## 1.1. Этиология и эпидемиология

Идиопатический легочный фиброз (синонимы: идиопатический фиброзирующий альвеолит, криптогенный фиброзирующий альвеолит, пневмофиброз, ИЛФ) – специфическая форма хронической идиопатической интерстициальной пневмонии, морфологическим субстратом которой является обычная интерстициальная пневмония [Хилькевич М. М., 1998; Шмелев Е. И., 2003; Авдеев С. Н., 2007]. ИЛФ характеризует воспаление и фиброз легочного интерстиция и воздухоносных пространств, дезорганизация структурно-функциональных единиц паренхимы, приводящая к развитию рестриктивных изменений легких, нарушению газообмена и прогрессированию дыхательной недостаточности [Окороков А. Н., 2003]. Клинико-гистологическая классификация заболевания приведена в таблице 1.

Таблица 1. Классификация идиопатического легочного фиброза

Патогистология	Клинический диагноз
Обычная интерстициальная пневмония	Идиопатический легочный фиброз
Неспецифическая интерстициальная пневмония	Неспецифическая интерстициальная пневмония
Организующаяся пневмония	Криптогенная организующаяся пневмония
Диффузное альвеолярное повреждение	Острая интерстициальная пневмония
Респираторный бронхиолит	Респираторный бронхиолит, ИЗЛ
Десквамативная интерстициальная пневмония	Десквамативная интерстициальная пневмония
Лимфоцитарная интерстициальная пневмония	Лимфоцитарная интерстициальная пневмония

Во второй четверти 20-го века L. Hamman и A. R. Rich (1935, 1944) сообщили четыре случая быстро прогрессирующего диффузного интерстициального фиброза легких [Hamman L., Rich A. R., 1935; Hamman L., Rich A. R. 1944]. С этого момента объем клинических наблюдений по легочному фиброзу нарастал очень быстро. В 2006 г. заболеваемость ИЛФ в США составила 6,8–16,3 случаев на 100 000 человек, в Англии в 2011 г. это соотношение составило 7,44 / 100 000, в Греции – 3,38 / 100 000, в Финляндии – 16–18 / 100 000, в Европейском Союзе – 26 / 100 000 [Gribbin J., Hubbard R.B, Jeune I. L. et al., 2006; Raghu G. et al., 2006; Fernandez Perez E. R., Daniels C. E., Schroeder D. R. et al., 2010]. Статистические исследования, проведенные в США, показывают, что уровень заболеваемости фиброзом легких составляет 28 случаев на 100 000 населения [Fernandez Perez E. R., Daniels C. E., Schroeder D. R. et al., 2010], и ежегодно регистрируется около 4000 новых случаев ИЛФ [Gribbin J., Hubbard R.B, Jeune I. L. et al., 2006]. Заболевание развивается в возрасте

40–45 лет и достигает своего пика к 70–75 годам [White E. S., Lazar M. H., Thannickal V. J. et al., 2003]. У мужчин заболевание диагностируется в 1,5 раза чаще, чем у женщин [Khalil N., O'Connor R., 2004]. Средний уровень выживаемости пациентов с ИЛФ составляет 2–4 года, в 47% случаев причиной смертности является дыхательная недостаточность [Fernandez Perez E. R., Daniels C. E., Schroeder D. R. et al., 2010].

В Российской Федерации заболевание чаще встречается у пациентов в возрасте старше 50 лет. Отмечается преобладание заболевания у мужчин, соотношение полов составляет примерно 1,7:1 в пользу мужчин. Заболеваемость ИЛФ составляет 11 случаев на 100 000 населения у мужчин и 7 случаев на 100 000 населения у женщин. Распространенность заболевания составляет у мужчин 20 случаев на 100 000 общей популяции и у женщин – 13 случаев на 100 000 населения. Летальность от идиопатического легочного фиброза составляет 3,3 случаев на 100 000 населения у мужчин и 2,5 случаев на 100 000 населения – у женщин.

Этиология заболевания неизвестна. Ниже представлены факторы риска, на которые Американское Торакальное Общество (*American Thoracic Society – ATS*), Европейское Респираторное Общество (*European Respiratory Society – ERS*) рекомендуют врачам обращать внимание при постановке диагноза, профилактических мероприятиях и лечении заболевания:

*1. Вирусные инфекции.* Латентные, «медленные» вирусы, такие как вирус гепатита С [Arase Y., Suzuki F., Suzuki Y. et al., 2008; Aliannejad R., Ghanei M., 2011], вирус иммунодефицита человека [Jakab G. J., 1990], вирус Эпштейн-Барра [Tsukamoto K., Hayakawa H., Sato A. et al., 2000; Sides M. D., Klingsberg R. C., Shan B. et al., 2010], вирус гриппа [Pinsker K. L., Schneyer B., Becker N. et al., 1981], цитомегаловирус [Dworniczak S., Ziora D., Kapral M. et al., 2004], герпес-вирусы 1, 6, 7, 8 типов [Tang Y.-W., Johnson J. E., Browning P. J. et al., 2003; Vannella K. M., Luckhardt T. R., Wilke C. A. et al., 2010; Lasithiotaki I., Antoniou K. M., Vlahava V.-M. et al., 2011], ТТ вирус [Bando M., Ohno S., Oshikawa K. et al., 2001] и аденовирусы [Kuwano K., Nomoto Y., Kunitake R. et al., 1997; Hayashi S., Hogg J. C., 2007] приводят к привлечению лимфоцитов и нейтрофилов в очаг инфицирования, развитию воспаления в легочной ткани и последующему фиброзу. Считается, что вирусные агенты внедряются в эпителиоциты легких, стимулируют их переход в фибробласты и секрецию профибротических факторов роста [Vannella K. M., Moore B. B., 2008; Naik P. K., Moore B. B., 2010].

*2. Полиморфизмы генов.* Генетические исследования спорадических случаев ИЛФ выявили гены-кандидаты, полиморфизм которых может привести к отложению коллагена в легких. Найдены мутации в генах, контролирующем клеточный цикл [Korthagen N. M., vanMoorsel C. H. M., Barlo N. P. et al., 2012], продукцию муцина [Seibold M. A., Wise A. L., Speer M. C. et al., 2011], рецептор TNF- $\alpha$  и антагонист рецептора ИЛ-1 [Lawson W. E., Loyd J. E., 2006; Korthagen N. M., van Moorsel C. H. M., Kazemier K. M. et al., 2012], а также антигены лейкоцитов HLA-DR [Xue J., Gochuico B. R., Alawad A. S. et al., 2011].

*3. Семейные формы ИЛФ.* При изучении спорадических и семейных случаев ИЛФ Yang I. V. и соавт. (2006) отметили различия в поражении структуры

генов [Yang I. V., Burch L. H., Steele M. P. et al., 2006]. Семейные формы фиброза сопровождаются наследованием потомками мутаций белков сурфактанта A2 и C. Накопление дефектного продукта приводит к гибели эпителиоцитов [Lawson W. E., Grant S. W., Ambrosini V. et al., 2004; Chibbar R., Gjevre J. A., Shih F. Et al., 2010; Garsia C. K., 2011]. Предположительно, ELMOD2, ген с неизвестной биологической функцией в хромосоме 4q31, может быть ответствен за развитие семейного ИЛФ [Hodgson U., Pulkkinen V., Dixon M. et al., 2006; Lawson W. E., Loyd J. E., Degryse A. L., 2011]. Недавние сообщения показывают, что генетические варианты в компонентах гена теломеразы обратной транскриптазы (hTERT) или человеческой теломеразы РНК (hTR) ассоциируются с семейным ИЛФ и выявлены у некоторых пациентов со спорадической формой ИЛФ [Liu T., Chung M. J., Ullenbruch M. et al., 2007; Tsakiri K. D., Cronkhite J. T., Kuan P. J. et al., 2007; Diazde Leon A., Cronkhite J. T., Katzenstein A. et al., 2010]. Эти редкие мутации приводят к укорочению теломер и неизбежному апоптозу клеток, включая альвеолярные эпителиальные клетки [Alder J. K., Chen J. J.-L., Lancaster L. et al., 2008; Cronkhite J. T., Xing C., Raghu G. et al., 2008; Alder J. K., Cogan J. D., Brown A. F. et al., 2011].

4. *Курение.* К. В. Baumgartner и его коллеги проанализировали состояние 248 больных ИЛФ в 16 консультативных центрах Соединенных Штатов Америки и 491 здоровых волонтеров [Baumgartner K. V. et al., 1997]. Курение в анамнезе было более распространено у пациентов с фиброзом легких (72%), чем у индивидуумов контрольной группы (63%). Сигаретный дым является очень сложной смесью канцерогенных веществ, мутагенов и других токсичных соединений [Dogan O. T., Elagoz S., Ozsahin S. L. et al., 2011]. Дым вызывает разрушение митохондриальной мембраны и некроз клеток альвеолярного эпителия (в основном I типа) [Kosmider B., Messier E. M., Chu H. W. et al., 2011]. Составляющие табачного дыма вызывают развитие оксидантного стресса, увеличение активности каспаз 3, 7 и последующий апоптоз альвеоцитов [Shen N., Gong T., Wang J.-D. et al., 2011; Yoon C. H., Park H.-J., Cho Y.-W. et al., 2011]. Это приводит к привлечению макрофагов в очаг воспаления, выбросу провоспалительных и профибротических цитокинов и последующему депонированию коллагена в ткани легких [Samara K. D., Margaritopoulos G., Wells A. U. et al., 2011; Oh C. K., Murray L. A., Molfino N. A., 2012].

5. *Лекарственные препараты.* Существующая лекарственная терапия многих заболеваний имеет одним из побочных эффектов развитие фиброза легких. В качестве профибротических факторов выступают цитотоксические препараты (блеомицин, бусульфан, хлорамбуцил, циклофосфамид, мелфалан, паклитаксел, ритуксимаб, сиролимус), сердечно-сосудистые средства (амиодарон, флекаинид, статины, мексилетин, фенитоин), противовоспалительные препараты (интерферон альфа и бета, инфликсимаб, метотрексат), антимикробные средства (амфотерицин В, нитрофурантоин, сульфасалазин) и другие препараты (метадон, бромкриптин, азатиоприн, адалимумаб, цетуксимаб, алемтузумаб) [Schwaiblmair M., Behr W., Haefcke T. et al., 2012]. Механизм токсического действия обеспечивается как прямым поражением альвеоцитов или капиллярного эпителия легких, так и избирательным накоплением метаболитов в ткани легких или сенсибилизацией препаратом Т-лимфоцитов

с последующим развитием хронического воспаления [Camus P., Kudoh S., Ebina M., 2004; Matsuno O., 2012].

**6. Профессиональные факторы.** Показано увеличение заболеваемости ИЛФ у лиц, занимающихся сельским хозяйством, оказанием парикмахерских услуг, содержанием домашнего скота и птиц [Khalil N., O'Connor R., 2004; Wilson M. S., Wynn T. A., 2010]. Воздействие на организм промышленной пыли (кварцевая, силикатная, металлическая, бериллиевая, нейлоновая, окиси ванадия, асбеста, каменная и диоксид кремния) способствует развитию соединительной ткани в легких [Baumgartner K. B. et al., 2000; Weissman D. N., Banks D. E., 2003; Banks D. E., 2003; Steele M. et al., 2003; Taskar V. S., Coultas D. B., 2006; Turpin E. A., Antao-Menezes A., Cesta M. F. et al., 2010; Mossman B. T., Lippmann M., Hesterberg T. W. et al., 2011; Yoshida T., Ohnuma A., Horiuchi H. et al., 2011]. Мелкие частицы пыли, надолго оседая в воздухоносных путях легких, вызывают процессы хронического воспаления и формирования соединительной ткани вокруг химического агента. Исследователи наблюдали значительное повышение риска ИЛФ у пациентов, подвергающихся воздействию древесной пыли [Baumgartner K. B. et al., 2000; Taskar V. S., Coultas D. B., 2006]. Есть данные о повышении риска заболевания ИЛФ среди мужчин, подверженных воздействию пыли лиственных пород деревьев. Не было обнаружено связи между фиброзом легких и пылью ели. Этот факт позволяет предположить, что конкретные виды пыли могут играть роль в патогенезе пневмофиброза [Gustafson T. et al., 2007]. ИЛФ чаще встречается в промышленно развитых регионах, при этом смертность у мужчин выше, чем у женщин [American Thoracic Society, European Respiratory Society, 2001].

**7. Металлическая пыль.** R. Hubbard с коллегами составили историческую когорту из пенсионных фондов архивов сотрудников Rolls-Royce PLC в Великобритании для определения риска идиопатического фиброза легких у людей, подвергающихся воздействию металлической пыли [Hubbard R. et al., 2000]. Число связанных с ИЛФ смертей в этой группе было значительно больше, чем ожидалось. G. A. Pinheiro и коллеги обнаружили повышенную смертность у работников горнорудной промышленности и в отрасли изготовления строительных металлических изделий [Pinheiro G. A. et al., 2008].

**8. Гастроэзофагальный рефлюкс.** Результаты нескольких исследований показали, что гастроэзофагальный рефлюкс является фактором риска ИЛФ. Благодаря микроаспирации содержимого желудка в ткань легких, компоненты химуса могут активизировать альвеолярные макрофаги и вызывать хроническое воспаление [Gaude G. S., 2009; Lee J. S., Collard H. R., Raghu G. et al., 2010; Fahim A., Crooks M., Hart S. P., 2011]. Однако точные механизмы участия гастроэзофагального рефлюкса в развитии фиброза легких до сих пор не известны.

Были описаны и другие возможные факторы риска развития ИЛФ, к примеру, сахарный диабет [Kim Y. K., Park J.-W., Kyung S. Y. et al., 2012].

Начало ИЛФ незаметное. Длительное время болезнь протекает бессимптомно, однако в последующем неотвратимо приводит к инвалидизации и резкому снижению качества жизни пациента. На момент обращения к врачу длительность симптомов составляет 1–3 года и никогда – менее 3 месяцев

[Илькович М. М., 1998; Шмелев Е. И., 2003; Авдеев С. Н., 2007]. Лабораторные и функциональные легочные тесты, стандартные исследования бронхоальвеолярного лаважа имеют ограниченное диагностическое значение при ИЛФ. На основании рентгенографической картины грудной клетки диагноз заболевания может быть установлен в 48–87% случаев. По данным компьютерной томографии высокого разрешения достоверность диагноза ИЛФ составляет около 90%. «Золотым» диагностическим стандартом при идиопатическом легочном фиброзе выступает открытая биопсия легких, позволяющая не только установить диагноз, но и предсказать прогноз заболевания и возможный ответ на терапию [Илькович М. М., 1998; Шмелев Е. И., 2003; Авдеев С. Н., 2007]. Биопсия совместно с легочными функциональными тестами оценки газообмена позволяет исключить многие схожие с ИЛФ по симптоматике заболевания, в том числе коллагеновые сосудистые заболевания легких [American Thoracic Society, 2000; American Thoracic Society, European Respiratory Society, 2001].

Медиана выживаемости больных составляет в среднем около 2,8 лет с момента установления диагноза [Илькович М. М., 1998; Шмелев Е. И., 2003; Авдеев С. Н., 2007]. По данным зарубежных коллег больные после постановки диагноза живут не более 3–5 лет [Olson A. L., Swigris J. J., 2012].

## 1.2. Лечение

В клинической практике различают хирургическое, немедикаментозное и медикаментозное лечение ИЛФ. Основные направления лечения ИЛФ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Лечение идиопатического легочного фиброза.

Немедикаментозное лечение	Медикаментозное лечение	Хирургическое лечение
Реабилитационные программы (физические тренировки, образование, психосоциальная поддержка).	Монотерапия глюкокортикоидами и антифиброзными лекарственными средствами.	Трансплантация легких – наиболее радикальный способ терапии заболевания. 5-летняя выживаемость больных после трансплантации по поводу идиопатического легочного фиброза составляет около 50–60%.
Длительная кислородотерапия	Комбинированная терапия (в том числе комбинация глюкокортикоидов с азатиоприном и комбинация глюкокортикоидов с циклофосфамидом).	
Вакцинация противогриппозными и антипневмококковыми вакцинами.		

**Хирургическое лечение.** На поздних стадиях ИЛФ при неблагоприятном течении заболевания и отсутствии эффекта от проводимой терапии проводят трансплантацию легких. Однако анализ таких хирургических вмешательств указывает на малую эффективность данного подхода. Во-первых, ишемия и гипоксия клеток дыхательных путей во время процедуры вызывает продукцию большого количества высокоактивных веществ (индуцируемый при гипоксии фактор 1 (HIF-1), VEGF, ICAM-1), которые привлекают воспалительные клетки и во время реперфузии пересаженного органа вызывают отек

ткани и в последующем его деструкцию [Taghavi S., Abraham D., Riml P. et al., 2002; Dhillon G. S., Zamora M. R., Roos J. E. et al., 2010; Paulus P., Ockelmann P., Tacke S. et al., 2012]. Во-вторых, легочная артериальная гипертензия, развивающаяся при жизни пациентов с ИЛФ, создает высокое кровеносное давление в капиллярах пересаженного легкого и приток клеток крови, что приводит к отеку интерстиция легких и быстрой несостоятельности трансплантата [Shorr A. F., Wainright J. L., Cors C. S. et al., 2007; Farkas L., Farkas D., Ask K. et al., 2009; Fang A., Studer S., Kawut S. M. et al., 2011]. В-третьих, до сих пор ведутся споры между сторонниками одно- и двусторонней трансплантации легких. Сторонники односторонней трансплантации выдвигают в пользу своего метода большую простоту процедуры, меньшие послеоперационные осложнения, более короткий ишемический период и социальную выгоду для двух реципиентов от одного донора. Сторонники двусторонней трансплантации выделяют полное восполнение дыхательной функции, меньшее несоответствие вентиляции и перфузии долей легких и низкий риск повторного развития ИЛФ [Force S. D., Kilgo P., Neujahr D. C. et al., 2011; Puri V., Guthrie T., Scavuzzo M. et al., 2011; Sims M. W., Beers M. F., Ahya V. N. et al., 2011]. Однако в обоих случаях имеются недостатки: при односторонней трансплантации срок жизни пациентов меньше, но при двусторонней трансплантации очень низкая выживаемость в течение первого года жизни.

Ограничивают применение данного метода лечения ИЛФ побочные эффекты, связанные с типичной реакцией «трансплантат против хозяина» и инфекциями, которые возникают, в том числе, вследствие дополнительного медикаментозного лечения (при приеме иммуносупрессоров) [Окороков А. Н., 2003; Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006; Meltzer E. B., Noble P. W., 2008].

**Медикаментозное лечение.** Монотерапия ИЛФ предусматривает применение, прежде всего, противовоспалительных средств (глюкокортикоиды, циклофосфамид, иммунодепрессанты, антикоагулянты), комбинированная – антиоксидантов и иммунодепрессантов, антифиброзных средств и противовоспалительных соединений с антиоксидантами, антагонистов рецепторов эндотелина и сосудорасширяющих средств.

*Противовоспалительные средства.* В противовоспалительной терапии широко используются глюкокортикостероиды (ГКС) (преднизолон, преднизол) и их комбинация с цитостатиками (азотиоприл, циклофосфамид, колхицин, талидомид). Эффективность монотерапии ГКС составляет около 20–25% [Meltzer E. B., Noble P. W., 2008]. Циклофосфамид является цитостатическим алкилирующим агентом, его иммуносупрессивное действие связано со снижением числа лейкоцитов и лимфоцитов. Азотиоприл относится к пуриновым аналогам, его основным механизмом действия является блокада синтеза ДНК в лейкоцитах. Колхицин снижает продукцию макрофагами фибронектина, инсулиноподобного фактора роста и PDGF [Окороков А. Н., 2003; Khalil N., O'Connor R., 2004]. Талидомид – лекарственный препарат, первоначально введенный в клинику как седативное средство, ныне используется для лечения миелодиспластического синдрома. Механизм действия талидомида до сих пор остается неясным, хотя наблюдаемое уменьшение фиброза в экспери-



менте сопровождается сокращением экспрессии VEGF и ИЛ-6 [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011].

Назначение цитостатиков ограничивает высокая вероятность развития таких побочных эффектов как панцитопения, желудочно-кишечные нарушения, почечная дисфункция, гонадо- и тератотоксичность [Munson J. C., Kreider M., Chen Z. et al., 2010].

*Антифиброзные средства.* Для лечения ИЛФ используются антифиброзные препараты (*D*-пеницилламин, тетраиомолебдат, пирфенидон). *D*-пеницилламин является одним из первых антифиброзных препаратов, используемых при фиброзе легких. Он ингибирует медьсодержащую аминоксидазу, что приводит к уменьшению содержания меди в крови и легких и, как следствие, к ингибированию синтеза коллагена [Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006]. Аналогичным действием обладает тетраиомолебдат, дополнительно подавляющий экспрессию TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  и обладающий ангиостатическим эффектом [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011].

Пирфенидон – производное пиридина (5-метил-1-фенил-2(1H)-пуридон), снижает пролиферацию фибробластов, дифференцировку и синтез экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), ингибирует TNF- $\alpha$  и транскрипцию TGF- $\beta$  [Macias-Barragan J., Sandoval-Rodriguez A., Navarro-Partida J. et al., 2010; Gan Y., Herzog E. L., Gomer R. H., 2011; Hisatomi K., Mukae H., Sakamoto N., 2012]. Нейтрализуя свободные радикалы, пирфенидон уменьшает оксидантный стресс. Дополнительно, терапевтический агент оказывает влияние на белок теплового шока 47, вовлеченного в секрецию проколлагена [Chen L., Wang T., Wang X. et al., 2009]. Ведутся клинические испытания пирфенидона [Azuma A., Taguchi Y., Ogura T. et al., 2011; Tanigushi H., Kondoh Y., Ebina M. et al., 2011; Jiang C., Huang H., Liu J. et al., 2012]. Пирфенидон одобрен для лечения ИЛФ в Японии (2010 г.), в некоторых странах Европейского союза (2011 г.) и Китае (2011 г.). FDA отказалось одобрить использование пирфенидона на территории США в силу незаконченности клинических исследований и развития побочных эффектов при его назначении (желудочно-кишечные расстройства, фоточувствительность, сыпь, зуд, сухость кожи, печеночные дисфункции, головокружение, усталость, потеря веса).

*Антиоксидантные средства.* Другим подходом к терапии ИЛФ является использование антиоксидантных препаратов, так как нарушение баланса в системе оксиданты/антиоксиданты играет важную роль в процессах повреждения и воспаления легких [Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006; Day B. J., 2008]. *N*-ацетилцистеин способствует увеличению глутатиона (антиоксидант), который понижает уровень свободных форм кислорода и, тем самым, препятствует фиброгенезу. Препарат также подавляет пролиферацию фибробластов [Phan S. H., 1995; Meltzer E. B., Noble P. W., 2008; Behr J. N., Demedts M., Buhl R. et al., 2009].

*Цитокиновые препараты.* Большие надежды в терапии ИЛФ связаны с использованием цитокиновых препаратов. Одним из них является интерферон  $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN).  $\gamma$ -IFN ингибирует активацию воспалительных клеток [Phan S. H., 1995], уменьшает пролиферацию фиброцитов, их хемотаксис и продукцию коллагена [Khalil N., O'Connor R., 2004; Kim J. H., Kim H. Y., Kim S. et al.,

2005], способствует экспрессии ангиостатических хемокинов ELR-CXC (ИЛ-10/CXCL-10), таким образом, блокируя сигналы ангиогенного профиля ELR+CXC. Кроме того,  $\gamma$ -IFN контролирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), регулируя экспрессию рецептора фактора роста гепатоцитов на альвеоцитах II типа, что облегчает их дифференцировку в эпителиоциты [Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006].

Применение других цитокиновых молекул в экспериментальных исследованиях также показало положительный эффект на моделях фиброза. Таковыми были ИЛ-7, подавляющий передачу сигналов фибробластами [Huang M., Sharma S., Zhu L. X. et al., 2002], и ИЛ-10, снижающий продукцию и активацию TGF- $\beta$  в легком [Millar A. B., 2006; Nakagome K., Dohi M., Okunishi K. et al., 2006].

Имеется огромный интерес и к другим участникам патогенеза ИЛФ. В частности, фиброгенезу способствует ИЛ-13 и хемоаттрактант CCL-2 (MCP-1) [Adamali H., Maher T. M., 2012]. Поиск ингибиторов этих веществ привел к созданию моноклональных антител (QAX576 и CNTO-888), которые в настоящее время проходят клинические испытания [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010].

*Гормональные средства.* В экспериментальных исследованиях на мышах было показано, что аналог меланоцитостимулирующего гормона [Xu P. B., Mao Y. F., Meng H. B. et al., 2011] и экстракт *Sophora flavescens* ait. [Chen X., Sun R., Hu J. et al., 2008] предотвращают развитие фиброза за счет уменьшения продукции провоспалительных и профиброзных цитокинов (ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , MIP-2, TGF- $\beta$ ) в легких, усиления метаболизма компонентов ЭЦМ, а также благодаря снижению пролиферации фибробластов и синтеза коллагена. Подобным действием обладает соматостатин и его аналог октреотид, механизм их действия до конца не ясен [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011].

*Антибиотики.* Противоречивые данные получены при использовании антибиотиков в терапии блеомицинового фиброза у животных. Эритромицин и доксициклин снижают количество нейтрофильных лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже и уменьшают токсическое повреждение легких, особенно в том случае, когда введение антибиотиков предшествует назначению блеомицина [Li Y. J., Azuma A., Usuki J. et al., 1998; Fujita M., Ye Q., Ouchi H. et al., 2006; Moon A., Gil S., Gill S. E. et al., 2012]. Цефотоксин и эритромицин неоднозначно влияли на оксидативную активность альвеолярных макрофагов крыс и вызывали повреждение сосудов на фоне активно протекающего фиброгенеза в легких [Новикова Л. Н., Лебедева Е. С., Двораковская И. В. и др., 2008].

*Ростовые факторы и их ингибиторы.* Интересные результаты были получены при использовании факторов роста в качестве средств, уменьшающих разрастание соединительной ткани в легких. При введении фактора роста гепатоцитов наблюдалась стимуляция образования эпителиальных клеток из мезенхимальных (эпителиально-мезенхимальный переход), уменьшение уровня профибротического TGF- $\beta$ , повышение апоптоза миофибробластов

через рецептор c-Met [Khalil N., O'Connor R., 2004; Shukla M. N., Rose J. L., Ray R. et al., 2009].

Фактор роста кератоцитов оказывает мощное влияние на процессы пролиферации, миграции и дифференцировки эпителиальных клеток [Pottier N., Maurin T., Chevalier B. et al., 2009; Koval M., 2010].

При пневмофиброзе фактор роста фибробластов 10 усиливает пролиферацию дистальных альвеолярных клеток-предшественников и значительно снижает депонирование коллагена [Gupte V. V., Hubbard R. B., Jeune I. L. et al., 2009].

Фактор роста соединительной ткани (CTGF) производится фибробластами в ответ на стимуляцию TGF- $\beta$ . Выключение его из процесса патогенеза при помощи моноклональных антител (FG-3019) препятствует депонированию коллагена в легких [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011].

Фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) является провоспалительным цитокином, его продукция способствует накоплению фибробластов в легких и усилению депонирования в ЭЦМ. В эксперименте продемонстрировано, что антагонист TNF- $\alpha$ , Etanercept (растворимый TNF-R-Fc), известный как Enbrel, значительно снижает активность фиброгенеза [Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006; Ryu J. H., Daniels C. E., 2010].

*Антисеротониновые препараты.* Блокада серотониновых рецепторов 5-HT<sub>2A</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> кетансерином и тергуридом сопровождается снижением продукции коллагена фибробластами у мышей при блеомицин-индуцированном пневмофиброзе [Fabre A., Marchal-Somme J., Marchand-Adam S. et al., 2008; Konigshoff M., Dumitrascu R., Udaltov S. et al., 2010]. Считается, что эффект антисеротониновых препаратов связан с уменьшением уровня мРНК TGF- $\beta$ , ингибитора активатора плазминогена-1 и CTGF.

*Гипотензивные средства.* Ангиотензиноген является мощным индуктором апоптоза эпителиальных клеток и стимулятором продукции проколлагена фибробластами легких [Marshall R. P., Gohlke P., Chambers R. C. et al., 2004]. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, такие как каптоприл [Wang R., Ibarra-Sunga O., Verlinski L. et al., 2000], и антагонисты соответствующих рецепторов, такие как лозартан, уменьшают блеомицин-индуцированный фиброз легкого. Эта реакция связана с сокращением апоптоза эпителиоцитов и снижением экспрессии TGF- $\beta$  [Molina-molina M., Serrano-Mollar A., Bulbena O. et al., 2006; Nelson C. A., Hunter R. B., Quigley L. A. et al., 2011].

Эндотелин-1 является мощным эндогенным вазоконстриктором, который вовлечен в патогенез легочной артериальной гипертензии при ИЛФ [De Andrade J. A., Thannickal V. J., 2009]. Эндотелин-1 вызывает пролиферацию и дифференцировку фибробластов, синтез коллагена и является митогеном для эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клеток [Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011]. В экспериментальных моделях фиброза легких антагонисты эндотелина-1 (босентан, амбрисентан, мацицентан) уменьшают активацию фибробластов и депонирование волокон коллагена [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Ryu J. H., Daniels C. E., 2010].

*Ингибиторы 5-липоксигеназы.* Лейкотриены (ЛТ В4/ЛТ С4) и простагландин Е2 (ПГ Е2) вовлечены в патогенез ИЛФ. ЛТ оказывают профиброзные эффекты, в то время как циклооксигеназа-2-зависимый ПГ Е2 обладает антифиброзным действием [Ogushi F., Endo T., Tani K. et al., 1999; Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006]. ПГ Е2 подавляет миграцию, пролиферацию и дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а также синтез коллагена [Bozyk P. D., Moore B. B., 2011; Li Y.-J., Wang X.-Q., Sato T. et al., 2011]. Кроме этого, ПГ Е2 играет ведущую роль в так называемом «парадоксе апоптоза» при ИЛФ: чрезмерный апоптоз эпителиоцитов и иммортализация фибробластов [Maher T. M., Evans I. C., Bottoms S. E. et al., 2010; Datta A., Scotton C. J., Chambers R. C., 2011]. Ингибитор 5-липоксигеназы зулеутон, в настоящее время применяемый для лечения астмы, ингибировал воспаление в легких и развитие фиброза [Gomer R. H., Lupher M. L., 2010; Ali E. N., Mansour S. Z., 2011].

*Ингибиторы тирозиновых протеинкиназ.* Трансмембранные белки, участвующие в передаче сигналов, в частности, от TGF- $\beta$ , PDGF, CTGF и VEGF являются тирозиновыми протеинкиназами. Иматиниб и гефитиниб являются ингибиторами протеинкиназ, применяются для лечения хронического миелолейкоза. Использование ингибиторов протеинкиназ в качестве средства для лечения ИЛФ дало неплохие результаты. В эксперименте отмечалось торможение фосфорилиции тирозина c-Abl, ингибирование продукции PDGF и снижение экспрессии рецепторов c-kit на стволовой клетке [Daniels C. E., Wilkes M. C., Edens M. et al., 2004; De Andrade J. A., Thannickal V. J., 2009; Namba T., Tanaka K.-I., Hoshino T. et al., 2011]. Однако клинические исследования этого препарата потерпели неудачу [Ryu J. H., Daniels C. E., 2010].

Существующий набор лечебных мероприятий может только облегчить симптомы заболевания, снизить скорость прогрессирования заболевания, улучшить качество жизни больных. Между тем, ранее опубликовано сообщение не только о продлении жизни пациенту с ИЛФ, но и сохранении относительно стабильного самочувствия и качества жизни на протяжении длительного периода времени. Так, больному А. с диагнозом идиопатического легочного фиброза (верифицирован в НИИ пульмонологии, г. Москва) назначали азатиоприн, преднизолон 40 мг (впервые отметил одышку при физической нагрузке, а затем – в покое в 1995 г., в возрасте 42 лет, окончательный диагноз ИЛФ поставлен в 2006 г.). Госпитализация проводилась не менее 5 раз в год, наблюдалось усиление дыхательной недостаточности, при компьютерной томографии легких обращало внимание преобладание симптома «матового стекла» над фиброзом и биохимические признаки высокой активности воспаления. Несмотря на нецелесообразность применения высоких доз преднизолона при ИЛФ, пульс-терапия давала положительный эффект (уменьшение одышки, увеличение жизненной емкости легких, частичное восстановление пневматизации легочной ткани). На момент последнего наблюдения (2013 г.) – выраженный фиброз и отсутствие динамики в состоянии легочных функций (жизненной емкости легких 46%) при снижении оксигенации тканей (Sat 72%) [Дегтярева Ю. С., 2013].

**Клеточная терапия.** В клинической практике пристальное внимание уделяется клеточной терапии с использованием стволовых клеток (СК). СК обладают высоким потенциалом к обновлению, дифференцируются в клетки практически всех линий. Классифицируют СК как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) и взрослые стволовые клетки (или СК постнатального развития). По сложившимся представлениям стволовые клетки (СК) участвуют в регенерации тканей при заболеваниях печени, поджелудочной железы, нервной системы, послеоперационных осложнениях, миодистрофиях, аутоиммунных заболеваниях, инфаркте, инсульте и др. заболеваниях [Pittenger M. F., 2005; Pittenger M. F., Walczak P., Zhang J. et al., 2008; Greco S. J., Zhou C., Ye J.-H. et al., 2008; Li, Y.J., Zhang C., Xiong F. et al., 2008; Feldman B. J., 2009; Kosztowski T., Zaidi H. A., Quinones-Hinojosa A., 2009; Laurila J. P., Latikainen L., Castellone M. D. et al., 2009; Shi X.-L., Gu J.-Y., Han B. et al., 2010; Lodi D., Iannitti T., Palmieri B., 2011].

*Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК).* Лечебный эффект после внутривенного или интратрахеального введения ЭСК при заболеваниях легких связывают с миграцией в ткани легких, «осаждением» и продукцией противовоспалительных цитокинов, что приводит к активации эндогенных СК [Warburton D., Perin L., DeFilippo R. et al., 2008; Weiss D. J., Kolls J. K., Ortiz L. A. et al., 2008]. После введения человеческих ЭСК мышам, получавшим блеомицин, регистрировалась их дифференцировка в альвеоциты I, II типов и клетки Clara, при этом наблюдалась экспрессия белков сурфактанта [Weiss D. J., Bertoncello I., Borok Z. et al., 2011; Banerjee E. R., Laflamme M. A., Parayannopoulou T. et al., 2012]. Высокая вероятность появления злокачественных опухолей сдерживает применение ЭСК в клеточной терапии [Lodi D., Iannitti T., Palmieri B., 2011; Trounson A., Thakar R. G., Lomax G. et al., 2011].

*Мезенхимальные / мезенхимные стволовые / стромальные клетки (МСК).* Мезенхимальные стволовые клетки постнатального развития выделены из разных тканей человека и животных. МСК человека (чМСК) представляют собой негематопозитические, мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки мезодермальной линии, такие как остециты, адипоциты и хондроциты, а также в клетки эктодермальной (нейроциты) и энтодермальной (гепатоциты) линий [Imran Ullah, Raghavendra Baregundi Subbarao and Gyu Jin Rho, 2015]. МСК характеризует экспрессия таких поверхностных маркеров как CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и отсутствие поверхностных маркеров CD14, CD34, CD45 и человеческого лейкоцитарного антигена HLA-DR (главного комплекса гистосовместимости у человека). У человека МСК обнаружены в костном мозге, изолированы из жировой ткани, амниотической жидкости, эндометрия, мягкой ткани зубов, пуповины. В экспериментах *in vitro* выявлен большой потенциал к самоподдержанию у чМСК без значительных изменений их свойств. МСК человека обладают иммуномодулирующими свойствами, секретируют цитокины и рецепторы к воспалительным молекулам, что позволяет клеткам модулировать тканеспецифическое микроокружение. Многолинейный потенциал, иммуномодуляция и секреция противовоспалительных молекул делают отличными МСК от

других стволовых клеток и могут использоваться в клеточной заместительной терапии для лечения хронических заболеваний. Многие доклинические и клинические исследования проводились с использованием МСК в лечении таких хронических заболеваний, как нейродегенеративные, аутоиммунные, сердечно-сосудистые и других заболеваний [Johannes Leibacher and Reinhard Henschler, 2016; Jeffrey L. Spees, Ryang Hwa Lee and Carl A. Gregory, 2016; Noriko Sugino et al., 2017].

В пользу необходимости использования МСК в противовоспалительной терапии выступают следующие результаты. Так, внутривенное введение МСК мышам, получавшим блеомицин, уменьшает воспаление и содержание коллагена в легких, при этом отмечается снижение экспрессии TGF- $\beta$ ,  $\gamma$ -IFN, MIP-2 [Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. et al., 2009]. Эффекты МСК связывают с целым спектром, продуцируемых биологически активных веществ: ИЛ-6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, М-КСФ, ГМ-КСФ, фактором роста стволовой клетки, SDF-1, CXCR-4 [Кругляков П. В., Лохматова Е. А., Климович В. Б. и др., 2006; Rojas M., Xu J., Woods C. R. et al., 2005]. МСК могут продуцировать антагонист рецептора интерлейкина 1 (IL-1RA), представляющий собой белок, который принадлежит к семейству IL-1 и кодируется геном IL1RN на 2-й хромосоме. Связываясь с IL-1R антагонист препятствует активации внутриклеточного сигнального каскада провоспалительного IL-1. С другой стороны, отмечается ингибция пролиферации IL-1-зависимой линии Т-лимфоцитов и продукции TNF- $\alpha$  и CCL-2 макрофагами [Ortiz L. A., DuTreil M., Fattman C. et al., 2007; Saito S., Nakayama T., Hashimoto N. et al., 2011].

За счет активации матриксных металлопротеиназ 2 и 9, подавления функции их ингибиторов, донорские МСК способны снижать активность воспалительной реакции, секреции TGF- $\beta$  и депонирования коллагена [Chistiakov D. A., 2010]. По результатам исследования Cargnoni A. и соавт. (2012) кондиционная среда от МСК обладает антифибротической активностью [Cargnoni A., Ressel L., Rossi D. et al., 2012].

Известны успешные результаты при проведении 1b фазы клинических испытаний пациентов с умеренным ИЛФ, леченных МСК из жировой ткани. Через 1 год после однократной инъекции 86% клеток от общей популяции МСК демонстрировали функциональную активность в легких, при этом серьезные побочные эффекты отсутствовали [Tzouvelekis A. et al., 2013]. В исследовании Chambers D. C. и коллег (2014) показано, что по истечении 6 месяцев МСК плаценты человека после трансплантации демонстрировали высокую выживаемость и улучшали качество жизни пациентов с тяжелым ИЛФ, побочные эффекты не обнаруживались. И в результатах недавнего клинического исследования Glassberg M. K. и соавторы сообщают о прекращении прогрессии ИЛФ после введения аллогенных костномозговых МСК. Подобное лечение МСК, но только пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), проводилось несколько раньше – в 2013 г. [Weiss D. J. et al., 2013]. Тридцать пациентов с ХОБЛ получали 4 ежемесячные инъекции МСК. В течение 2 лет наблюдения не выявлено побочных эффектов, однако и значительных клинических эффектов не было зарегистрировано.

Несмотря на ежегодный рост зарегистрированных клинических испытаний для терапии на основе аллогенных СК, количество исследований дошедших до 4 фазы мало. Так, согласно ClinicalTrials на 2017 г. заявлено 6648 клинических испытаний терапии различных заболеваний на основе аллогенных МСК (таблица 3). При этом число распространенных заболеваний легких, для которых рекомендована аллогенная трансплантация МСК, возросло до 21 [Ullah I., Subbarao R. B., Rho G. J., 2015].

Таблица 3. Число распространенных заболеваний, зарегистрированных для клеточной терапии на основе МСК (ClinicalTrials.gov) [Biosci Rep. 2015 Apr 28;35(2). pii: e00191. doi: 10.1042/BSR20150025. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ].

Кардиоваскулярные заболевания	70
Аутоиммунные заболевания	45
Остеоартриты	37
Заболевания печени	32
Болезнь «Трансплантат против хозяина»	29
Заболевания легких	21
Травма спинного мозга	15
Почечная недостаточность	15
Заболевания кожи	13
Мышечная дистрофия	7
Апластическая анемия	5
Несовершенный остеогенез	4
Болезнь Паркинсона	2
Язвенный колит	2

При многих заявленных терапевтических эффектах и активном продвижении клеточной терапии с использованием чМСК для лечения пациентов обращает на себя внимание то обстоятельство, что из 6648 клинических испытаний 1196 находятся на уровне 3 и 4 фазы испытаний, с результатами исследования 4 фазы испытаний – 33 исследования.

Есть вопросы, которые должны быть решены перед использованием чМСК в больших клинических масштабах. В первую очередь, вопрос безопасности. При аллогенной и ксеногенной трансплантации МСК неизбежна реакция «трансплантат против хозяина» [Majumdar M. K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al., 2003; Barry F. P., Murphy J. M., O'Brien T. et al., 2005; Otto W. R., Wright N. A., 2011]. Наиболее серьезным является то, что, к сожалению, долгосрочное культивирование МСК, используемое для наращивания необходимого для терапии числа клеток, может привести к трансформации клеток, что значительно повышает вероятность развития опухолей и метастазов [Togel F., Westenfelder C., 2011]. Кроме этого, проведение мероприятий *in vitro* повышает риск эмболии. С другой стороны, высок риск возникновения реакции «трансплантат против хозяина».

Опубликована статистика отдаленных осложнений клеточной терапии [Yoshihiro Inamoto and Stephanie J. Lee, 2017]. Уже сейчас можно говорить о возникновении после аллогенной трансплантации солидного рака, сер-

дечно-сосудистых заболеваний, болезней печени, гонадальных дисфункций и бесплодия, инфекционных заболеваний, болезней почек, гемохроматоза и заболеваний костной системы, эндокринных заболеваний и таких легочных осложнений как облитерирующий бронхолит, криптогенная организуемая пневмония, легочная гипертензия (таблица 4).

Поднимается вопрос контроля качества получаемых для трансплантации чМСК. Так, указывается на необходимость дополнительного проведения *in vivo* исследования жизнеспособности клеток, анализов на эндотоксины и онкогенные тесты. Важно решить задачу по созданию протокола для определения оптимального количества и конкретного времени введения чМСК пациенту в зависимости от тяжести заболевания. И последнее, широкомасштабное применение в клинической практике чМСК возможно только после того, как будет сформировано понимание механизмов регуляции и модуляции их активности [Yoshihiro Inamoto and Stephanie J. Lee, 2017].

Таблица 4. Отдаленные осложнения после аллогенной трансплантации (через 5 лет) (Yoshihiro Inamoto and Stephanie J. Lee, 2017).

<b>Нейропсихические эффекты</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- депрессия, тревожность</li> <li>- посттравматическое стрессовое расстройство</li> <li>- нейрокогнитивный дефицит</li> </ul>
<b>Заболевания легких</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- облитерирующий бронхолит</li> <li>- криптогенная организуемая пневмония</li> <li>- легочная гипертензия</li> </ul>
<b>Болезни почек</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- тромботическая микроангиопатия</li> <li>- нефротический синдром</li> <li>- идиопатическая хроническая болезнь почек</li> <li>- персистирующая острая почечная недостаточность</li> <li>- полиомавирусная нефропатия</li> </ul>
<b>Гемохроматоз Заболевания костной системы</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- остеопения</li> <li>- остеопороз</li> <li>- аваскулярный некроз</li> </ul>
<b>Эндокринные заболевания</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- дисфункция щитовидной железы</li> <li>- гонадальная дисфункция</li> <li>- диабет</li> <li>- дислипидемия</li> <li>- метаболический синдром</li> <li>- гипокортицизм</li> </ul>
<b>Солидный рак</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ротовой полости</li> <li>- кожи</li> <li>- груди</li> <li>- щитовидной железы</li> </ul>
<b>Сердечно-сосудистые заболевания</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- кардиомиопатия</li> <li>- хроническая сердечная недостаточность</li> <li>- клапанные пороки сердца</li> <li>- аритмия</li> <li>- перикардит</li> <li>- ишемическая болезнь сердца</li> </ul>
<b>Болезни печени</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- гепатит В и С, цирроз печени</li> <li>- нодулярная регенеративная /</li> <li>- фокальная нодулярная гиперплазия</li> </ul>



Гонадальные дисфункции / бесплодие	
Инфекционные заболевания	- возбудитель пневмоцистной пневмонии
	- инкапсулированные бактерии
	- грибы
	- вирус ветряной оспы
	- цитомегаловирус
	- респираторно-синцитиальный вирус
	- вирусы гриппа и парагриппа

*Гемопоэтические стволовые клетки.* Существуют положительные результаты назначения в качестве трансплантационного материала гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Так, исследования Krause D. S. и соавт. (2001) показали, что ГСК способны дифференцироваться в альвеоциты I типа [Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I. et al., 2001]. Таким образом, ГСК проявляют так называемую «пластичность» и дифференцируются в негемопоэтические клеточные линии [Grove J. E. et al., 2004]. В условиях блеомицинового фиброза легких внутривенное введение ГСК способствует регенерации легочной ткани [Hashimoto N., Jin H., Liu T. et al., 2004; Kotton D. N., Summer R., Fine A., 2004; Kotton D. N., Fabian A. J., Mulligan R. C., 2005]. Однако при отсутствии поврежденного участка в легких, введение костномозговых ГСК не приводит к их заселению в легочной ткани [Herzog E. L. et al., 2006]. Не исключено, что существует зависимость процессов мобилизации и миграции ГСК от инициирующих хоминг медиаторов воспаления и др. факторов, высвобождающихся после травмы альвеолярной ткани. Исследования Aguilar S. и соавт. (2009) регистрировали сокращение экспрессии TNF- $\alpha$ , CCL-2, CCL-9 и увеличение митогенной активности альвеоцитов в легких блеомициновых мышей после трансплантации ГСК [Aguilar S., Scotton C. J., McNulty K. et al., 2009].

*Тканеспецифичные прогениторные клетки.* Считается, что роль тканеспецифических прогениторных клеток (ТПК) могут выполнять кубоидальные клетки II типа, способные делиться и восполнять количество альвеоцитов I типа [Mason R. J., Williams M. C., 1977; Brody J. S., Williams M. C., 1992]. Цитостатический препарат гликопептидный антибиотик блеомицин вызывал развитие фибротического процесса и сокращение пула ТПК легких. В этих условиях введение экзогенных ТПК снижало уровень депонирования коллагена в поврежденных блеомицином легких, уменьшало количество лимфоцитов и гранулоцитов в бронхоальвеолярной жидкости и тормозило пролиферацию Т-лимфоцитов [Jun D., Garat C., West J. et al., 2011]. После инъекции в поврежденное легкое мышам ТПК от человека отмечается формирование бронхиол, альвеол и легочных сосудов [Kajstura J., Rota M., Hall S. R. et al., 2011; Konigshoff M., Schwarz J., Eickelberg O., 2011]. В исследованиях Uzunhan Y. и соавторов назначение альвеоцитов II типа, полученных из легких здоровых доноров, препятствовало фиброгенезу [Uzunhan Y. et al., 2011]. В других исследованиях, сообщается о том, что человеческие эмбриональные клетки были дифференцированы в альвеоциты II типа *in vitro*, а затем уже были пересажены в блеомициновые легкие животных, тем самым достигался положительный эффект [Zhou Q. L. et al., 2014]. Между тем, довольно сложно

выделять фракцию ТПК из легочной ткани. В этой связи Tanaka K. и соавт. (2014) предлагают применять смешанную популяцию эпителиальных клеток легких, что приводит к улучшению клеточного микроокружения в поврежденной ткани [Tanaka K. et al., 2014].

Появились данные, подтверждающие участие клеток Клара в восстановлении легочного эпителия [Borthwick D. W., Shahbazian M., Krantz Q. T. et al., 2001].

Не исключено, что пул ТПК легких восполняется за счет стволовых клеток костного мозга [Banerjee E. R., Henderson W. R. Jr., 2012; Ricciardi M., Malpeli G., Bifari F. et al., 2012]. Однако механизмы обеспечения этого процесса до конца не изучены.

Приведенные выше данные указывают на положительный эффект клеточной терапии, при этом основной механизм действия – паракринный. Однако внушительная часть научного мирового сообщества сдержанно относится к клеточной трансплантации в связи с многочисленными побочными эффектами [Cohen M. Z. et al., 2013]. Альтернативой клеточной терапии может выступить модуляция прогениторных / стволовых клеток пациента [Tzouvelekis A. et al., 2011; Дыгай А. М. и др., 2007, 2015].

## **ГЛАВА 2. ПАТОГЕНЕЗ ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА**

### **2.1. Этапы фиброза легкого**

Хроническое повреждение альвеолярного эпителия и следующее за ним воспаление, синтез и отложение коллагена в интерстиции легких представляют собой единый динамический процесс. Функции резидентных и привлеченных в легкие зрелых клеток и их предшественников при травме альвеолярной ткани разнообразны. Одни из клеток реагируют на травму и принимают участие в свертывании/коагуляции, другие мигрируют к травмированному участку, третьи активно делятся, дифференцируются, продуцируют различные цитокины и, тем самым, поддерживают воспаление и инициируют фиброз, четвертые – задействованы в ремоделировании легочной ткани (таблица 5). Зрелые клетки и их предшественники могут быть задействованы не только в воспалении и фибропластическом процессе, но и в регенерации альвеолярного эпителия. Каждый шаг посттравматической реакции (фаза свертывания/коагуляции, фаза миграции воспалительных клеток, фаза миграции/пролиферации/активации фибробластов, фаза разрешения – ремоделирование ткани) генетически детерминирован. При благоприятном течении процесс завершается фазой разрешения: ремоделирование ткани легкого [Wynn T. A., 2011].

Таблица 5. Эффекты клеток при фиброзных заболеваниях легких (данные экспериментальных и клинических исследований).

Клетки	Эффекты	Источник
1	2	3
Эпителиальные и эндотелиальные клетки	Секреция медиаторов воспаления, инициирующих антифибринолитический-коагуляционный каскад, который вызывает активацию тромбоцитов и формирование тромбов, и изменяет качество экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ)	[Wynn T.A., 2011]
	Регенерация поврежденных тканей	[Zolak J. S., Joao A. A., 2012]
Эпителиальные клетки	Трансдифференцировка в ходе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в фибробласто-подобные клетки	[Wynn T.A., 2011] [Willis B. C., duBois R.M., Borok Z., 2006; Corvol H., Flamein F., Epaud R. et al., 2009; Felton V.M., Borok Z., Willis B. C., 2009; Tanjore H., Cheng D.S., Degryse A. L. et al., 2011]
Альвеолярные эпителиальные прогениторные клетки	Дифференцировка в эпителиальные клетки	[Crystal R. G. et al., 2008; Kajstura J. et al., 2011]
«Ненормальные» альвеолярные эпителиальные клетки	Иницируют миграцию, пролиферацию, и стимулируют мезенхимальные клетки с образованием фибробластов / миофибробластов	[SelmanM., Pardo A., 2006]
	Дифференцировка в гладкомышечные клетки	[Zhu P. et al., 2006; Arciniegas E., 2007; Barbera J.A., 2011]
Эндотелиальные прогениторные клетки	Восстанавливают сосуды и функции эндотелия за счет дифференцировки в эндотелиальные клетки	[Caramori G. et al., 2010; Fadini G. P. et al., 2006]
Бронхоальвеолярные стволовые клетки	Дифференцировка в альвеоциты I и II типов	[Kim C. F.B., Jackson E. L., Woolfenden A. E. et al., 2005; FujinoN., KuboH., SuzukiT. et al., 2011; WangX.-Y., Keefe K. M., Jensen-TaubmanS.M. et al., 2012]
Тромбоциты	Агрегация и дегрануляция способствует расширению и повышению проницаемости кровеносных сосудов, что обеспечивает привлечение клеток воспаления к месту травмы	[Wynn T.A., 2007; Wynn T.A., 2011]
Макрофаги и нейтрофилы	На начальной стадии воспаления очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, продуцируют цитокины и хемокины (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-13 и TGF- $\beta$ )	[Bringardner B. D., Baran C. P., 2008]

Клетки	Эффекты	Источник
1	2	3
Нейтрофилы	CCR2-, CXCR3- и CXCR2-опосредованная миграция из костного мозга в легкие	[Belperio J.A. et al., 2001; 2002; 2005]
Макрофаги	Увеличивают выработку коллагена нормальными человеческими фибробластами CCL18-зависимым образом <i>invitro</i>	[Prasse A. et al., 2006]
	Секреция TGF-β и PDGF, усиление полиаминного и пролинового биосинтеза, образование коллагена	[Hesse M. et al., 2001]
	Продукция фибронектина и α-SMA	[Muro A.F. et al., 2008]
Эозинофилы	IL-5- и IL-4-опосредованная продукция TGF-β	[Elovic A.E. et al., 1998]
Тучные клетки	Химазы тучных клеток повышает агрессивность TGF-β и тем самым способствует легочному фиброзу	[Tomimori Y. et al., 2003]
	Способствуют распространению фибробластов в очаге травмы	[Garbuzenko E. et al., 2002]
Т-клетки	Дифференцировка в Th2-клетки, тем самым обеспечивается секреция IL-5, IL-9, IL-13, IL-21.	[Takatsu K., Nakajima H., 2008]
Т-хелперные клетки	Формирование профиля цитокинов, характерного для различных фиброзных состояний легкого (IL-4, IL-13, TGF-β) – цитокины 2-го типа иммунного ответа	[Strutz F. et al., 2001; Wynn T.A., 2003].
	Формирование провоспалительного профиля цитокинов, характерного для пациентов с ИЛФ (IL-1α, IL-1β, TNF-α, TGF-β, тромбоцитарный фактор роста (PDGF))	[Agostini C., Gurrieri C., 2006]
Фibroциты	CXCL12-, CCL12- и CCR2- опосредованная миграция из костного мозга в легкие	[Phillips R.J. et al., 2004; Moor B.B. et al., 2005; 2006]
	Выявляются в непосредственной близости от очагов в областях с текущими признаками воспаления	[Andersson-Sjoland A. et al., 2008]
	Участвуют в фиброзе	[Phillips R.J. et al., 2004]
	Источники фибробласто-подобных клеток	[Abe R., Donnelly S.C., Peng T. et al., 2001; Hashimoto N., Jin H., Liu T. et al., 2004]
Прогениторные фибробластные клетки	Дифференцировка в фибробласты	[Wilson M.S., Wynn T.A., 2009]
Фибробласты	Трансформация в миофибробласты, экспрессирующие α-гладкомышечный актин	[Andersson-Sjoland A. et al., 2011]
	IL-13- и TGF-β-опосредованная продукция коллагена	[Malavia N.K. et al., 2008; Wenzel S.E. et al., 2002]
	Создание профибротического ЭЦМ	[Andersson-Sjoland A. et al., 2008]
	Продукция фибронектина и α-SMA	[Muro A.F. et al., 2008]
	TGF-β-опосредованная миграция вдоль границы внеклеточного матрикса и ремодуляция повреждения	[Garcia-Alvarez J. et al. 2006; Gill S.E. et al., 2008]
	Апоптическая гибель после ремодуляции альвеолярного эпителия	[Fattman C.L., 2008]

Клетки	Эффекты	Источник
1	2	3
Миофибробласты	Секреция компонентов ЭЦМ, способствуют сокращению раневой поверхности (ремоделирование)	[Zolak J. S., Joao A. A., 2012]
	Уменьшают размер поражения, меняют баланс MMPs / TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) и коллаген / коллагеназы	[Garcia-Alvarez J. et al. 2006; Gill S. E. et al., 2008]
	Удаляются из раны после ремодуляции альвеолярного эпителия	[Fattman C. L., 2008]
Мезенхимальные клетки-предшественники	Выход из костного мозга в циркуляцию, миграция по сосудистому руслу в поврежденные участки легких, где дифференцируются до фибробластов и миофибробластов	[Strieter R. M. et al., 2007; Gomperts B. N., Strieter R. M., 2007]
МСК	Предполагают трансдифференцировку в альвеоциты, дают начало структурным дыхательным единицам, включающим бронхиолы, альвеолы и легочные сосуды	[Ortiz L. A. et al., 2003; Baksh D. et al., 2004; Tzouvelekis A. et al., 2011; Huleihel L. et al., 2013]
	Иммуносупрессивная активность, секреция фактора стромальных клеток-1, моноцитарного хемотаксического протеина-3, сосудистого эндотелиального фактора роста ( <i>Vascularendothelialgrowthfactor</i> VEGF), фактора роста гепатоцитов	[Garcia-Gomez I. et al., 2010; Kotton D. N., Fine A. 2008; Gimble J. M. et al., 2010]
	Дифференцировка в клетки стромальных линий (адипоциты, остеобласты, хондроциты, фибробласты)	[Majka S. M. et al., 2005; Summer R. et al., 2007; Martin J. et al., 2008; Skurikhin E. G. et al. 2013]

После повреждения легочной ткани, эпителиальные клетки и эндотелиальные клетки выделяют медиаторы воспаления, которые инициируют антифибринолитический-коагуляционный каскад, вызывающий активацию тромбоцитов и формирование тромбов, изменение качества экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (рисунок 1) [Wynn T. A., 2011]. Агрегация тромбоцитов и их последующая дегрануляция, в свою очередь, способствует расширению и повышению проницаемости кровеносных сосудов, что обеспечивает эффективное привлечение клеток воспаления (нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и эозинофилов) к месту травмы [Wynn T. A., 2007; Wynn T. A., 2011]. Нейтрофилы являются наиболее распространенными клетками воспаления на самых ранних стадиях заживления – повреждения, но после дегрануляции быстро сменяются макрофагами.

Во время этой начальной фазы миграции лейкоцитов активированные макрофаги и нейтрофилы очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, продуцируют различные цитокины и хемокины (ИЛ-1 $\beta$ , TNF, ИЛ-13 и TGF- $\beta$ ), которые усиливают воспалительный ответ и вызывают пролиферацию резидентных фибробластов [Bringardner B. D., Baran C. P., 2008]. Предполагается привлечение циркулирующих в крови фиброцитов и костномозговых прогениторных фибробластных клеток в разрешении 3 этапа фиброгенеза

[Wilson M. S., Wynn T. A., 2009]. Фибробластные клетки дифференцируются в миофибробласты [Andersson-Sjöland A. et al., 2011]. Миофибробласты могут быть получены из эпителиальных клеток в ходе так называемого эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [Wynn T. A., 2011]. Считается, что при таком патологическом процессе как фиброз и при заживлении ран изменение эпителиальными клетками эпителиального фенотипа на мезенхимальный – это необходимый процесс.

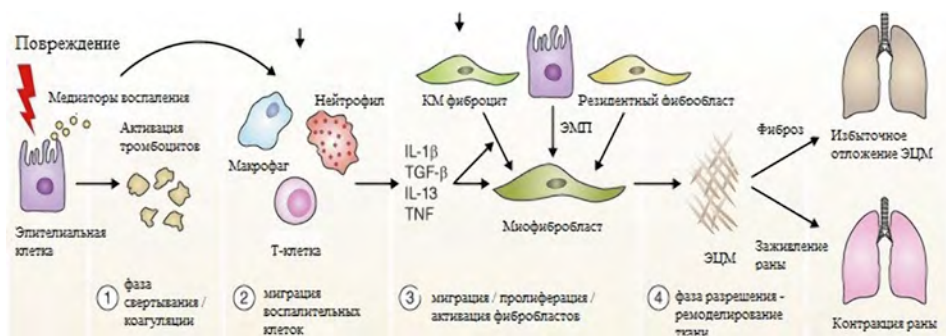


Рисунок 1. Этапы заживления ран в легких [Wynn T. A., 2011].

Как только фибробласты активизируются, они трансформируются в  $\alpha$ -гладкомышечный актин экспрессирующие миофибробласты, которые секретируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса. В фазу разрешения миофибробласты способствуют сокращению раневой поверхности (ремоделирование). На заключительном этапе эпителиальные и эндотелиальные клетки делятся и мигрируют, и таким образом участвуют в регенерации поврежденных тканей [Zolak J. S., Joao A. A., 2012]. Если любой этап в программе восстановления тканей нарушается или сохраняются стимулы, повреждающие легкие, развивается фиброз (постоянный фиброзный «шрам») (Рисунок 1) [Wynn T. A., 2011]. Вероятность необратимости фиброгенеза сохраняется и при обширной раневой поверхности.

## 2.2. Цитокины

Значение воспаления в прогрессировании фиброза легких неоднократно обсуждалось многими авторами. Различные формы болезни вызваны, по крайней мере, на начальном этапе, сильной воспалительной реакцией [Crystal, R. G. et al., 2002]. В интерстиции легких у многих пациентов наблюдается скопление лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток, эозинофилов и нейтрофилов, наличие лимфоидных фолликулов с герминальными центрами [Crystal R. G. et al., 1976]. Первоначальные термины “диффузный фиброзирующий альвеолит” и “криптогенный фиброзирующий альвеолит” были использованы как отражение воспалительного компонента легочного фиброза [Scadding J. G., Hinson K. F., 1967; Bois R. M., Wells A. U., 2001]. Некоторые типы легочного фиброза поддерживают воспаление на протяжении всего заболевания. Между тем, ИЛФ часто характеризуется как быстро прогрессирующее фиброзное

заболевание с отсутствием воспаления [Thannickal V.J. et al., 2004]. Факт, что активный воспалительный ответ это не строгое условие ИЛФ, объясняется временным фактором. В подавляющем числе случаев заболевание диагностируется, когда болезнь перешагнула этап воспаления и неумолимо движется к своему печальному разрешению. С этим связано обнаружение только следов воспаления. Вот почему стандартная противовоспалительная терапия (в том числе кортикостероиды и цитостатики) малоэффективна у больных с ИЛФ [Demedts M. et al., 2005]. Условия эксперимента позволяют проследить у животных всю описанную выше последовательность событий от начала повреждения альвеолярного эпителия до ремоделирования легочной ткани либо до остановки дыхания.

Исследования механизмов фиброза легких показали важность цитокинов в легочном фиброгенезе у животных и людей. Потенциальным источником цитокинов в легких могут выступать эпителиальные и мезенхимальные клетки, Т- и В-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и тромбоциты. В таблице 6 представлены цитокины, имеющие самое непосредственное отношение к фиброзу легкого.

Таблица 6 – Цитокины, участвующие в регуляции легочного фиброза

Факторы роста	Эффекты
Трансформирующий фактор роста $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ -TGF- $\beta$ )	TGF- $\beta$ играет центральную роль в патогенезе легочного фиброза, способствует активации, пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток и коллаген-продуцирующих миофибробластов [Border W. A., Noble N. A., 1994]. Основной профибротический фактор роста. In vitro стимулирует выработку фибробластами ЭЦМ, дифференцировку миофибробластов. Индуцирует апоптоз в эпителиальных клетках, и способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП). В условиях животных моделей фиброза TGF- $\beta$ усиливает свою активность, избыточная его экспрессия вызывает тяжелый фиброз [Willis B. C., Liebler J. M. et al., 2005; Gharaee-Kermani M. et al., 2009; Biernacka A. et al., 2011].
Фактор роста соединительной ткани (Connective tissue growth Factor – CTGF, CCN2)	CTGF in vitro стимулирует пролиферацию фибробластов и способствует ЭМП. Усиливает свою активность в блеомициновой модели, избыточная экспрессия in vivo вызывает тяжелый фиброз. Функционирует в сочетании с TGF- $\beta$ [Atamas S. P., 2002; Ihn H., 2002].
Тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor – PDGF)	PDGF стимулирует пролиферацию фибробластов и хемотаксис in vitro. В условиях пневмофиброза ингибирование PDGF снижает активность фиброгенеза у животных. Фактор усиливает свою активность у больных с ИЛФ, ингибирование фактора не улучшает выживаемость у пациентов [Trojanowska M. 2008; Abdollahi A. et al., 2005].
Инсулиноподобный фактор роста (Insulin-like growth factor – IGF)	IGF стимулирует продукцию фибробластами молекул ЭЦМ in vitro. Активность фактора в условиях блеомицинового пневмофиброза возрастает, но избыточная экспрессия in vivo не вызывает фиброз. IGF стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток [Hsu E., Feghali-Bostwick C.A., 2008].
Интерлейкины	Эффекты
Интерлейкин-4 (Interleukin-4 – ИЛ-4) Интерлейкин-13 (Interleukin-13 – ИЛ-13)	Интерлейкины продуцируются Th-2 клетками, стимулируют пролиферацию фибробластов и производство ЭЦМ in vitro, вызывают активацию макрофагов. При поражении легких блеомицином усиливают свою активность, избыточная экспрессия in vivo вызывает фиброз [Jakubzick C. et al., 2004; Joshi B. H. et al., C. 2006].

Факторы роста	Эффекты
Интерлейкин-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ -ИЛ-1 $\beta$ ) Фактор некроза опухоли- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ TNF- $\alpha$ )	Провоспалительные цитокины, которые in vitro стимулируют пролиферацию фибробластов и хемотаксис, но подавляют выработку коллагена. На животной модели блеомицинового фиброза усиливают свою активность, избыточная их продукция вызывает воспаление и фиброз. Ингибирование TNF- $\alpha$ у пациентов с ИЛФ не влияло на фиброгенез [Hoshino T. et al., 2009; Ortiz L.A. et al., 1998].
Интерлейкин-17 (Interleukin-17 – ИЛ-17)	Провоспалительный цитокин, усиливает свою активность на модели блеомицинового фиброза. In vivo ИЛ-17 стимулирует фиброз, который уменьшается при блокировании TGF- $\beta$ . ИЛ-17 усиливает свою активность у пациентов с ИЛФ [Wilson M.S. et al., 2010].
Интерлейкин-10 (Interleukin-10 – ИЛ-10)	Противовоспалительный цитокин, in vitro ингибирует производство фибробластами молекул ЭЦМ. Повышение уровня или избыточная экспрессия ИЛ-10 уменьшает блеомицин-индуцированный фиброз [Sun L. et al., 2011].
Хемокины	Эффекты
CCL2 (MCP-1) (C–C motif ligand 2, Monocyte Chemoattractant Protein 1)	Провоспалительный хемокин, стимулирует продукцию фибробластами ЭЦМ in vitro. Уровень CCL2 повышается на модели блеомицинового фиброза, блокирование или генетическое его удаление обеспечивает защиту от блеомицин-индуцированного фиброза легких. Предполагается, что CCL2 привлекает в легкие фиброциты костномозгового происхождения [Liu X. et al., 2007].
CCL18	Провоспалительный хемокин, стимулирует производство фибробластами молекул ЭЦМ in vitro. Сверхэкспрессия in vivo индуцирует фиброз, однако, сверхэкспрессия в сочетании с блеомицином уменьшает фиброз. Сывороточные концентрации CCL18 обратно коррелируют с клиническими параметрами фиброгенеза у пациентов с ИЛФ [Pochetuhnen K. et al., 2007].
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Провоспалительный хемокин, привлекает в легкие фиброциты, возможно, костномозгового происхождения [Ishida Y. et al., 2007].
CXCL12	CXCL12 является основным хемокином, ответственным за привлечение фиброцитов в легкие в блеомициновой модели пневмофиброза. У пациентов с ИЛФ его уровень повышается в БАЛ и сыворотке, и обратно коррелирует с параметрами фиброгенеза [Phillips R.J. et al., 2004].
	Эффекты
ОнкостатинМ (Oncostatin M – OSM)	Стимулирует пролиферацию фибробластов и производство ими молекул ЭЦМ in vitro, ингибирует апоптоз. Сверхэкспрессия и введение OSM in vivo вызывает воспаление и фиброз [Mozaffarian A. et al., 2008; Scaffidi A. K. et al., 2002].
Интерферон- $\gamma$ ( <i>Interferon-<math>\gamma</math></i> IFN- $\gamma$ )	Провоспалительный цитокин Th-1-клеток, ингибирует пролиферацию фибробластов и производство ЭЦМ in vitro, усиливает апоптоз фибробластов. In vivo уменьшает фиброз в условиях блеомицинового повреждения легких, но введение IFN- $\gamma$ пациентам с ИЛФ не улучшает их выживаемость [King T.E. et al., 2009].

Характер повреждения или возбудителя диктует контур последующей воспалительной реакции. Первым шагом в организации воспалительного каскада выступают рецепторные взаимодействия. Такие экзогенные раздражители как патоген-связанные молекулярные паттерны (Pathogen-associated molecular pattern PAMPs) распознаются Toll-подобными рецепторами и NOD-подобными рецепторами, и определяют клеточный ответ на внедряющиеся патогены [Janeway C.A. Jr., Medzhitov R., 2002]. Эндогенные сигналы также могут формировать воспалительный ответ [Matzinger P., 2002].



В зависимости от доминирующего цитокинового ответа Т-хелперных клеток иммунный ответ разделяют на 1-й тип (Th1-клетки, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IgG2, провоспалительный), 2-й тип (Th2-клетки, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, IgE) и тип 17 (Th17-клетки, в последнее время связывают с провоспалительным состоянием). Например, хронические аллергические заболевания дыхательных путей астматиков обычно ассоциируется с повышением профиля цитокинов иммунного ответа 2-го типа (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-9, ИЛ-3 [Holgate S. T., 2008]), тогда как у пациентов с ИЛФ обнаруживается иной провоспалительный профиль цитокинов (ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [Agostini C., Gurrieri C., 2006]). При различных фиброзных состояниях легкого особое внимание обращают на себя ИЛ-4, ИЛ-13 и TGF- $\beta$  – цитокины 2-го типа иммунного ответа. Каждый из этих цитокинов демонстрирует значительную профиброзную активность [Strutz F. et al., 2001; Wynn T. A., 2003]. Механизм их профибротической активности многообразен. Так, ИЛ-4, ИЛ-13 и TGF- $\beta$  способны привлекать в очаг повреждения в легких фибробласты, макрофаги и миофибробласты, стимулировать пролиферацию фибробластов [Wynn T. A., 2004].

Уровень ИЛ-4 повышается в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у пациентов при ИЛФ, криптогенном фиброзирующем альвеолите, радиационном пневмоните [Jakubzick C., Kunkel S. L., 2004]. Рецепторы к ИЛ-4 присутствуют на фибробластах легких, а ИЛ-4-сигналинг увеличивает отложение коллагена и количество белков внеклеточного матрикса. Некоторые исследователи считают, что ИЛ-4 превосходит TGF- $\beta$ 1 в индуцировании синтеза коллагена фибробластами [Sempowski G. D. et al., 1994]. Известна способность ИЛ-4 стимулировать макрофаги. Это альтернативный путь активации макрофагов (*Alternative activation of macrophages* – AA-Mac) [Martinez-Pomares L. et al., 2003]. Макрофаги давно связывают с легочным фиброзом, однако механизмы действия и функции альтернативного пути активации в условиях легочного фиброза выяснены недавно. При AA-Macs отмечается секреция TGF- $\beta$ , PDGF макрофагами, а также усиление полиаминного и пролинового биосинтеза, образование коллагена [Hesse M. et al., 2001]. Макрофаги, активированные альтернативным путем, были выделены из бронхоальвеолярного лаважа пациентов с ИЛФ и культивированы A. Prasse с коллегами (2006). Супернатант этих макрофагов значительно увеличивал выработку коллагена нормальными человеческими фибробластами CCL18-зависимым образом *in vitro*.

Одним из самых известных свойств ИЛ-4 является стимуляция дифференцировки Т-клеток в Th2-клетки, тем самым обеспечивается источник цитокинов 2-го типа: ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13, ИЛ-21. В свою очередь, ИЛ-5 мобилизует и стимулирует созревание эозинофилов, привлекает их в очаг воспаления [Takatsu K., Nakajima H., 2008]. ИЛ-5 совместно с ИЛ-4 способствует продукции эозинофилами TGF- $\beta$  [Elovic A. E. et al., 1998]. Кроме этого, ИЛ-5 может увеличивать секрецию ИЛ-13, а также провоцировать ИЛ-13-зависимый фиброз [Reiman R. M. et al., 2006].

ИЛ-9 избирательно привлекается в легкие и активирует тучные клетки. Химаза тучных клеток повышает агрессивность TGF- $\beta$  и тем самым способствует легочному фиброзу [Tomimori Y. et al., 2003]. Тучные клетки способ-

ствуют распространению фибробластов в очаге поражения и производству ими коллагена и матриксных металлопротеиназ [Garbuzenko E. et al., 2002]. По мнению Т. Masuda и соавт. (2003), тучные клетки могут быть вовлечены в субэпителиальный фиброз после стимуляции аллергеном.

ИЛ-13 определяется в качестве одного из ключевых фиброгенных цитокинов при многих фиброзных состояниях [Munitz A., Brandt E. B., 2008; Wynn T. A., 2003] и может функционировать независимо от TGF- $\beta$  [Kaviratne M. et al., 2004]. ИЛ-21 усиливает Th2-легочной ответ и ИЛ-13-связанный фиброз путем положительной регуляции экспрессии ИЛ-4 и ИЛ-13 рецепторов. ИЛ-13 вызывает дифференциацию фибробластов в  $\alpha$ -гладкомышечный актин – экспрессирующие ( $\alpha$ -SMA) миофибробласты и PDGF-продуцирующие клетки [Ingram J. L., Rice., 2004] со значительными митогенными свойствами. Интересно, что ИЛ-13-опосредованная дифференциация фибробластов в миофибробласты рефрактерна к стероидному ингибированию, это объясняет, почему стероиды не эффективны в подавлении фиброза.

Фибробласты, полученные от пациентов с ИЛФ и аллергических астматиков, демонстрировали гиперреактивность к ИЛ-13, TGF- $\beta$  и CCL-2, а также значительное взаимодействие между этими тремя медиаторами [Murray L. A. et al., 2008; Kraft M. et al., 2001]. С. G. Lee с соавт. (2001) полагает, что ИЛ-13 через различные субъединицы соответствующего рецептора может стимулировать активатор плазминогена и MMP-9, и, таким образом, высвобождается активный TGF- $\beta$  и развивается фиброз легкого. In vitro культура нормальных человеческих фибробластов с нормальными эпителиальными клетками, которые были предварительно обработаны ИЛ-13, продуцировали значительно больше TGF- $\beta$ , растворимого и фибриллярного коллагена, чем в культуре не обработанных ИЛ-13 эпителиальных клеток [Malavia N. K. et al., 2008]. Эти данные указывают на то, что ИЛ-13 может прямо или косвенно способствовать выработке коллагена фибробластами. S. E. Wenzel с коллегами (2002) подтвердили необходимость скоординированного и совокупного действия ИЛ-13 и TGF- $\beta$  для стимуляции продукции коллагена фибробластами.

TGF- $\beta$  является одним из наиболее широко изученных профиброзных цитокинов [Letterio J. J., Roberts A. B., 1998; Grotendorst G. R. et al., 1989]. Получают цитокин из Т-клеточных, макрофагальных, эозинофильных и нейтрофильных костномозговых монокультур. TGF- $\beta$  стимулирует пролиферацию фибробластов и синтез ими белков внеклеточного матрикса [Strutz F., et al., 2001], опосредованно через провоспалительный хемокин MCP-1 (CCL2) привлекает в очаг воспаления клетки воспаления [Szardening-Kirchner C. et al., 2008]. Существуют данные о подавлении цитокином Т-клеточного ответа [Letterio J. J., Roberts A. B. 1998; Biernacka A. et al., 2011]. Противоположные эффекты TGF- $\beta$  объясняются различными источниками и клеточными мишенями [Coker R. K. et al., 1997]. TGF- $\beta$  избыточно экспрессируется в легких у мышей с интерстициальным и плевральным фиброзом. В отличие от ИЛ-13, сверхэкспрессия TGF- $\beta$  напрямую не привлекает клетки воспаления, не усиливает секрецию слизи в легких [Kaviratne M. et al. 2004]. Предполагается, что при отсутствии значительной воспалительной реакции TGF- $\beta$  может непосредственно вызывать фиброз. Ингибирование активности TGF- $\beta$  вмеша-

тельством в SMAD-передачу сигналов (*small mother against decapentaplegic*) [Flanders K. C., 2004] значительно уменьшает активность кожного [Lakos G. et al., 2004], почечного [Inazaki K. et al., 2004], глазного [Stramer B. M. et al., 2005] и легочного [Bonniaud P. et al., 2004] фиброгенеза.

Хемокины представляют собой большое семейство хемоаттрактантов, участвующих в фиброзе легкого (Таблица 1). Хемокины привлекают лейкоциты, прекурсоры фибробластов и многие другие ключевые эффекторные клетки к месту повреждения легочной ткани [Strieter R. M. et al., 2007]. В этой связи, соединения семейства хемоаттрактантов представляют собой потенциальные цели для антифибротической терапии. Известно, что сывороточные уровни CCL18 негативно коррелируют со снижением легочной функции у пациентов с легочным фиброзом [Prasse A. et al., 2006; Prasse A. et al., 2009]. По мнению A. Prasse (2009), CCL18 может быть использован в качестве сывороточного биомаркера прогрессии легочного фиброза. Блокирование или генетическое удаление CCL2 (*monocyte-chemoattractant protein-1*), CCL6 или CCR1 обеспечивает значительное снижение активности блеомицин-индуцированного фиброза легких [Tokuda A. et al., 2000; Moor B. B. et al., 2001]. Важную роль в FITC- и блеомицин-индуцированном легочном фиброзе играют такие хемокины, как CXCL12, CCL12 и CCR2. Профибротическое их действие связано с привлечением в легкие секретирующих коллаген фиброцитов, возможно, костномозгового происхождения [Phillips R. J. et al., 2004; Moor B. B. et al., 2005; 2006]. При синдроме облитерирующего бронхиолита CCR2, CXCR3 и CXCR2 участвуют в ремоделировании сосудов, привлекают в легкие фагоциты и нейтрофилы [Belperio J. A. et al., 2001; 2002; 2005]. Однако не все хемоаттрактанты содействуют легочному фиброзу. Так, CXCL10, CXCL11 и CXCR3 предотвращают миграцию фибробластов и уменьшают ангиогенез в легких, содействуют секреции антифибротического цитокина IFN- $\gamma$  [Jiang D. et al., 2004, 2010].

### 2.3. Фибробласты и миофибробласты

Ведущая роль фибробластов и миофибробластов при создании профибротического ЭЦМ в легких не подвергается сомнению. Между тем, происхождение фибробластов и миофибробластов в легких при фиброзе до сих пор не известно. Классическое представление о происхождении этих клеток заключается в том, что повреждение альвеолярного эпителия вызывает активацию резидентных фибробластов: пролиферацию и экспрессию белков, составляющих ЭЦМ [Andersson-Sjoland A. et al., 2008]. Ряд исследователей считает, что повреждение легочной ткани в присутствии TGF- $\beta$  индуцирует трансформацию (переход) эпителиальных клеток в клетки мезенхимального фенотипа (фибробласты, миофибробласты), которые вносят свой вклад в фиброгенез. Третья гипотеза предполагает участие в пневмофиброзе циркулирующих фиброцитов, источник которых – мезенхимальные клетки-предшественники костного мозга. Мезенхимальные клетки-предшественники выходят из костного мозга в циркуляцию, мигрируют по сосудистому руслу в поврежденные участки легких, где дифференцируются до фибробластов

и миофибробластов [Strieter R. M. et al., 2007; Gomperts B. N., Strieter R. M., 2007]. В подтверждение гипотезы выступают данные R. J. Phillips, M. D. Burdick и K. Hong (2004). В своем исследовании авторы выявили циркулирующий пул CD45<sup>+</sup>-клеток, положительных по коллаген I и CXCR4, и названных ими фиброцитами, которые направлялись в легкие в ответ на повреждение и приводили к фиброзу [Phillips R. J. et al., 2004]. Механизм привлечения костномозговых фиброцитов в легкие, возможно, связан с CXCR4, и его лигандом SDF-1 / CXCL12, экспрессия которого увеличивается в условиях гипоксии [Ceradini D. J. et al., 2004; Phillips R. J., et al., 2005]. Как известно, костный мозг гипоксичен по сравнению с окружающими его сосудами и экспрессирует SDF-1 / CXCL12. Травмы в легких приводят к повышению уровня SDF-1 / CXCL12 в плазме и в жидкости бронхоальвеолярного лаважа [Andersson-Sjoland A., et al 2008]. Это инициирует выход фиброцитов из костного мозга в циркуляцию и миграцию по хемотаксическому градиенту SDF-1 / CXCL12 к месту повреждения легкого [Christopher M. J. et al., 2009]. Кроме этого, фиброциты экспрессируют MMPs, что, по всей видимости, облегчает их трансэндотелиальную и тканевую миграцию [Garcia-de-Alba C. et al., 2010].

Прогрессирующее накопление в легочной ткани фибробласт-миофибробластных очагов – это отрицательный прогностический фактор: при фиброзных заболеваниях легких чем больше очагов, тем хуже прогноз [King T. E. et al., 2001]. При ИЛФ количество фибробластов и миофибробластов, достигнув определенных значений, в последующем изменяется достаточно редко или незначительно [Selman M., et al., 2000]. Клинические наблюдения A. Andersson-Sjoland (2008) показали, что фиброциты, определяющиеся в легочной ткани пациентов с ИЛФ, не расположены внутри очагов, но выявляются в непосредственной близости от очагов, в областях с текущими признаками воспаления. Впоследствии такие прилегающие области позже становятся фибробластическими очагами. В фибробластических очагах имеется собственная среда с определенным набором цитокинов, ростовых факторов и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (Tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP). Так, альвеолярные фибробласты и макрофаги, выделенные у больных с ИЛФ, производят значительно больше фибронектина и  $\alpha$ -SMA, чем контрольные фибробласты. В этих условиях фибробласты и миофибробласты устойчивы к апоптозу, молекулы экстрацеллюлярного матрикса продолжают производиться в избытке [Muro A. F. et al., 2008].

Фаза разрешения (ремодуляция ткани) включает в себя клеточную реорганизацию, сокращение и закрытие раны, реэпителизацию (рисунок 1). Коллаген миофибробластов и  $\alpha$ -SMA, фибронектин фибробластов – основа внеклеточного матрикса фиброзированных легких (фибриновая подложка) [Kadler K. E. et al., 2008]. Кроме коллагеновых волокон,  $\alpha$ -SMA и фибронектина ЭЦМ включает в себя гликопротеины (такие как PDGF), гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота), протеогликаны и эластин. Считается, что активированные TGF- $\beta$  фибробласты мигрируют вдоль границы внеклеточного матрикса и ремодулируют повреждение. Прикрепленные к внеклеточному матриксу на специализированных сайтах (“Fibronexus” – “супер зрелая фокальная адгезия”) миофибробласты уменьшают размер поражения. При этом меняется баланс

MMPs / TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) и коллаген / коллагеназы [Garcia-Alvarez J. et al. 2006; Gill S. E. et al., 2008]. В фазу разрешения наблюдается переход от синтеза и увеличения отложения коллагена (ответ на поражение) к снижению продукции коллагеновых волокон. Ремодуляция альвеолярного эпителия сопровождается апоптической гибелью фибробластов. Одновременно из раны удаляются клетки воспаления и наиболее интенсивно  $\alpha$ -SMA миофибробластов [Fattman C. L., 2008].

## **2.4. Мезенхимальные / мезенхимные стволовые / стромальные клетки (МСК)**

Среди стволовых клеток, возможно играющих роль в патогенезе и регенерации ИЛФ, наиболее интенсивно изучаются МСК. 40 лет назад их идентифицировали как негемопоэтические клетки мезодермального происхождения с фибробластоподобной морфологией и возможным потенциалом к дифференцировке в мезенхимальные клеточные линии. На сегодняшний день известны популяции эмбриональных и взрослых МСК [Tzouveleakis A., 2011; Rankin S., 2012]. Источником взрослых МСК могут быть пуповинная кровь и костный мозг, жировая, скелетная и мышечная ткани, пульпа зуба взрослого организма. По современным представлениям МСК обладают выдающимися плеiotропными свойствами, в том числе способностью к дифференцировке (остеобласты, хондроциты, жировые клетки, фибробласты), регенерации и миграции [Weiss D. J., 2011; Wolf D., Wolf A. M., 2008; Rankin S. M., 2012]. Рассматривается вопрос о возможной трансдифференцировке МСК в альвеоциты,  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, гепатоциты, нейроны и др. специализированные клетки [Huleihel L. et al., 2013; Baksh D. et al., 2004].

Исследования в области СК ведутся с большой интенсивностью, данные накапливаются в геометрической прогрессии (Таблица 7). На сегодняшний день МСК представляют собой основную клеточную популяцию, используемую в клеточной терапии при хронических заболеваниях легких [Huleihel L. et al., 2013]. В основе этого подхода лежат глубокие и разносторонние исследования МСК.

Исследования легких с использованием мышиной модели блеомицин-индуцированной травмы позволили L. A. Ortiz с соавт. (2003) предположить, что после травмы донорские костномозговые МСК могут направляться в область повреждения, принимают эпителиальный фенотип (мезенхимально-эпителиальный переход) и, возможно, тем самым уменьшают воспаление и отложение коллагена в легочной ткани.

Вводимые донорские МСК в фиброзированные легкие проявляют иммуносупрессивную активность, секретируют ангиогенные, антиапоптозные и противовоспалительные факторы – такие как фактор стромальных клеток-1, моноцитарный хемотаксический протеин-3, сосудистый эндотелиальный фактор роста (*Vascular endothelial growth factor* VEGF), фактор роста гепатоцитов [Kotton D. N., Fine A. 2008; Garcia-Gomez I. Et al., 2010; Gimble J. M. et al., 2010]. Факторы стимулируют ангиогенез, способствуют защите ткани от повреждения и восстановлению клеток [Kondo K., 2009; Hong S. J., 2010].

С другой стороны, МСК, привлеченные в пораженные участки легких, могут как ускорять процесс восстановления эпителия, посредством дифференцировки в альвеоциты II типа [Liu A., Chen S., Cai S. et al., 2014; Cai S. X., Liu A. R., Chen S. et al., 2015], так и участвовать в развитии пневмофиброза. Так, Tang N. и соавт. (2014) установили, что МСК, активированные через Wnt/ $\beta$ -catenin сигнальный путь, дифференцируются в фибробласты и способствуют развитию пневмофиброза [Tang N., Zhao Y., Feng R. et al., 2014]. Введение МСК в фиброзную стадию развития болезни значительно усугубляло пневмофиброз [Mora A. L., Rojas M., 2008]. При этом задействован паракринный механизм фиброза – секреция МСК главного профибротического цитокина TGF- $\beta$  [Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM. et al., 2010]. Однако подавляющее количество исследователей склоняются к тому, что экзогенные и эндогенные МСК обладают огромным терапевтическим потенциалом в лечении заболеваний легких. Единственным ограничением применения МСК в лечении ИЛФ является использование их в раннюю воспалительную фазу развития болезни, так как применение МСК в фиброзную фазу может усугубить пневмофиброз [Li X., Yue S., Luo Z., 2017].

Таблица 7. Эффекты введения донорских клеток при экспериментальном пневмофиброзе.

Авторы	Клетки	Модель	Эффекты	Механизм действия
Ortiz L.A. et al., 2003	КМ–МСК мышей	Блеомицин, ВВ	Уменьшение воспаления, снижение уровней гидроксипролина и матричных металлопротеиназ-2 и –9	Паракринный
Rojas M. et al., 2005	КМ–МСК мышей	Блеомицин, ВВ	Снижение экспрессии цитокинов воспаления	Паракринный
Germano D. et al., 2009	КМ–МСК мышей	Блеомицин, ВВ	Снижение системных воспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-8, MIP-1 $\alpha$ )	Паракринный
Zhao F. et al., 2008	КМ–МСК крыс	Блеомицин, ВВ	Уменьшение повреждения легких, снижение уровней оксипролина, ламинина, TGF- $\beta$ , PDGF, IGF, гиалуроновой кислоты	Паракринный
Moodley Y. et al., 2009	МСК пуповины человека	Блеомицин, ВВ	Уменьшение повреждения легких, уменьшение отложения коллагена и уровней гидроксипролина, и TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases)	Паракринный
Aguilar S. et al., 2009	КМ–МСК мышей	Блеомицин, ВВ	Снижение отложения коллагена и уровней $\alpha$ SMA, TNF $\alpha$ , CCL-2, CCL-9	Секреция фактора роста кератиноцитов
Kumamoto M. et al., 2009	КМ–МСК мышей	Блеомицин, ВВ	Уменьшение повреждения легких и количества клеток воспаления, снижение уровня гидроксипролина	Паракринный
Lee S, H. et al., 2010	КМ–МСК крыс	Блеомицин, ВВ	Уменьшение воспаления (нейтрофилов, воспалительных цитокинов бронхо альвеолярной жидкости), отложение коллагена	Паракринный
Cargnoni A. et al., 2009	МСК плаценты	Блеомицин, ВВ	Гистологически – уменьшение фиброза, увеличение массы тела	Паракринный

Авторы	Клетки	Модель	Эффекты	Механизм действия
Wang D. et al., 2010	ЭСК человека	Блеомицин, ИТ	Уменьшение легочного повреждения и активности фиброгенеза, улучшение дыхательного объема и газообмена легких	Дифференцировка ЭСК в альвеолярные эпителиальные клетки II типа
Spitalieri P. et al., 2012	ЭСК человека	Двуокись кремния, ИТ	Снижение повреждения легких, снижение уровня TGF- $\beta$ , улучшение газообмена легких	Дифференцировка ЭСК в альвеолярные эпителиальные клетки II типа

Примечание – КМ – костномозговые, МСК – мезенхимальные стволовые клетки, ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ВВ – внутривенное введение, ИТ – интратрахеальное введение.

## 2.5. Эндотелиальные прогениторные клетки

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) локализуются в микрососудах, обладают способностью к циркуляции по сосудистому руслу. Источниками ЭПК могут выступать костный мозг, периферическая кровь, пуповинная кровь [Reinado V.I. et al., 2006]. Считается, что популяция костномозговых ЭПК гетерогенна, ее составляют так называемые «ранние» и «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки. Свое название популяции получили в связи с тем, что образование колоний из «ранних» ЭПК, хронологически значительно раньше, чем из клеток «поздних» ЭПК. При более глубоком изучении были выявлены и другие различия между популяциями: морфологические, иммунофенотипические и функциональные. В частности, «ранние» ЭПК экспрессируют на плазматической мембране маркеры лейкоцитов – CD45, CD11 и CD14, эндотелиальные маркеры – CD31, VEGF-A, и гемопоэтический маркер CD133. Высказывается точка зрения о том, что «ранние» ЭПК являются производными клеток гемопоэтической линии и появляются в результате дифференцировки незрелых клеток миелоидной линии, предположительно, в ответ на действие различных растворимых медиаторов [Alagappan V.K. et al., 2013]. «Поздние» ЭПК положительны по маркерам CD31, CD144, CD146, CD105 и VEGF-R2, обладают способностью участвовать в ангиогенезе [Yoo S. Y., Kwon S. M. 2013].

Предметом активных исследований являются циркулирующие в крови ЭПК. Существующие на сегодняшний день данные позволяют говорить о вовлечении костномозговых и циркулирующих в крови клеток в восстановление сосудистых структур и функции эндотелия при патологии, в том числе при фиброзных заболеваниях легких [Fadini G. P. et al., 2006; Caramori G. et al., 2010]. Так, фиброзированные участки ткани имеют в своем составе малое количество кровеносных сосудов, в то время как области здоровой ткани избыточно насыщены капиллярами [Ebina M, et al., 2004]. В области между фиброзированными участками ткани привлекается большое количество ЭПК в целях неоваскулогенеза. Между тем, эти клетки могут оказать дополнительное влияние на развитие ИЛФ [Smadja D. M. et al., 2013]. Так,

исследования S. D. Biasi и коллег (2015) показали участие ЭПК в развитии фиброзных очагов. Такие противοфибротические препараты как пирфенидон и нинтенданиб значительно сокращали циркулирующий в крови пул ЭПК у пациентов с ИЛФ и таким образом блокировали описанный D. M. Smadja et al. (2013) механизм дополнительной индукции фиброза легких эндотелиальными прогениторными клетками [Biasi S. D. et al., 2015].

Другие исследователи показали значительное снижение в ткани легких и крови пациентов с ИЛФ количества эндотелиальных предшественников. На фоне этого наблюдается компенсаторное увеличение уровня в крови фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [Malli F., Koutsokera A., Paraskeva E. et al., 2013]. Чрезмерная экспрессия VEGF в легочной ткани значительно ослабляет развитие блеомицин-индуцированного фиброза легких [Murray L. A., Habieli D. M., Hohmann M. et al., 2017]. Таким образом, можно предположить, что в процессе развития ИЛФ истощается пул ЭПК и ввиду недостатка эндотелиальных предшественников не происходит ревакуляризация фиброзных участков легких. Как следствие этого – увеличение площади соединительной ткани.

ЭПК могут быть вовлечены в ремоделирование сосудов путем дифференцировки в гладкомышечные клетки. Такое проявление плеiotропной активности приводит к гиперплазии интимы и сужению сосудов и, как следствие, к повышению сосудистого сопротивления [Zhu P. et al., 2006; Arciniegas E., 2007; Barbera J. A., 2011].

## **2.6. Альвеолярные эпителиальные прогениторные клетки**

Альвеолярный эпителий представляет собой достаточно динамичную ткань, которая активно реагирует на различные (в том числе повреждающие) эндогенные и экзогенные стимулы. При повреждении эпителиальный слой с нормальной структурой и функцией быстро восстанавливается. Высокий потенциал регенерации эпителия дыхательных путей базируется на резидентных эпителиальных прогениторных клетках, которые запрограммированы на эпителиальный путь дифференциации [Crystal R. G. et al., 2008; Kajstura J. et al., 2011]. Локализуются эпителиальные прогениторные клетки в специфических альвеолярных нишах.

Легкие человека содержат стволовые клетки мезенхимального происхождения, которые в поврежденных легких мышей дают начало структурным дыхательным единицам, включающим бронхиолы, альвеолы и легочные сосуды [Tzouvelekis A. et al., 2011]. Тем не менее, своим исследованием авторы не ответили на вопрос, являются ли вновь образуемые дыхательные единицы функционально полноценными, участвуют ли они в газообмене. В других работах проводилась попытка дифференцировки донорских МСК различного происхождения в альвеолярные эпителиальные клетки, которая не имела положительного результата [Tzouvelekis A. et al., 2013].

По мнению Hind M. и Maden M. (2011), регенерацию альвеолярного эпителия можно ускорить влиянием на сигнальные молекулы. Однако об эндогенных



сигналах, контролирующих дифференцировку альвеолярных эпителиальных клеток II типа в I тип, мало известно [Crystal R. G. et al., 2008].

Таким образом, фиброз легкого включает в себя гетерогенную группу легочных расстройств, характеризующихся прогрессирующей и необратимой деструкцией архитектуры альвеолярного эпителия, вызванной образованием рубцов, что приводит к нарушению газообмена и к смерти от дыхательной недостаточности. Идиопатический фиброз легкого – наиболее тяжелая форма легочного фиброза с неизвестной этиологией. Координацию и интеграцию реакций всех клеток, участвующих в посттравматическом фиброзе легких и процессе ремоделирования альвеолярного эпителия, обеспечивает комплекс различных семейств цитокинов, хемокинов, ингибирующих и ростовых факторов [Wynn T. A., 2011]. Дисбаланс в продукции цитокинов, хемокинов, ингибирующих и ростовых факторов неотвратимо приводит к избытку провоспалительных и профиброзных факторов, фибробластов (основных продуцентов коллагена) и миофибробластов, и, как следствие, превращает процесс нормального заживления ран в патологическую фиброзную реакцию. На рисунке 2 представлен патогенез фиброза легкого.

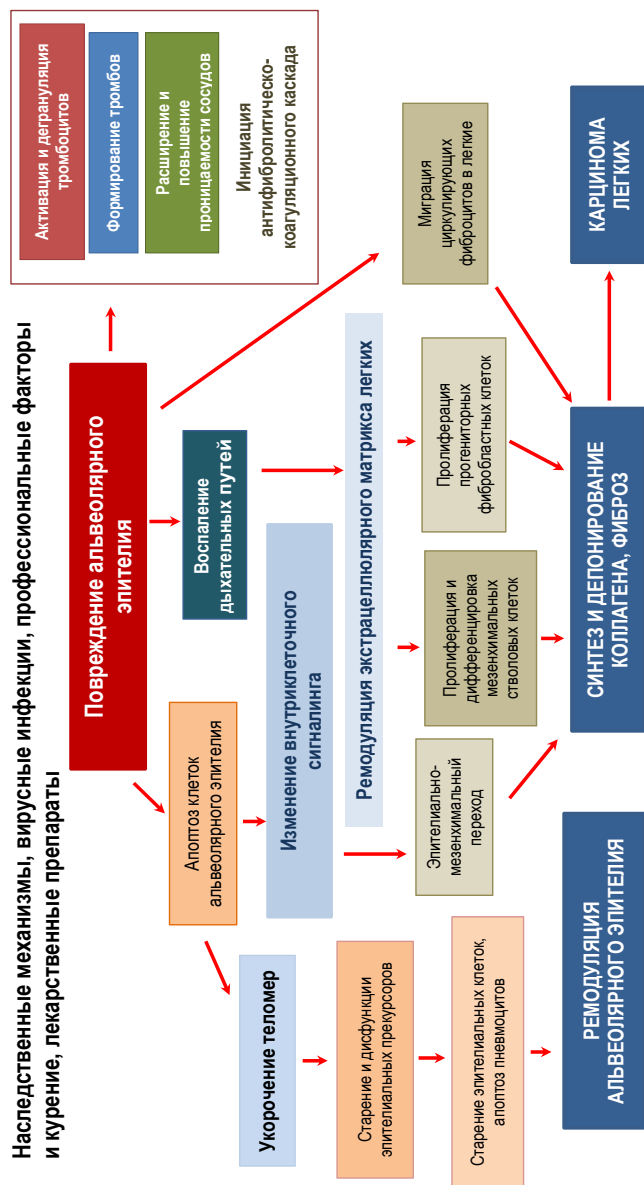


Рисунок 2. Патогенез пневмофиброза. Повреждение альвеолярного эпителия вызывает апоптоз клеток альвеолярного эпителия (изменение генома и внутриклеточного сигналинга и, как следствие, старение и дисфункции эпителиальных прекурсоров), инициацию антифибротическо-коагуляционного каскада, воспаление дыхательных путей (миграцию в очаг травмы клеток воспалителей и их предшественников – ГСК, прогениторных гемопоэтических прекурсоров, формирование профибротического матрикса – соответствующий цитокиновый баланс и повышение концентрации гиалуроновой кислоты), активацию клеток мезенхимального происхождения (дифференцировка МСК и прогениторных фибробластных прекурсоров в фибробласты, синтез фибробластами коллагена). Результатом этих событий является нефизиологическая ремодуляция альвеолярного эпителия, пневмофиброз, при неблагоприятном развитии – карцинома легких).

## **ГЛАВА 3. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

### **3.1. Общие представления о стволовых клетках**

Термин стволовые клетки (СК) отражает два основных типа клеток: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и СК постнатального развития или взрослого организма (ВСК). ЭСК являются плюрипотентными, самостоятельно обновляются в течение длительного времени, дифференцируются в клетки всех 3-х зародышевых листков (энтодерма, эктодерма, мезодерма) [Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S. et al., 1998]. ВСК были выявлены практически во всех органах взрослого организма. По локализации ВСК разделяют на костномозговые и локальные (тканеспецифичные или регионарные). ВСК сохраняют способность к самообновлению, но по этому показателю уступают ЭСК [Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S. et al., 1998; Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L. et al., 2002]. ВСК – это гетерогенная фракция клеток, разделяют мультипотентные, бипотентные и унипотентные клетки. Считается, что мультипотентные СК дифференцируются в унипотентные СК, которые дают начало строго определенному типу специализированных клеток, но теряют способность к самообновлению [Chao M. P., Seita J., Weissman I. L., 2008]. Представленная система иерархии клеток открыта и наиболее изучена в отношении гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

Основная задача ВСК – это «физиологическое обеспечение» тканей клетками в течение жизненного цикла (физиологическая регенерация). При этом физиологическая регенерация требует слаженную «оркестровку» близлежащих и/или пространственно удаленных от очага травмы сигнальных каскадов (цитокинов различных семейств, хемокинов, ингибирующих и ростовых факторов), клеток микроокружения и ниш, симпатической нервной системы по координации ВСК [Дыгай А. М., Скурихин Е. Г., 2011; Hong K. U. Reynolds S. D., Giangreco A. et al., 2001; Giangreco A., Reynolds S. D., Stripp B. R., 2002; Theise N. D., 2003; Bjerknes M., Cheng H. 2005; Blanpain C., Fuchs E., 2006; Robert C Rennert et al., 2012]. Процесс клеточной и тканевой регенерации при хронических заболеваниях печени, поджелудочной железы, нервной, сердечно-сосудистой системы, легких и др. систем менее изучен, хотя считается, что процессы физиологической и патологической регенерации во многом сопоставимы: наблюдаются активация пролиферации, миграции и дифференцировки ВСК [Robert C Rennert et al., 2012].

### **3.2. Стволовые клетки костного мозга**

*Гемопоэтическая стволовая клетка.* Костный мозг выступает в качестве резервуара для многих клеточных популяций, в том числе для ГСК, МСК, эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и малых эмбрионально-подобных клеток (МЭПК). В ответ на повреждение тканей наблюдается мобилизация ГСК, МСК, ЭПК и МЭПК в циркуляцию [Terper O. M. et al., 2005; Kucia M. J.

et al., 2008; Hamou C. et al., 2009]. Далее клетки по кровотоку мигрируют к поврежденным тканям (мышцы, сердце, почки, кожа, кости, печень, мозг и др.) [Tepper O. M. et al., 2005; Hamada H. et al., 2006; Schenk S. et al., 2007; Qian H. et al., 2008; Hamou C. et al., 2009; Xynos A. et al., 2010; Deng J. et al., 2011; Park D. et al., 2012; Zhao W. et al., 2012]), где, как полагают многие авторы, принимают участие в восстановлении структуры и функций тканей за счет паракринных эффектов и, возможно, дифференцируются в клетки поврежденных органов [Tepper O. M. et al., 2005; Hamou C. et al., 2009; Chen Y. et al., 2010; Si Y. et al., 2010].

Гемопоэтическая стволовая клетка представляет собой самообновляющуюся, мультипотентную фракцию клеток костного мозга, которая отвечает за пополнение клеточных компонентов крови, в том числе лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Содержание ГСК составляет приблизительно 0,01–0,15% от всех клеток костного мозга [Hamou C. et al., 2009; Challen G. A. et al., 2009]. Идентификация ГСК основана на исследовании поверхностных антигенов. Используемая комбинация поверхностных антигенов включает в себя отсутствие клон-специфического маркера (Lin) и экспрессию CD45, c-kit и/или Sca-1 (у мышей) и CD34, CD133 (у человека) (иммунофенотип) [Ratajczak M. Z., 2008; Xynos A. et al., 2010]. По этой комбинации маркеров различают две популяции ГСК: “долго живущие” (long-term) (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) и “коротко живущие” (short-term) (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>). J. Cheng с коллегами (1996 г.) обнаружил CD34-нулевые гемопоэтические стволовые клетки (CD34<sup>0</sup> ГСК) у мышиных эмбрионов. С точки зрения авторов, CD34<sup>0</sup> ГСК не являются необходимыми для выживания, но играют важную роль в развитии эритро- и миелопоэза во время эмбрионального и постнатального развития.

Направление клеточной идентификации по антигенному профилю постоянно развивается. Для изоляции мышиных ГСК и идентификации их в срезах тканей используют комбинацию рецепторов клеточной поверхности семейства SLAM (signaling lymphocyte activation molecule), в том числе CD150, CD244 и CD48 [Kiel M. J. et al., 2005]. У человека эти рецепторы менее выражены, чем у животных [Larochelle A. et al., 2011].

Для объяснения механизмов, с помощью которых обеспечивается самоподдержание ГСК, используется такое понятие как «ниша» [Schofield R., 1978; Spradling A. et al., 2001; Watt F. M., Hogan B. L. M., 2000]. В «нишах» родоначальные элементы находятся в стадии покоя. Процесс выхода из указанных образований происходит случайно (стохастически) [Скофилд Р., Декстер Т. М., 1982]. Термин «ниша» используется для обозначения совокупности факторов, обеспечивающих жизнеспособность и самовоспроизведение ГСК, дифференцировку ГСК и дочерних прекурсоров [Lin H., 2002; Calvi L. M. et al., 2003; Zhang J. et al., 2003; Moore, K. A., Lemischka, I. R., 2006; Lo Ceslo C. et al., 2007; Xie Y. et al., 2009; Chan C. K. et al., 2008; Kiel M. J., Morrison S. J., 2008; Wagner W. Et al., 2008]. Среди факторов следует выделить наличие базальной мембраны, молекул внеклеточного матрикса и присутствие соседних клеток, продуцирующих факторы роста. В последние годы был обнаружен ряд молекул (ангиопоэтин, тромбопоэтин, хемокин CXCL12, остеопонтин и др.),

нарушение экспрессии которых существенно сказывается на взаимодействии ГСК со своей микросредой. Справедливости ради следует сказать, что значительно раньше советский и российский ученый Е. Д. Гольдберг предложил и со своими учениками активно развивал учение о гемопоэзиндуцирующем микроокружении для гемопоэтических прогениторных клеток: КОЕ-ГЭММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М и КОЕ-Э. С нашей точки зрения, это являлось определенной предтечей для «ниши» для костномозговых ГСК.

Иммуногистохимические исследования показали, что ГСК локализуются вблизи эндоста – гетерогенного слоя клеток, выстилающего костномозговую полость и это так называемая «эндостальная ниша» для ГСК. Эндостальная выстилка образована остеобластами, остеогенными клетками-предшественниками (часто обозначаемыми как «клетки костной выстилки» – bone-lining cells) и остеокластами, при этом остеобласты рассматриваются как главный клеточный компонент эндоста, отвечающий за регуляцию ГСК [Calvi L. M. et al., 2003; Zhang J. et al., 2003; Wu J. Y. et al., 2009]. Эти клетки экспрессируют ряд белков, необходимых для регуляции гемопоэтических стволовых клеток. К ним относятся Ang-1, удерживающий ГСК в нише, Bmi-1, отвечающий за пролиферацию, Jagged-1, способствующий самоподдержанию ГСК, и ряд других [Pazianos G., 2003; Ohishi K., 2003; Suda T. et al., 2005; Taichman R. S., 2005]. Паратиреоидный гормон (ПТГ) активирует остеобласты и стимулирует их деление. Было показано, что он повышает уровень экспрессии Jagged-1 на поверхности остеобластов и, таким образом, через Notch-1 – Jagged-1 взаимодействие опосредованно регулирует физиологический статус ГСК [Weber J. M. et al., 2006]. Обработка ПТГ подслоев прилипающих клеток из длительных культур костного мозга мышей существенно улучшает выживание на них ГСК [Ploemacher R. E. et al., 1989]. Положение незрелых гемопоэтических клеток относительно костномозгового микроокружения во многом определяется их дифференцировочным статусом. Так, длительно репопулирующие и непролиферирующие ГСК располагаются ближе к остеобластам и эндосту нежели более зрелые мультипотентные или коммитированные кроветворные предшественники [Lo Celso C. et al., 2009].

В образцах костного мозга и селезенки мышей были обнаружены устойчивые ассоциации CD150<sup>+</sup> ГСК с эндотелием сосудов. Эти образования представляют как «сосудистую нишу» для ГСК [Kiel M. J., et al., 2005]. Через сосудистый эндотелий поступают эндокринные сигналы от циркулирующих гормонов, цитокинов и факторов роста, поэтому контакт ГСК с эндотелием позволяет ускорить их функциональный ответ на внешний стимул. Расположение ГСК по отношению к эндосту зависит от их функционального состояния и активности клеток микроокружения [Wilson A., Trumpp A., 2006; Lo Celso C. et al., 2009]. По мнению Tong Y. и Linheng L. (2006) рекрутирование ГСК в «сосудистую нишу» происходит под действием фактора роста фибробластов 4 (ФРФ-4), стромального клеточного фактора-1 (SDF-1) и O<sub>2</sub> (увеличение концентрации). Низкий уровень SDF-1 регулирует хоуминг мобилизованной в кровотоке костномозговой ГСК в «сосудистую нишу» [Tong Y., Linheng L., 2006]. При повышении уровня фактора наблюдается «возвращение» ГСК в костный мозг.

Ряд авторов подвергает сомнению разделение микроокружения ГСК на отдельные «ниши», поскольку эндостальный и сосудистый компоненты микроокружения находятся в тесной функциональной и структурной взаимосвязи [Lo Celso C. et al., 2009; Xie Y. et al., 2009]. Очевидно, следует говорить об «эндостально-сосудистой нише» для ГСК [Kiel M. J., Morrison S. J., 2008; Lo Celso C. et al., 2009]. Не следует сбрасывать со счета гемопоэзиндуцирующее микроокружение (ГИМ). Десятилетние исследования, проводимые в НИИ-ФиРМ имени Е. Д. Гольдберга, убедительно показали, что ГИМ – это структура, формирующая специфическую регуляцию клеток с гораздо меньшим, чем ГСК, пролиферативным потенциалом, развитие которых детерминировано в определенные линии клеток. С нашей точки зрения, более корректно следует говорить о структуре регуляции судьбы ГСК и гемопоэтических прогениторных клеток костного мозга при физиологических и патологических состояниях, состоящей из «эндостально-сосудистой ниши» и элементов ГИМ.

Известны сообщения о мобилизации ГСК из костного мозга в кровотоки у пациентов после различных травм, в том числе при инфаркте миокарда [Massa M. et al., 2005], инсульте [Paczkowska E. et al., 2009], поражении печени [Gehling U. M. et al., 2010] и ожоге кожи [Drukala J. et al., 2012]. Однако вклад костномозговых ГСК в ремодуляцию и регенерацию тканей на сегодняшний момент остается неопределенным. Остается открытым вопрос о связи типовых патологических процессов (в частности воспаление) с ГСК. Orlic D. et al. (2001) и Lin F. et al. (2003) представили гипотезу, основанную на результатах доклинических исследований, основным положением которой является то, что ГСК могут дифференцироваться в клетки пораженной ткани и, таким образом, участвуют в восстановлении ее структуры и функции [Orlic D. et al., 2001; Lin F. et al., 2003]. Доказательства пластичности ГСК представлены единичными работами дифференцировки ГСК в направлении клеток мезодермальной линии [Xynos A. et al., 2010]. Namou C. et al. (2009) указывает на незначительное увеличение содержания и приживание костномозговых ГСК в ишемизированной ткани у мышей по сравнению с МСК костномозгового происхождения [Namou C. et al., 2009]. Авторами ставится под сомнение утверждение, по крайней мере, о важности эндогенных ГСК костного мозга в восстановлении ишемизированной ткани. Между тем, нельзя исключить из обсуждения пластичности ГСК тот факт, что в эксперименте системные и местные инъекции экзогенных ГСК при соответствующем цитокиновом сопровождении улучшают состояние травмированной ткани [Balsam L. B. et al., 2004; Si Y., Tsou C. L., Croft K., Charo I. F., 2010].

*Эндотелиальная прогениторная клетка.* Эндотелиальные прогениторные клетки представляют собой редкую популяцию циркулирующих клеток, участвующих в васкулогенезе постнатального периода онтогенеза. Обнаружение ЭПК в 1997 году [Asahara T. et al., 1997] привело к изменению парадигмы сосудистой биологии взрослого организма. Ранее считалось, что образование новых кровеносных сосудов происходит через строго ангиогенный механизм: резидентные эндотелиальные клетки мигрируют к месту формирования сосудов и реализуют свой потенциал регенерации [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011]. На настоящий момент известны две субпопуляции эндотелиальных

прогениторных клеток – гемопоэтические и не гемопоэтические ЭПК. Для каждой из субпопуляций характерны специфический поверхностный профиль антигенов и функции [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011].

Гемопоэтические ЭПК представляют собой альтернативу резидентным предшественникам эндотелиальных клеток [Yoon C. H. et al., 2005; Shepherd R. M. et al., 2006]. Предположительно, эта васкулогенная субпопуляция может происходить из костномозговых ГСК [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011]. Гемопоэтические ЭПК позитивны по маркеру CD34 (у человека) и c-kit/Sca-1 (у мыши), описана ко-экспрессия маркеров эндотелиальной клетки (CD31, vWF, VEGFR2), пан-гемопоэтического маркера (CD45) и моноцитарных маркеров (CD14 и CD163) [Yoon C. H. et al., 2005; Timmermans F. et al., 2007; Yoder M. C. et al., 2007; Timmermans F. et al., 2009]. Гемопоэтические ЭПК секретируют различные цитокины, в том числе фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor (VEGF)), интерлейкин 8, или хемокин CXCL8 (interleukin-8 (IL-8)), фактор роста гепатоцитов или «рассеивающий фактор» (hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/ SF)) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)), и, как полагают, в основном через паракринные механизмы способствуют ремодуляции и регенерации сосудов [Yoon C. H. et al., 2005; Yoder M. C. et al., 2007]. По мнению некоторых авторов, эти клетки способны включаться в эндотелий [Bailey A. S. et al., 2006; Masuda H. et al., 2011].

Не гемопоэтические ЭПК не экспрессируют CD45 и маркеры моноцитов, но имеют профиль поверхностных маркеров зрелых эндотелиальных клеток [Yoon C. H. et al., 2005; Timmermans F. et al., 2009; Yoder M. C. et al., 2007]. Для не гемопоэтических ЭПК характерен низкий уровень продукции цитокинов. Полагают, что эта субпопуляция участвует в васкулогенезе в основном за счет дифференцировки до эндотелиальных клеток, которые мигрируют к очагу повреждения и формируют сосуд [Yoder M. C. et al., 2007]. Происхождение не гемопоэтических ЭПК остается неясным. Предположительно, клетки происходят из кровеносных сосудов или не гемопоэтических клеток костного мозга [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011]. Так или иначе существование связи не гемопоэтических ЭПК с костным мозгом не опровергнуто.

Многими исследователями отмечается важность ЭПК в регенерации тканей при многих заболеваниях. Так, мобилизация костномозговых ЭПК происходит в ответ на ишемическое повреждение [Massa M. et al., 2005; Sandri M. et al., 2011]. Дифференцируясь в эндотелиальные клетки и секретируя цитокины и ростовые факторы (VEGF, SDF-1, IGF-1), мобилизованные ЭПК участвуют в неоваскуляризации [Tepper O. M. et al., 2005; Urbich C. et al., 2005]. Секретируемые ЭПК цитокины содействуют миграции зрелых эндотелиальных клеток и резидентных клеток-предшественников в область формирования сосуда. Дефицит и дисфункция ЭПК может привести к утяжелению клинического течения сахарного диабета, в частности наблюдается плохое заживление ран [Fadini G. P. et al., 2005; Sorrentino S. A. et al., 2007]. Аллогенные ЭПК препятствуют расширению травмы и улучшают функциональные показатели на моделях инсульта [Fan Y. et al., 2010], инфаркта миокарда [Schuh A. et al., 2008], повреждения печени и легких [Lam C. F. et al., 2011; Nakamura T. et

al., 2011]. Как видно, эндотелиальная прогениторная клетка может выступать не только как элемент клеточной терапии, но и предлагается как диагностический и прогностический критерий сосудистых осложнений при многих заболеваниях.

*Мезенхимальные/мезенхимные стволовые/стромальные клетки.* Мезенхимальные / мезенхимные стволовые / стромальные клетки (МСК) – это мультипотентные клетки не гемопоэтического происхождения. МСК выделены из многих органов и тканей взрослого организма, в том числе из костного мозга [Pittenger M. F. et al., 1999], жировой ткани [Zuk P. A. et al., 2001], крови [Chong P. P., Selvaratnam L., Abbas A. A., Kamarul T., 2012], легких [Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B., 2006], мозга [Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B., 2006] и скелетных мышц [Dodson M. V. et al., 2010]. Полагают, что в естественных условиях МСК могут находиться в периваскулярной нише [Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B., 2006; Feng J., Mantesso A., Sharpe P. T., 2010]. МСК способны дифференцироваться *in vitro* в клетки мезенхимальных линий (остеобласты, миоциты, хондроциты, адипоциты) [Pittenger M. F. et al., 1999], не исключается дифференцировка в клетки других зародышевых листков, например в кератиноциты и нейроноподобные клетки [Sasaki M. et al., 2008; Bae K. S. et al., 2011]. Международным обществом клеточной терапии (ISCT) для обозначения фибробластоподобных, прилипающих к пластику клеток с определенными характеристиками (самообновление, дифференцировка в клетки стромальной линии *in vitro*) рекомендовано называть их мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) [Horwitz E. M. et al. 2005].

Общепринятого стандарта комбинации поверхностных антигенов для МСК человека и животных нет. Критериями костномозговых МСК человека выступают адгезия к пластику при стандартных условиях культивирования, наличие антигенов CD105, CD73 и CD90, отсутствие клон-специфических маркеров (lineage-specific) и CD34, дифференцировка в пробирке в остеобласты, адипоциты и хондробласты [Dominici M. et al., 2006]. По функциональным характеристикам МСК костного мозга мышей во многом сопоставимы с человеческими клетками (самообновление, адгезия к пластику, дифференцировка), для них характерна экспрессии Sca-1 и/или PDGFR $\alpha$ , при этом поверхностные маркеры гемопоэтических клеток не определяются [Namou C. et al., 2009; Morikawa S. et al., 2009]. В зависимости от источника ткани иммунофенотип МСК может значительно варьировать.

Популяция МСК костного мозга малочисленна, по разным источникам составляет от 0,001% до 0,08% [Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al., 1999; Namou C. et al., 2009]. При экспериментальной травме наблюдается их мобилизация в кровь и циркуляция [Namou C. et al., 2009; Chen Y. et al., 2010]. Мобилизованные костномозговые МСК мигрируют в поврежденный участок ткани [Namou C. et al., 2009; Chen Y. et al., 2010], где, как полагают, они способствуют регенерации тканей и восстановлению их функций в основном через секрецию HGF, EGF, VEGF и sFRP-4 (паракринный механизм) [Nguyen B. K. et al., 2010; Katsha A. M. et al., 2011]. Ряд авторов не исключает участие МСК в регуляции внеклеточного матрикса [Xu X., Xu Z., Xu Y., Cui G., 2005; Xu X.,



Xu Z., Xu Y., Cui G., 2005; Nguyen B. K. et al., 2010], иммунного ответа (ИЛ-1 антагонизм, секреция IL-10) [Ortiz L. A. et al., 2007; Dayan V. et al., 2011], пролиферации и дифференцировки регионарных клеток-предшественников [Hatzistergos K. E. et al., 2010]. Полагают, что МСК костного мозга, подобно эндотелиальным прогениторным клеткам, вовлекаются в восстановление целостности сосудов и неоваскуляризацию после травмы. На это указывает два обстоятельства, во-первых, включение 25% МСК во вновь образованный эндотелий кровеносных сосудов при ишемии кожи у мышей [Hamou C. et al., 2009], во-вторых, экспрессия проангиогенных факторов у МСК в ответ на сигналы окружающей среды [Kasper G. et al., 2007]. В литературе сообщается, что в условиях экспериментальной травмы МСК костного мозга способны за счет дифференцировки и/или слияния (химеризация) образовать кардиомиоциты [Li Z., Guo J., Chang Q., Zhang A., 2009], мезангиальные клетки почек [Wong C. Y., Cheong S. K., Mok P. L., Leong C. F., 2008], остеобласты [Park D. et al., 2012], клетки скелетных мышц [De La Garza-Rodea A. S. et al., 2011] и нейроноподобные клетки [Deng J. et al., 2011]. Однако эти события редки, и, вероятно, менее важны в регенерации сосудов, чем вышеупомянутые механизмы действия.

Озвученные свойства костномозговых МСК делают их особенно привлекательными для клеточной терапии. Подавляющая доля исследований направлена на использование этого клеточного материала в качестве трансплантата. Так, донорские МСК костного мозга поддерживают у реципиента образование новых сосудов, повышают эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов и улучшают общую сердечную функцию в условиях моделирования ишемии миокарда [Li Z., Guo J., Chang Q., Zhang A., 2009; Hughey C. C. et al., 2012]. Трансплантация костномозговых МСК была показана для ускорения регенерации мозга [Borlongan C. V. et al., 2011], печени [Zhao W. et al., 2012], почек [Qian H. et al., 2008] и легких [Pati S. et al., 2011] при экспериментальной травме, а также для формирования иммунной толерантности [Ge W. et al., 2010; Jui H. Y. et al., 2012].

*Малая эмбрионально-подобная клетка.* Малые эмбрионально-подобные клетки (МЭПК) являются наиболее примитивными плюрипотентными СК, локализующимися прежде всего в костном мозге и других органах, тканях взрослого организма [Kucia M. et al., 2006; Zuba-Surma E. K. et al., 2008; Sovalat H. et al., 2011]. МЭПК отличают малые размеры, большое ядро и сдвиг ядерно-плазматического отношения в сторону ядра, эухроматин (области ДНК, лишенные нуклеосом и гиперчувствительные к обработке ДНК-азой I), высокая теломеразная активность и способность дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков [Kucia M. et al., 2006]. Замечательно, что эти свойства характерны и для эмбриональных стволовых клеток. МЭПК составляют около 0,006% от всех клеток костного мозга мышей [Zuba-Surma E. K. et al., 2008], как правило, отрицательны по lineage- и CD45, у мышей позитивны по CXCR4 и Sca-1, у человека по CD133 и CD34 [Zuba-Surma E. K. et al., 2008; Sovalat H. et al., 2011]. Кроме этого, на клеточной поверхности экспрессируются маркеры плюрипотентности (Oct-4, SSEA-1) [Kucia M. et

al., 2006] и маркер эпибласта/зародышевой линии стволовых клеток (epiblast/germ line stem cell markers) [Shin D. M. et al., 2010].

На ранней стадии гастрюляции малые эмбрионально-подобные клетки, предположительно, принимают участие в формировании тканей и органов, и играют важную роль в репопуляции тканеспецифичных стволовых клеток [Ratajczak M. Z. et al., 2008]. Возможно, МЭПК костного мозга задействованы в посттравматической регенерации ткани. Этот вывод основан на клинических и экспериментальных наблюдениях. Клетки мобилизуются в циркуляцию в кровь у животных в условиях экспериментальной травмы и у пациентов с ишемической болезнью сердца и инсультом [Kucia M. J. et al., 2008; Paczkowska E. et al., 2009; Wojakowski W. et al., 2009], улучшают сердечную функцию при индуцированном инфаркте миокарда [Dawn B. et al., 2008]. При травме небольшая часть МЭПК подвергается дифференцировке в кардиомиоциты [Dawn B. et al., 2008]. Однако позитивный эффект этих клеток, вероятнее всего, связан с паракринными механизмами.

*Рекрутирование стволовых клеток из костного мозга.* После повреждения ткани контроль за рекрутированием СК и прогениторных клеток костного мозга осуществляет каскад биологически активных молекул. Наиболее полно описана регуляция рекрутирования ГСК [Kavanagh D. P., Kalia N., 2011]. Однако многие узловые моменты взаимодействия сигнальной системы и ГСК схожи для других субпопуляций клеток [Chavakis E., Urbich C., Dimmeler S., 2008; Chen F. M. et al., 2011]. В процессе рекрутирования любая из СК проходит многие этапы, в том числе мобилизацию из костного мозга в кровоток, хоуминг, движение по сосудам и адгезию на поверхности эндотелия, миграцию через эндотелий и, наконец, движение в пределах внеклеточного пространства к месту повреждения. Взаимодействие цитокина SDF-1 с рецептором (CXCR-4) на клетках костного мозга лежит в основе клеточной мобилизации и самонаведения [Abbott J. D. et al., 2004; Ceradini D. J. et al., 2004]. Однако, как было показано многими исследователями, в этот процесс вовлекаются и другие молекулы [Hiasa K. et al., 2004; Kwon S. M. et al., 2008; Belema-Bedada F. et al., 2008; Si Y., Tsou C. L., Croft K., Charo I. F., 2010; Li Y. et al., 2011].

В физиологических условиях контроль за ГСК в костномозговых нишах осуществляется хемокинами, цитокинами, ростовыми и ингибирующими факторами, а также молекулами внеклеточного матрикса и адгезии [Discher D. E., Mooney D. J., Zandstra P. W., 2009; Chen F. M. et al., 2011]. После воздействия отмечается усиление секреции цитокинов эндотелием сосудов и активированными тромбоцитами в области травмированного участка (градиент сигнала), что в сочетании с увеличением концентрации ростовых факторов в костном мозге обеспечивает мобилизацию стволовых клеток из ниши и хоуминг [Massberg S. et al., 2006; Youn S. W. et al., 2011; Brandao D., 2011].

Фактор, полученный из стромальных клеток (stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)), или CXCL12 – хемокин подсемейства CXC (chemokine (C–X–C motif) ligand 12CXCL12), у человека кодируется геном CXCL12. Мишенью для SDF-1 являются лейкоциты, активность хемокина связана с такими провоспалительными стимулами как ЛПС, фактор некроза опухоли и интер-

лейкин-1. До определенного момента считалось, что SDF-1 взаимодействует только с рецептором CXCR4 (CXCL12-CXCR4) [Bleul et al., 1996]. Однако были получены сведения о том, что CXCL12 может связываться с CXCR7 рецептором [Balabanian K. et al., 2005; Bleul et al., 1996; Burns J. M. et al., 2006; Cruz-Orego L. et al., 2011].

В эмбриональном развитии SDF-1 управляет миграцией разных типов клеток и играет важную роль в формировании органов [Lewellis S. W., Knaut H., 2012]. SDF-1 выполняет множество функций во взрослом организме, в частности является хемоаттрактантом для клеток, которые имеют его рецепторы на мембране, например для В-лимфоцитов и ГСК [Rankin S. M., 2012]. Кроме этого, SDF-1 выступает как ростовой фактор для В-клеток: стимулирует пролиферацию, защищает злокачественные В-клетки от апоптоза при хроническом лимфоцитарном лейкозе [Burger J. A. et al., 2000]. Полагают, что SDF-1 играет важную роль в регуляции костномозговых ГСК в нишах: не дает раньше времени покинуть костный мозг, обеспечивает мобилизацию и высвобождение после травмы.

Гипоксия в костном мозге приводит к активации SDF-1 и связыванию его с CXCR4 рецептором ГСК [Ceradini D. J. et al., 2004]. Вероятно, таким образом модулируется экспрессия молекул адгезии, пролиферация и выживаемость клеток [Lataillade J. J. et al., 2000; Hidalgo A. et al., 2001; Liu X. et al., 2011]. После инсульта гипоксический эндотелий и активированные тромбоциты секретируют в месте повреждения SDF-1. Полагают, что возникающий градиент концентрации хемокина способствует CXCR4-опосредованной мобилизации стволовых клеток костного мозга в кровь и миграции к очагу поражения [Ceradini D. J. et al., 2004; Massberg S. et al., 2006; Youn S. W. et al., 2011]. Значимость этого пути мобилизации (SDF-1/CXCR4) в условиях экспериментальной травмы (модель ишемической ткани) была продемонстрирована для ГСК и ЭПК [Hiasa K. et al., 2004; Tang Y. L. et al., 2005]. Не исключается участие SDF-1 и CXCR4-рецептора в мобилизации и вербовке костномозговых МСК и МЭПК, так как обе эти популяции экспрессируют на поверхности CXCR4 [Kucia M. et al., 2006; Liu X. et al., 2011].

SDF-1 регулируется индуцируемым гипоксией фактором  $1\alpha$  (*hypoxia-inducible factor*  $1\alpha$  – HIF- $1\alpha$ ) [Youn S. W. et al., 2011]. В условиях гипоксии (ишемия тканей, инфекция, быстрый тканевой рост, например, развитие эмбриона или опухолевой рост) клетки млекопитающих активируют большое число генов, вовлеченных в гликолиз, ангиогенез и гемопоэз. Это гены таких белков, как эритропоэтин, трансферрин, рецептор трансферрина, фактора 1 стромальных клеток (SDF-1), Flk-1, Flt-1, тромбоцитарный фактор роста  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ), фактор роста фибробластов (bFGF) и другие гены, связанные с процессом гликолиза. Гипоксический транскрипционный ответ опосредуется первично транскрипционным комплексом HIF, состоящим из субъединиц HIF- $1\alpha$  и HIF- $1\beta$ . Субъединица HIF- $1\beta$ , также называемая арил-углеводным рецептором и ядерным транслокатором (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator – ARNT), экспрессируется конститутивно, в то время как экспрессия HIF- $1\alpha$  строго контролируется определенными стимулами. HIF- $1\alpha$  стабилизируется в условиях низкого уровня кислорода ( $>5\% O_2$ ), что при-

водит к формированию гетеродимера с ARNT и стимуляции гипоксических генов. Когда уровень кислорода нормализуется, HIF-1 $\alpha$  гидроксилируется в остатках пролина 402 и 577 и в таком виде распознается pVHL (von Hippel-Lindau) – членом комплекса убиквитинирования E3, участвующего в процессе убиквитин-опосредованной деградации 26S-протеосомой.

Механизм SDF-1-опосредованной мобилизации стволовых клеток костного мозга до конца не изучен. Есть свидетельства того, что после травмы циркулирующий SDF-1 способствует мобилизации клеток из костного мозга через десенсибилизацию рецепторов CXCR4 [Ceradini D. J. et al., 2004] и усиления активности матриксной металлопротеиназы 9 (matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)) стромальных клеток, фермента участвующего в ремодуляции структур внеклеточного матрикса [Heissig B. et al., 2002]. После мобилизации клетки мигрируют и находятся в кровеносных сосудах зоны ишемической травмы, затем каким-то образом преодолевают CXCR4 десенсибилизацию, происходит миграция к очагу поражения и тканеспецифическая адгезия [Peled A. et al., 1999; Ceradini D. J. et al., 2004].

Оксид азота (NO) – это сигнальная молекула, играет важную роль в гомеостазе сосудов. NO опосредованно принимает участие во взаимодействии SDF-1 и CXCR4 рецептора стволовых клеток костного мозга в условиях травмы. Эндотелиальная синтаза оксида азота (endothelial nitric oxide synthase (eNOS)) увеличивает экспрессию SDF-1 через цГМФ-зависимый механизм в ишемической ткани мышцы [Li N. et al., 2009]. Блокирование eNOS ингибирует SDF-1-опосредованный хоминг эндотелиальных прогениторных клеток [Hiasa K. et al., 2004]. Кроме этого, eNOS играет важную роль в адгезии клеток-предшественников на поверхности сосудистого эндотелия через ICAM-1- и CXCR4-зависимые механизмы [Kaminski A. et al., 2008]. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) – это молекула межклеточной адгезии 1 типа, молекула эндотелиальных клеток и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов.

Трансмембранный рецепторный белок 1 типа – notch homolog 1, translocation-associated (Notch1). Notch-сигнализация играет ведущую роль в эмбриональном развитии, принимает активное участие во многих процессах взрослого организма, в том числе в регуляции самообновления, экспансии, выживании и дифференцировки стволовых клеток [Varnum-Finney B. et al., 2000; Conboy I. M. et al., 2005; Mizutani K. et al., 2007]. Важность взаимодействия Notch1 с его лигандом Jagged продемонстрирована для рекрутирования и развития терапевтического эффекта МСК и ЭПК костного мозга на модели ишемического повреждения у мышей [Kwon S. M. et al., 2008; Li Y. et al., 2011]. Механизм этого эффекта отчасти связан с CXCR4 рецептором, на что указывает уменьшение экспрессии CXCR4 рецептора на поверхности костномозговых МСК у Notch-нокаутных мышей [Li Y. et al., 2011]. Wang Y. C. et al. (2009) обнаружили Notch-опосредованную регуляцию CXCR4 рецептора в клетках костномозгового происхождения [Wang Y. C. et al., 2009].

CCL2 (C–C motif ligand 2) или MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) – цитокин, относится к группе CC-хемокинов ( $\beta$ -хемокинов). Представляет собой мощный фактор хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих, осуществляет контроль за активностью клеток костномозгового происхождения

и их миграции к очагу воспаления. Рецептором для MCP-1 является CCR2 (C–C chemokine receptor type 2 или CD192 (кластер дифференциации 192)). На мышинной модели ишемии миокарда продемонстрирована необходимость взаимодействия MCP-1 с рецептором CCR2 для хоминга и приживления в очаге поражения костномозговых стволовых клеток [Belema-Bedada F. et al., 2008]. Экспрессия CCR2 на поверхности мобилизованных костномозговых ГСК имеет важное значения для воспаления у мышей [Si Y., Tsou C. L., Croft K., Charo I. F., 2010]. MCP-1-опосредованная миграция и хемотаксис мобильных клеток происходит за счет формирования ламеллиподий от их тела путем сокращения внутренних нитей актина цитоскелета [Belema-Bedada F. et al., 2008]. Однако, по мнению ряда авторов, MCP-1/CCR2 путь сигнализации не столь распространен для стволовых и прогениторных клеток, как к примеру SDF-1/CXCR4 сигнализация, на что указывается низкая экспрессия CCR2 рецептора у ЭПК у человека [Walenta K. L., Bettink S., Bohm M., Friedrich E. B., 2011].

Такие факторы роста, как васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF) и Г-КСФ (G-CSF), рассматриваются в качестве молекул мобилизации и рекрутирования стволовых и прогениторных клеток костного мозга при травматических нарушениях. Так, на различных экспериментальных моделях травмы, в том числе при ишемическом повреждении, продемонстрировано, что введение VEGF и G-CSF содействует мобилизации стволовых клеток, формированию новых сосудов и регенерации тканей [Hopkins S. P. et al., 1998; Hattori K. et al., 2001; Wu X. et al., 2008; Pitchford S. C. et al., 2009]. Экзогенный Г-КСФ способствует мобилизации ГСК и ЭПК за счет снижения концентрации SDF-1 в костном мозге у мышей, таким образом создается градиент концентрации хемокина в области травмы, а также за счет экспрессии CXCR4 на ГСК [Levesque J. P. et al., 2003; Pitchford S. C. et al., 2009]. В своем сообщении S. C. Pitchford с соавторами (2009) указывает на то, что активность VEGF определяется профилем VEGFR рецепторов на поверхности клеток костного мозга. Так, у мышей наблюдается ингибирование мобилизации ГСК при взаимодействии VEGF с VEGF-рецептором-1 (VEGFR-1), и стимуляция миграции ЭПК и выживание в участке травмы через VEGF-рецептор-2 (VEGFR-2) [Pitchford S. C. et al., 2009]. Кроме этого, васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), играет важную роль в HIF-1 $\alpha$ -индуцированной неоваскуляризации у мышей в постнатальном развитии [Oladipupo S. et al., 2007].

У человека VEGF и G-CSF могут инициировать ишемию конечностей и ишемический инсульт за счет мобилизации и миграции в зону поражения специфических для этих факторов эндогенных клеток [Hasselblatt M. et al., 2007; Brandao D. et al., 2011].

После мобилизации и хоминга стволовых клеток к области травмы, отмечается вовлечение множества молекул в продвижении их по сосудам и адгезии, трансэндотелиальной миграции и миграции во внеклеточном пространстве. Селектины (Р-селектин, Е-селектин) относят к молекулам движения клеток [Ruster B. et al., 2006; Thankamony S. P., Sackstein R., 2011], белок/интегриновые взаимодействия (VCAM-1/VLA-4, ICAM-1/ $\beta$ 2 интегрин) – к молекулам адгезии [Yoon C. H. et al., 2006; Ruster B. et al., 2006; Thankamony S. P., Sackstein R., 2011], хемокины (CXCL9, CXCL16, CCL20, CCL25) – к молекулам трансэн-

дотелиальной миграции [Chamberlain G., Smith H., Rainger G. E., Middleton J., 2011], разрушающие внеклеточный матрикс ферменты/ингибиторы (ММР-2, ММР-9, тканевый ингибитор металлопротеиназы-2) важны для клеточной миграции в поврежденной ткани [Ries C. et al., 2007; Tondreau T. et al., 2009]. Согласованная работа этой сложной молекулярной сети в условиях травмы позволяет собирать в поврежденном участке определенный набор стволовых и прогениторных клеток, мобилизованных из костного мозга, и вовлекать их в процессы клеточной и тканевой регенерации.

### **3.3. Стволовые клетки легких**

На сегодняшний день охарактеризованы многие предшественники клеток проксимального и дистального эпителия легочной ткани [Evans M. J., Cabral L. J., Stephens R. J. et al., 1975; Boers J. E., Ambergen A. W., Thunnissen F. B., 1998; Reynolds S. D., Hong K. U., Giangreco A. et al., 2000; Giangreco A., Reynolds S. D., Stripp B. R., 2002]. При заболеваниях легких отмечаются изменения в количестве зрелых мезенхимальных клеток. В нижней доли легких здоровых мышей C57BL/6J Summer R. и соавт. (2007) обнаружили популяцию клеток, на поверхности которой определялись мезенхимальные маркеры CD45, CD31, Hoechst. Эти клетки не только фенотипически, но и функционально авторы относят к мезенхимальным предшественникам, поскольку в длительных культурах они демонстрируют способность к выживанию и могут дифференцироваться в гладкомышечные миоциты, хондроциты, остециты и адипоциты [Summer R., Fitzsimmons K., Dwyer D. et al., 2007]. Ранее подобные результаты были получены Majka S. M. и соавт. (2005) [Majka S. M., Beutz M. A., Hagen M. et al., 2005]. Другая группа исследователей выделила во взрослых легких CD45<sup>+</sup>-моноклеары, на поверхности которых определяются мезенхимальные маркеры: CD44, CD90, CD105, CD106, CD73 и Sca-1 [Martin J., Helm K., Ruegg P. et al., 2008]. Гемопоэтические маркеры (c-kit, CD11b, CD34, CD14) не определяются. В культурах эти моноклеары продемонстрировали наличие адипогенного, остеогенного и хондрогенного потенциала.

В легочной ткани присутствуют не только CD45<sup>+</sup>-клетки. На 75% клеток легких экспрессируется пан-гемопоэтический маркер CD45 [Summer R., Kotton D. N., Sun X. et al., 2004]. По предположению Summer R. и соавт. (2004) CD45<sup>+</sup>-клетки костномозгового происхождения, в легких им определены регуляторные функции, которые еще предстоит изучить.

Характерными особенностями любого фиброза является накопление клеток с фибробласто-подобной морфологией и депонирование коллагена. В качестве источника фибробласто-подобных клеток были предложены три популяции. Резидентные стромальные клетки активируются в ответ на местные и/или системные профибротические стимулы к пролиферации и изменению экспрессии их генов [Vyalov S. L., Gabbiani G., Kapanci Y., 1993]. Второй предлагаемый источник – это циркулирующие фиброциты [Abe R., Donnelly S. C., Peng T. et al., 2001; Hashimoto N., Jin H., Liu T. et al., 2004]. Также высказывается предположение, что эпителиальные клетки легких,

в том числе альвеоциты II типа, участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) и трансформируются в фибробласты или в фибробласто-подобные клетки [Willis B. C., duBois R. M., Borok Z., 2006; Corvol H., Flamein F., Epaud R. et al., 2009; Felton V. M., Borok Z., Willis B. C., 2009; Tanjore H., Cheng D. S., Degryse A. L. et al., 2011]. По предварительной оценке 50% фибробластов при фиброзных поражениях возникают в силу активации ЭМП. Эта гипотеза базируется на данных ретроспективного иммуногистохимического анализа человеческих образцов, при изучении клеток фиброзированных легких *in vitro* и в экспериментах на клеточных линиях. Так были получены доказательства ЭМП из альвеоцитов II типа на модели блеомицин-индуцированного пневмофиброза [Kim K. K., Kugler M. C., Wolters P. J. et al., 2006; Tanjore H., Xu X. C., Polosukhin V. V. et al., 2009; Degryse A. L., Tanjore H., Xu X. C. et al., 2010]. В свою очередь, Rock J. R. и соавт. (2011) не нашли доказательств перехода альвеолярных эпителиальных клеток в миофибробласты на клеточном и молекулярном уровне. Исследователи утверждают, что блеомицин-индуцированное повреждение не приводит к повышению количества фибробластов, но генерирует альвеоциты I и II типа [Rock J. R., Barkauskas C. E., Cronic M. J. et al., 2011].

Взрослые легкие мышей содержат незначительное количество мультипотентных эпителиальных стволовых / прогениторных клеток [McQualter J. L., Yuen K., Williams B. et al., 2010]. Фенотипически эта популяция характеризуется как EpCAM<sup>hi</sup> CD49f<sup>+</sup> CD104<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup>, в культуре формирует колонии, способные самообновляться, клетки дифференцируются в клетки альвеолярного эпителия.

Selman M. и Pardo A. (2006) предполагают, что существуют «ненормальные» альвеолярные эпителиальные клетки [Selman M., Pardo A., 2006]. При ИЛФ активация этой популяции альвеолярных клеток провоцирует миграцию, пролиферацию и активацию мезенхимальных клеток с образованием фибробластов / миофибробластов, что вызывает накопление внеклеточного матрикса.

Выделена и охарактеризована популяция стволовых клеток легкого – бронхоальвеолярные стволовые клетки, которые расположены в дистальных и терминальных отделах бронхов и способны дифференцироваться в клетки легких (альвеоциты I и II типов, бронхиальные предшественники) в ответ на повреждение бронхиол (нафталин) и альвеол (блеомицин) [Kim C. F. B., Jackson E. L., Woolfenden A. E. et al., 2005]. Эти предшественники экспрессировали на своей поверхности маркеры MCK (CD90), клеток Клара (CCSP) и белок просурфактанта С. Данные маркеры регистрировались в пределах стенок альвеол, и их уровень значительно возрастал при гиперплазии альвеоцитов II типа после введения блеомицина [Fujino N., Kubo H., Suzuki T. et al., 2011; Wang X.-Y., Keefe K. M., Jensen-Taubman S. M. et al., 2012].

Потеря MCK в легких в ответ на интратрахеальное введение блеомицина коррелирует со степенью тяжести пневмофиброза, воспаления и артериальной легочной гипертензии [Jun D., Garat C., West J. et al., 2011]. Многими исследователями с использованием донорского материала была показана миграция и участие прогениторных клеток костного мозга в репаративной

регенерации ткани легких [Пальцев М. А., 2009]. Ученые из Pulmonary Center of Boston University School of Medicine (Boston) оценили способность адгезирующих lacZ<sup>+</sup>-клеток костного мозга служить в качестве предшественников дифференцированных клеток паренхимы легких [Kotton D. N., Summer R., Fine A., 2004]. После внутривенного введения lacZ<sup>+</sup>-клеток мышам с поврежденными блеомицином легкими в паренхиме реципиентов были обнаружены прижившиеся донорские клетки, которые морфологически и фенотипически относились к пневмоцитам I типа. Это наблюдение ставит под сомнение точку зрения, что эпителиальные альвеолярные клетки I типа появляются только из регионарных (легкие) клеток-предшественников. Аналогичные результаты были получены и при использовании МСК в качестве трансплантационного материала [Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C. et al. 2003]. В экспериментах Jun D. и соавт. (2011) введение костномозговых МСК снижает активность фиброза и сопутствующую легочную гипертензию [Jun D., Garat C., West J. et al., 2011]. Авторы отмечают, что в отличие от легочных фибробластов костномозговые МСК не продуцируют провоспалительные медиаторы и не развиваются по профибротическому пути. Дополнительной характеристикой донорских МСК выступает снижение числа лимфоцитов и гранулоцитов в бронхоальвеолярном пространстве и подавление пролиферации Т-эффекторных клеток.

В подтверждении гипотезы о том, что клетки костного мозга являются предшественниками для клеток легкого, выступают данные, полученные при трансплантации костномозговых мононуклеаров у людей. В назальной биопсии женщин, получавших клетки костного мозга от мужчин-доноров, не было выявлено Y-хромосом в эпителии верхних дыхательных путей [Davies J. C., Potter M., Bush A. et al., 2002]. В более поздних исследованиях был показан химеризм человеческого альвеолярного эпителия после трансплантации гемопоэтических СК. Слияние костномозговых СК с легочным эпителием продемонстрировано *in vitro*. Однако такое слияние не было обнаружено у пациентов, получавших трансплантант противоположного пола. Известно, что клетки, мигрирующие в легкие из костного мозга, способны к энграфтингу и дифференцировке в клетки альвеолярного эпителия, а также в макрофаги, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки.

Клетки костного мозга могут оказывать и негативное влияние на развитие легочного фиброза. В работе Hashimoto N. и соавт. (2004) отмечена миграция донорских прогениторных клеток костного мозга в очаг повреждения с одновременным увеличением количества коллаген-продуцирующих фибробластов [Hashimoto N., Jin H., Liu T. et al., 2004].

### **3.4. Подходы усиления терапевтического эффекта вовлеченных в посттравматическую регенерацию СК**

Генерации стволовых и прогениторных клеток, способные рекрутировать из костного мозга в поврежденные ткани при инсульте, ишемии, фиброзе, диабете, болезни Альцгеймера и др. заболеваниях постоянно пополняются. Однако причины ограниченного регенеративного ответа эндогенных клеток



при тяжелых травмах до сих пор остаются неясными. Высокая эффективность стволовых и прогениторных клеток отмечалась исключительно на животных моделях (мыши) [Balsam L. B. et al., 2004; Qian H. et al., 2008; Schuh A. et al., 2008; Dawn B, Tiwari S, Kucia MJ, et al., 2008; Si Y., Tsou C. L., Croft K., Charo I. F., 2010; Fan Y. et al., 2010; Lam C. F. et al., 2011; Nakamura T. et al., 2011; Borlongan C. V. et al., 2011; Pati S. et al., 2011; Zhao W. et al., 2012], в то же время в клинике терапия с участием эндогенных стволовых клеток (аллогенная трансплантация) была не столь успешна [Malliaras K, Kreke M, Marban E., 2011]. Это расхождение в результативности частично связывают с различиями в дизайне клинических и экспериментальных исследований [Hoover-Plow J., Gong Y., 2012]. Следует отметить, что, несмотря на "модность" проекта использования регенеративного потенциала эндогенных стволовых клеток и стремление получить исключительно положительный результат от клеточной терапии, многие авторы подходят к проблеме ответственно. Благодаря публикациям Teng C. J. et al. (2006), Iso Y. et al. (2007), Burst V. R. et al. (2010) стало известно о малой эффективности рекрутирования стволовых клеток костного мозга в очаг повреждения у животных на некоторых животных моделях травм [Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D., 2006; Iso Y. et al., 2007; Burst V. R. et al., 2010]. Низкая эффективность предполагаемых эндогенных СК у пациентов может быть связана со значительными межвидовыми различиями в фенотипе и физиологии стволовых клеток мышей и человека [Ginis I. et al., 2004; Demetrius L., 2005].

Для разрешения вопроса существования эффекта использования эндогенных СК у человека T. I. Van Der Spoel с коллегами (2011) провел мета-анализ (meta-analysis) результатов клинических исследований многих групп независимых авторов. Мета-анализ подтвердил низкую эффективность терапии стволовыми клетками ишемии сердца в клинических исследованиях [Van Der Spoel T. I. et al., 2011]. Ограниченная клиническая эффективность клеточной терапии подтолкнула исследователей к разработке методов увеличения терапевтического эффекта СК при травматических нарушениях функций и структур клеток и тканей. Эти подходы можно разделить на две основные группы: к первой группе относят избирательное повышение активности собственных эндогенных стволовых клеток, ко второй группе – усовершенствование уже известных методов клеточной терапии.

Увеличение продолжительности ответа эндогенных стволовых клеток пациента после травмы привлекательно для клиники прежде всего в силу того, что временные и финансовые затраты для получения, обработки и трансплантации донорских клеток отсутствуют. В клинической практике содействие мобилизации СК костного мозга является общей стратегией для увеличения фракции циркулирующих в крови, получения и возможного дальнейшего использования в качестве трансплантата [Brauninger S. et al., 2012]. Подобный подход предложен и реализован в целях увеличения пула эндогенных клеток возможно с регенеративным потенциалом. Так, в эксперименте была продемонстрирована способность различных соединений мобилизовать из костного мозга ГСК, МСК, ЭПК и МЭПК в циркуляцию [Shepherd R. M. et al., 2006; Broxmeyer H. E. et al., 2007; Kucia M. J. et al., 2008; Pitchford S. C. et

al., 2009], при этом прослеживается зависимость мобилизуемого типа клеток от используемого агента [Pitchford S. C. et al., 2009]. Эффективность агентов, мобилизующих СК, была подтверждена на разных моделях травм. Системное введение Г-КСФ мобилизует ГСК, ЭПК и МСК из костного мозга, при этом наблюдается ускорение регенерации травмированного мозга, печени и системы крови [Takamiya M. et al., 2006; Liu F. et al., 2006; Wu X. et al., 2008; Deng J. et al., 2009]. Выше указывалось, что Г-КСФ уменьшает уровень SDF-1 в костном мозге [Levesque J. P. et al., 2003]. Таким образом, эффекты цитокина опосредованы взаимодействием SDF-1 с CXCR4 рецептором. Плериксафор (plerixafor, антагонист CXCR4) мобилизует ГСК и уменьшает повреждение печени у крыс при острой печеночной недостаточности [Mark A. L. et al., 2010]. Эффективность действия плериксафора возрастает при совместном назначении с Г-КСФ. Итак, фармакологическое влияние на ось SDF-1/CXCR4 – перспективный подход в мобилизации СК при патологии. Однако для того, чтобы мобилизованные блокадой CXCR4 рецептора клетки могли достичь поврежденной ткани, следует вовлекать дополнительные механизмы хоминга.

Пероральное введение ингибитора фосфодиэстеразы 3 цилостазола (cilostazol) вызывает мобилизацию ЭПК [Kawabe-Yako R. et al., 2011]. Эффект объясняется увеличением уровня SDF-1 в месте повреждения. При экспериментальном артериальном повреждении цилостазол повышает экспрессию CXCR4 рецептора, секрецию интегрина  $\alpha\beta3$  и VEGF эндотелиальными прогениторными клетками, при этом регистрируется ЭПК-опосредованная ингибция образования неоинтимы и ускорение повторной эндотелизации [Kawabe-Yako R. et al., 2011]. Аналогичные изменения отмечались при системном введении агентов, нацеленных на внутриклеточный сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR. Центральным компонентом внутриклеточного сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR. Считается, что это универсальный сигнальный путь, характерный для большинства клеток человека, противодействует апоптозу, отвечает за рост, пролиферацию и метаболизм. Одна из нескольких тканеспецифичных функций сигнального пути – это обеспечение работы сердца [McCubrey J. A. et al., 2012].

Важным медиатором выживаемости и модификатором реакций клеток является эндотелиальная NO-синтаза, III тип (eNOS). eNOS участвует в мобилизации ЭПК и повышает активность регенерации с их участием в условиях оптимальной жизнедеятельности [Urao N. et al., 2006; Gensch C. et al., 2007; Li X., Xu B., 2009]. Точный механизм действия eNOS требует дальнейшего изучения.

Для увеличения количества костномозговых СК в сердце, легких и мягких тканях, стимуляции их в целях регенерации при экспериментальных ишемических и травматических повреждениях предлагают использовать местные инъекции таких хемокинов как SDF-1 и E-селектин (англ. E-selectin, CD62E) [Sasaki T. et al., 2007; Oh I. Y. et al., 2007; Hannoush E. J. et al., 2011]. Однако местные инъекции цитокинов не решают проблему рекрутирования СК из костного мозга в силу быстрой деградации вводимых молекул. При развитии этого направления регуляции эндогенных клеток D. P. Cross и C. Wang

(2011) призывают учитывать то обстоятельство, что некоторые цитокины, высвобождаемые после травмы, на определенном этапе призваны ограничить реакцию эндогенных стволовых клеток [Cross D. P., Wang C., 2011].

Использование генной терапии позволяет локально (в месте травмы) обеспечить более устойчивую экспрессию трансгена с известными функциями клетками-мишенями. Так, локальное усиление экспрессии генов HIF-1 $\alpha$  и SDF-1 влечет за собой повышение концентрации соответствующих цитокинов, увеличение концентрации СК костномозгового происхождения в области ишемии и ускорение образования новых сосудов [Hiasa K. et al., 2004; Kwon S. M. et al., 2008; Haider H., Jiang S., Idris N. M., Ashraf M., 2008; Huang M. et al., 2011]. Между тем, регулирование экспрессии трансгена вирусным вектором представляет собой неконтролируемый процесс. Это может привести к нарушению физиологических механизмов синтеза цитокина в конце генной терапии, в том числе, к необратимой стимуляции процесса. Такое положение дел выступает сдерживающим фактором генной терапии.

Несмотря на обнадеживающие экспериментальные данные, селективная модуляция только одного сигнального пути регуляции эндогенных СК не приводит к положительному эффекту при лечении больных. В менее контролируемых условиях, характерных для клиники, мобилизации стволовых клеток одним агентом для восстановления сердечно-сосудистой системы не выявлено [Abdel-Latif A. et al., 2008]. В независимых исследованиях на животных было продемонстрировано, что локальная доставка комплекса цитокинов, вызывающих системную мобилизацию, оказалась более эффективна, чем монотерапия [Askari A. T. et al., 2003; Hannoush E. J. et al., 2011; Shin J. W. et al., 2011; Ko I. K. et al., 2012].

Итак, эндогенные СК и прогениторные клетки костномозгового происхождения вовлекаются в регенерацию органов и тканей при травмах. Основное внимание исследователей было посвящено ГСК, МСК, ЭПК и малым эмбрионально-подобным клеткам. Не вызывает сомнения участие обсуждаемых стволовых клеток в таких типовых реакциях организма на повреждение как воспаление, фиброз и васкуляризация. Изучение характеристик костномозговых СК (мобилизация, рекрутирование, миграция, хоминг, приживание, пролиферация, дифференцировка и др.) необходимо продолжать в дальнейшем. Несмотря на неудачи и выявленные "болевые точки" при использовании клеточной терапии, направление активно развивается. Активно внедряются в регенеративную медицину знания о взаимодействии «ниш» и внеклеточного матрикса со СК и прогениторными клетками после травмы. Так, предлагается использовать воздействие на механизм регуляции эндогенных СК для регенерации поврежденных при заболеваниях органов и тканей.

## Глава 4. АМИНЫ И НЕЙРОТРОПНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

### 4.1. Серотонин: сигнализация и эффекты

Серотонин (5-гидрокситриптамин; 5-hydroxytryptamine, 5-HT) – основной медиатор серотониновой системы. По химическому строению серотонин относится к биогенным аминам, классу триптаминов. Прежде под действием фенил-гидроксилазы с *коферментом*-донором водорода (Н4БП) происходит синтез такого прекурсора серотонина как 5-гидрокситриптофан. 5-гидрокситриптофан декарбоксилируется в серотонин под влиянием фермента триптофандекарбоксилазы с помощью витамина B<sub>6</sub> [Green A. R., 2006; Maclean M. R., Dempsie Y., 2010]. У человека лучше всего охарактеризована роль 5-HT в центральной нервной системе (ЦНС), где амин выступает в качестве нейромедиатора в нейронных синапсах и влияет на широкий спектр нейрофизиологических функций: эмоциональное, пищевое и половое поведение, обучение и память, цикл сон-бодрствование, терморегуляцию [Derek A. Mann, Fiona Oakley, 2013]. Наряду с гистамином серотонин участвует в формировании болевой реакции при раздражении сенсорных рецепторов.

В естественных условиях уровень свободного серотонина в крови очень низкий. Основное место синтеза 5-HT и локализация вне ЦНС – это энтерохромаффинные клетки кишечника и эндотелиальные клетки легочных артерий [Eddahibi S. et al., 2006; Sullivan C. C. et al., 2003; Maclean M. R., Dempsie Y., 2010]. Эндотелиальные клетки не только синтезируют нейромедиатор серотонин [Dempsie Y, MacLean MR., 2008; Eddahibi S. et al., 2006; Maclean MR, Dempsie Y., 2010; Morecroft I et al., 2007], но и экспрессируют на своей поверхности стимулирующие и ингибирующие рецепторы серотонина [Dempsie Y., MacLean M.R., 2008; Kawahara K. et al., 2008; Maassen Van Den Brink A. et al., 2008; MacLean M.R., 2007; MacLean M.R, Dempsie Y., 2009]. В кишечнике серотонин участвует в контроле сокращения гладких мышц и переваривании пищи. 5-HT обнаружен в тромбоцитах крови и тучных клетках дыхательных путей [Potenzieri C., Meeker S., Undem B. J., 2012]. При повреждении клетки, накапливаясь в травмированном участке ткани, и при участии переносчика серотонина (SERT) захватывают серотонин из плазмы крови. При соответствующей стимуляции тромбоциты и тучные клетки выделяют серотонин. 5-HT участвует в вазоконстрикции и вазодилатации, деятельности дыхательного центра, терморегуляции, развитии сердечно-сосудистой системы, молочных желез и выделении молока, сокращении матки и созревании ооцитов, обмене веществ, а также в агрегации тромбоцитов и образовании тромбов [Berger M., Gray J. A., Roth B. L., 2009]. Продemonстрировано взаимодействие 5-HT и иммунной системы [Ahern G. P., 2011]. Амин может приводить как к увеличению, так и уменьшению провоспалительных цитокинов [Mossner R., Lesch K. P., 1998; Kubera M. et al., 2005]. Серотонин играет важную роль в изменении фенотипа печеночных звездчатых клеток в ответ на повреждение печени [Ruddell R. G. et al., 2006]. 5-HT, взаимодействуя с 5-HT<sub>2A</sub> рецепторами, активирует внеклеточный сигнал, регулирующий киназу в мезангиальных клетках почек, индуцируя трансформирующий фактор роста (TGF)-b1, что

увеличивает пролиферативную активность клеток [Grewal J. S. et al., 1999]. Посредством активации 5-HT<sub>2A</sub> рецепторов серотонин индуцирует синтез коллагена и TGF- $\beta$ 1 интерстициальными клетками аортального клапана [Jian B. et al., 2002; Xu J. et al., 2002]. На мышинной модели легочной гипертензии показано, что серотонин, взаимодействуя с 5-HT<sub>2B</sub> рецепторами, регулирует клеточный цикл совместно с тромбоцитарным фактором роста [Esteve J. M. et al., 2007].

Серотонин и 5-HT<sub>2A</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> рецепторы играют важную роль в жизнедеятельности легких. Так, амин участвует в контроле вазореактивности и бронхореактивности [Loric S. et al., 1995; Marcos E. et al., 2004]. В физиологических условиях в легких обнаруживается низкий уровень свободного серотонина. При патологии легких 5-HT секретируется тромбоцитами и эндотелиальными клетками и таким образом концентрация легочного и свободного серотонина возрастает. Исследования *in vitro* показали митогенное и профибротическое влияние серотонина на различные типы мезенхимальных клеток. Серотонин расширяет пролиферацию фибробластов в культуре легочных артерий у крыс при гипоксии [Welsh D. J. et al., 2004].

Широкий спектр эффектов 5-HT в ЦНС и вне ЦНС объясняется разнообразием семейства 5-HT рецепторов. В настоящее время идентифицированы семь типов рецепторов серотонина (5-HT<sub>1</sub>–7) и 15 их подтипов [Richter D. W. et al., 2003]. Так, 5-HT<sub>3</sub> является ионотропным рецептором, остальные 5-HT рецепторы – метаботропные рецепторы, семидоменные, связаны G-белками (G-protein coupled seven-transmembrane receptors (GPCR)). Установлено сходство метаботропных 5-HT<sub>3</sub> с рецепторами норадреналина. Кодированы GPCR13 генами.

В состав GPCR входят различного класса G белки. Различают  $G_{\alpha_{q/11}}$  (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> рецепторы),  $G_{\alpha_{i/o}}$  (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> и 5-HT<sub>5A/B</sub> рецепторы) или  $G_{\alpha_s}$  (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторы) G белки [Nichols D. E. et al., 2008]. Следует отметить, что G-белок GPCR, в том числе и у 5-HT рецепторов, способен взаимодействовать с несколькими типами внутриклеточных сигнальных молекул. Так,  $G_{\alpha_q}$  белки активируют фосфолипазу C, которая расщепляет фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат до диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата. Диацилглицерин (остается связанным с мембраной) действует в качестве вторичного мессенджера и активирует протеинкиназу C. Инозитол-1,4,5-трифосфат диффундирует через цитозоль и связывается с IP<sub>3</sub> рецептором кальциевых каналов в эндоплазматическом ретикулуле. Это приводит к повышению цитозольной концентрации кальция [Bockaert J. et al., 2004; Millan M. J. et al., 2008]. Кроме этого после связи серотонина с 5-HT рецептором  $G_{\alpha_q}$  активируют ГТФазы (англ. Rho). ГТФазы относят к суперсемейству Ras клеточных сигнальных белков: «малые» (около 21 кДа) G-белки. Белки этого семейства регулируют многие аспекты клеточной жизнедеятельности: пролиферация, апоптоз, экспрессия генов [Boureux A. et al., 2007; Bustelo X. R. et al., 2007], регуляция внутриклеточного актина, тем самым влияя на миграцию клеток и адгезию [Matsusaka S., Wakabayashi I., 2005]. Активация  $G_{\alpha_{i/o}}$  класса 5-HT рецепторов вызывает подавление аденилатциклазы и снижение уровня цАМФ и, как одно

из следствий, подавление активности нейронов [Nichols D. E., Nichols C. D., 2008]. В свою очередь, взаимодействие серотонина с  $G_{\alpha_c}$  классом 5-HT рецепторов, напротив, стимулирует аденилатциклазу, содействует накоплению цАМФ и активации протеинкиназы А и, таким образом, происходит влияние на синтез белка.

## **4.2. Посттравматическое воспаление и серотонин**

Восстановление поврежденных тканей является фундаментальным и универсальным биологическим механизмом, критически важным для выживания. После травмы различные системы в организме обеспечивают упорядоченную замену мертвых и/или поврежденных клеток [Wynn T. A., 2007]. Процесс заживления ран, во многом искусственно, разделяют на четыре отдельных этапа. Первый посттравматический этап характеризуется различными гомеостатическими изменениями, в том числе, в системе свертывания крови и коагуляции. Фаза свертывания сменяется миграцией клеток воспаления к участку травмы. Вслед за фазой воспаления наблюдаются фибропролиферативные изменения: миграция, пролиферация и активация фибробластов. Этой фазе свойственно рубцевание травмированного участка. В следующие за фиброзом несколько недель или месяцев (в зависимости от тяжести раны и ткани) наблюдается полная или частичная регенерация ткани и восстановление ее функции, и это 4 этап или фаза разрешения – ремоделирования ткани [Wynn T. A., 2007; Wynn T. A., 2011].

Серотонин принимает участие в коагуляции и агрегации тромбоцитов. В очаге повреждения тромбоциты высвобождают 5-HT. В зависимости от ткани и запроса амин сужает или расширяет микрососуды. Так, в печени у мышей, лишенных «периферического» серотонина ( $Tph^{-/-}$ ), 5-HT способствует сужению печеночных синусоид в естественных условиях и при болезненных состояниях [Lang P. A. et al., 2008]. Секретируемый тромбоцитами 5-HT через специфические 5-HT<sub>2A</sub> на поверхности сосудистых эндотелиальных и гладкомышечных клетках координирует активность межклеточных контактов [Cloutier N. et al., 2012].

При воспалении 5-HT привлекает и удерживает лейкоциты в месте травмы, оказывает хемотаксическое действие на тучные клетки и эозинофилы [Kushnir-Sukhov N. M., et al., 2006; Boehme S. A. et al., 2004]. Взаимодействуя с 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторами, серотонин увеличивает экспрессию IL-6 дендритными клетками [Idzko M. et al., 2004; Muller T. et al., 2009]. Амин через 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторы стимулирует секрецию IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL12p40 и TNF- $\alpha$  у моноцитов человека, предварительно обработанных ЛПС [Durk T. et al., 2005]. 5-HT ингибирует апоптоз моноцитов с помощью 5-HT<sub>1</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторов, что сохраняет моноциты в тканях и способствует воспалению [Soga F. et al., 2007].

Такой цитокин как TNF- $\alpha$  играет ключевую роль в воспалении, а его секреция и сигнализация вносит определенный вклад в развитие многих воспалительных заболеваний. В 2008 г. были обнародованы данные о том, что активация серотониновых 5-HT<sub>2A</sub> рецепторов селективным агонистом

(R)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane ((R)-DOI) препятствует развитию воспаления в дуге аорты [Yu B. et al., 2008]. Кроме этого, (R)-DOI блокирует TNF- $\alpha$ -индуцированную экспрессию провоспалительных факторов клеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1), цитокинов (IL-6, IL-1b) и хемокинов (MCP-1, CX3CL1) в кишечнике. Одновременно (R)-DOI предотвращает ФНО- $\alpha$ -индуцированное увеличение циркулирующего в крови IL-6 [Nau F. Jr. et al., 2013].

Лейкоциты экспрессируют на поверхности рецепторы к серотонину, амин регулирует хемотаксис лейкоцитов, продукцию цитокинов и активацию дендритными клетками Т-клеток [Abdouh M. et al., 2001; Abdouh M. et al., 2004; Boehme S.A. et al., 2004; Vega Lde L. et al., 2005; Kushnir-Sukhov N.M. et al., 2006; Yin J. et al., 2006; Cloez-Tayarani I., Changeux J. P., 2007; Leon-Ponte M., Ahern G. P., O'Connell P.J., 2007; Menard G., Turmel V., Bissonnette E. Y., 2007; Levite M., 2008; Muller T. et al., 2009]. Механизмом регуляции внутриклеточных реакций выступает serotonylation [Dai Y. et al., 2008; Watts S. W., Priestley J. R., 2009; Kim Y. et al., 2010; Park D., Choi S. S., Ha K. S., 2010; Liu Y. et al., 2011]. Термин "serotonylation" был озвучен в 2003 году D. J. Walther с коллегами. "Serotonylation" является рецептор независимым сигнальным механизмом активации серотонином внутриклеточных процессов. Взаимодействуя с глутаминовыми остатками (возникают длительные ковалентные связи), серотонин модифицирует белки. Это происходит с участием трансглутаминазы, через создание глутамил-амидных связей. Этот механизм осуществляется в случае транспорта серотонина внутрь клетки [Walther DJ et al., 2003]. По данным Abdala-Valencia H. et al. (2012), 5-НТП снижает активность аллергического воспаления, вызванного овальбуминовой фракцией V (англ. ovalbumin fraction, OVA), домашними пылевыми клещами или назначением IL-4. Механизмом снижения аллергического воспаления может быть ингибирование экспрессии трансглутаминазы и serotonylation в эндотелиальных клетках [Abdala-Valencia H. et al., 2012].

Меньшую восприимчивость трансгенных  $\text{Trp1}^{-/-}$  мышей к экспериментальному колиту связывают с уменьшением секреции цитокинов и инфильтрации макрофагов в кишечнике [Ghia J. E. et al., 2009]. Объяснение этому авторы находят во влиянии 5-НТ на эти процессы. Прослеживается зависимость ответа Т-клеток от уровня серотонина. Так, в малых концентрациях амин стимулирует пролиферацию Т-клеток и продукцию IL-2 [Young M. R. et al., 1993], высокие концентрации ингибируют митоген-стимулированную пролиферацию Т-клеток и экспрессию IL-2-рецептора [Slauson D. O. et al., 1984].  $\text{Tf}^{-/-}$  мыши менее восприимчивы к воспалению в печени при стеатогепатозе. В этом случае не выявлено влияние 5-НТ на продукцию цитокинов. Объяснение этому феномену находят в поглощении и деградации 5-НТ гепатоцитами. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  способны индуцировать экспрессию переносчика серотонина SERT [Zhu C. B., Blakely R. D., Hewlett W. A., 2006]. Не исключено, что поглощение серотонина и продукция ROS может быть частью системы контроля воспаления через механизм положительной обратной связи.

### 4.3. Серотониновая сигнализация и фиброз

Впервые на зависимость фиброза от серотонина указал J. A. Oates с коллегами в 1964 г. При исследовании нейроэндокринной карциноидной опухоли исследователи обнаружили секрецию огромного количества 5-НТ [Oates A. et al., 1964]. Нейроэндокринный синдром характеризует фиброз клапанов сердца, легких и кожи [Fries J. F., Lindgren J. A., Bull J. M., 1973; Pavlovic M. et al., 1995]. Внутривенное введение метисергида (1-метил-D-лизергиновая кислота бутанол-амид или UML-491, *англ.* methysergid), механизм действия которого связан с 5-НТ<sub>2B</sub> рецепторами, приводит к возникновению фиброза [Reimund E., 1987]. Такой агонист 5-НТ<sub>2B</sub> рецепторов как фенфлурамин (*англ.* fenfluramine) способствует развитию фиброза [Fowles R. E., Cloward T. V., R. L., 1998; Rothman R. B. et al., 2000; Setola V. et al., 2003]. Перголид и каберголин, используемые для лечения болезни Паркинсона, и структурно схожие с 5-НТ<sub>2B</sub>, вызывают фиброз клапанов сердца [Antonini A., Poewe W., 2007].

*Печень.* После различных травм печень млекопитающих быстро и эффективно восстанавливает свою потерянную клеточную массу, сложную структуру (печеночные синусоиды и желчные протоки) и функцию. После семидесятипроцентной резекции массы структура печени полностью восстанавливается в течение 14 дней [Yokoyama H. O. et al., 1953]. Аутокринные и паракринные 5-НТ сигнальные пути печени участвуют в росте и регенерации паренхиматозных клеток печени. Известно, что кишечные 5-НТ быстро мобилизуются и накапливаются в печени после резекции печени. Введение 5-НТ увеличивает пролиферацию гепатоцитов у мышей с семидесятипроцентной резекцией печени.

В своей публикации за 2006 год M. Lesurtel с соавт. указали на тромбоциты, как на основной источник 5-НТ, и высказали предположение о том, что серотонин участвует в регенерации печени. Авторы наблюдали ухудшение регенерации гепатоцитов у Thp1<sup>-/-</sup> мышей в условиях резекции печени [Lesurtel M. et al., 2006]. При этом утверждается, что ведущая роль в 5-НТ управляемой регенерации гепатоцитов принадлежит 5-НТ<sub>2A</sub> рецепторам и в меньшей степени – 5-НТ<sub>2B</sub> рецепторам. Результаты последующих исследований той же группой исследователей подтвердили про-воспалительную и про-регенеративную роль серотонина в постишемическом восстановлении структуры и функции печени [Nocito A. et al., 2007]. Интересен и тот факт, что агонисты 5-НТ<sub>2B</sub> рецепторов улучшают выживаемость животных при трансплантации ткани печени [Tian Y. et al., 2011] и связанных с возрастом нарушений регенерации гепатоцитов [Furrer K. et al., 2011].

Другая команда исследователей продемонстрировала отсутствие регенерации печени у серотонин-дефицитных крыс [Matondo R. B. et al., 2009]. В тромбоцитах серотонин-дефицитных крыс 5-НТ не выявлялся, что связано с отсутствием поглощения амина из кишечника. Низким уровнем свободного 5-НТ в сыворотке и внутриклеточного 5-НТ (тромбоцитарного) объясняется низкая регенеративная активность печени при травмах у серотонин-дефицитных крыс.



Интерес представляет сообщение А. Omenetti и коллег (2011) о новых источниках 5-НТ. Как известно, холангиоциты являются клетками эпителия желчных протоков, известна их роль в поддержании гомеостаза печени и иммунитета. Группа А. Omenetti выявила нервные окончания около холангиоцитов. Нервные окончания продуцируют серотонин, который подавляет пролиферацию холангиоцитов по принципу отрицательной обратной связи [Omenetti A. et al., 2011]. В ответ на травму желчных протоков 5-НТ индуцирует продукцию TGF1 миофибробластами. В свою очередь, TGF1 подавляет экспрессию серотониновых рецепторов на холангиоцитах. Таким образом, подавляются эффекты 5-НТ на холангиоциты.

При трансдифференцировке в клетки с миофибробластным фенотипом синусоидальные звездчатые клетки печени (sinusoidal hepatic stellate cells – SHSC) значительно усиливают экспрессию 5-НТ<sub>2А</sub> и 5-НТ<sub>2В</sub> [Ruddell R. G. et al., 2006]. SHSC производят огромное количество молекул внеклеточного матрикса, ингибируют коллагеназу TIMP-1 [Mann D. A., Oakley F., 2013]. В этой связи инициацию фиброгенеза при заболеваниях печени можно связать с синусоидальной звездчатой клеткой печени. D. A. Mann и F. Oakley (2013) рассматривают SHSC в качестве основной мишени при профилактике и лечении фиброза у больных с хроническими заболеваниями печени. SHSC экспрессируют рецепторы к серотонину и отвечают на 5-НТ. Ответ может протекать по аутокринному и паракринному механизму (тромбоцитарный, холангиоцитарный) [Ruddell R. G. et al., 2006]. Селективные антагонисты 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов ингибируют пролиферацию и индуцируют апоптоз SHSC. Таким образом, 5-НТ/5-НТ<sub>2</sub> сигнализация важна для регуляции апоптоза и трансдифференцировки в миофибробласты, выступает важным критерием прогрессирования фиброза. По мнению M. R. Ebrahimkhani и коллег (2011), с серотониновой сигнализацией связан не только фиброз печени, но и регенерация гепатоцитов. На различных моделях повреждения печени (мыши нокаутные по 5-НТ<sub>2В</sub> рецептору, фармакологическая блокада 5-НТ<sub>2В</sub> рецепторов) исследователи продемонстрировали стимуляцию пролиферации гепатоцитов и ингибицию фиброза [Ebrahimkhani M. R. et al., 2011]. 5-НТ сигналы, вероятно, через 5-НТ<sub>2В</sub> рецепторы связаны с ERK- и JunD-зависимой активацией экспрессии TGF1. Как известно, TGF1 ингибирует пролиферацию гепатоцитов, с другой стороны, является мощным стимулятором экспрессии генов фиброгенеза [Fausto N. et al., 2006; Gressner A. M. et al., 2002].

*Легкие.* В 1960 году была документально подтверждена связь серотонина с легочным фиброзом. Назначение метисергида в качестве препарата для лечения головной боли вызывало легочный фиброз [Graham J. R., 1967]. Индуцированный пневмофиброз был обратимым. После отмены лечения метисергидом у некоторых пациентов фибротические изменения в легких отсутствовали. Различные хронические респираторные заболевания, включая ИЛФ, легочную артериальную гипертензию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхиальный облитерирующий синдром и астму, приводят к фиброзу [Wilson M. S., Wynn T. A., 2009]. Фиброз легких наблюдается при системном склерозе [Almeida I. et al., 2011] и лучевой терапии области груди [Denham J. W., Hauer-Jensen M., 2002], индуцируется различны-

ми препаратами (например, метотрексатом) [Van der Veen M. J., et al., 1995]. Роль 5-НТ при патологии легких до конца не изучена. На настоящий момент можно с уверенностью говорить о том, что амин локально секретируется тромбоцитами и тучными клетками и, тем самым, оказывает дополнительное вазоактивное действие на легочную артерию. Кроме этого серотонин оказывает профиброгенное действие в легких, стимулируя пролиферацию фибробластов и миофибробластов [Lee S. L. et al., 1994; Welsh D. J. et al., 2004]. Наряду с тромбоцитами и тучными клетками легочные нейроэндокринные клетки синтезируют и секретируют 5-НТ [Johnson D. E., Georgieff M. K., 1989]. Пролиферативная активность нейроэндокринных клеток при легочной артериальной гипертензии коррелирует с распространением миофибробластов в легочных артериях.

Предполагается, что в пост-операционный период у детей с легочной артериальной гипертензией пролиферирующие нейроэндокринные клетки легких выступают в качестве основного источника 5-НТ. На поверхности легочных эпителиальных клеток у пациентов с идиопатической легочной артериальной гипертензией в больших количествах экспрессируется Tryptophan hydroxylase 1 (tryptophan 5-monoxygenase) [Eddahibi S. et al. 2006]. Особенно сильно выражен в легких уровень серотонинового транспортера (the serotonin transporter (*SERT* or 5-HTT)). Не исключено участие *SERT* в стимуляции пролиферации фибробластов и гладкомышечных клеток легочной артерии путем активации в частности сигнального пути ERK (Ras-ERK, MAPK/ERK) после интернализации (поглощение клеткой) 5-НТ [Maclean M. R., Dempsie Y., et al., 2010]. Сигнальный путь ERK (англ. extracellular signal-regulated kinase; Ras-ERK, MAPK/ERK) – это один из ключевых и наиболее хорошо изученных сигнальных путей MAPK (mitogen-activated protein kinase). Свое название этот путь получил от центральной MAP-киназы ERK, которая представлена двумя близкими по структуре белками, ERK1 и ERK2. Данный путь может быть активирован внеклеточными сигналами, такими как гормоны, факторы роста, хемокины и нейротрансмиттеры, которые распознаются соответствующими рецепторными тирозинкиназами или рецепторами, ассоциированными с G-белками. В конечном итоге передача сигнала по ERK-пути приводит к выживанию, пролиферации и увеличению подвижности клеток [Mendoza M. C., Eg E. E., Blenis J., 2011].

В дыхательной системе 5-НТ сужает легочную артерию, вызывает бронхоспазм и стимулирует гиперпластические и гипертрофические изменения в клетках гладких мышц и миофибробластах [MacLean M. R. et al., 2000]. Этот эффект серотонина может инициировать склеротическое ремоделирование в легочных сосудах и/или дыхательных путях. В результате склеротического ремоделирования увеличивается сопротивление в легочных сосудах, развивается фиброз легких. Между тем, с какими из 5-НТ рецепторов связаны эффекты серотонина при легочной артериальной гипертензии и фиброзе легких до сих пор не известно. До 1993 года считалось, что опосредованное 5-НТ<sub>2A</sub> рецепторами сужение сосудов легочной артерии при назначении антагониста кетансерина обладает некоторой клинической полезностью, особенно у пожилых людей [Demoulin J. C. et al., 1981]. Более поздние работы

указывают на вклад 5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов в сосудосуживающий эффект [Dumitrascu R. et al., 2011; Launay J. M. et al., 2002; Morecroft I. et al., 1999]. О. Eickelberg с коллегами (2010) сообщил о повышенной экспрессии 5-HT<sub>1A/B</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> в легких у пациентов с ИЛФ и неспецифической интерстициальной пневмонией. При ИЛФ наблюдалось увеличение экспрессии 5-HT<sub>2A</sub> и 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов в легких. 5-HT<sub>2A</sub> рецепторы были локализованы на фибробластах, в то время как 5-HT<sub>2B</sub> был найден главным образом на эпителиальных клетках [Konigshoff M. et al., 2010]. Антагонист 5-HT<sub>2A/B</sub> рецепторов terugide значительно ограничивает продукцию TGF $\beta$ 1 фибробластами у мышей. При введении в естественных условиях terugide улучшает функции легких, в условиях блеомицин-индуцированного фиброза легких интенсивность фиброгенеза падает. Эти данные подтвердили более ранние наблюдения А. Fabre и коллег о том, что при блеомицин-индуцированном фиброзе легких повышается уровень серотонина в альвеолярной ткани, назначение антагониста 5-HT<sub>2A</sub> рецепторов кетансерина и антагониста 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов SB215505 ослабляет фибротические проявления [Fabre A. et al., 2008].

*Сердце.* Важность серотонина в регуляции сердечно-сосудистой системы была продемонстрирована у мышей, лишенных 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов. У мышей с этим дефектом отмечается высокая эмбриональная и неонатальная смертность из-за отсутствия трабекул в сердце [Nebigil C. G. et al., 2000]. В свою очередь, сверхэкспрессия 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов на поверхности кардиомиоцитов вызывает гипертрофию сердца [Nebigil C. G. et al., 2003]. Агонисты 5-HT рецепторов и повышенный уровень транспортера серотонина инициируют клапанный фиброз при карциноидных опухолях, способствуют гипертрофии сердца с одновременной потерей кардиомиоцитов, накоплением фибробластов в интерстиции и отложением коллагена [Hutcheson J. D. et al., 2011]. Авторами предполагается прямое действие 5-HT/5-HT<sub>2B</sub> сигнализации на кардиомиоциты.

Не исключается опосредованная через другие типы клеток и паракринные механизмы стимуляция фиброгенеза в сердечной ткани. По данным F. Jaffré и коллег (2004) серотонин через 5-HT<sub>2B</sub> рецепторы стимулирует продукцию фибробластами больного сердца таких цитокинов как IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Примечательно, что адренергическая стимуляция соответствующих рецепторов также вызывает секрецию IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  фибробластами желудочка [Jaffré F. et al., 2004]. В эксперименте перфузия изопротеренолом стимулирует гипертрофию сердца и повышает плазменные уровни IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [Jaffré F. et al., 2009]. У нокаутных по 5-HT<sub>2B</sub> рецептору мышей и у мышей дикого типа с SB206553 (антагонист 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов) изопротеренол не вызывает гипертрофического ремоделирования сердечной мышцы. С чем связана блокада адренергического пути сигнализации продукции цитокинов фибробластами у нокаутных по 5-HT<sub>2B</sub> рецептору мышей и у мышей с SB206553 до конца не ясно. Потенциальный механизм, посредством которого 5-HT<sub>2B</sub> рецепторы могут оказывать перекрестные помехи другим G белок-связанным рецепторам, это генерация активных форм кислорода. 5-HT<sub>2B</sub> соединяется с NAD (P) H-оксидазой [Pietri M. et al., 2005], которая играет ключевую роль в физиологической реакции П/АТ<sub>1</sub> сигнализации на

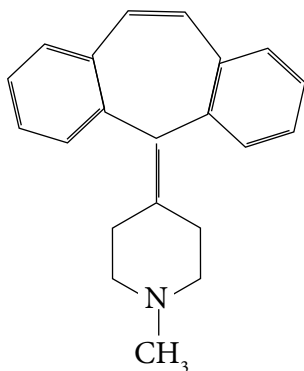
ангиотензин. Из данных L. Monassier и соавторов следует, что селективный антагонист 5-НТ<sub>2В</sub> рецепторов SB215505 предотвращает инициированную ангиотензином II или изопротеренолом генерацию супероксида в сердце и гипертрофию сердечной ткани [Monassier L. et al., 2008].

*Системный склероз (склеродермия).* Системная склеродермия является редким аутоиммунным заболеванием неизвестной этиологии, в основном, поражает женщин в возрасте от 30 до 50 лет. Заболевание характеризуется отложением фибрилл, образующих коллаген в коже, легких, желудке, сердце и почках, что является плохим прогнозом [Almeida I. et al., 2011]. Большинство пациентов с системной склеродермией имеют заболевания сосудов и болезнь Рейно [Generini S. et al., 1999]. Экспериментальные исследования в 1950 году показали, что серотонин стимулирует пролиферацию фибробластов кожи. При подкожном введении амин вызывает ремоделирование кожи у грызунов, по гистопатологическим признакам во многом похожее на системную склеродермию у человека [Macdonald R. A. et al., 1958]. Инфузия серотонина в плечевую артерию человека вызывает нарушения схожие с нарушениями, характерными для болезни Рейно [Roddie I. C. et al., 1955]. Болезнь Рейно относится к вазоспастическим заболеваниям, представляет собой ангиотрофоневроз с преимущественным поражением мелких концевых артерий и артериол. Роль серотонина в системной склеродермии до конца не известна. Однако отмечается, что у пациентов фиброзу предшествует прогрессивное повреждение клеток эндотелия. Было высказано предположение, что потеря эндотелием антикоагулянтных свойств может вызвать активацию тромбоцитов и высвобождение серотонина. Действительно у больных системной склеродермией обнаружены повышенные уровни 5-НТ в плазме [Biondi M. L. et al., 1988]. Некоторые авторы подвергают сомнению этот вывод [Klimiuk P. S. et al., 1989]. C. Dees с коллегами показал, что в ответ на 5-НТ фибробласты кожи больных системной склеродермией и здоровых людей увеличивают синтез коллагена Ia1, коллагена Ia2 и фибронектина *in vitro*. Эти эффекты 5-НТ на синтез коллагеновой матрицы блокировались антагонистом 5-НТ<sub>2В</sub> рецептора SB204741 или трансфекцией (Transfection) малых интерферирующих РНК к РНК 5-НТ<sub>2В</sub> рецептору [Dees C. et al., 2011]. Трансфекция – это процесс введения малых (20–25 пар оснований в длину) интерферирующих нуклеиновых кислот в клетки в целях блокады определенных генов с комплементарными последовательностями нуклеотидов. Кроме этого, авторы показали блокаду SB204741 блеомицин-индуцированного кожного фиброза, что было связано с уменьшением числа миофибробластов. Серотониновая стимуляция синтеза коллагена дермальными фибробластами зависела от активации TGF1 транскрипции генов и последующей TGF1 сигнализации [Palumbo K. et al., 2011]. Та же группа исследователей сообщила, что транскрипционный фактор JunD более выражен в культуре фибробластов кожи больного системной склеродермией. Напомним, что JunD выступает посредником TGF1-индуцированной активации фибробластов при блеомицин-индуцированном фиброзе.

Итак, исследования различных органов и систем указывают на активацию серотониновой системы в раннюю фазу заживления ран после травмы и участие 5-НТ в фиброзе. В контексте хронических заболеваний целесоо-

бразно сдерживать активность серотониновой составляющей фиброза. Это может быть достигнуто блокадой 5-НТ рецепторов. Как уже упоминалось выше, роль 5-НТ сигнализации в развитии фиброза клапанов сердца, легких, кожи и печени до конца не ясна. Несмотря на это эффективность блокады фиброгенного сигнала антагонистами 5-НТ рецепторов различного типа высока. В этой связи, целесообразно проводить поиск потенциальных противofибротических соединений с антисеротониновой активностью с целью использования для лечения фиброзных заболеваний.

#### 4.4. Ципрогептадин и кетансерин



Ципрогептадин

**Ципрогептадин.** Ципрогептадин гидрохлорид (Cyproheptadine) химическое название 4-(5H-Дибензо[а, d]циклогептен-5-илиден)-1-метилпиперидин (в виде гидрохлорида). Синонимы: Перитол, Adekin, Apetigen, Astonin, Cipractin, Cyprodin, Cyproheptadin hydrochlorid, Istabin, Pariactin, Peritol, Supersan, Vieldrin, Vinorex и др.

Фармакологическая группа вещества ципрогептадина – это  $H_1$ -антигистаминные и серотониновые средства. Основным фармакологическим свойством ципрогептадина является антигистаминное и противоаллергическое действие. Ципрогептадин блокирует гистаминные  $H_1$ -рецепторы и таким образом понижает реакцию организма на гистамин, предотвращает и облегчает течение аллергических реакций [Машковский М. Д., 2006; Венгеровский А. И., 2007]. Кроме этого ципрогептадин блокирует 5-НТ рецепторы и ослабляет спазмогенное действие серотонина на гладкие мышцы (сосуды, кишечник и др.) [Peroutka et al., 1981]. Препарат широко применяется в качестве антагониста гистаминных и серотониновых рецепторов для лечения аллергических реакций, как профилактическое средство для мигрени и симптоматического лечения метастатического карциноидного синдрома [Droogmans S. et al., 2009]. Кроме этого, ципрогептадин может назначаться при повышении аппетита, оказывает антидиарейное действие, уменьшает проницаемость капилляров, предупреждает развитие отека тканей, эффективен при зудящих дерматозах, оказывает слабое седативное действие. Не исключено, что действие ципрогептадина на различные функции и реакции организма может быть связано с его влиянием на ГАМК.

При приеме внутрь препарат быстро и полностью (более 90%) абсорбируется из ЖКТ.  $C_{\max}$  (максимальная концентрация) достигается в течение

первых 2 ч, терапевтический уровень в плазме сохраняется 4–6 ч. Равномерно распределяется в организме, проникает в ЦНС. Интенсивно метаболизируется (гидроксилирование с последующим глюкуронидированием) в печени. Выводится с мочой, главным образом, в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой. При почечной недостаточности элиминация замедляется [Машковский М. Д., 2006].

Применяется ципрогептадин при различных заболеваниях. Препарат блокирует гиперсекрецию соматотропина при акромегалии и секрецию адренокортикотропного гормона при синдроме Иценко Кушинга. Применяют при аллергических заболеваниях (острой и хронической крапивнице, сывороточной болезни, поллинозах, вазомоторном рините, контактном дерматите, нейродермитах, отеке Квинке, при аллергических реакциях на прием лекарств и др.), а также при мигрени (главным образом в связи с антисеротониновым эффектом), при потере аппетита различной этиологии (нейрогенная анорексия, хронические заболевания и др.). В связи с тем, что гистамин и серотонин усиливают секрецию сока поджелудочной железы, предложено также применять ципрогептадин в комплексной терапии хронического панкреатита [Машковский М. Д., 2006].

Начиная с 1961 года, ципрогептадина гидрохлорид продается в качестве лекарственного средства в большинстве развитых стран. В определенный период был доступен под маркой Periactin® (Периактин) от Merck&Co. В 2003 году Merck&Co прекращает продажу препарата в США и Канаде. Бренд по-прежнему доступен во многих странах мира (Австралия, Австрия, Бельгия, Ирландия, Италия, Нидерланды, Новая Зеландия, Южная Африка, Испания, Швеция, Таиланд и Великобритания). В настоящий момент ципрогептадин продается под множеством других торговых марок по всему миру, в виде одно- и мульти-ингредиентных препаратов. Дженерики препарата доступны в США, Канаде и в других странах.

Для ципрогептадина гидрохлорида первого поколения были характерны некоторые побочные эффекты, такие как седативный эффект [Spangler D. L., Brunton S., 2006]. Кроме этого, препарат снижает когнитивные функции. По действию ципрогептадин во многом похож на клозапин. Клозапин – это атипичный антипсихотический препарат или «антипсихотик», который используется для лечения шизофрении [Goudie A. J., 2007]. Традиционное название антипсихотиков – нейролептики. Структура ципрогептадина аналогична структуре антидепрессантов, таких как амитриптилин, имипрамин и N-methylamitriptyline [Woollorton J. R., Mathie A., 1995]. Эти данные позволяют предположить, что ципрогептадин оказывает влияние на ЦНС. Механизм действия ципрогептадина связывают с влиянием на первичные афферентные нейроны [Woollorton J. R., Mathie A., 1995].

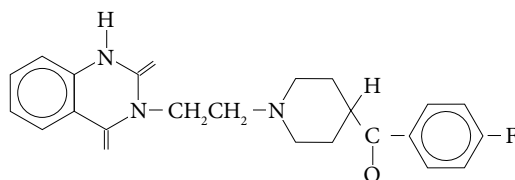
Как уже выше указывалось, ципрогептадин обладает несколькими видами фармакологической активности. Кроме блокады серотониновых и гистаминовых рецепторов, отмечается относительно высокая прочность связывания (аффинность) молекулы ципрогептадина с детерминантными (реакционноспособными) группами дофаминовых, адренергических и мускариновых рецепторов [Clineschmidt B. V., 1976; Remy D. C., 1977]. В дополнение

к рецептор-зависимой активности препарат ингибирует ионные каналы в кардиомиоцитах: калиевые ( $K^+$ ) и натриевые ( $Na^+$ ) каналы, N-тип и L-тип кальциевых ( $Ca^{2+}$ ) каналов [Kotake H., 1987]. По данным Х. Мао и соавторов (2008), ципрогептадин индуцирует апоптоз в клетках при лейкемии. Этот эффект не связан с антигистаминовой и антисеротониновой активностями [Мао Х. et al, 2008]. Ципрогептадин и его метаболиты демонстрируют токсичность в отношении  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [Codd E. E., 2010]. Как и в случае с апоптозом, токсическое действие не зависит от гистаминовых и серотониновых рецепторов. По мнению В. S. Hawkins и L. J. Fischer (2004), диабетогенный эффект ципрогептадина может быть опосредован изменением регулирования синтеза белка [Hawkins B. S., Fischer L. J., 2004].

А. Pal с соавторами (2007) указывает на то, что ципрогептадин может выступать в качестве внутриклеточной сигнальной молекулы и взаимодействовать с внутриклеточными сайтами связывания, в частности с сигма-1 (sigma-1) рецептором [Pal A. et al., 2007]. Сигма-1 рецептор широко распространен в нейронах ЦНС и выступает элементом некоторых внутриклеточных сигнальных путей [Walker J. M. et al., 1990].

Из всех ионных каналов  $K^+$ -каналы наиболее разнообразны по структуре и функции.  $K^+$ -каналы являются важными сигнальными макромолекулами в нейронах и не-нейрональных клетках. В ЦНС активность  $K^+$ -каналов определяет частоту и продолжительность потенциала действия [Melishchuk A., Loboda A., Armstrong C. M., 1998]. Существует предположение о том, что, влияя на  $K^+$ -каналы, можно изменить возбудимость нейронов и активность высвобождения нейромедиаторов [Mathie A., Woollorton J. R., Watkins C. S., 1998]. В качестве потенциальных методов лечения неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний, включая инсульт, гипертонию, психические заболевания предлагаются ингибиторы и активаторы  $K^+$ -каналов [Wulff H., Castle N. A., Pardo L. A., 2009].

Некоторые исследователи используют корковые нейроны для изучения влияния ципрогептадина на трансфицированные Kv2.1  $\alpha$ -субъединицы  $K^+$ -каналов [He Y-L et al., 2012]. Вводимый внутриклеточно ципрогептадин увеличивал  $I_K$  (калиевый ток) за счет снижения активности протеин-киназы (protein kinase A (PKA)). Блокирование 5-HT-, M-, D2-, H1- и H2- типов GPCR-рецепторов (рецепторы, сопряженные с G-белком, (англ. G-protein-coupled receptors, GPCRs), известные как семиспиральные рецепторы или серпентины) соответствующими антагонистами не устранили увеличение  $I_K$ . Эффекты ципрогептадина были блокированы антагонистами рецептора sigma-1. Более того, у животных, нокаутных по малым интерферирующим РНК (или коротко интерферирующие РНК (*siRNA*, small interfering RNA)), значительно снижены ципрогептадин-индуцированные эффекты на  $I_K$  [He Y-L et al., 2012]. Агонист рецептора sigma-1 имитирует индукцию калиевого тока при внутриклеточном введении ципрогептадина. Анализ связывания рецептора-лиганда выявил высокую степень связывания ципрогептадина с sigma-1. Следует отметить, что на клетках НЕК-293 авторы обнаружили эффект, подобный эффекту ципрогептадина на трансфицированных Kv2.1  $\alpha$ -субъединицах  $K^+$ -каналов [He Y-L et al., 2012].



Кетанстерин

*Кетансерин.* Кетансерин (Ketanserinum) химическое название 3-[2-[4-(пара-Фторбензоил) пиперидинил]этил]-2,4(1H, 3H)-хиназолиндион. Синонимы: Суфроксал, Serefrex, Sufrexal, Sufroxal.

Кетансерин является специфическим антагонистом 5-HT<sub>2</sub>-рецепторов и одновременно оказывает умеренное  $\alpha$ -адреноблокирующее действие. Активность кетансерина связана с блокадой эффектов серотонина, особенно со спазмогенным влиянием амина на мышцы сосудов и бронхов, и действием на агрегацию тромбоцитов. Сочетанное блокирующее влияние препарата на 5-HT<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>)-гистаминовые и  $\alpha$ 1-адренергические рецепторы вызывает расширение кровеносных сосудов и оказывает антигипертензивное действие. В этой связи кетансерин применяют при лечении артериальной гипертензии, для купирования гипертонических кризов, а также при нарушениях периферического кровообращения (перемежающаяся хромота, болезнь Рейно и др.). Возможно назначение кетансерина при тромбозах (периферических тромбофлебитах, геморроидальном тромбозе и др.) и в комплексной терапии хронических бронхитов. Нарушение серотониновой медиации кетансерином снижает содержание коллагена и проколлагена 1 в легких животных с пневмофиброзом, экспрессию мРНК проколлагена 3 и уровень трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 [Fabre A. et al., 2008].

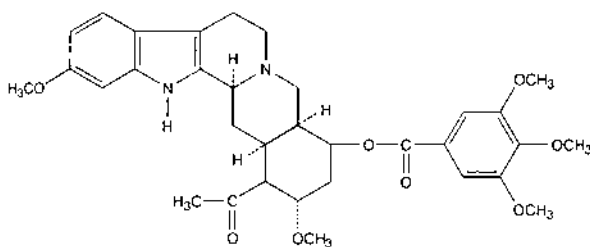
Интересны результаты коррекции кетансерином нарушений, вызванных сигаретным дымом. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется воспалением и прогрессивным разрушением легочной ткани, ведущим к обструкции. Курение сигарет основная этиологическая причина ХОБЛ. Окислительный стресс, вызванный избытком активных форм кислорода при действии сигаретного дыма, индуцирует продукцию IL-8 в дыхательных путях [Спаро, J. D., 2003]. Высокий уровень IL-8 положительно коррелирует с дисфункцией дыхательных путей в условиях курения [Kodama et al. 2009]. В свою очередь IL-8 стимулирует миграцию нейтрофилов в легкие, что провоцирует дальнейшее развитие воспалительных реакций [Kunkel et al., 1991]. Известно, что уровень серотонина при ХОБЛ повышается. Взаимодействуя с 5-HT<sub>2</sub>, серотонин увеличивает секрецию провоспалительных цитокинов, IL-6 и IL-8 эпителиальными клетками человека линии BEAS-2B и клетками альвеолярного эпителия II типа (АЕС-II) [Bayer et al. 2007]. В исследованиях Way Kwok Wai Lau с коллегами (2012) были получены доказательства того, что кетансерин подавляет индуцированную сигаретным дымом продукцию IL-8 путем блокады p38, ERK1/2 MAPK и Nrf2 сигнального пути и частично блокирует уменьшение соотношения глутатиона к окисленному глутатиону (rGSH/GSSG).



Все представленные выше данные открывают новые перспективы в развитии противовоспалительной и антифибротической терапии при заболеваниях легких.

## 4.5. Резерпин

Резерпин – один из нескольких десятков алкалоидов раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina*), которая произрастает в Южной Азии и с древних времен используется в медицинских целях, в частности при бессоннице и «безумстве». Первое сообщение об антигипертензивном действии экстрактов раувольфии появилось в 1931 г. Первое сообщение о клиническом использовании экстрактов раувольфии датировалось 1949 г. В 1952 г. из раувольфии выделен алкалоид резерпин. По антигипертензивной эффективности резерпин значительно сильнее, чем другие алкалоиды раувольфии. В 1952 г. резерпин в качестве антигипертензивного средства зарегистрирован в США, в 1953 г. – в Германии. В 1957 г. Совет по изучению гипертензии Американской ассоциации сердца признал, что некоторые алкалоиды раувольфии могут использоваться для начальной терапии артериальной гипертензии [Jerie P., 2007].



Резерпин

Основным фармакологическим свойством резерпина является его симпатолитическое действие. При этом известно, что резерпин оказывает двухфазное влияние на тоническую и рефлекторную активность симпатической нервной системы, а также на вазомоторные рефлексы. Первая депримирующая фаза действия резерпина обусловлена возбуждением высвобождаемыми моноаминами центральных тормозных моноаминергических механизмов. Эта фаза совпадает с кратковременным увеличением содержания свободных, функционально активных форм моноаминов в мозге [Каверина Н. В., Розанов Ю. Б., 1984; Slotkin T. A., Edwards K., 1973; Carmichael S. W., Weber A., Winkler H., 1980]. Вторая фаза действия резерпина развивается через 2–4 ч после введения и характеризуется увеличением тонической активности и вазомоторных рефлексов, а также полным устранением рефлекторного торможения в симпатических нервах. Эта фаза по времени совпадает с периодом истощения лабильного запаса моноаминов в мозговой ткани.

Механизм действия резерпина до конца не выяснен. Известно, что синаптические везикулы адренергических синапсов содержат высокую концентрацию

катехоламинов [Eiden L. E. et al., 2004]. Высокая концентрация катехоламинов обусловлена трансмембранным рН и электрохимическим градиентом, генерируемым везикулярной  $H^+$ -АТФазой, расположенной на мембране везикул [Wimalasena K. et al., 2011].

Отвечают за депонирование катехоламинов и серотонина в синаптических везикулах белки VMAT [Guillot T. S., Miller G. W., 2009]. Везикулярные транспортеры моноаминов содержатся в цитозоле, представляют собой трансмембранный белок, открыты в 1998 году. Описаны 2 изоформы везикулярных транспортных белков VMAT1 и VMAT2. VMAT1 экспрессируется в основном в нейроэндокринных клетках периферической нервной системы (мозговое вещество надпочечников, симпатические нейроны, тромбоциты), обнаружен в развивающихся нейронах [Hoffman B. J., Hansson S. R., Mezey E. et al., 1998; Mandela P., Ordway G. A., 2006; Fukui M., Rodriguez R. M., Zhou J. et al., 2007; Mandela P., Chandley M., Xu Y.-Y. et al., 2010; Wimalasena K. et al., 2011]. VMAT<sub>2</sub> локализован преимущественно в головном мозге, симпатической нервной системе, тучных клетках, кишечнике и поджелудочной железе.

Резерпин подавляет биогенные амины путем ингибирования везикулярного транспортера моноаминов (VMAT), расположенных на мембранах секреторных везикул в пресинаптических нейронах [Schuldiner S., Liu Y., Edwards R. H., 1993; Henry J. P., Sagne C., Botton D. et al., 1998; Lele R. D., 2010; Golembiowska K., Dziubina A., 2012]. Симпатолитик аллостерически изменяет конформацию  $Na^+/Cl^-$  – зависимого транспортера моноаминов, расположенного на пресинаптической мембране [Mandela P., Ordway G. A., 2006; Mandela P., Chandley M., Xu Y.-Y. et al., 2010]. Транспортер становится не способным к обратному захвату и транспорту катехоламинов, они разрушаются под действием моноаминоксидазы [Slotkin T. A., Edwards K., 1973; Kanner B. I., Fishkes H., Maron R. et al., 1979; Gopalakrishnan A., Sievert M., Ruoho A. E., 2007]. Резерпин блокирует оба транспортера VMAT<sub>1</sub> и VMAT<sub>2</sub>. Симпатолитик имеет в 3 раза больший аффинитет к VMAT<sub>2</sub>, чем к VMAT<sub>1</sub> [Wimalasena K. et al., 2011].

С самого начала применения резерпина в спектре его действия на организм выделяли влияние на периферическую нервную систему, с этим в значительной мере связано антигипертензивное действие препарата, и на центральную нервную систему [Машковский М. Д., 2006; Венгеровский А. И. 2007].

Первоначально, до появления современных нейролептических средств, резерпин применяли также для лечения психических заболеваний. В настоящее время резерпин как антипсихотическое средство применяют редко, в основном его используют как антигипертензивное средство для лечения артериальной гипертензии. Назначают симпатолитик чаще в сочетании с другими антигипертензивными средствами, в частности с диуретиками. Депрессорный антигипертензивный эффект резерпина зависит от исходного уровня давления: при повышенном давлении гипотензия выражена сильнее, чем при нормальном давлении [Slotkin T. A., 1975]. Так, у спонтанно гипертензивных крыс эффект от введения симпатолитика, оцениваемый по уровню биогенных аминов, развивается раньше и выражен в большей степени, чем у нормотензивных крыс. Авторы связывают данный эффект с особенностями

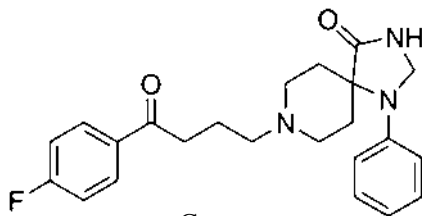
реактивности симпатoadренальной системы у гипертензивных животных [Slotkin T. A., 1975].

Антигипертензивный эффект резерпина начинает проявляться в малых дозах препарата (0,1–1 мг в сутки), без проявления его центрального депрессивного действия [Parker J. N., Murphy C. W., 1961]. Способность резерпина в дозах 1–2 мг/кг и более оказывать преимущественно центральное влияние, вызывая снижение биогенных аминов в головном мозге, часто используют для изучения антипсихотических препаратов и моноаминергической регуляции различных органов и систем при патологических состояниях.

Островки нейроэндокринных клеток в ткани легких способны секретировать биоактивные вещества (биогенные амины и пептиды), регулирующие рост эпителиоцитов в норме и при патологии [Polak J. M., Becker K. L., Cutz E. et al., 1993; Lauweryns J. M., Van Lommel A., 1997; Reynolds S. D., Giangreco A., Power J. H. et al., 2000]. Между тем, многие исследователи указывают на зависимость синтеза коллагеновых волокон в легких от адренергических рецепторов [Berg R. A., Moss J., Baum B. J. et al., 1981; Giri S. N., Sanford D. A. Jr., Robinson T. W. et al., 1987]. При блеомицин-индуцированном фиброзе легких активность воспаления в альвеолах и интерстициальной ткани коррелирует с повышением экспрессии адренорецепторов в легких [Kim D. S., Collard H. R., King T. E. Jr., 2006]. Не исключено, что вещества, снижающие активность адренергической системы, в частности резерпин, могут выступать в качестве эффективных противовоспалительных агентов и препятствовать фиброгенезу в легких. Как подтверждение тезиса выступают данные о том, что резерпин вызывает снижение в сыворотке таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1, интерферон- $\gamma$  и ТНФ- $\alpha$  [Ning Zhao, et al., 2011].

#### 4.6. Спиперон

Спиперон (син. Спироперидол, Спиропитан) – типичное антипсихотическое средство, производное бутирофенона. Спиперон проявляет свойства антагониста в отношении  $\alpha$ -адренорецепторов, семейства 5-НТ<sub>1,2</sub> рецепторов серотонина, дофаминовых рецепторов D1R, D2R и D3R.



Спиперон

Спиперон проявляет различную селективность в отношении дофаминовых, серотониновых и адренергических рецепторов, на что указывает константа диссоциации ( $K_i$ ) (таблица 8). Так, если  $K_i$  для серотониновых рецепторов семейства 5НТ<sub>1</sub> составляет 322,58–425,84 наномоль (nM), то  $K_i$  для D2 рецепторов – около 0,05 nM.

Таблица 8. Константа диссоциации спиперона в отношении дофаминовых, серотониновых и адренергических рецепторов.

Рецептор	Константа диссоциации, $K_i$ (nM)	Тип рецептора	Упоминание в литературе
5-HT1	322.5800	Человеческий	Richelson E, 1988
5-HT1A	425.8400	Крысиный	Gozla N et al., 1988
5-HT1A	130.7600	Человеческий	Hoyer et al., 1986
5-HT2	0.430000	Крысиный	Millan MJ et al., 1994
5-HT2	0.380000	Человеческий	Richelson E, 1988
5-HT2A	15.488166	Человеческий	Knight AR et al., 2004
$\alpha 1$	39.810000	Человеческий	Schwinn DA et al., 1995
D1	577.000000	Человеческий	Toll L et al., 1998
D1	8,400.000000	Крысиный	Billard W et al., 1984
D2	0.050000	Человеческий	Joyce JN et al., 1991
D2	0.050000	Крысиный	Kessler RM et al., 1993

Высокая селективность стала причиной использования спиперона для идентификации D2 рецепторов дофамина [Gundlach A. L., Largent B. L., Snyder S. H., 1984; Darren R. Quelch, Sarah L et al., 2013].

В клинической практике активно используется средство спиперона и его аналогов к соответствующим рецепторам. Так, радиофармацевтические препараты, созданные на основе спиперона и его аналогов, хорошо зарекомендовали себя в оценке рецепторов к дофамину в позитронно-эмиссионно томографических исследованиях у человека [Arndt K. A. et al., 1993; Sjoerd J. Finnema et al., 2010].

В эксперименте продемонстрировано, что системное введение спиперона вызывает стойкую иммуносупрессию. Между тем, основной эффект спиперона при системном введении нейролептический, что, безусловно, будет сдерживать назначение препарата при заболеваниях с повышенной активностью иммунной системы. Подкожное, внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное и пероральное назначение производных спиперона в диапазоне разовой суточной дозы от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг вызывает иммуносупрессию [Arndt K. A. et al., 1993]. В этой связи, использование спиперона и его солей может быть оправдано в качестве средств, снижающих активность иммунной системы.

Спиперон демонстрирует высокую иммуносупрессивную активность и при местном применении [Arndt K. A. et al., 1993]. При таком введении нейролептические эффекты соединения не развиваются. Способность спиперона влиять на отек ткани и инфильтрацию лейкоцитов при подкожных инъекциях оценена у мышей, зараженных оксазолоном. Вводимый подкожно в дозе 150 мг/кг нейролептический агент препятствовал развитию реакции гиперчувствительности. Меньшие дозы – 30 и 40 мг/кг, также подавляли отек ткани и их инфильтрацию лейкоцитами, но в меньшей степени. Следует отметить, что у мышей, леченных вводимым подкожно спипероном, в отличие от мышей, получавших соединение системно, сонливость и другие доказательства влияния на центральную нервную систему не проявляются. Возможно,

механизм местного действия спиперона связан с блокадой серотониновых и дофаминовых рецепторов на лимфоцитах.

Местный прием спиперона и его производных используют для лечения дерматита (контактный, атопический, экзематозный), псориаза, синдрома Шегрена, сухого вторичного кератоконъюнктивита, очаговой алопеции, болезни Крона, афтозных язв, ирита, конъюнктивита, кератоконъюнктивита, язвенного колита, астмы, кожной красной волчанки, склеродермии, вагинита, проктита [Ooms L.A. A. et al., 1989; Sharpe R. J. et al., 1992; Arndt K. A. et al., 1993; Arndt K. A. et al., 1997]. Периферическая блокада соответствующих рецепторов спипероном и его аналогами снижает инфильтрацию кожи лейкоцитами при микозе, ускоряет заживление ран.

Рассматривается возможность использования спиперона в лечении панкреатита [Hamada K. et al., 2007].

Обладая способностью влиять на  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые хлорные ионные каналы, спиперон стимулирует секрецию  $\text{Cl}^-$  эпителиальными клетками дыхательных путей при кистозном фиброзе, что делает его возможной платформой для создания новых средств медикаментозной терапии [Liang L, MacDonald K et al, 2008].

Wnt сигнальный путь играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [Clevers H., 2006; Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A., 2004; Nusse R., 2005; Willert K, Jones K. A., 2006], а также в развитии легочных заболеваний: идиопатический легочный фиброз и хроническая обструктивная болезнь легкого [Marco Chilosi, Venerino Poletti, and Andrea Rossi, 2012]. Существует канонический и неканонический путь передачи сигнала Wnt. В каноническом пути инициации сигналинга происходит связывание рецептора с комплексом, состоящим из трансмембранного белка Frizzled (Fz) и рецептора липопотеидов низкой плотности LRP5 или LRP6.

Цитоплазматический белок  $\beta$ -катенин является ключевой эффекторной молекулой в каноническом пути передачи сигнала Wnt, для этой сигнализации необходима стабилизация  $\beta$ -катенина. В отсутствие Wnt сигнала  $\beta$ -катенин связан и фосфорилируется так называемым «деструктурирующим комплексом», состоящим из группы белков: белок, оказывающий супрессирующее действие на опухоль (adenomatous polyposis coli, APC), цитоплазматический «поддерживающий» белок Axin, а также протеинкиназы GSK-3 и казеинкиназы (CK1). Лиганд Wnt связывает мембранный рецептор семейства Frizzled, который, в свою очередь, активирует белок Dishevelled (DSH), ингибирующий «деструктурирующий комплекс», что приводит к снижению скорости деградации  $\beta$ -катенина в силу того, что Wnt изолирует GSK-3. При этом GSK-3 прочно связан с внутренней стороной мембраны так называемыми мульти-везикулярными тельцами цитоплазмы [Taelman VF et al., 2010] и подавляет убиквитинилирование [Li V. S. W. et al., 2012].  $\beta$ -катенин, избегая деградации, накапливается в цитоплазме и перемещается в ядро, где взаимодействует с факторами Т-клеточного/лимфоидного семейства (T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) и активирует транскрипцию генов-мишеней сигнального пути Wnt [Clevers H., 2006; Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A., 2004; Nusse R., 2005; Willert K, Jones K. A., 2006].

Не все лиганды Wnt активируют  $\beta$ -катениновый комплекс. Wnt4, Wnt5a и Wnt11 способны инициировать катенин-независимый Wnt сигнальный путь, связываясь с Frizzled рецептором и, возможно, с корецептором Knypek (Kny) или Ror1, Ror2 [Kohn A. D., Moon R. T., 2005; Fukuda T. et al., 2008]. Это приводит к высвобождению внутриклеточного кальция и активации ферментов, таких как кальций/кальмодулин зависимой протеинкиназы типа II (calcium/calmodulin dependent protein kinase II, CamKII) и белка киназы C (protein kinase C, PKC), которые оказывают антагонистическое действие на канонический путь. Таким образом, кальций – важный медиатор антагонизма канонического Wnt сигнализации, действующий в нескольких точках канонического Wnt пути [Kohn A. D., Moon R. T., 2005; Maye P, Zheng J, Li L, Wu D. 2004; Park C. H., 2005].

Эти данные о Wnt сигнализации приведены нами для понимания механизма действия спиперона. Наряду с блокадой рецепторов дофамина и серотонина [Leysen JE, Gommeren W, Laduron PM., 1978; Leysen JE, Niemegeers CJ, Tollenaere JP, Laduron P. M., 1978; Gundlach A. L., Largent B. L., Snyder S. H., 1988], и демонстрацией высокого сродства с опиоидными  $\sigma$ -рецепторами [Snyder S. H., Largent B. L., 1989] нейролептик выступает в качестве блокатора Wnt сигналинга. В основе ингибирующего действия спиперона лежит блокада канонического сигнального пути Wnt до точки активации  $\beta$ -катенина [Desheng Lu and Dennis A Carson, 2009]. При этом Desheng Lu and Dennis A Carson (2009) считают, что ингибция спипероном Wnt сигнального пути не связана с блокадой дофаминовых, серотониновых и опиоидных  $\sigma$ -рецепторов. Спиперон аналогично тапсигаргину (thapsigargin) увеличивает уровни внутриклеточного кальция и таким образом препятствует трансдукции сигнала Wnt. Тапсигаргин является неконкурентным ингибитором  $\text{Ca}^{2+}$  АТФазы (SERCA) саркоплазматического ретикулума [Rogers TB et al., 1995]. Эти выводы поддерживает сообщение Liang et al. о том, что спиперон стимулирует кальций-зависимое секретирующее хлорида через киназа-зависимый фосфолипидный C-зависимый путь [Liang L. et al., 2009].

## **ГЛАВА 5. СТВОЛОВЫЕ И ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ В ПА- ТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗА ЛЕГКОГО И ЭФФЕКТАХ НЕЙ- РОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

### **5.1. Стволовые и прогениторные клетки в воспалении и фиброгенезе**

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) – хроническое заболевание, характеризующееся воспалением, фиброзом легочного интерстиция и воздухоносных пространств, дезорганизацией структурно-функциональных единиц паренхимы. Изменения гистоархитектоники ткани легкого вызывают нарушения газообмена и прогрессирование дыхательной недостаточности [Окороков А. Н., 2003]. Длительное время заболевание протекает бессимптом-

но, однако, в последующем оно может привести к инвалидизации и снижению качества жизни пациента [Чучалин А. Г., 2007].

ИЛФ является мультифакториальным заболеванием. Считается, что вирусные инфекции, профессиональные вредности и генетическая предрасположенность могут выступать пусковым механизмом в инициации болезни [Khalil N., O'Connor R., 2004; Wilson M. S., Wynn T. A., 2010]. Терапия ИЛФ представлена противовоспалительными (глюкокортикостероиды, цитостатики), антифиброзными (*D*-пеницилламин, тетратиомолибдат, колхицин), антиоксидантными (*N*-ацетилцистеин) и цитокиновыми ( $\gamma$ -IFN) препаратами [Phan S. H., 1995; Khalil N., O'Connor R., 2004; Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006; Meltzer E. B., Noble P. W., 2008]. Однако эффективность лечения не оправдывает ожиданий, поскольку используемые в лечении больных ИЛФ лекарственные средства способны лишь задержать прогрессирование фибротического процесса.

На поздних стадиях ИЛФ при неблагоприятном течение заболевания и отсутствии эффекта от проводимой терапии проводят трансплантацию легких. Однако побочные эффекты, связанные с операцией по трансплантации легких (реакция «трансплантат против хозяина», прием иммуносупрессоров, инфекции), ограничивают применение данного метода лечения в клинической практике [Околоков А. Н., 2003; Horowitz J. C., Thannickal V. J., 2006; Meltzer E. B., Noble P. W., 2008].

В последнее время уделяется огромное внимание такому направлению лечения как терапия СК. Трансплантацией ЭСК, МСК и ГСК пытаются лечить хронические заболевания печени и поджелудочной железы, послеоперационные осложнения, миодистрофию, патологию нервной ткани, аутоиммунные заболевания, инфаркт и инсульт, различные виды рака и др. заболевания [Pittenger M. F., 2005; Pittenger M. F., Walczak P., Zhang J. et al., 2008; Greco S. J., Zhou C., Ye J.-H., Rameshwar P., 2008; Li Y. J., Zhang C., Xiong F. et al., 2008; Feldman B. J., 2009; Kosztowski T., Zaidi H. A., Quinones-Hinojosa A., 2009; Laurila J. P., Latikainen L., Castellone M. D. et al., 2009; Shi X.-L., Gu J.-Y., Han B. et al., 2010; Lodi D., Iannitti T., Palmieri B., 2011]. В эксперименте на модели индуцированного блеомицином пневмофиброза получены положительные результаты использования донорских моноклеаров мезенхимального происхождения [Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C. et al., 2003; Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. et al., 2009; Shukla M. N., Rose J. L., Ray R. et al., 2009]. В поврежденных цитостатиком легких у мышей снижается интенсивность отложения коллагена и увеличивается количество клеток альвеолярного эпителия.

Одновременно с лечебными эффектами у получавших СК больных регистрируются аллергические реакции, подавляется иммунная система, возможен рецидив лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза». Следует отметить и другие возможные негативные реакции трансплантации МСК, такие как эмболия и стимуляция неопластического процесса [Togel F., Westenfelder C., 2011]. Таким образом, суммарный вес побочных эффектов трансплантации может преобладать над лечебными эффектами.

Альтернативой терапии стволовыми клетками может выступить метод фармакологической регуляции эндогенных СК взрослого организма, основанный на принципе подражания эндогенным механизмам регуляции [Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Жданов В. В. и др., 2007; Дыгай А. М., Жданов В. В., 2010]. Воздействуя на СК различных классов, предполагается нарушать последовательность событий патогенеза заболевания и/или стимулировать процессы регенерации тканей [Дыгай А. М., Скурихин Е. Г., 2011]. Между тем на сегодняшний день нет понимания роли отдельных клонов СК и прогениторных клеток взрослого организма в механизмах развития фибропластического процесса в альвеолярной ткани. Затрудняет разработку тактики медикаментозного лечения ИЛФ с использованием костномозговых и/или региональных СК отсутствие потенциальных антифибротических соединений, терапевтический эффект которых был бы связан с предшественниками зрелых клеток. Большие надежды в терапии идиопатического легочного фиброза нами возлагаются на нейротропные препараты. Ранее в НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН продемонстрировано избирательное влияние симпатолитика резерпина на ГСК, что приводило к задержке развития миелосупрессии и стимуляции регенерации гемопоэза [Дыгай А. М., Хмелевская Е. С., Скурихин Е. Г. и др., 2011]. Выраженные изменения со стороны системы крови мы наблюдали при коррекции лейкопении и анемии антагонистами постсинаптических С2 серотониновых рецепторов и постсинаптических D2 дофаминовых рецепторов.

Принимая во внимание выше изложенное, представляет несомненный интерес изучить роль костномозговых и региональных СК и прогениторных клеток гемо- и мезенхимопоэза в развитии пневмофиброза. Исследование в данном контексте представляет не только теоретический, но и практический интерес, так как полученные результаты позволят оценить фиброгенез легких и состояние отдельных клонов СК и прогениторных клеток при лечении нейротропными препаратами.

На первом этапе настоящего исследования проанализировано распределение СК и прогениторных клеток в костном мозге, крови и легких у мышей интактного контроля, при этом был использован подход, предложенный L. S. Meirelles и соавт. (2006) [Meirelles L. S., Chagastelles P. C., Nardi N. B., 2006]. В таблице 9 представлены изученные нами предшественники зрелых клеток и их иммунофенотипы. Как видно, в условиях оптимальной жизнедеятельности в костном мозге, крови и легких у мышей C57BL/6 нами выявлен целый ряд СК и прогениторных клеток. Свое внимание мы обратили на мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Термин мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки в настоящее время рекомендован Международным обществом клеточной терапии (ISCT) для обозначения фибробластоподобных, прилипающих к пластику клеток с определенными характеристиками (в частности, по способности *in vitro* дифференцироваться в различные клетки стромальной линии), но исследователями (Horwitz E. M. et al., 2005) используется и такой термин как мезенхимальные стволовые клетки. Нами выдвинуто предположение участия



ГСК и ММСК в патогенезе пневмофиброза. Изучению роли ГСК и ММСК в воспалении и фиброгенезе был посвящен второй этап исследования.

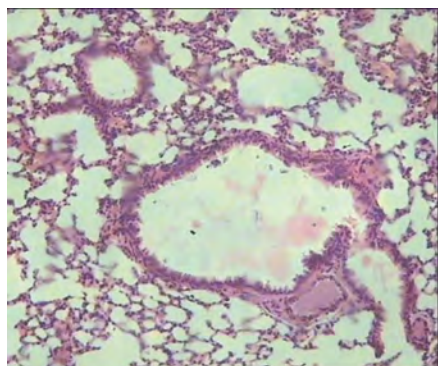
Таблица 9. Стволовые и прогениторные клетки, выявленные в костном мозге, крови и легких у мышей линии C57Bl/6.

Клетки	Иммунофенотип
«Длительно живущие» ГСК	Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup>
«Коротко живущие» ГСК	Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>
Гемопозитические прогениторные клетки	Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup>
ММСК	CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
Прогениторные эпителиальные клетки	CD45 <sup>-</sup> Ter119 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>
Прогениторные эндотелиальные клетки микрососудистого русла	CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>
Эндотелиальные клетки	CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD73 <sup>-</sup> CD90 <sup>-</sup>
Предшественники ангиогенеза	CD45 <sup>-</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
Прогениторные эндотелиальные клетки	CD309 (VEGFR2, Flk-1)
Стволовые / прогениторные клетки легких	CD45 <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup>

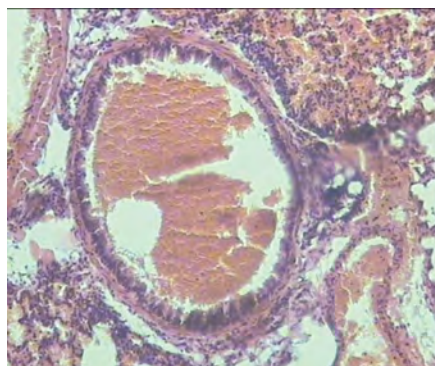
В классическом понимании токсический пневмофиброз – это поражение альвеолярного эпителия с последовательно развивающимся воспалением и фибропластическим процессом в паренхиме легких. Это было подтверждено результатами гистопатологических исследований легких мышей, получавших блеомицин. Так, на 3-и сутки эксперимента отмечались венозное полнокровие в стенках альвеол, отек эпителия межальвеолярных перегородок и воспалительная инфильтрация легочной ткани лимфоцитами, макрофагами и плазмócитами, с преимущественной локализацией вокруг крупных сосудов и бронхов. На 7-е сутки гиперемия и отек усиливались, повышалась интенсивность клеточной инфильтрации стенок альвеол, что приводило к их утолщению (рисунок 3). В просвете альвеол появлялись плазматические клетки, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты, альвеолярные макрофаги, гистиоциты. К 14-м суткам усиление отека и нарастающая диффузная инфильтрация легочного интерстиция и альвеолярных ходов воспалительными клетками приводила к значительному нарушению гисто-архитектоники легочной ткани. Стенки альвеол еще более утолщались по сравнению с 7-ми сутками, а их просвет заполнялся слущенными альвеоцитами и клетками инфильтрата. У корня легкого встречались участки, где легочный рисунок отсутствовал за счет массивной воспалительной инфильтрации. Нарушение структуры стенок альвеол приводило к образованию альвеолярных кист, что являлось начальным этапом формирования так называемого «сотового легкого». Своей максимальной активности воспаление достигало на 21-е сутки опыта.

В иммуногистохимических исследованиях мы получили подтверждение накоплению клеток воспаления (CD16<sup>+</sup> клеток) в альвеолярной ткани и поражения альвеолярного эпителия (экспрессия пан-цитокератина) и эндоте-

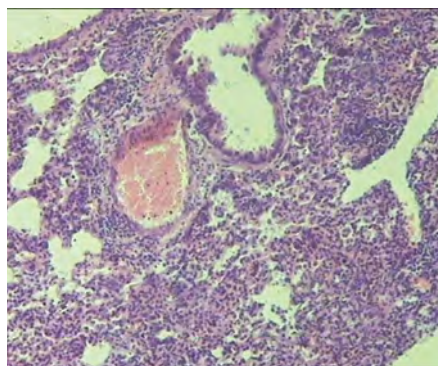
лия (CD31<sup>+</sup> клеток) у мышей в условиях введения блеомицина на 21 сутки эксперимента (рисунок 4).



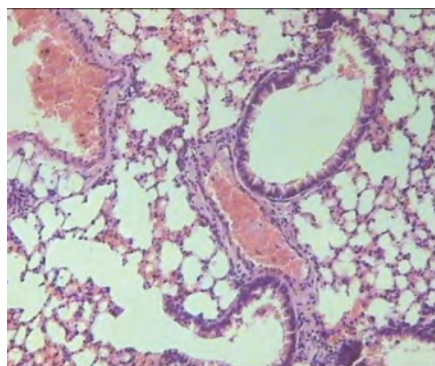
А



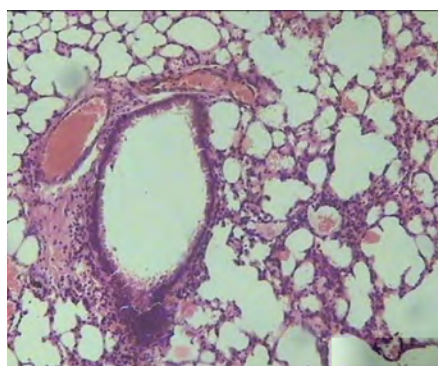
Б



В



Г



Д

Рисунок 3. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 интактного контроля (А), в условиях частично обратимого пневмофиброза на 7 сутки (Б) и 21 сутки (В), и в условиях пневмофиброза, леченных резерпином, на 7 сутки (Г) и 21 сутки эксперимента (Д). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$ .

Блеомициновая травма альвеолярного эпителия неоднозначно влияла на уровни цитокинов в сыворотке крови. Так, если уровень ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-5 достоверно превосходил у интактных животных, то концентрация TNF- $\alpha$  и ИЛ-13, напротив, снижалась. Следует отметить повышение уровня профибротического TGF- $\beta$  (на 68%,  $p < 0,05$ ) и резкий ”всплеск” противовоспалительного ИЛ-10 (в 52–26 раза,  $p < 0,05$ ) относительно интактного контроля.

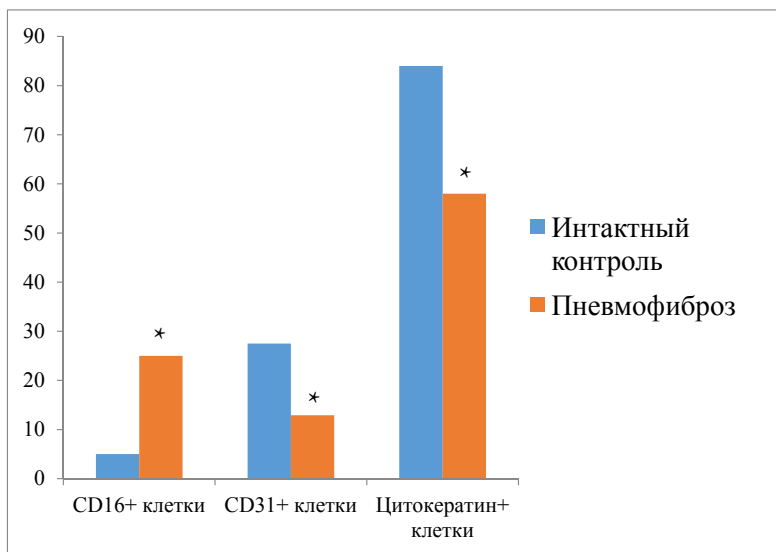


Рисунок 4. Относительное содержание клеток, экспрессирующих маркеры CD16, CD31 и пан-цитокератин (% от общего количества клеток легких), в альвеолярной ткани у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза на 21-е сутки эксперимента.

Примечание. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни).

В гомогенате легких мышей патологического контроля выявлены менее выраженные изменения, чем в сыворотке крови. Блеомицин достоверно увеличивал концентрацию воспалительных ИЛ-2 (7-е сутки) и TNF- $\alpha$  (7, 14-е сутки), и профибротического TGF- $\beta$  (14-е сутки) относительно интактных животных. Колебания ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-17 и ИЛ-10 были в пределах статистической погрешности.

Начиная с 7-х суток от начала введения блеомицина наблюдалось накопление коллагеновых волокон в легочной ткани животных, при этом соединительная ткань располагалась в основном периваскулярно и перибронхиально. На 14-е сутки имело место диффузное распространение фибротических масс, в альвеолах появлялся серозно-фибринозный экссудат. У корня легкого регистрировались участки, где легочный рисунок отсутствовал полностью. В бронхиолах образовывались мелкие кисты, структура альвеол продолжала разрушаться. На 25-е сутки после инсталляции блеомицина завершалось формирование «сотового легкого». Повышенное содержание соединительной

ткани относительно интактного контроля отмечалось и в более поздние сроки эксперимента: на 40 и 60-е сутки. Между тем, наибольшее депонирование волокон коллагена в паренхиме легких наблюдалось на 21–25-е сутки (530%,  $p < 0,05$  по отношению к показателю у интактных мышей) (таблица 10).

Таблица 10. Содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 в условиях интратрахеального введения блеомицина и применения резерпина ( $M \pm m$ ).

Сроки исследования, сутки	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный резерпином
Интактный контроль	1,03 $\pm$ 0,20	
7	1,98 $\pm$ 0,26 *	1,33 $\pm$ 0,06 * #
14	3,09 $\pm$ 0,23 *	2,94 $\pm$ 0,27 *
21	3,02 $\pm$ 0,44 *	2,75 $\pm$ 0,42 *
25	5,45 $\pm$ 0,74 *	3,85 $\pm$ 0,58 * #
40	3,47 $\pm$ 0,21 *	2,58 $\pm$ 0,30 *
60	2,77 $\pm$ 0,25 *	1,59 $\pm$ 0,39 #

Примечание:  $P < 0,05$  – отмечена достоверность различия показателя: от интактного контроля – \*, от блеомицинового контроля – #.

Для подтверждения высокой активности фиброгенеза нами был проведен ИФА общего коллагена, коллагена I, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в гомогенатах легких больных мышей. По нашим данным, блеомицин достоверно увеличивал уровни общего коллагена (на 39%), коллагена I типа (на 43%), гидроксипролина (на 75%) и гиалуроновой кислоты (на 55%) по сравнению с интактным контролем на 7 сутки эксперимента (таблица 11). На 21 сутки концентрация общего коллагена, коллагена I типа и гиалуроновой кислоты падала, но была достоверно выше, чем в интактном контроле. В то же время значение гидроксипролина практически нормализовалось, что косвенно указывало на снижение интенсивности его синтеза.

Таблица 11. Уровень коллагена I типа, гидроксипролина, гиалуроновой кислоты и общего коллагена в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях введения блеомицина ( $M \pm m$ ).

Сроки исследования	Коллаген I типа (нг/легкое)	Гидроксипролин (мкг/легкое)	Гиалуроновая кислота (нг/легкое)	Общий коллаген (мкг/легкое)
Интактный контроль	162,2 $\pm$ 11,7	6,4 $\pm$ 5,7	66,5 $\pm$ 5,4	110,9 $\pm$ 9,7
Пневмофиброз				
7 сутки	233,3 $\pm$ 22,4 *	11,2 $\pm$ 9,8 *	103,6 $\pm$ 9,5 *	154,5 $\pm$ 13,0 *
21 сутки	208,1 $\pm$ 18,4	7,3 $\pm$ 0,5	85,3 $\pm$ 7,2 *	152,6 $\pm$ 13,3 *

Примечание. \* – достоверность различия с интактным контролем ( $P < 0,05$ ).

После введения блеомицина инфильтрация легких клетками воспаления сопровождается высокой активностью костномозгового гемопоэза и лейкоцитозом в периферической крови. Хронологически этому предшествует и/или сопутствует (1–3-и сутки) усиление клональной активности гемопоэтических прогениторных клеток (Lin<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>) костного мозга: *in vitro* формируются

КОЕ-Н, КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г и КОЕ-Э. Клональная активность циркулирующих в крови прогениторных гемопоэтических клеток возростала позднее, чем у мононуклеаров костного мозга: рост КОЕ-Н отмечался на 14-е сутки эксперимента, КОЕ-ГЭММ – на 7-е сутки, и незначительное повышение числа КОЕ-Э – на 7-е сутки.

Представленные результаты цитометрических и культуральных исследований позволили нам предположить, что гемопоэтические прогениторные клетки (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>) костного мозга вовлекаются в патогенез блеомин-индуцированного воспаления. В качестве механизма провоспалительной активности выступает их избирательная дифференцировка в клетки воспаления [Skurikhin E., Pershina O., Dygai A., 2013]. Зрелые гемопоэтические клетки способны мигрировать по кровеносному руслу к органам и, в том числе, в легкие [Massberg S., Schaerli P., Knezevic-Maramica I. et al., 2007]. По всей видимости, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты-макрофаги рекрутируются из костного мозга в блеомициновые легкие, где за счет выделения профибротических цитокинов поддерживают воспаление и продукцию коллагена фибробластами. Последовательное повышение уровня мультипотентных и олигопотентных предшественников гемопоэза в костном мозге и крови объясняется мобилизацией гемопоэтических предшественников различных классов (КОЕ-Н, КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г, КОЕ-Э) в кровь. Между тем, выраженных изменений в содержании и клональной активности «длительно живущих» ГСК (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) костного мозга, крови и альвеолярной ткани мы не обнаружили, но количество «коротко живущих» ГСК (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) в фиброзированных легких возрастало, в супернатантах от этих клеток выявлялся ИЛ-1 (таблица 12). Вероятно, при данной патологии легких провоспалительное действие ГСК (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) обусловлено паракринной активностью.

Таблица 12. Содержание гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных гемопоэтических клеток в легких мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза на 7-е сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) (M±m).

Группы исследования	«Длительно живущие» ГСК (Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup> )	«Коротко живущие» ГСК (Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> )	Прогениторные гемопоэтические клетки (Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup> )
Интактный контроль	0,020±0,002	0,005±0,0004	0,025±0,002
Пневмофиброз	0,0133±0,001 *	0,0067±0,0006 *	0,020±0,002

Примечание \* – отмечена достоверность различия (P<0,05) показателя от интактного контроля.

По современным представлениям фибробласты являются основным источником интерстициального коллагена. Благодаря энергичной репликации фибробластов и избыточному отложению внеклеточного матрикса, происходит уничтожение воздушного пространства легких. Считается, что происхождение фибробластов внутрилегочное. Есть свидетельства о циркулирующих клетках крови (так называемых «фиброблотах»), которые обладают фибробласто-подобными свойствами и способны мигрировать в поврежденные ткани [Abe R.,

Donnelly S. C., Peng T. et al., 2001]. Циркулирующие фибробластные клетки, возможно, мигрируют в легкие, «оседают» в формирующемся очаге воспаления и вовлекаются в фибротические изменения [Hardie W. D., Glasser S. W., Hagood J. S., 2009; Wilson M. S., Wynn T. A., 2010]. В своих исследованиях N. Hashimoto и соавт. (2004) показали миграцию донорских костномозговых GFP<sup>+</sup>-клеток от трансгенных мышей в блеомициновые легкие химерных мышей. Одновременно в легких повышалось число GFP<sup>+</sup>-клеток, продуцирующих коллаген I типа [Hashimoto N., Jin H., Liu T. et al., 2004].

Результаты собственных исследований распределения CD45<sup>-</sup>-клеток в тканях в фибротическую фазу пневмофиброза подтверждают состоятельность гипотезы о возможном вовлечении костномозговых и циркулирующих прогениторных фибробластных клеток и фибробластов в патогенез пневмофиброза. По нашим данным, одновременно с отложением коллагеновых волокон в паренхиме блеомициновых легких на 7–21-е сутки эксперимента наблюдается поступательное увеличение количества легочных прогениторных фибробластных клеток с высокой митотической активностью (7, 14, 21-е сутки). На 21-е сутки эксперимента значение показателя наибольшее. Такому течению событий в легких предшествует увеличение клональной активности (КОЕ-Ф) CD45<sup>-</sup>-клеток костного мозга (3, 7-е сутки) и крови (7, 21-е сутки).

Не следует забывать об участии СК мезенхимального происхождения в патогенезе многих заболеваний. ММСК способны мигрировать к поврежденным тканям [Le Blanc K., Pittenger M., 2005; Siniscalco D., Sullo N., Maione S. et al., 2008]. В настоящей работе показано достоверное повышение числа ММСК (CD45-CD31-CD34-CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) в костном мозге (в 2,5 раза) и легких (в 3,8 раза) у мышей линии C57BL/6 в условиях введения блеомицина относительно интактного контроля на 21-е сутки эксперимента. Исходя из этого, нами сделан вывод о том, что увеличение количества ММСК в легких происходит вследствие мобилизации костномозговой фракции в кровь и миграции в поврежденную цитостатиком альвеолярную ткань.

Не исключено, что увеличение популяции ММСК в блеомициновых легких может происходить за счет усиления их митотической активности. Действительно, по нашим данным, полученные на 21-е сутки из фиброзированных легких мышей (фаза наибольшей интенсивности отложения коллагеновых масс) ММСК продемонстрировали высокий потенциал к самоподдержанию в условиях длительного культивирования, при этом клетки не теряли мезенхимальную морфологию и фенотип (CD45-CD31-CD34-CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>), секретируют TNF- $\alpha$  и  $\gamma$ -IFN (рисунок 5).

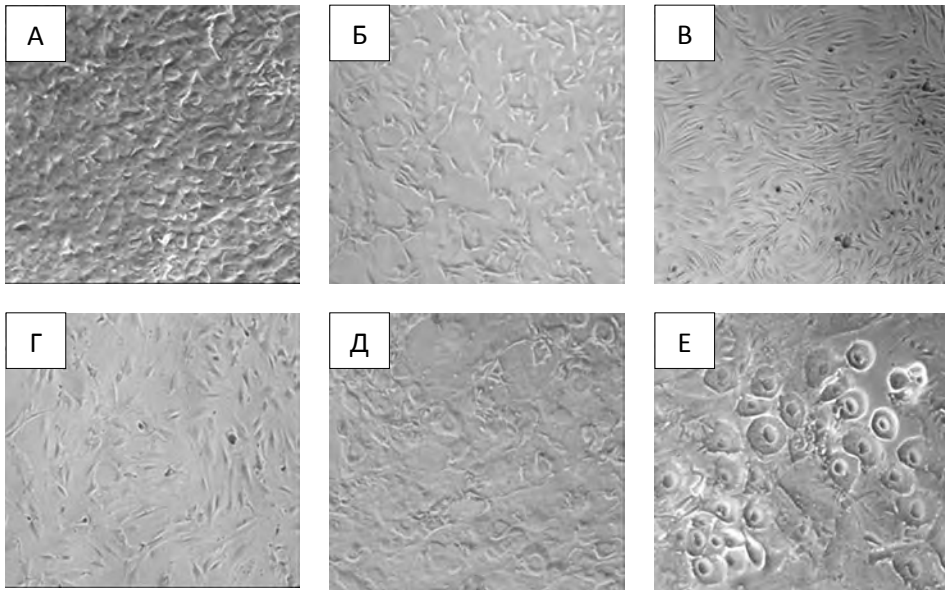


Рисунок 5. Морфология клеток в первичной культуре адгезирующих моноклеаров легких мышей линии C57BL/6. А, Б, В, Г – клетки с фибробластной морфологией; Д – клетки эпителиального типа; Е – эндотелиальный тип клеток. Увеличение –  $\times 100$ .

В экспериментах, направленных на изучение *in vitro* мультипотентности ММСК легких животных интактного контроля, была продемонстрирована способность клеток спонтанно и под влиянием ростовых факторов дифференцироваться в хондроциты, остеобласты, адипоциты, фиброциты. Интратрахеально вводимый блеомицин влияет на дифференцировку легочных ММСК в отдельные клеточные линии на 21-е сутки эксперимента. В патологическом контроле наблюдается избирательное увеличение дифференцировки ММСК в направление фибробласто-подобных клеток. Интенсивность дифференцировки в зрелые хондрогенные и остеогенные клетки снижается (таблица 13). Таким образом, при пневмофиброзе с участием легочных ММСК расширяется пул фибробластов. Как известно, фибробласты – это основные клетки-продуценты коллагена.

Итак, все приведенные выше аргументы указывают на то, что происхождение фибробластов в легких костномозговое или расширение популяции связано с дифференцировкой ММСК.

Таблица 13. Дифференцировка ММСК легких мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза на 21-е сутки эксперимента ( $M \pm m$ ).

Вид дифференцировки / единицы измерения		Интактный контроль	Пневмофиброз
Остеогенная / площадь депозитов кальция, $\text{мм}^2$	Стимулятор отсутствует	$17,73 \pm 0,89$	$3,81 \pm 0,42^*$
	$\beta$ -глицерофосфат	$136,13 \pm 24,03$	$29,32 \pm 1,47^*$

Вид дифференцировки / единицы измерения		Интактный контроль	Пневмофиброз
Адипогенная / количество клеток, содержащих липидные включения (% от общего числа мононуклеаров)	Стимулятор отсутствует	5,0 ± 0,25	3,0 ± 0,15
	Индометацин и инсулин	11,0 ± 2,32	10,0 ± 1,85
Хондрогенная / количество клеток, содержащих сульфатированные протеогликаны (% от общего числа мононуклеаров)	Стимулятор отсутствует	28,0 ± 1,4	49,0 ± 2,45*
	TGF-β <sub>1</sub>	62,0 ± 3,1	67,0 ± 3,35
Фибробластная / содержание фибробластов (% от общего числа мононуклеаров)	Стимулятор отсутствует	55,0 ± 2,75	76,3 ± 3,82*
	Фактор роста фибробластов	71,0 ± 3,55	92,0 ± 4,6*

Примечание. \* – достоверность различия с интактным контролем (P<0,05).

Дополнительно следует отметить, что в ответ на блеомициновую травму количество незрелых эпителиальных клеток (на 34%), эндотелиальных клеток микрососудистого русла (в 2,58 раза), предшественников ангиогенеза (в 4,46 раза) и так называемых стволовых/прогениторных клетки легких (в 10 раз) в альвеолярной ткани мышей с пневмофиброзом достоверно превышало таковое в интактном контроле. Так как блеомицин разрушал клетки альвеолярного эпителия и эндотелия, вовлечение предшественников эндотелиальных и эпителиальных клеток в регенерацию закономерно.

## 5.2. Симпатолитик резерпин

При изучении вопроса о возможном влиянии симпатолитика резерпина на развитие токсического пневмофиброза был выявлен ряд закономерностей. Так результаты гистологических и иммуногистохимических показали, что резерпин заметно снижает интенсивность деструктивных процессов в легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения блеомицина, на что указывает достоверное увеличение в альвеолярной ткани клеток, экспрессирующих CD31 (в 2,27 раза) и пан-цитокератин (на 33%), относительно не леченных мышей с пневмофиброзом. В воспалительную фазу пневмофиброза отмечается уменьшение инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов CD16<sup>+</sup> клетками: сокращались фракции лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и плазматических клеток. В фибротическую фазу болезни симпатолитик препятствует разрастанию соединительной ткани в легочной паренхиме (таблица 10; рисунок 3).

Одновременно с противовоспалительной и антифибротической активностью резерпин отменяет нейтрофильный лейкоцитоз и лимфоцитоз в периферической крови. В костном мозге леченных животных с пневмофиброзом количество нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов снижается до уровня интактного контроля. Эти результаты предопределили изучение механизма действия симпатолитика на систему крови.



Показано, что резерпин снижает клональную активность (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г) костномозговых и циркулирующих в крови гемопоэтических прогениторных клеток (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>) на 3, 7, 14-е сутки эксперимента. Далее было изучено действие резерпина на ГСК. Препарат повышает количество «длительно живущих» ГСК и уменьшал до уровня интактного контроля число «коротко живущих» ГСК в легких больных животных (7-е сутки), при этом значительно увеличивается число ГСК обеих фракций в костном мозге.

На фоне замедления развития альвеолита возможное объяснение противоположного действия резерпина на ГСК и гемопоэтические прогениторные клетки мы нашли в гипотезе о «нишах» для ГСК. По современным представлениям, постнатальные костномозговые ГСК находятся в равновесии с небольшой фракцией циркулирующих ГСК. Предполагается, что при нарушении физиологического ритма жизнедеятельности (введение лекарственных препаратов, болезнь) происходит мобилизация ГСК. Стволовые клетки костного мозга мигрируют через эндотелиальный барьер и циркулируют в кровотоке без немедленного возврата (хоуминга) в костный мозг или другой орган [Wilson A., Trumpp A., 2006]. По мнению J. Zhang (2003), L. M. Calvi (2003) и соавт., «длительно живущие» ГСК расположены в непосредственном контакте с остеобластами, выстилающими переход коркового костного мозга (эндост) [Calvi L. M., Adams G. B., Weibrecht K. W. et al., 2003; Zhang J., Niu C., Ye L. et al., 2003]. Другое возможное местоположение в костном мозге для ГСК – сосудистая «ниша». В сосудистой «нише» ГСК связаны с фенестрированным эндотелием специализированных сосудов костного мозга («слепые мешки»), названных синусоидами [Kiel M. J., Yilmaz O. N., Iwashita T. et al., 2005]. Синусоиды костного мозга продуцируют молекулы, важные для мобилизации ГСК, хоуминга и приживания, включая цитокины, такие как хемокин CXCL-12, молекулу клеточно-сосудистой адгезии 1 (VCAM-1), эндотелиальный клеточный (E) селектин и другие молекулы адгезии. ГСК с глубоким дефектом клеточной миграции в результате потери комбинированной функции сигнальных путей CXCR4,  $\beta$ 1-интегринов и c-kit могут быть мобилизованными в больших количествах [Cancelas J. A., Lee A. W., Prabhakar R. et al., 2005]. Природа «ниш» такова, что симпатические нервные волокна выступают одним из ее элементов [Katayama Y., Battista M., Kao W. M. et al., 2006]. Остеобласты экспрессируют  $\beta_2$ -адренергические рецепторы, являясь тем самым прямыми эффекторами передачи симпатических сигналов [Eleftheriou F., Ahn J. D., Takeda S. et al., 2005]. Такая архитектура способствует восстановлению костного мозга: катехоламины инициируют секрецию остеобластами цитокинов, действие которых связано со стимуляцией «длительно живущих» ГСК. По мнению Y. Katayama и соавт. (2006), симпатические нейроны не образуют синапсы с каждой клеткой «ниши» [Katayama Y., Battista M., Kao W. M. et al., 2006]. Передача сигнала к соседним клеткам, вероятно, осуществляется через прямые межклеточные контакты. Представленная картина во многом объясняет то, каким образом адренергическая система участвует в управлении ГСК при пневмофиброзе, в том числе их накопление в легких.

Резерпин – ингибитор везикулярного захвата катехоламинов и серотонина. Препарат оказывает двухфазное влияние на тоническую и рефлекторную активность симпатической нервной системы, а также на вазомоторные рефлексы [Каверина Н. В., Розанов Ю. Б., 1967; Турова А. Д., Сапожникова Э. Н., 1984]. Первая депримирующая фаза действия резерпина на центры вазомоторной регуляции обусловлена возбуждением высвобождаемыми моноаминами центральных тормозных моноаминергических структур. Эта фаза совпадает с увеличением содержания свободных, функционально активных форм моноаминов в мозге [Каверина Н. В., Розанов Ю. Б., 1984; Slotkin T. A., Edwards K., 1973; Carmichael S. W., Weber A., Winkler H., 1980]. Кратковременным повышенным уровнем свободных и функционально активных форм моноаминов в нервной системе в депримирующую фазу с последующим стимулирующим паракринным действием остеобластов можно объяснить выход из «ниши» и миграцию в легкие «длительно живущих» ГСК в условиях введения резерпина при пневмофиброзе.

Вторая фаза действия развивается через 2–4 ч после введения и характеризуется увеличением тонической активности и вазомоторных рефлексов и полным устранением рефлекторного торможения в симпатических нервах. По времени вторая фаза совпадает с периодом истощения лабильного запаса моноаминов в мозговой ткани. Именно этим эффектом симпатолитика мы объясняем снижение активности дифференцировки находящихся вне «ниши» «коротко живущих» ГСК в клетки иммунной системы, а также нарушение их хоминга в легкие.

Участие клеток мезенхимального происхождения в развитии пневмофиброза явилось основанием для изучения действия резерпина на ММСК и прогениторные фибробластные клетки в период интенсивного отложения коллагена в легких – 21-е сутки эксперимента. По нашим данным, препарат сокращает популяцию CD45-CD31-CD34-CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>-клеток в паренхиме фиброзированных легких. Примечательно, но при исследовании мультипотентности мы не выявили существенных изменений со стороны дифференцировки ММСК из фиброзированных легких в адипоциты, фибробласты, остеобласты и хондрогенные клетки [Скурихин Е. Г., Хмелевская Е. С., Першина О. В. и др., 2012]. Под действием симпатолитика заметно сокращается популяция костномозговых ММСК.

Ингибирующее действие резерпин оказывает и на прогениторные фибробластные клетки. Как видно из таблицы 14, клональная активность CD45-мононуклеаров легких и костного мозга уменьшается в фазу высокой интенсивности фибропластического процесса (7, 14, 21-е сутки). Следует отметить то обстоятельство, что в фазу воспаления – 3, 7-е сутки, симпатолитик оказывает стимулирующее действие на клональную активность костномозговых и циркулирующих в крови прогениторных фибробластных клеток.

Из результатов этой серии экспериментов следует, что снижение резерпином активности фиброгенеза связано с уменьшением содержания в поврежденной блеомицином паренхиме легких клеток мезенхимального происхождения (ММСК, прогениторные фибробластные клетки). Выявленный эффект является следствием нарушения миграции ММСК и прогениторных

фибробластных клеток из костного мозга и, вероятно, других органов-депо в легкие. Не исключено, что симпатолитик может снижать интенсивность пролиферации прогениторных фибробластных клеток.

Таблица 14. Клональная активность (КОЕ-Ф,  $\times 10^5$  адгезирующих мононуклеаров) CD45<sup>+</sup>-клеток костного мозга, крови и легких мышей линии C57BL/6 в условиях интратрахеального введения блеомицина и применения резерпина ( $M \pm m$ ).

Сроки исследования		Костный мозг	Кровь	Легкие
Интактный контроль		4,83 $\pm$ 0,75	0	0
3 сутки	1	30,17 $\pm$ 9,01 *	0	0
	2	52,17 $\pm$ 10,16 * #	0,17 $\pm$ 0,17 *	0
7 сутки	1	28,33 $\pm$ 3,62 *	0,17 $\pm$ 0,17 *	3,00 $\pm$ 0,40 *
	2	18,17 $\pm$ 2,23 *	1,67 $\pm$ 0,67 * #	0
14 сутки	1	3,17 $\pm$ 0,60 *	0	11,00 $\pm$ 0,80 *
	2	1,33 $\pm$ 0,42 *	0	0
21 сутки	1	1,83 $\pm$ 0,54 *	0,67 $\pm$ 0,33 *	18,30 $\pm$ 1,70
	2	0,67 $\pm$ 0,33 *	0	8,27 $\pm$ 1,28 #

Примечание: 1 – мыши, получавшие блеомицин, 2 – мыши, получавшие резерпин на фоне моделирования фиброза легких;  $P < 0,05$  – отмечена достоверность различия показателя: от интактного контроля – \*, от блеомицинового контроля – #.

Обсуждая вопрос об основах регенерации легких при введении симпатолитика, следует учитывать то обстоятельство, что в популяцию CD45<sup>+</sup>-клеток входят не только ММСК и прогениторные фибробластные клетки. Отсутствие CD45 рецептора характеризует стволовые клетки бронхиол, которые определяются как CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>low</sup> и AF<sup>low</sup> (клетки Клара) [Teisanu R. M., Lagasse E., Whitesides J. F. et al., 2009]. По результатам наших цитометрических исследований следует, что резерпин повышает количество легочных CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-клеток. Во многом этот эффект объясняется снижением симпатолитиком активности альвеолита и, как следствие, уменьшением ингибирующего влияния факторов воспаления на клетки Клара.

Результаты фармакологического раздела настоящего исследования дают основание предложить новый медикаментозный подход в лечении ИЛФ, в основе которого лежит избирательная модуляция мобилизации и миграции симпатолитиком резерпином стволовых и прогениторных клеток мезенхимального и гемопоэтического ряда.

### 5.3. Антисеротониновые препараты кетансерин и ципрогептадин

Эффективное лечение больных с пневмофиброзом может быть связано с регуляцией серотонинового звена патогенеза фиброза. Как уже выше было сказано, блокатор 5-HT<sub>2</sub> рецепторов кетансерин и блокатор 5-HT<sub>2B</sub> рецепторов SB215505 существенно снижают содержание коллагена и проколлагена I, экспрессию мРНК проколлагена 3 в пораженных блеомицином легких

животных [Fabre A. et al., 2008]. При этом уменьшается уровень таких ключевых факторов фиброза, как TGF- $\beta$ 1, CTGF и PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1).

В свете выше изложенного, мы изучили противовоспалительную и антифибротическую активности  $H_1$ -антигистаминного и 5-HT<sub>2</sub>-антисеротонинового средства ципрогептадина и антагониста серотониновых 5-HT<sub>2</sub>-рецептором кетансерина у мышей линии C57BL/6 при экспериментальном пневмофиброзе. Кроме этого, в этих условиях была проведена оценка содержания и функциональной активности СК и прогениторных клеток мезенхимального и гемопоэтического происхождения в легких и других тканях. Ципрогептадин и кетансерин вводили в фазу острого воспаления внутрибрюшинно курсом.

Как видно из рисунка 3, ципрогептадин снижает активность инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления (макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты, плазматические клетки) у мышей в условиях введения блеомицина на 7-е сутки эксперимента, сокращает площадь соединительной ткани на 21-е сутки (таблица 15; рисунок 6). Подобное противовоспалительное и антифибротическое действие на альвеолярную ткань оказывал кетансерин.

Таблица 15. Содержание соединительной ткани (% от площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином и кетансерином ( $M \pm m$ )

Сроки исследования, сутки	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	Пневмофиброз, леченный кетансерином
Интактный контроль	1,26 $\pm$ 0,25		
7	1,98 $\pm$ 0,28	1,27 $\pm$ 0,26 ●	1,24 $\pm$ 0,13 ●
21	3,94 $\pm$ 0,34 *	1,99 $\pm$ 0,22 ●	2,34 $\pm$ 0,25 * ●

Примечание \* – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

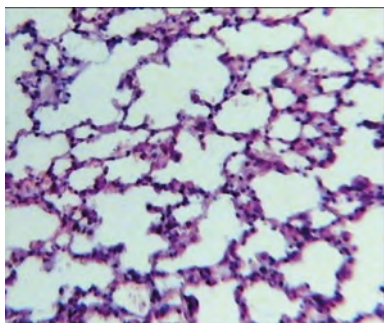
Иммуноферментный анализ (ИФА) позволил выявить значительное уменьшение концентрации гиалуроновой кислоты, общего коллагена, коллагена I типа и гидроксипролина в легочной ткани при лечении препаратами пневмофиброза на 21-е сутки эксперимента (таблица 16).

Таблица 16. Содержание общего коллагена, коллагена I типа, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансерином на 21-е сутки опыта ( $M \pm m$ )

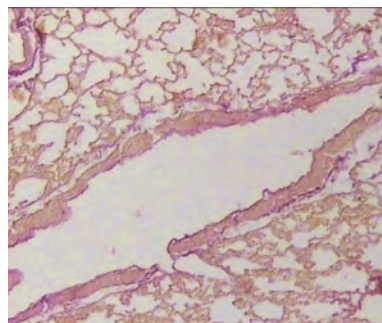
Группы исследования	Коллаген I типа (нг/легкое)	Гидроксипролин (нг/легкое)	Гиалуроновая кислота (пг/легкое)	Общий коллаген (мкг/легкое)
Интактный контроль	121,1 $\pm$ 11,7	2915 $\pm$ 240	28054 $\pm$ 2441	69,6 $\pm$ 6,3
Пневмофиброз	233,3 $\pm$ 22,4 *	8714 $\pm$ 651 *	98948 $\pm$ 6954 *	117,2 $\pm$ 11,4 *
Пневмофиброз, леченный кетансерином	214,6 $\pm$ 19,7 *	4867 $\pm$ 389 * ●	47211 $\pm$ 4211 * ●	109,9 $\pm$ 9,7 *

Группы исследования	Коллаген I типа (нг/легкое)	Гидроксипролин (нг/легкое)	Гиалуроновая кислота (пг/легкое)	Общий коллаген (мкг/легкое)
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	141,8±13,5 ●	3901±364 ●	39541±3725 * ●	79,3±7,4 ●

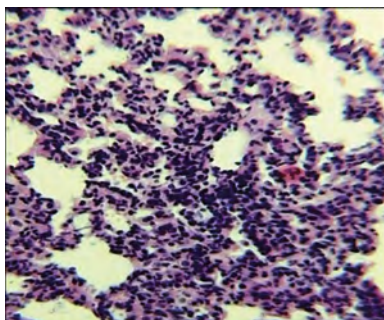
Примечание \* – отмечена достоверность различия ( $P<0,05$ ) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия ( $P<0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.



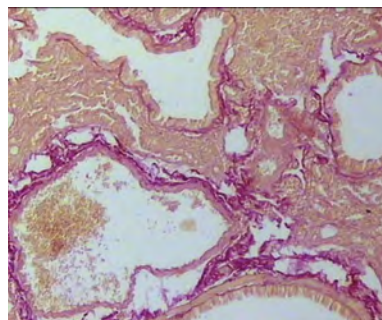
А



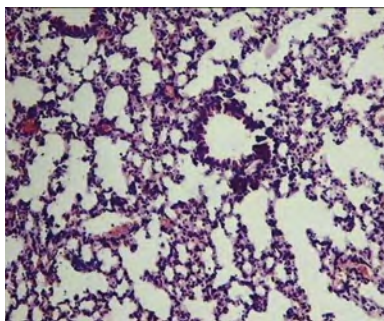
Б



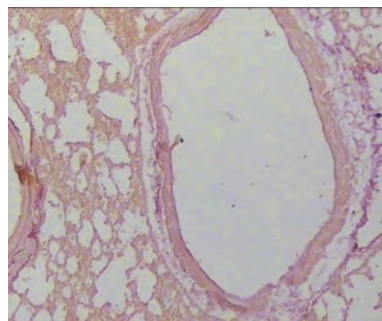
В



Г



Д



Е

Рисунок 6. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 интактного контроля (А, Б), в условиях пневмофиброза (В, Г), при лечении пневмофиброза ципрогептадином (Д, Е). Окраска гематоксилином и эозином (А, В, Д), ув.  $\times 300$ , препараты изготовлены на 7-е сутки опыта; окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (Б, Г, Е), ув.  $\times 100$ , препараты изготовлены на 21-е сутки опыта.

Представленные результаты гистологических исследований и ИФА позволяют рассматривать ципрогептадин и кетансерин в качестве противовоспалительных лекарственных средств при фиброзе легких, в том числе ИЛФ. Важна способность соединений препятствовать фиброгенезу в легких. Следует отметить, что по сравнению с ципрогептадином ингибирующие эффекты кетансерина на ряд показателей (общий коллаген, коллаген I типа, гидроксипролин, гиалуроновая кислота, IL-1 $\beta$ ) менее выражены.

На начальной стадии воспаления макрофаги и нейтрофилы не только очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, но и продуцируют различные цитокины и хемокины (в том числе IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 и TGF- $\beta$ ) [Hesse M. et al., 2001; Bringardner B. D. et al., 2008]. Т-хелперные клетки участвуют в формировании характерного для различных фиброзных состояний легкого профиля воспалительных цитокинов [Agostini C., Gurrieri C., 2006]. Элементами профиля являются IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  относят не только к медиаторам воспаления, цитокин выступает индуктором миграции фибробластов вдоль границы внеклеточного матрикса [Garcia-Alvarez J. et al. 2006; Gill S. E. et al., 2008], стимулирует продукцию фибробластами коллагена [Wenzel S. E. et al., 2002; Malavia N. K. et al., 2008]. По нашим данным, блеомицин снижает концентрацию TGF- $\beta$  в гомогенатах правой доли легкого на 3-и сутки эксперимента (таблица 17). В то же время уровень сывороточных IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$  значительно возрастает. Считается, что такое соотношение воспалительных и фибротических медиаторов выступает плохим прогностическим критерием для экспериментального фиброза легкого [Fabre A. et al., 2008]. В этой связи мы обратили свое внимание на регуляторные эффекты медиаторов воспаления. Две независимые группы исследователей под руководством Rodriguez S. (2009) и Scumpia P. O. (2010) указывают на то, что при бактериальной и вирусной инфекциях регистрируется расширение костномозговой фракции ГСК [Rodriguez S. et al., 2009; Scumpia P. O. et al. 2010]. Такое поведение костномозговых ГСК обусловлено высокой концентрацией IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  [Jaiswal S. et al., 2009; Baldrige M. T. et al., 2010]. Выявленные нами ранее миграция в травмированные легкие и дифференцировка в клетки воспаления «коротко живущих» костномозговых ГСК при пневмофиброзе, возможно, связаны с IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$ . Между тем, серотонин участвует в экспансии циркулирующих в крови CD34<sup>+</sup> стволовых/прогениторных клеток [Yang M., Li K., Ng P. C. et al., 2007]. С нашей точки зрения, обусловленная воспалительными и фибротическими медиаторами регуляция ГСК и серотониновая регуляция ГСК находятся в тесной взаимосвязи. Не исключено влияние серотонина на продукцию медиаторов воспаления. Связь нервной системы (в том числе серотонина) и клеток иммунной системы была продемонстрирована ранее Девойно Л. В. и Ильюченко Р. Ю. (1993). В этой связи нами не исключается, что антисеротониновые препараты способны оказывать свое влияние на ГСК и прогениторные гемопоэтические клетки.

Таблица 17. Уровни IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$  в сыворотке крови и в гомогенате правой доли легкого мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансерином на 3-и сутки опыта (M $\pm$ m)

Группы исследования	Сыворотка крови		Гомогенат легкого	
	IL-1 $\beta$ , pg/ml	TGF- $\beta$ , ng/ml	IL-1 $\beta$ , pg/ml	TGF- $\beta$ , ng/ml
Интактный контроль	29,6 $\pm$ 2,8	0,6 $\pm$ 0,05	517,2 $\pm$ 50,3	81,8 $\pm$ 8,4
Пневмофиброз	160,4 $\pm$ 15,4 *	30,2 $\pm$ 2,7 *	561,2 $\pm$ 55,9	57,9 $\pm$ 4,8 *
Пневмофиброз, леченный кетансерином	95,8 $\pm$ 8,8 * ●	8,6 $\pm$ 1,2 * ●	287,6 $\pm$ 24,4 * ●	70,6 $\pm$ 8,6
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	118,9 $\pm$ 10,3 * ●	11,2 $\pm$ 0,9 * ●	64,2 $\pm$ 6,2 * ●	26,5 $\pm$ 2,3 * ●

Примечание \* – отмечена достоверность различия (P<0,05) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия (P<0,05) показателя от пневмофиброза без лечения.

При изучении этого вопроса выявлены следующие закономерности. Во-первых, при моделировании пневмофиброза ципрогептадин и кетансерин снижают высокий уровень IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$  в сыворотке крови и гомогенате легкого животных (3-и сутки). Во-вторых, антисеротониновые препараты заметно уменьшают количество «длительно живущих» и «коротко живущих» ГСК в легких мышей в сроки развития альвеолита, при этом костномозговая фракция ГСК, напротив, расширяется (рисунок 7).

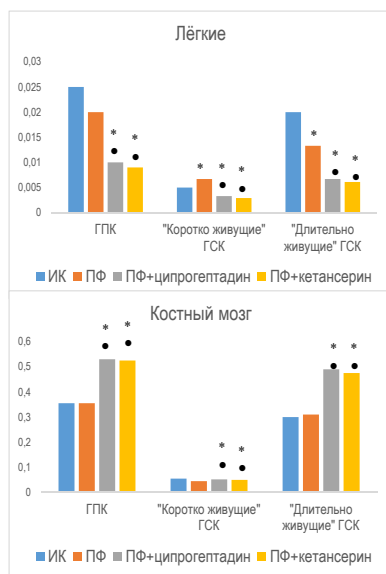


Рисунок 7. Содержание гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК), «Коротко живущих» и «Длительно живущих» ГСК в легких и костном мозге мышей линии C57BL/6 интактного контроля, в условиях пневмофиброза без лечения и леченных кетансерином или ципрогептадином на 7-е сутки опыта (% от всех окрашенных мононуклеаров).

Примечание \* – отмечена достоверность различия (P<0,05) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия (P<0,05) показателя от пневмофиброза без лечения.

По современным представлениям соотношение между «коротко живущими» и «длительно живущими» ГСК указывает на интенсивность дифференцировки ГСК. По нашим данным при пневмофиброзе это соотношение составило 1,45, при лечении ципрогептадином и кетансерина значение показателя снижается соответственно до 1,05 и 1,06. Следует обратить внимание на то обстоятельство, что при лечении число гемопоэтических прогениторных клеток (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>) и зрелых клеток системы крови в костном мозге, селезенке и крови уменьшалось. Одновременно отмечалось снижение клонональной активности КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г и КОЕ-Э.

Представленные данные культуральных исследований, проточной цитометрии, морфологии костного мозга и периферической крови позволили нам сделать следующее предположение. Вероятно, при пневмофиброзе ципрогептадин и кетансерин, связываясь с 5HT<sub>2</sub> на ГСК и гемопоэтических прогениторных клетках, блокирует серотониновую составляющую пролиферации и дифференцировки. Как итог взаимодействия лиганда и рецептора выступает уменьшение клеточности гранулоцитарного и лимфоидного ростка кроветворения. Нарушение мобилизации и миграции ГСК в очаг повреждения объясняется нами ингибирующим действием препаратов на цитокиновый (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ ) механизм хоминга.

Серотонин относят к основному медиатору начальных микроциркуляторных нарушений в очаге воспаления и быстрого повышения сосудистой проницаемости. Амин участвует в вазоконстрикции [Nishihira K. et al., 2006; Kekewska A. et al., 2012], его вазоконстрикторное действие чаще всего обусловлено взаимодействием с 5-HT<sub>2R</sub> серотониновыми рецепторами мембран гладкомышечных клеток [Машковский М. Д., 2006; Венгеровский А. И., 2007]. Вазоконстрикторный эффект серотонина частично обусловлен тромбоксаном A<sub>2</sub>, высвобождающимся при агрегации тромбоцитов и лейкоцитов в участках сосуда с поврежденным эндотелием. Активация 5-HT<sub>2R</sub> серотониновых рецепторов на поверхности тромбоцитов служит триггерным механизмом усиления сосудистого спазма под действия тромбоксанов. При воспалительных заболеваниях легких серотонин, сужая сосуды микроциркуляторного русла, вызывает увеличение давления в капиллярах, что на фоне повышения клеточной проницаемости (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги) усиливает трансудацию жидкости во внесосудистое пространство легких. Этот механизм во многом раскрывает причину массивной инфильтрации легких «коротко живущими» ГСК в наших экспериментах и работах авторов других исследовательских групп [Nishihira K. et al., 2006; Kekewska A. et al., 2012]. Объяснение количественным изменениям клеток воспаления и их предшественников в блеомициновых легких при блокаде постсинаптических С<sub>2</sub> серотониновых рецепторов назначением ципрогептадина и кетансерина нам видится в нарушении взаимодействия серотонина с 5-HT<sub>2R</sub> серотониновыми рецепторами. Антисеротониновые препараты препятствуют вазоконстрикции и нарушают серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Это приводит к частичному восстановлению гемодинамики в микроциркуляторном



русле, уменьшению проницаемости и снятию бронхоспазма, и в силу обратной связи накоплению предшественников клеток крови в костномозговой ткани.

При легочном воспалении реализуется бронхоконстрикторное действие серотонина [Logic S. et al., 1995; Marcos E. et al., 2004]. В генезе серотонинового бронхоспазма очень важна роль отечного механизма нарушения гемодинамики в микроциркуляторном русле. Бронхоконстрикторное действие серотонина опосредуется через систему эйкозаноидов (лейкотриены, простагландины, тромбоксан А) и гистамина [Машковский М. Д., 2006; Венгеровский А. И., 2007]. Учитывая это, антисеротониновые препараты, вероятно, купируют серотонин-индуцированную бронхоконстрикцию.

В представленных выше главах мы указали на то, что препарат ципрогептадин обладает несколькими видами фармакологической активности. Кроме блокады серотониновых рецепторов, отмечается антигистаминовая активность, аффинность молекулы ципрогептадина с дофаминовыми, адренергическими и мускариновыми рецепторами высока [Clineschmidt B. V., 1976; Remy D. C., 1977]. Препарат ингибирует калиевые ( $K^+$ ) и натриевые ( $Na^+$ ) каналы, N-тип и L-тип кальциевых ( $Ca^{2+}$ ) каналов [Kotake H., 1987]. С этих позиций не исключено, что основой более выраженного противовоспалительного эффекта ципрогептадина по сравнению с кетансерином, что было продемонстрировано выше, выступает дополнительное действие на гистаминовые, дофаминовые, адренергические и мускариновые рецепторы, 5-НТ<sub>2</sub> рецептор-независимое влияние на ионные каналы, что приводит к соответствующим эффектам.

Клетки мезенхимального происхождения – это еще одна важная популяция клеток, участвующая в фиброзе легких после блеомициновой травмы [Fabre A. et al., 2008; Skurikhin EG et al., 2014]. В настоящей работе, мы стремились исследовать наиболее распространенные маркеры, используемые для характеристики ММСК. Легочные мезенхимальные клетки, привлеченные в легкие мышей на 21-е сутки фиброза, были отрицательные по маркерам CD31, CD34, CD45 и экспрессировали CD44, CD73, CD90, CD106. Эта фракция относится к мультипотентным клеткам, в длительных культурах демонстрирует высокий потенциал к самообновлению [Skurikhin EG et al., 2014]. Дополнительно после назначения блеомицина наблюдался выход в циркуляцию в кровь и миграция к очагу воспаления в легких прогениторных фибробластных клеток костного мозга. Лечение пневмофиброза ципрогептадином приводит к снижению клональной активности КОЕ-Ф костного мозга (21, 40-е сутки), крови и селезенки (21-е сутки), легких (14, 21-е сутки) (таблица 18; рисунок 8). Аналогичная картина наблюдается при назначении кетансерина.

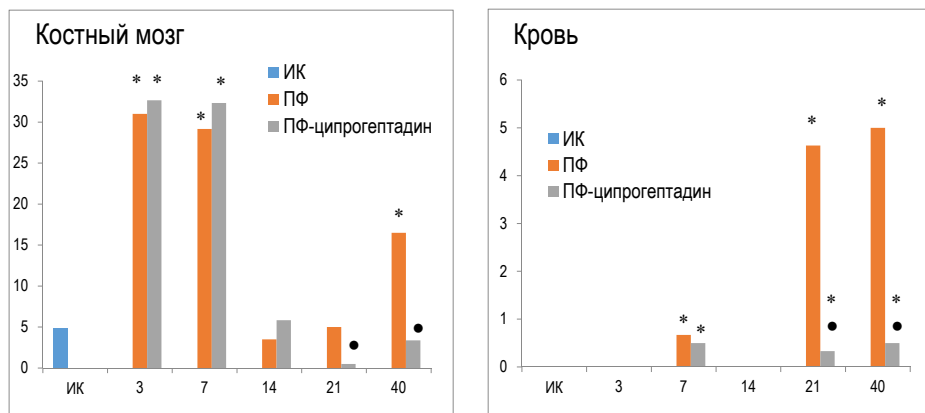


Рисунок 8. Клональная активность ((КOE-Ф,  $\times 10^5$  адгезирующих мононуклеаров) CD45-клеток костного мозга, крови и селезенки мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином.

Примечание \* – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, • – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

Таблица 18. Клональная активность (КOE-Ф,  $\times 10^5$  адгезирующих мононуклеаров) CD45-клеток легких у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансерином ( $M \pm m$ ).

Группы	КOE-Ф
Интактный контроль	0
<b>14-е сутки</b>	
Пневмофиброз	6,25±0,45 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	2,45±0,28 * •
Пневмофиброз, леченный кетансерином	2,84±0,47 * •
<b>21-е сутки</b>	
Пневмофиброз	15,24±1,25 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	4,50±0,47 * •
Пневмофиброз, леченный кетансерином	5,75±0,75 * •

Примечание \* – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, • – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

Другой важный аспект антифибротического действия препаратов с антисеротониновой активностью связан с МСК-подобными клетками. В настоящей работе продемонстрировано, что блокада 5-HT<sub>2</sub> рецепторов увеличивает количество МСК в легких (21-е сутки). Эти данные противоречат морфологическим эффектам ципрогептадина и кетансерина. Культуральные исследования позволили выявить причину этих противоречий. Так как ципрогептадин кроме блокады серотониновых рецепторов выступает антагонистом гистаминовых, дофаминовых, адренергических и мускариновых рецепторов, а в эксперименте необходима избирательная блокада 5-HT<sub>2</sub> серотониновых рецепторов, в этой связи в качестве инструмента мы выбрали кетансерин.

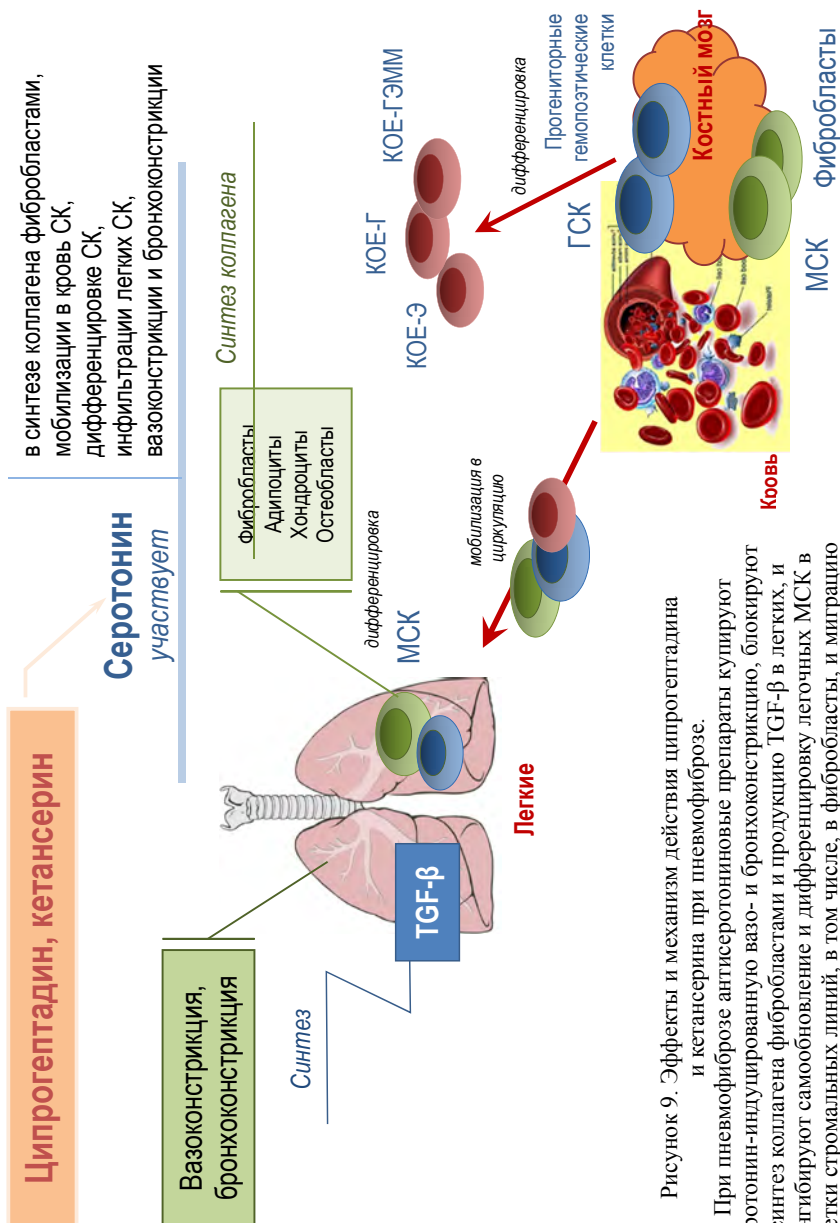
По нашим данным кетансерин уменьшает активность формирования монослоя из легочных CD45<sup>-</sup>-клеток с фибробластоподобной морфологией, при этом количество CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> -клеток в образцах опытной группы на 30% снижается по сравнению с контрольной группой.

Кетансерин оказывает ингибирующее влияние и на дифференцировку МСК-подобных клеток, полученных в результате длительного культивирования. В культурах МСК опытной группы отмечается достоверное уменьшение доли клеток с окрашенными кислотными и ацетатными муцинами, и доли клеток с липофильными включениями по отношению к соответствующим культурам контрольной группы. Кроме этого, лечение уменьшает выход фибробластов в образцах опытной группы до уровня интактного контроля. Интенсивность остеогенной дифференцировки остается без изменений.

Итак, кетансерин оказывает ингибирующее действие на прогениторные фибробластные клетки, снижает потенциал к самообновлению МСК при длительном культивировании, уменьшает активность дифференцировки МСК в направлении хондроцитов, адипоцитов и фибробластных клеток *in vitro*. Вероятно, этот механизм выступает основой гистологических эффектов антисеротониновых препаратов.

Подводя итог разделу нашей работы, посвященному изучению механизма действия антисеротониновых препаратов на модели фиброза легких, индуцированного блеомицином, необходимо сказать о том, что легочная фракция CD45<sup>-</sup> незрелых клеток мезенхимального происхождения гетерогенна. Помимо прогениторных фибробластных клеток и МСК, участвующих в фиброгенезе, фракция обогащена клетками с фенотипом (CD34, CD45, CD3, CD8, CD19)<sup>-</sup>(Sca-1, CD44, CD73)<sup>+</sup>, способных дифференцироваться в эпителиальные клетки и, тем самым, участвовать в регенерации легочного эпителия [Bitencourt C. S., Pereira P. A. T., Ramos S. G. et al., 2011]. Можно предположить, что антисеротониновые препараты способствуют избирательной стимуляции дифференцировки (CD34, CD45, CD3, CD8, CD19)<sup>-</sup>(Sca-1, CD44, CD73)<sup>+</sup> -клеток в эпителиальные клетки. Нами не исключается стимуляция кетансерином регенерации альвеолярного эпителия путем вовлечения в процесс стволовых клеток бронхиол (Клетки Клара) (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>AF<sup>low</sup>), которые, так же как и изученные нами МСК и прогениторные фибробластные клетки, негативны по CD45.

Эффекты и механизм действия ципрогептадина и кетансерина при пневмофиброзе представлены на рисунке 9. Антисеротониновые препараты не только купируют серотонин-индуцированную вазо- и бронхоконстрикцию, блокируют синтез коллагена фибробластами и продукцию TGF- $\beta$  в легких [Fabre A. et al., 2008], но и ингибируют самообновление и дифференцировку легочных МСК в клетки стромальных линий, в том числе, в фибробласты, миграцию мезенхимальных предшественников в легкие. С блокадой 5-HT<sub>2R</sub> серотониновых рецепторов мы связываем ингибицию костномозговых ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток (дифференцировка, клональная активность, мобилизация в циркуляцию).



**Рисунок 9.** Эффекты и механизм действия цитрогептадина и кетасерина при пневмофиброзе.

При пневмофиброзе антисеротониновые препараты купируют серотонин-индуцированную вазо- и бронхоконстрикцию, блокируют синтез коллагена фибробластами и продукцию TGF- $\beta$  в легких, и ингибируют самообновление и дифференцировку легочных МСК в клетки стромальных линий, в том числе, в фибробласты, и миграцию мезенхимальных предшественников в легкие. С блокадой 5-HT<sub>2</sub> серотониновых рецепторов связана ингибция костномозговых ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток (дифференцировка, клональная активность, мобилизация в циркуляцию).

## 5.4. Антагонисты дофаминовых рецепторов

Хорошо известно, что дофамин проявляет свои регуляторные функции в отношении иммунокомпетентных клеток [Девойно Л. В., Ильюченко Р. Ю., 1993]. Отмечается, что эффект амина зависит от его концентрации и состояния мишени. Так, в физиологических концентрациях дофамин стимулирует нативные Т-лимфоциты, индуцируя адгезию и хемотаксис CD45RA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток. С другой стороны, наблюдается снижение активности Т-киллеров, в частности уменьшение секреции IL-2, IL-6, и IL-4 [Levite M, 2015]. Дофамин снижает фагоцитарную активность нейтрофилов, их способность к хемотаксису и угнетает продукцию активных форм кислорода. При этом нарушение адгезии к эндотелию в случае действия амина связывают с уменьшением плотности маркеров CD11b и CD18 на поверхности нейтрофилов. В высоких концентрациях (1–5 мкг/мл) дофамин оказывает цитотоксическое действие на моноциты, дозы в десять раз меньшие (0,1–0,5 мкг/мл) повышают фагоцитарную активность клеток [Argeola R, Alvarez-Herrera S et al, 2016]. Исходя из этого, нам видится перспективным тактика коррекции воспаления при фиброзе легких, основанная на использовании соединений, изменяющих активность дофаминовой системы.

Из результатов гистологического анализа препаратов легких, окрашенных гематоксилином и эозином следует, что на модели частично обратимого пневмофиброза спиперон (блеомицин вводится однократно) уменьшал инфильтрацию интерстиция альвеол и альвеолярных ходов воспалительными клетками (плазматические клетки, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты) по сравнению с группой животных с не леченным альвеолитом (7–14-й день). Данные иммуногистохимических исследований подтверждают этот вывод: в легких животных с пневмофиброзом, получавших спиперон, количество CD16<sup>+</sup>-клеток сокращалось на 60% относительно группы патологического контроля.

Таким образом, при пневмофиброзе спиперон оказывает ингибирующее влияние на активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов.

Хронологически выявленным изменениям со стороны морфологически распознаваемых клеток предшествовало сокращение популяции ГСК в костном мозге и легких (7-й день) и падение клональной активности костномозговых и циркулирующих в крови гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных КОЕ (соответственно на 3, 7, 14, 21-й день и на 3-й день соответственно) и гранулоцитарных КОЕ (соответственно на 3, 7, 21-й день и на 3, 7, 14, 21-й день) (таблица 19, 20). Противовоспалительный эффект спиперона прослеживался и в фазу отложения коллагеновых волокон – 21-й день опыта.

Таблица 19. Влияние спиперона на рост КОЕ-ГЭММ в культурах клеток костного мозга и циркулирующей крови ( $\times 10^6$  неадгезирующих мононуклеаров) у мышей линии C57BL/6 при пневмофиброзе ( $M \pm m$ ).

Сроки исследования / группы		Костный мозг	Кровь
Интактный контроль		2,50 $\pm$ 0,43	0,11 $\pm$ 0,47
3 день	Пневмофиброз	10,16 $\pm$ 0,98 *	0,33 $\pm$ 0,15 *
	Пневмофиброз, леченный спипероном	6,17 $\pm$ 0,32 * ●	0,08 $\pm$ 0,31
7 день	Пневмофиброз	2,00 $\pm$ 0,37	2,33 $\pm$ 0,21 *
	Пневмофиброз, леченный спипероном	0,33 $\pm$ 0,17 * ●	4,17 $\pm$ 0,42 * ●
14 день	Пневмофиброз	0,83 $\pm$ 0,48 *	0,1 $\pm$ 0,505
	Пневмофиброз, леченный спипероном	0,1 $\pm$ 0,43 * ●	0,07 $\pm$ 0,12
21 день	Пневмофиброз	3,17 $\pm$ 0,31	0,11 $\pm$ 0,42
	Пневмофиброз, леченный спипероном	1,67 $\pm$ 0,34 * ●	0,1 $\pm$ 0,77

Примечание – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

Эти данные указывают на то, что в условиях однократного введения бле-омицина противовоспалительный эффект спиперона, по всей видимости, связан с угнетением ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток (пролиферация, дифференцировка). При этом нами не исключается нарушение миграции костномозговых кроветворных клеток в легкие. Доказательством этой гипотезы выступают данные цитометрических исследований, свидетельствующие о расширении костномозговой популяции CD45<sup>+</sup>-клеток на фоне уменьшения их числа в легких.

Таблица 20. Влияние спиперона на рост КОЕ-Г в культурах клеток костного мозга и циркулирующей крови ( $\times 10^6$  неадгезирующих мононуклеаров) у мышей линии C57BL/6 при пневмофиброзе ( $M \pm m$ ).

Сроки исследования / группы		Костный мозг	Кровь
Интактный контроль		1,00 $\pm$ 0,26	1,00 $\pm$ 0,13
3 день	Пневмофиброз	9,33 $\pm$ 1,94 *	1,25 $\pm$ 0,61
	Пневмофиброз, леченный спипероном	2,83 $\pm$ 0,32 * ●	0,15 $\pm$ 0,15 * ●
7 день	Пневмофиброз	5,67 $\pm$ 0,84 *	1,45 $\pm$ 0,23 *
	Пневмофиброз, леченный спипероном	1,17 $\pm$ 0,17 * ●	0,10 $\pm$ 0,50 * ●
14 день	Пневмофиброз	2,83 $\pm$ 0,48 *	1,00 $\pm$ 0,15
	Пневмофиброз, леченный спипероном	4,33 $\pm$ 0,43 * ●	0,17 $\pm$ 0,12 * ●
21 день	Пневмофиброз	6,67 $\pm$ 1,36 *	6,53 $\pm$ 0,62
	Пневмофиброз, леченный спипероном	2,33 $\pm$ 0,34 * ●	0,14 $\pm$ 0,17 * ●

Примечание – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, ● – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

Кроме блокады альвеолита, спиперон препятствовал отложению соединительной ткани в легких (Таблица 21). Антифибротическая активность препарата в большей мере проявлялась на 21-й день.

Таблица 21. Влияние спиперона на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при пневмофиброзе ( $M \pm m$ )

Сроки исследования (дни)	Интактный контроль	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный спиперон
7	1,12 $\pm$ 0,05	3,07 $\pm$ 0,07 *	2,09 $\pm$ 0,11 •
14	1,13 $\pm$ 0,02	3,91 $\pm$ 0,07 *	2,75 $\pm$ 0,12 * •
21	1,15 $\pm$ 0,07	4,26 $\pm$ 0,14 *	2,12 $\pm$ 0,13 * •

Примечание – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, • – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

Между тем фиброз легкого, как правило, возникает в результате неоднократного повреждения легких. В этой связи мы оценили эффекты спиперона на модели необратимого пневмофиброза. Необратимость фиброза достигалась 5-кратным введением блеомицина. В условиях курсового введения блеомицина спиперон препятствует развитию воспалительной реакции и фиброзирующего альвеолита в легочной ткани (таблица 22). Итак, избирательная блокада  $D_2$  дофаминовых рецепторов выступает перспективным направлением коррекции фиброза легких.

Таблица 22. Влияние спиперона на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при необратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ )

Интактный контроль	Необратимый пневмофиброз	Необратимый пневмофиброз, леченный спипероном
<b>21-й день опыта</b>		
1,15 $\pm$ 0,06	5,13 $\pm$ 0,75 *	1,86 $\pm$ 0,18 •
<b>40-й день опыта</b>		
1,12 $\pm$ 0,18	4,12 $\pm$ 0,40 *	1,52 $\pm$ 0,20 •

Примечание – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля, • – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от пневмофиброза без лечения.

В известном исследовании S. Shome et al. (2012) показал, что взаимодействие дофамина с  $D_2$  дофаминовыми рецепторами, локализованными на мембране мезенхимальных стволовых клеток, вызывает торможение их миграции. Введение антагониста  $D_2$  рецепторов, напротив, повышает количество циркулирующих МСК [Shome S., Dasgupta P. S., Basu S. 2012]. В этой связи не исключена связь антифибротических эффектов спиперона с незрелыми мезенхимальными клетками. При изучении этого вопроса нами выявлен ряд закономерностей. Так, в условиях введения блеомицина блокада  $D_2$  дофаминовых рецепторов существенно уменьшает число МСК (CD45-CD73<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>) в легких и значительно увеличивает циркулирующую в крови фракцию, при этом количество МСК в костном мозге увеличивается до значений интактного контроля (рисунок 10). Аналогичные изменения были выявлены при изучении фиброцитов (CD31-CD34-CD45<sup>+</sup>).

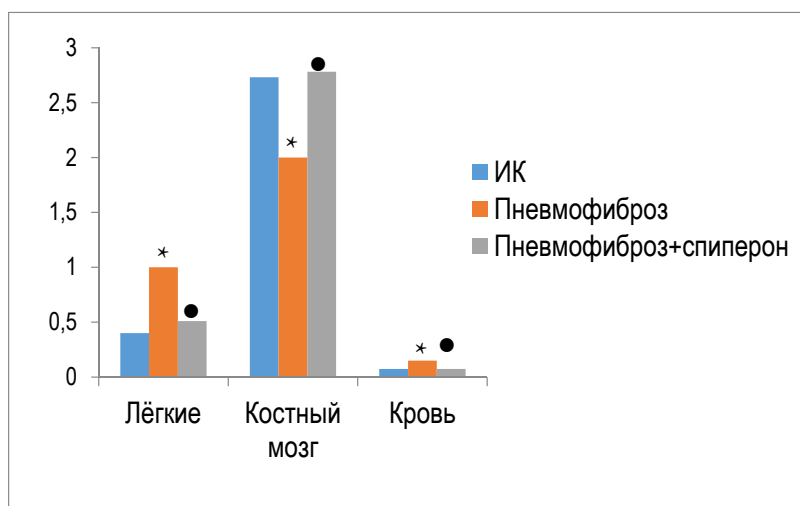


Рисунок 10. Содержание МСК с фенотипом  $CD45-CD73^+CD106^+$  (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких, костном мозге и крови мышей линии C57BL/6 в условиях частично обратимого пневмофиброза и введения спиперона на 21-е сутки эксперимента.

Примечание. Результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов.

\* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); • – различия с патологическим контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни).

Другой важный аспект действия спиперона на незрелые мезенхимальные клетки был связан с пролиферацией и дифференцировкой. По нашим данным, антагонист дофаминовых рецепторов снижает скорость формирования монослоя в культуре МСК, полученных из фиброзированных легких. Одновременно препарат усугубляет нарушение остеогенеза и адипогенеза, наблюдаемых при моделировании пневмофиброза, и уменьшает интенсивность хондрогенной и фибробластной дифференцировки стволовых клеток мезенхимального ряда. Дополнительной характеристикой действия спиперона выступает уменьшение роста КОЕ-Ф в культуре прогениторных фибробластных клеток из костного мозга, крови и легких.

Итак, при введении блеомицина спиперон, по всей видимости, оказывает ингибирующее действие на дофаминовую регуляцию мезенхимальных клеток. Исходя из этого, уменьшение площади соединительной ткани спипероном можно связать с нарушением мобилизации и миграции МСК и фиброцитов в травмированную легочную ткань, с другой стороны, с угнетением дифференцировки МСК (и прежде всего в фибробласты – основной продуцент коллагена) и снижением пролиферативной активности прогениторных фибробластных клеток. Учитывая, что спиперон блокирует 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>1</sub> серотониновые рецепторы, мы полагаем, что его антифибротические эффекты частично могут быть связаны с нарушением серотонинового механизма пролиферации фибробластов и синтеза ими коллагена, с одновременным уменьшением секреции TGF- $\beta$ 1, соединительнотканного ростового фактора и ингибитора активатора



плазминогена-1 в легких [Fabre A. et al., 2008]. Некоторые авторы связывают синтез коллагеновых волокон в легких с активностью адренергической системы [Berg R.A. et al., 1981; Giri S.N. et al., 1987]. В этой связи необходимо отметить, что спиперон является антагонистом  $\alpha 1B$ -адренорецепторов.

Наряду с противовоспалительной и антифибротической активностью спиперон нормализует количество клеток, экспрессирующих маркер CD31. Содержание CD31<sup>+</sup>-клеток у не леченных мышей с пневмофиброзом составляет 46,9% ( $p < 0,05$ ) от интактного контроля. Итак, результаты иммуногистохимических исследований указывают на регенерацию альвеолярного эндотелия.

По современным представлениям формирование микрососудистого русла обуславливают эндотелиальные прогениторные клетки. Являясь малодифференцированными клетками, эндотелиальные прогениторные клетки, обладают значительным пролиферативным потенциалом и принимают активное участие в процессах репарации эндотелия и ангиогенезе. На мембране эндотелиальных прогениторных клеток обнаружены D<sub>2</sub> дофаминовые рецепторы [Chakroborty D., Chowdhury U. R. et al., 2008]. Однако дофамин известен как ингибитор ангиогенеза. Так, внутрибрюшинное введение дофамина ингибирует VEGF-зависимую мобилизацию эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга, что, по мнению D. Chakroborty и его коллег, связано со снижением активности MMP-9. Активация D<sub>2</sub> рецепторов может снижать проангиогенный эффект VEGF за счет ингибирования фосфорилирования рецепторов VEGF-2 [Osinga T. E., Links T. P., 2017]. Кроме этого, дофамин уменьшает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и стимулирует их апоптоз [Peters M. A., Walenkamp A. M., 2014]. Амин показывает свою способность ингибировать ангиогенез на моделях рака толстой кишки, желудка и легких [Sarkar C., Chakroborty D., 2015]. С озвученных выше позиций, вполне закономерным выглядит изучение эндотелиальных прогениторных клеток (мобилизация, миграция) в условиях нарушения дофаминергической сигнализации. По нашим данным, блокада постсинаптических дофаминовых рецепторов значительно увеличивает количество эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла с фенотипом CD45-CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> в фиброзированных легких мышей, что связано с мобилизацией и миграцией их из костного мозга (таблица 23). Таким образом, в условиях введения блеомицина ускорение регенерации эндотелия в случае назначения спиперона можно связать с увеличением числа эндотелиальных прогениторных клеток в легочной ткани.

Таблица 23. Содержание эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45-CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких, костном мозге и крови мышей линии C57Bl/6 в условиях пневмофиброза и введения спиперона на 21-е сутки эксперимента ( $M \pm m$ ).

Интактный контроль	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный спипероном
Легкие		
6,468 $\pm$ 0,534	12,321 $\pm$ 0,994 *	17,976 $\pm$ 1,342 *●
Костный мозг		
1,473 $\pm$ 0,154	1,307 $\pm$ 0,089	0,149 $\pm$ 0,008 *●

Интактный контроль	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный спипероном
Кровь		
0,149 ± 0,017	0,058 ± 0,006 *	0,118 ± 0,009 ●

Примечание. Результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – различия с патологическим контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни).

Одной из функций эндотелиальных клеток является формирование эндотелиального барьера. Эндотелиальный барьер регулирует диффузию простых веществ, белковых молекул и контролирует трансэндотелиальную миграцию клеток. В сосудах легкого обнаружены дофаминовые  $D_1$  и  $D_2$  рецепторы [Kobayashi Y. et al., 1995; Bruzzone P. et al., 2002]. Предполагается, что дофамин принимает участие в регуляции функций эндотелия. В частности, еще в 1975 г. Goldberg L. I. сообщил об индуцированном дофамином спазме изолированных кровеносных сосудов [Goldberg L. I., 1975]. Между тем, вазоконстрикторный эффект дофамина значительно сложнее, и по мнению Ozawa H. с коллегами, частично опосредован адреномиметическими эффектами [Ozawa H., Aihara H., Sasajima M., Tanaka I., 1975]. Это было подтверждено в более поздних исследованиях других авторов: дофамин взаимодействуя с альфа1-адренорецепторами повышает сосудистый тонус [Lin Y., Quartermain D., 2008; Özkan M., Johnson N. W., 2017].

В условия индукции липополисахаридом острой легочной травмы Р.К. Vohra et al. (2011) показали, что дофамин уменьшает проницаемость легочных сосудов и ингибирует рекрутинг нейтрофилов. Аналогичный эффект наблюдается при введении агониста  $D_2$  рецепторов квинпиrolа. У knockdown мышей, нокаутных по  $D_2$  рецепторам, введение дофамина не влияет на сосудистую проницаемость [Vohra PK, Hoeppner LH et al., 2011]. Снижение сосудистой проницаемости связывают со способностью дофамина ингибировать опосредованное VEGF повышение сосудистой проницаемости: нарушается взаимодействие VE-кадгерина с ZO-1 (zonula occludens) [Bhattacharya R, Sinha S et al., 2008].

Все выше представленные данные не исключают отмену спипероном вазоконстрикции и улучшение трансэндотелиального перехода для мигрирующих в очаг травмы стволовых клеток костного мозга в ответ на введение блеомицина, что положительно сказывается на процессах регенерации альвеолярной ткани.

В заключение мы приводим результаты ИГХ, которые свидетельствуют о повышении количества пан-цитокератин положительных клеток (на 20%,  $p < 0,05$ ) в альвеолярной ткани животных с фиброзом легких, получавших спиперон, по сравнению с патологическим контролем. Регенеративный эффект препарата мы связываем с увеличением в легочной ткани числа мультипотентных прогениторных эпителиальных клеток ( $CD326^{hi}CD49f^{+}CD45^{-}$ ) (рисунки 11).

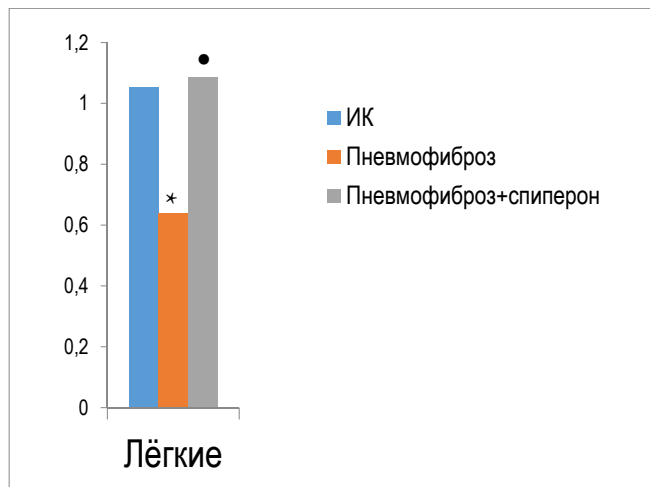


Рисунок 11. Содержание мультипотентных прогениторных эпителиальных клеток (CD326<sup>hi</sup>CD49<sup>f</sup>CD45<sup>-</sup>) (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57BL/6 в условиях обратимого пневмофиброза и введения спиперона на 21-е сутки эксперимента ( $M \pm m$ ).

Примечание. Результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов.

\* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); • – различия с патологическим контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни).

## ГЛАВА 6. ПЕРСПЕКТИВЫ РЕМОДУЛЯЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ГИАЛУРОНИДАЗОЙ ДЛЯ ТЕРАПИЙ ФИБРОЗА ЛЁГКИХ

### 6.1. Гиалуроновая кислота и гиалуронидаза при пневмофиброзе

*Структура, продукция, локализация и функции гиалуроновой кислоты.* Гиалуроновая кислота (ГК) была обнаружена в 1934 году [Meyer K. P., John W., 1934], ее структура была определена гораздо позднее – в 1951 году [Rapport M. M. et al., 1951]. По современным представлениям, ГК состоит из линейной последовательности единиц дисахаридов, состоящих из D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина (рисунок 12) [Jiang D. et al., 2007]. Распространенной формой ГК является высокомолекулярная гиалуроновая кислота (ВМ-ГК), которая имеет молекулярную массу более  $10^6$  Da [Olczyk P. et al., 2008; Maharjan Anu S. et al., 2011]. ВМ-ГК демонстрирует структуру произвольного клубка (катушки), в водных растворах увеличивающегося в объеме. Водная ВМ-ГК имеет высокую вязкость и обладает эластичными свойствами, что способствует заполнению ею пространства [Scott J. E. et al., 2013].

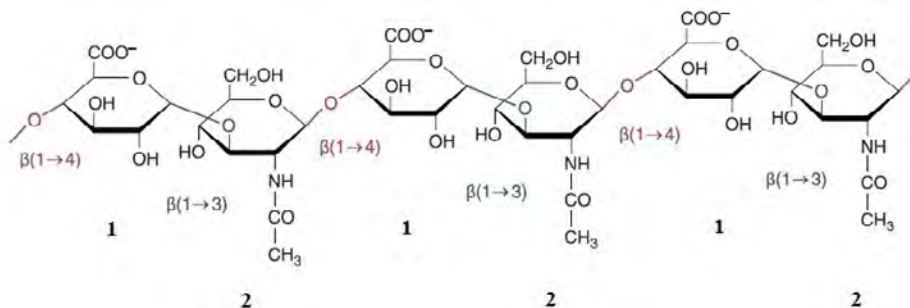


Рисунок 12. Структура гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота состоит из повторяющихся полимерных дисахаридов D-глюкуроновой кислоты (1) и N-ацетил-D-глюкозамина (2), соединенных поочередно  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,3-гликозидными связями [Jiang D. et al., 2007].

Гиалуроновая кислота является наиболее распространенным несulfатированным гликозаминогликаном (ГАГ) в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) легких. Содержание ГК в легких составляет  $15\text{--}150 \text{ мг} \times \text{г}^{-1}$  сухой массы, локализована в основном в перибронхиальных и межальвеолярных / периальвеолярных тканях [Petrigni G., Allegra L., 2006]. Количество ГК в секрете легких у человека варьирует в диапазоне от  $34$  до  $423 \text{ нг} \times \text{мл}^{-1}$  [Dentener M. A. et al., 2005]. В дыхательных путях ГК производится подслизистыми железами и поверхностными эпителиальными клетками дыхательных путей [Basbaum C. B., Finkbeiner W. E., 1988; Monzon M. E. et al., 2006]. Синтезируются ГК гиалуронан синтазами на плазматической мембране и высвобождается в качестве высокомолекулярного полимера во внеклеточное пространство [Itano N. et al. 2013].

Провоспалительные цитокины, включая  $\text{TNF-}\alpha$ , ИЛ- $1\beta$  и ЛПС, индуцируют производство ГК *in vitro* эндотелиальными [Mohamadzadeh M. et al., 1998], дендритными [Bollyky P. L. et al., 2010] и фибробластными клетками [Wilkinson T. S. et al., 2004]. Считается, что фибробласты являются основным типом клеток, которые высвобождают ГК [Luke H. J., Prehm P., 1999; Jacobson A. et al., 2000]. Фибробласты синтезируют все три изоформы ГК-синтаз и высвобождают ГК в ответ на повреждение, в том числе легочной ткани и / или стимуляцию выше приведенными воспалительными факторами [Wilkinson T. S. et al., 2004]. С другой стороны, фрагменты гиалуроновой кислоты могут стимулировать фибробласты к секреции цитокинов, что регулирует воспалительный ответ, а также способствует  $\text{TGF-}\beta$ -опосредованной пролиферации фибробластов [Meran S. et al., 2008]. Кроме этого, ГК способна модулировать  $\text{TGF-}\beta$ -зависимую дифференциацию миофибробластов [Webber J. et al., 2009].

ГК участвует в фундаментальных физиологических и патологических процессах, таких как эмбриональное развитие, миграция, адгезия, пролиферация и дифференцировка клеток [Heldin P., 2003; Spicer A. P. et al., 2004], иммунный контроль, воспаление [Termeer C. et al., 2003; George J., Stern R., 2004], заживление ран, фармакокинетика лекарственных средств, ангиогенез, злокачественная трансформация, водный гомеостаз и вязкоупругие свойства

экстрацеллюлярного матрикса [Tool B. P., 2004]. Многие и различные биологические функции, проявляемые гиалуроновой кислотой, связывают с длиной цепи, молекулярной массой и условиями, при которых синтезируется молекула [Noble P. W., 2002; Tool B. P., 2004].

Гиалуроновая кислота вовлечена в различные функции легких при фиброзе, такие как:

1. Регулирование баланса интерстициальной жидкости благодаря своей высокой способности связывать молекулы воды [Allen S. J. et al., 1991].

2. Регуляция адгезии [Kosaki R. et al., 1999], миграции [Ito T. et al., 2004], дифференцировки [Zoltan-Jones A. et al., 2003] и пролиферации клеток [Evanko S. P. et al., 2007].

3. Регенерация. Достигается посредством регулирования ГК-синтазы-2 и гиалуронидазы-2 в ответ на медиаторы, высвобождаемые в процессе заживления после повреждения легких, что приводит к фибропролиферативному ответу [Li Y. et al., 2000; Jiang D. et al., 2005].

4. Провоспалительная активность. После повреждения легких, фрагменты ГК накапливаются и стимулируют альвеолярные макрофаги к секреции хемокинов, привлекающие клетки воспаления [Noble P. W., Jiang D., 2004].

5. ГК усиливает клеточный механизм защиты организма, стимулируя активность нейтрофилов крови, фагоцитоз и миграцию [Turino G. M., Cantor J. O., 2003].

6. В легочных альвеолах ГК взаимодействует с поверхностными фосфолипидами, что способствует стабильности сурфактанта [Lu K. W. et al., 2005].

7. Путем создания более вязкой среды, ГК может препятствовать движению клеток и молекул через внеклеточный матрикс, и, тем самым, снижает активность лейкоцитов и их провоспалительных продуктов [Cantor J. O., 2007].

8. Фенотипические преобразования фибробластов в миофибробласты связаны с изменениями производства и метаболизма ГК. ГК модулирует TGF- $\beta$ -сигналинг вследствие взаимодействия с рецептором CD44 [Ito T. et al., 2004]. Так, в эксперименте было показано, что угнетение синтеза ГК приводит к отмене TGF- $\beta$ -опосредованному фенотипическому преобразованию миофибробластов. Это указывает на ключевую роль ГК в фибробластно-миофибробластном переходе [Meran S., Thomas D., 2007]. Обнаруженные при фиброзе легких  $\alpha$ -SMA-positive миофибробласты (Alpha-Smooth Muscle Actin) коррелируют с аномальным отложением экстрацеллюлярного матрикса и прогрессированием заболевания [Gabbiani G., 2003]. В тканях эти миофибробласты появляются в результате активации и дифференцировки стромальных фибробластов, процесс, в котором TGF- $\beta$  непосредственно участвует. Стойкость миофибробластического фенотипа зависит от аутокринной генерации TGF- $\beta$  [Vaughan M. B. et al., 2000].

9. ГК улучшает рост культуры человеческих мезенхимальных стволовых клеток и способствует хондрогенной дифференцировке человеческих мезенхимальных стволовых клеток [Kavalkovich K. W. et al., 2002]. CD44 и ГК помогают МСК перейти к области повреждения в целях содействия регенерации тканей [Poulsom R., 2007].

10. ГК увеличивает объем и площадь поверхности для миграции клеток и клеточной активности и способствует стимуляции рецептор-опосредованной клеточной пролиферации [Solis M. A. et al., 2012].

Повышение уровня ГК и продуктов ее разложения наблюдаются у животных при блеомицин-индуцированном фиброзе легких [Zhao H. W., Lu C. J., Yu R. J., Hou X. M., 1999; Dentener M. A., Vernooy J. H., Hendriks S., Wouters E. F., 2005]. После интратрахеального введения блеомицина производство ГК увеличивается в несколько раз, максимальный пик концентрации наступает с 7 по 10 день. Затем ГК выводится из интерстиция легких, и это совпадает с накоплением коллагена. Продукты деградации ГК размером 10–500 кДа накапливаются в легких и могут стимулировать экспрессию генов макрофагов и других воспалительных клеток *in vitro*.

Увеличение уровня ГК наблюдается в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и/или плазме больных фиброзом легких [Bensadoun E. S. et al., 1996], хронической обструктивной болезнью легких [Dentener M. A. et al., 2005], аллергическим альвеолитом [Soderberg M. et al., 1989], астмой [Zhu Z. et al., 2001], интерстициальными заболеваниями легких [Cantin A. M. et al., 1992], саркоидозом [Milman N. et al., 1995] и идиопатической легочной артериальной гипертензией [Papakonstantinou E. et al., 2008].

Уровни ГК были значительно выше в БАЛ у пациентов с ИЛФ, чем у здоровых людей, при ухудшении состояния пациенты имели более высокие концентрации ГК в лаважной жидкости, чем пациенты со стабильным течением болезни [Bjermer L. et al., 1989]. Клоны фибробластов, полученные из первичной культуры ткани легких пациентов с ИЛФ, секретировали гораздо большее количество гиалуроновой кислоты и протеогликана декарина, чем клоны фибробластов от здоровых людей [Westergren-Thorsson G. et al., 2004].

*Высокомолекулярные и низкомолекулярные фрагменты гиалуроновой кислоты.* Высокомолекулярные фрагменты гиалуроновой кислоты (ВМ-ГК) обнаруживаются преимущественно в здоровых легких [Teder P. et al., 2002]. В поврежденной ткани ВМ-ГК распадается на низкомолекулярные фрагменты ГК (НМ-ГК) массой от 0,8 до  $8 \times 10^5$  Da [Jiang D. et al., 2007]. Таким образом, соотношение ВМ-ГК / НМ-ГК нарушается. Для реализации биологических эффектов ВМ-ГК и НМ-ГК связываются с CD44, TLR2, TLR4, LYVE и RHAMM (CD168) рецепторами [Powell J. D., Horton M. R., 2005].

Высокомолекулярные фрагменты гиалуроновой кислоты, найденные на поверхности эпителия дыхательных путей, участвуют в гомеостазе дыхательных путей, связывая и регулируя деятельность ферментов, таких как лактопероксидаза и тканевой калликреин [Forteza R. et al., 2001]. ВМ-ГК повышает эндотелиальную клеточную барьерную функцию в легких через CD44, сфингозин-1-фосфат-рецепторы [Singleton P. A. et al., 2006], подавляет экспрессию хемокинов [Turino G. M., Cantor J. O., 2003], вызывает противовоспалительный и иммуносупрессивный эффекты [Delmage J. M. et al., 1986], в культуре макрофагов ВМ-ГК ингибирует фагоцитоз [Maharjan A. S. et al., 2011]. По мере регенерации легких отношение ВМ-ГК/НМ-ГК увеличивается, ВМ-ГК способствует дифференцировке моноцитов в фиброциты, что

приводит к восстановлению гисто-архитектоники тканей, а также стимулирует производство ЭЦМ фибробластами [Wang J. F. et al., 2007].

Низкомолекулярная ГК снижает эндотелиальную клеточную барьерную функцию в легких [Singleton P. A. et al., 2010], стимулирует ангиогенез [Deed R. et al., 1997], через CD44 и Toll-подобные рецепторы (TLR2, TLR4) индуцирует экспрессию множества медиаторов воспаления в альвеолярных макрофагах, в том числе макрофагального воспалительного белка-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), ИФН- $\gamma$ -индуцированного белка-10 и активатора ингибитора плазминогена [Jiang D. et al., 2005]. Кроме этого, фрагменты ГК с низкой молекулярной массой стимулируют созревание дендритных клеток и синтез провоспалительных интерлейкинов: ИЛ-1b, ИЛ-12, и фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) [Taylor K. R. et al., 2004]. Являются синергистом интерферона-g в стимулировании антифибротических хемокинов и монокинов [Horton M. R. et al., 1998]. НМ-ГК в месте повреждения ткани препятствуют дифференцировке фиброцитов и отложению коллагена, что позволяет макрофагам свободно передвигаться по поврежденному сайту, фагоцитировать мусор и очищать ткань от любых инфекционных агентов. [Maharjan A. S. et al., 2011].

*Рецепторы гиалуроновой кислоты.* Эффекты гиалуроновой кислоты и ее фрагментов зависят от их взаимодействия с тем или иным рецептором клеточной поверхности: Cluster of differentiation 44 (CD44), рецептор для гиалуронан-опосредованной подвижности (RHAMM), эндотелиальный рецептор гиалуроновой кислоты лимфатических сосудов (LYVE-1), гиалуронан-рецептор эндоцитоза (HARE) и Toll-подобный рецептор (TLR) [Park J. B. et al., 2011].

CD44 является трансмембранным гликопротеином 1-го типа, экспрессируется на поверхности различных типов клеток легких, в том числе на легочном эпителии, фибробластах, эндотелиальных и гемопоэтических клетках (рисунок 13) [Singleton P. A. et al., 2006]. Появление CD44 отмечается на поверхности гладкомышечных клеток и таких иммунных клетках как нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты [Papakonstantinou E., Karakiulakis G., 2009]. Активность экспрессии рецептора регулируется воспалительными стимулами: ЛПС и цитокины, включая ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , а также факторы роста (основной фактор роста фибробластов и эндотелиальный фактор роста сосудов) [Lennon F. E., Singleton P. A., 2011].

Гиалуроновая кислота связывается с внеклеточным доменом CD44 рецептора, цитоплазматический хвост CD44 активирует внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие взаимодействие сигнальных комплексов с активным цитоскелетом [Toole B. P., 2004].

Экспрессия легочного CD44 увеличивается во время воспалительной реакции одновременно с повышением концентрации ГК в интерстиции легких [Yasuda M. et al., 2002]. После повреждения легких, фрагменты ГК накапливаются и стимулируют альвеолярные макрофаги к продукции хемокинов, которые привлекают множество воспалительных клеток. Фрагменты ГК затем выводятся из легких альвеолярными макрофагами CD44-зависимым образом. Следует отметить, что у CD44-нокаут мышей, блеомицин-индуцированная острая воспалительная реакция сохраняется, это приводит к избыточному привлечению иммунных клеток в легкие, избыточной продукции воспа-

лительных цитокинов, снижению активации трансформирующего фактора роста- $\beta$ , прогрессивному накоплению низкомолекулярных фрагментов ГК и, в конечном итоге, к смерти [Teder P. et al., 2002].

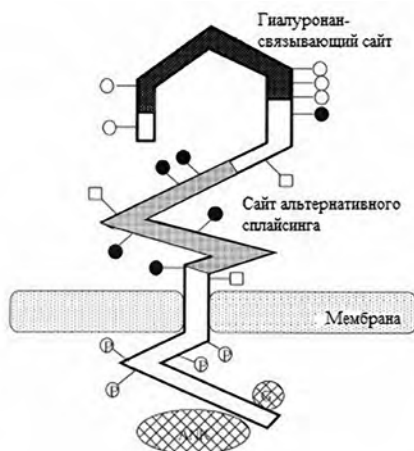


Рисунок 13. Структура CD44. Рецептор CD44 состоит из белка и связанного с ним гомологичного внеклеточного домена; трансмембранного домена и цитоплазматического домена. Внеклеточный домен обладает обязательным связывающим гиалуроновую кислоту сайтом и альтернативными сплайсинг сайтами [Yasuda M., et al., 2002].

CD44 давно используется в качестве маркера для МСК [Zohar R. et al., 1997]. Так, ГК и ГК-связывающие белки играют активную роль в поддержании дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. ГК улучшает рост культуры человеческих МСК и способствует их хондрогенной дифференцировке [Hegewald A. A. et al., 2004]. Взаимодействие ГК с CD44-рецептором способствует миграции МСК к области травмы, предположительно, для участия в регенерации ткани [Poulsom R., 2007].

После введения блеомицина на плазматической мембране легочных макрофагов наблюдается увеличение экспрессии RHAMM [Zaman A. et al., 2005]. По данным А. Е. Turley и коллег (2002), гиалуроновая кислота, связываясь с RHAMM, взаимодействует с цитоскелетом. Вероятно, так осуществляется контроль ГК миграции и пролиферации клеток [Turley A. E. et al., 2002].

Моноциты, дендритные клетки, и лимфоциты способны связываться с ГК и ее фрагментами, используя Toll-подобные рецепторы (TLR): TLR2, TLR4. Низкомолекулярная ГК связывается либо с TLR4, либо с TLR2 и вызывает провоспалительное действие, в то время как высокомолекулярная ГК снижает воспаление путем ингибирования TLR2 или TLR4 сигналинга [Termeer C. et al., 2002; Scheibner K. A. et al., 2006; Campo G. M. et al., 2010]. ВМ-ГК и НМ-ГК регулируют дифференцировку фиброцитов через TLR2 или TLR4 [Maharjan A. S. et al., 2011]. Высокомолекулярная ГК экспрессируется на клеточной поверхности альвеолярного эпителия, взаимодействует с TLR2 и TLR4, обеспечивает гомеостатический сигнал защиты дистальных отделов



легких от травм, что способствует восстановлению альвеолярного эпителия [Noble P. W., Jiang D., 2006].

**Гиалуронидазы.** ГК разлагается ферментом гиалуронидазой (ГД). Термин «гиалуронидазы» ввел Карл Мейер и на основе конечных продуктов биохимического анализа классифицировал гиалуронидазы на три группы [Meyer K. P., 1971].

1 группа – гиалуронидазы млекопитающих (тестикулярный тип), которые являются эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазами и случайным образом расщепляют  $\beta$ -1–4 гликозидные связи в ГК, хондроитинах и хондроитин сульфатах. Конечными продуктами деградации являются четные олигосахариды: тетра- и гекса-олигосахариды. Ферменты этого класса имеют как гидролитическую, так и трансгликозидазную активности. Эта группа ферментов присутствует в сперматозоидах млекопитающих, лизосомах и в яде змей, рептилий и перепончатокрылых.

2 группа – эндо- $\beta$ -D-глюкуронидазы, которые расщепляют глюкуроновые связи гиалуроновой кислоты и являются инертными по отношению к другим гликозаминогликанам. Тетрасахариды и гексасахариды являются основными конечными продуктами деятельности эндо- $\beta$ -D-глюкуронидаз. Ферменты этого класса присутствуют в слюнных железах пиявок и нематодах.

3 группа – микробиологические гиалуронидазы расщепляют ГК по  $\beta$  1–4 гликозидной связи. Они отличаются от гиалуронидаз двух первых групп тем, что при расщеплении ГК не используют гидролиз. Ферменты этого класса включают ГК-лиазы из *Streptococcus pneumoniae* и *S. Agalactiae* [Stern R. et al., 2006].

Шесть гиалуронидазных генов – HYAL –1, –2, –3, –4, HYALP1 (псевдоген) и RH-20 (SPAM1), кодируют последовательность гиалуронидаз [Stern R. et al., 2007]. Локализация генов показана на рисунке 14. Три кластера расположены на хромосоме 3p21.3, аналогичные кластеры – на хромосоме 7q31.3.

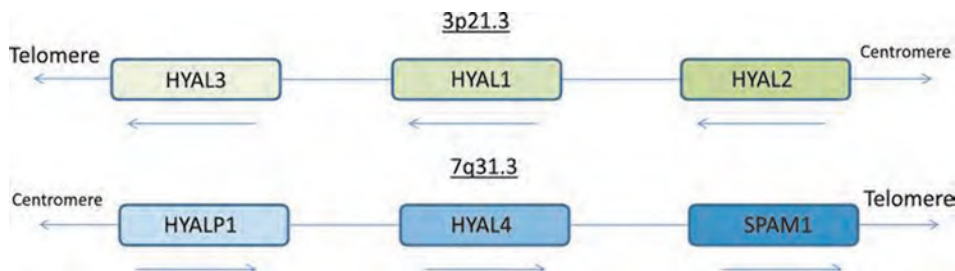


Рисунок 14. Схематическое представление локализации шести гиалуронидазных генов на их двух соответствующих хромосомных сайтах. Относительный порядок генов был создан в связи с их теломерно-центромерной ориентацией. Рисунок не в масштабе [Csoka A. B., Stern R., 2013].

Ген HYAL 1 человека расположен на 3p21.3-p21.2 хромосоме, у мышей ген расположен на хромосоме 9. Ген HYAL 1 найден преимущественно в таких паренхиматозных органах, как печень, почки, селезенка и сердце [Csoka A. B. et al., 2001]. Присутствует ген HYAL 1 в сыворотке и моче. Разрушение гиал-

лурановой кислоты гиалуронидазой может быть pH-зависимым процессом. Было установлено, что ГД1 максимально и полно разрушает гиалуроновую кислоту любого размера молекул до фрагментов молекулярной массой менее 20 кДа, генерируя в основном тетрасахариды / гексасахариды при pH 3,5–4,0.

ГД2 является гликозилфосфатидилинозитол-закрепленным рецептором клеточной поверхности во всех типах тканей у мышей, за исключением мозга. ГД2 имеет более низкую активность по сравнению с сывороточной гиалуронидазой 1 [Rai S. K. et al., 2001]. Вопрос об оптимальном pH для ГД2 до сих пор остается открытым. Предполагается, что pH зависит от формы ГД: свободная форма активна в кислых условиях, в то время как ассоциированный с мембраной фермент действует в кислотно-нейтральных условиях (pH 6,0–7,0). ГД2 взаимодействует с гиалуроновой кислотой высокой молекулярной массы, гидролизует ГК на фрагменты промежуточного размера примерно 20 кДа [Jiang D. et al., 2011]. E. S. Hofinger, J. Hoechstetter и M. Oettl (2008) подчеркивают, что ГД2 при pH 4,5 способна разрушать высокомолекулярные фрагменты ГК до малых олигосахаридов, при pH 5,5 ВМ-ГК деградирует до более крупных фрагментов.

Экспрессия ГД3 наиболее интенсивна в семенниках и костном мозге, относительно слабо выражена в других органах [Csoka A. B. et al., 2001]. Роль ГД3 в деградации гиалуроновой кислоты не ясна.

Тестикулярный фермент PH-20, называемый ГД5, кодируется геном молекулы адгезии спермы 1 (SPAM1). Это гликозил-фосфатидил-инозитол связанный фермент находится на поверхности человеческих сперматозоидов и внутренней акросомальной мембране. PH-20 является уникальным среди гиалуронидаз, так как показывает ферментативную активность в кислой и нейтральной среде [Oettl, M., Hoechstetter J., Asen, 2003].

Активность ГК-синтаз и гиалуронидаз регулируется цитокинами и факторами роста [Pasonen-Seppanen S. et al., 2003]. Астма и различные воспалительные реакции дыхательных путей характеризуются повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [Churg A. et al., 2002]. В дыхательных путях человека ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  вызывает экспрессию и повышение активности гиалуронидаз, увеличивается деградация ГК [Forteza R. et al., 2004].

*Терапия препаратами гиалуронидазы.* Применение препаратов гиалуронидазы успешно практикуется более 40 лет в различных областях медицины. Используются препараты тестикулярной гиалуронидазы, выделенной из семенников крупного рогатого скота. Показания к применению препаратов гиалуронидазы включают ожоговые, травматические, послеоперационные рубцы (келоидные, гипертрофические); длительно незаживающие раны и язвы; тугоподвижность и контрактуры суставов (после воспалительных процессов, травм), остеоартроз, анкилозирующий спондилоартрит, тяжелые заболевания поясничных дисков; хронический тендовагинит; склеродермия (кожные проявления); гематомы мягких тканей поверхностной локализации; профилактику образования грубого рубцевания пораженных участков роговицы (в офтальмологии). Терапия гиалуронидазой проводится при подготовке к пластическим операциям по коррекции рубцов [Rosier R. N., O'Keefe R. J.,

2000; Brown M. B., Jones S. A., 2005; Gold M. H., 2007; Necas J., Bartosikova L., 2008; Chhetri D. K., Mendelsohn A. H., 2010].

M. D. Spallicci с коллегами (2007) обнаружили значительную связь между интрацервикальной инъекцией гиалуронидазы и созреванием шейки матки, с более короткой продолжительностью родов и увеличением шансов родов через естественные родовые пути. Предполагается, что это простой, эффективный и безопасный метод даже для женщин, имеющих ранее кесарево сечение [Spallicci M. D. et al., 2007].

Сложилась точка зрения, что лекарственные средства на основе гиалуронидазы малоэффективны для лечения патологических состояний соединительной ткани, поскольку при парентеральном введении они быстро инактивируются в сыворотке крови. Кроме этого, препараты реактогенны и термолабильны, требуют длительного курса лечения для достижения эффекта, при их применении возможно развитие аллергических реакций у пациента [Самцов А. В., Лучина Е. Н., 2012].

В 1952 г. H. Conway и R. B. Stark обнаружили, что адренокортикотропный гормон, смешанный с большим количеством гиалуронидазы, распространяется так же быстро в твердой келоидной ткани, как и сама гиалуронидаза [Conway H., Stark R. B., 1952]. В связи с этим открылась еще одна сфера применения гиалуронидаз – повышение биодоступности лекарственных препаратов (антибиотиков, цитостатиков, антигистаминных, радиоконтрастных соединений, местных анестетиков, вакцин и др.), которые вводятся подкожно или внутримышечно и другими способами [Машковский М. Д., 2006]. Как пример подобного подхода можно привести использования гиалуронидаз совместно с кортикостероидами. В клинической практике нередко кортикостероиды применяются в сочетании с препаратами гиалуронидазы, при этом гиалуронидаза рассматривается как фактор распространения.

В экспериментальных исследованиях Claudia S. Bitencourt (2011) выявлено, что в условиях блеомицин-индуцированного пневмофиброза интраназальная инокуляция тестикулярной гиалуронидазы вызывает увеличение количества мононуклеарных клеток в бронхоальвеолярном пространстве, демонстрирующих мезенхимальный фенотип. Одновременно ГД препятствует токсическому разрушению альвеолярного эпителия, снижает продукцию TGF- $\beta$  и интенсивность отложения коллагена в интерстиции легких [Bitencourt C. B. et al., 2011].

Таким образом, гиалуриновая кислота является той молекулой, которая избирательно может способствовать или препятствовать развитию фиброзных заболеваний легких. Этот вывод сделан нами, исходя из молекулярной массы фрагментов ГК, взаимодействия с хемокинами, про- и противовоспалительными цитокинами, про- и антифибротическими факторами, а также доступа к различным ГК-связывающим белкам. Велика роль системы «гиалуриновая кислота – гиалуронидаза» в патогенезе фиброза легких. Известный десятилетний опыт использования препаратов гиалуронидаз в медицине и полученные за последние годы экспериментальные данные позволяют предположить, что гиалуронидаза является новым и перспективным инструментом в лечении легочного фиброза. Однако кратковременное действие и побочные эффекты

гиалуронидазы указывают на необходимость поиска новых подходов использования этого фермента.

## **6.2. Пегилирование фармакологически активных молекул как направление создания эффективных лекарственных препаратов**

Потенциальная ценность таких белков как антитела, цитокины, факторы роста, ферменты в качестве терапевтических средств проверена десятилетиями. Однако создание лекарственных средств на их основе затрудняют короткое время циркулирования, низкая стабильность и биодоступность, высокая иммуногенность и аллергический потенциал [Veronese F. M., Pasut G., 2005; Jokerst J. V. et al., 2011]. Одним из способов преодоления большинства из этих трудностей является присоединение цепей полиэтиленгликоля к поверхности белка. Опыт пегилирования лекарственных препаратов указывает на то, что клинические эффекты пегилированных биологически активных пептидов превосходят соответствующие свойства немодифицированных молекул. Потенциал пегилированных препаратов улучшается за счет:

1. повышения растворимости в воде, что особенно важно для препаратов с низкой растворимостью,

2. устойчивости к действию ферментов, полностью разрушающих или частично снижающих концентрацию в тканях препарата и нарушающих, тем самым, поглощение системой мононуклеарных фагоцитов,

3. адресной доставки лекарственного препарата до мишени [Khandare J., Minko T., 2006; Knop K. et al., 2010].

Кроме этого, пегилирование, задерживая всасывание препарата, отменяет развитие многих серьезных побочных эффектов, вызванных острым пиком тканевой концентрации препарата, продлевает период его полувыведения [George S. et al., 2008; Hu J. et al., 2010; Tamai H. et al., 2011].

На настоящий момент ковалентное присоединение полиэтиленгликоля к интересующей фармакологически активной молекуле – пегилирование, стало устоявшейся формулой создания пролекарства с избирательной доставкой к клеткам-мишеням [Hinds K. D., 2005; Filpula D., Zhao H., 2008].

Полиэтиленгликоль является наиболее часто используемым неионным полимером для доставки лекарств на основе полимеров [Khandare J., Minko T., 2006; Knop K. et al., 2010]. Мономер ПЭГ и основная структура полимера представлены на рисунке 15.

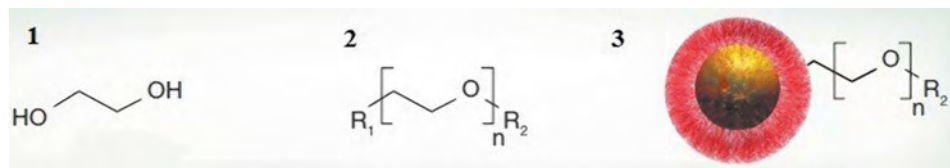


Рисунок 15. Мономер полиэтиленгликоля (1) и основная структура полимера (2), лекарственная форма на основе ПЭГ (3) [Jokerst J. V. et al., 2011].

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) представляет собой синтетический полиэфир – ионный полимер, легкодоступный в широком диапазоне молекулярных масс. ПЭГ известный как полиоксиэтилен или полиэтиленоксид (ПЭО). Полимеры с молекулярной массой < 100000 Да называют ПЭГ, более высокомолекулярные полимеры – ПЭО. Полимеры амфифильны: растворимы в воде и многих органических растворителях (метилхлорид, этанол, толуол, ацетон, хлороформ). ПЭГ с низкой молекулярной массой (< 1,000 Да) являются вязкими и бесцветными жидкостями, ПЭГ с более высокой молекулярной массой представляют собой воскообразные твердые вещества белого цвета с температурой плавления, пропорциональной их молекулярной массе [Bailey F. E., Koleske J. V., 1976]. Растворимость ПЭГ в воде уменьшается с увеличением молекулярной массы [Chen J. et al., 2005]. Полиэтиленгликоль синтезируется анионной полимеризацией этиленоксида инициированной нуклеофильным нападением гидроксид-иона на эпоксидное кольцо. Самым полезным для модификации полипептидов является монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ).

Новые свойства пролекарств вытекают из гидрофильности и гибкости ПЭГ. Большинство полимеров содержат проксимальный конец, который крепится к поверхности наночастицы (R1), другая дистальная концевая группа (R2) взаимодействует с растворителем (рисунок 15). Идеальная концевая группа R2 снижает абсорбцию неспецифического белка, увеличивает гидрофильность, предотвращает агрегацию наночастиц и облегчает связывание лиганда для целевых наночастиц. [Jokerst J. V. et al., 2011]. Модель пролекарства обычно состоит из нескольких компонентов:

- (I) полимер в качестве носителя;
- (II) препарат, пептид или белок в качестве биологически активного компонента;
- (III) молекулы разделителя.

Впервые о пегилировании сообщили Davies и A. Abuchowski в 1970 г. Авторам удалось связать полиэтиленгликоль с бычьим сывороточным альбумином и каталазой печени посредством сопряжения с цианурхлоридом. Это положило начало ковалентному присоединению ПЭГ к пептидам и белкам, а также важному этапу в фармакологии: придавать новые положительные свойства ферментам без изменения их специфической активности [Ringsdorf H., 1975; Abuchowski A. et al., 1977; Abuchowski A. et al., 1977]. С тех пор процедура пегилирования постоянно совершенствуется.

Успешное сопряжение ПЭГ с биомолекулами зависит от химической структуры, молекулярной массы, стерических препятствий и реакционных способностей как биомолекул, так и полимера. Для того, чтобы синтезировать биоконъюгат, с одной стороны, ПЭГ должен обладать реактивными группами, такими как -COOH, -OH, -SH или -NH<sub>2</sub> [Bentley M. D., Harris J. M. 1999, Shashwat S. et al., 2012], с другой стороны, остатками лизина, цистеина и N-концевых остатков в структуре белка [Cai Y., Yue P., 2011]. Успешное сопряжение ПЭГ с биомолекулой зависит от химической структуры, молекулярной массы, стерических препятствий и реакционной способности биомолекул, а также полимеров.

Исследователями отмечается, что, несмотря на приведенные выше положительные свойства, ПЭГ имеет ограниченные возможности сопряжения с пептидом в силу обладания только одной концевой функциональной группой в конце полимерной цепи [Jevs'evar S. et al., 2010; Shashwat S. B. et al., 2012].

Наиболее часто используемые стратегии сопряжения предусматривают использование таких связующих веществ как дициклогексилкарбодиимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид и N-гидроксисукцинимид. Химическое сопряжение препаратов или других биомолекул к полимерам и их модификации могут образовывать прочные эфирные, амидные и дисульфидные связи. Химическая связь должна быть стабильной, чтобы предотвратить высвобождение лекарственного средства во время его транспортировки. В то же время она не должна препятствовать взаимодействию лекарства с мишенью [Satchi-Fainaro R. et al., 2005].

Пегилирование разделяется на случайное (неселективное) и сайт-направленное. В случае неселективного пегилирования ПЭГ преимущественно присоединяется при помощи активированных сложных эфиров или карбонатов цепей ПЭГ к выставленной на поверхность первичной аминогруппе лизина (таблица 24) [Kinstler O. et al., 2002]. Реакция проходит быстро, и результатом ее являются сложные смеси конъюгатов. Конъюгаты различаются между собой по количеству и сайту приложения цепей ПЭГ к пептиду и белку. Взаимодействие ПЭГ с аминокислотными остатками лизина не специфично, в меньшей степени ПЭГ способны связываться с N-концевыми аминокислотными группами, остатками гистидина и даже с боковыми цепями серина, треонина, тирозина и цистеина. Первые пегилированные фармацевтические препараты Adagen (pegademase) и Oncaspar (пегилированная аспарагиназа, пегаспаргаза) представляли сложные смеси различных видов пегилированных конъюгатов [Jevs'evar S. et al., 2010]. Pegvisomant (Somavert®, Pfizer), одобренный в 2003 г. для лечения акромегалии, также получают случайным пегилированием.

Таблица 24. Технологии пегилирования [Jevs'evar S. et al., 2010].

Место прикрепления	ПЭГ реагент	Технология применима для	Препараты
<b>Случайное Пегилирование</b>			
Преимущественно ε-аминогруппы лизиновых остатков и N-концевые аминокислотные группы	ПЭГ NHS-эфиры ПЭГ NHS-карбонаты ПЭГ-паранитрофениловые карбонаты ПЭГ-триазиновые реагенты	Все белки	Adagen® (Adenosine deaminase) Oncaspar® (Asparaginase) PegIntron® (Interferon-α2b) Pegasys® (Interferon-α2a) Somavert® (Human growth hormone mutein) Mircera® (Erythropoietin)
<b>Сайт-специфическое пегилирование (химическое)</b>			
N-концевая аминокислотная группа	ПЭГ-альдегиды и восстанавливающие агенты	Все белки	Neulasta® (G-CSF)

Место прикрепления	ПЭГ реагент	Технология применима для	Препараты
SH-группы непарных остатков цистеина	ПЭГ-малеимиды Пиридил дисульфиды Винилсульфоны Тиол реагенты	Белки с поверхностными естественными или встроенными остатками цистеина	Cimzia® (Anti-TNF-Fab')
Неприродные аминокислоты (азидо- и этинильные производные серина)	ПЭГ-этинильные реагенты ПЭГ-азид реагенты	Белки с неприродными аминокислотами – (необходимы генетические манипуляции организма- хозяина)	
Дисульфидные связи	ПЭГ-моноссульфоны	Белки с поверхностными -S-S связями	
<b>Сайт-специфическое пегилирование (ферментативное)</b>			
Серин или треонин	N-актил галактозамина и ПЭГ-производные сиаловой кислоты	Негликозилированные белки с открытыми Ser или Thr остатками	
Глутаминовые остатки	ПЭГ-алкиламины (транс-глутаминаза опосредованные)	Белки с природными или встроенными остатками Gln в гибких регионах	

Перспективным направлением выступает сайт-специфическое пегилирование (таблица 24). Примеры известных успешных сайт-специфических реакций – это N-концевое и цистеин-специфическое пегилирование. N-концевое пегилирование выполняется как редуцирующая стадия алкилирования с ПЭГ-альдегид реагентом и восстановителем (например, цианоборгидридом натрия) [Kinstler O. et al., 2002]. Подобная реакция была использована в разработке Neulasta® [Molineux G., 2004]. Пегилирование тиольных групп – другой известный подход сайт-специфического пегилирования. Доступно большое разнообразие тиол-специфических реагентов, таких как малеимид, пиридилдисульфид, винилсульфон, тиол-реагенты и др. Благодаря стабильности образованных связей, малеимид-ПЭГ реагенты стали очень популярны.

Разрабатываются подходы сайт-специфического пегилирования с использованием ферментов (Таблица 24). Так, трансглутаминазы способны катализировать реакцию сопряжения ПЭГ-алкиламин реагентов с остатками глутамина [Sato H., 2002; Fontana A., et al., 2008]. Реакция имеет высокую степень специфичности.

В последнее десятилетие созданы стратегии ковалентного связывания ПЭГ с белками (таблица 25). Как правило, монометилловый эфир ПЭГ (мПЭГ) используется для пегилирования после активации (обычно многоступенчатой) гидроксильной группы с помощью фрагментов реактивного белка. Потенциально интересным реагентом, который мог бы способствовать преодолению этих проблем, является диэтиловый скварат (рисунок 25). Диэтиловый скварат состоит из двух связанных сложных эфиров карбоновых

кислот винилогического ряда, разделенных углерод-углеродной двойной связью. Ранее диэтиловый скварат использовался для amino-селективного, гидрокси-ортогонального присоединения углеводов [Shu-jie H. et al., 2008] и гликопептидов [Westerlind U. et al., 2008] к белкам. На настоящий момент известна одношаговая активация  $\alpha$ -амино-ПЭГ диэтиловым скваратом [Dingels C. et al., 2012].

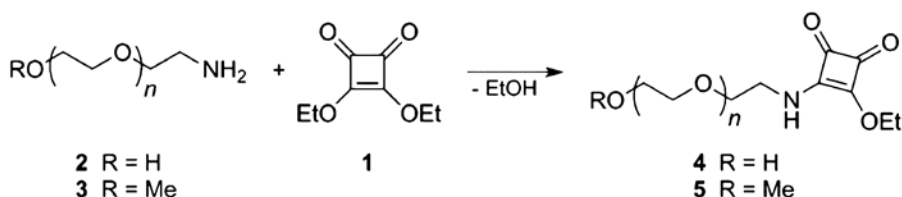


Рисунок 25. Одношаговая активация  $\alpha$ -амино-ПЭГ диэтиловым скваратом [Dingels C. et al., 2012]. 1 – диэтиловый скварат.

С тех пор как первый пегилированный продукт был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (1990 г.), химическое пегилирование широко используется в качестве пост-производственной модификации для улучшения биомедицинской эффективности и физико-химических свойств терапевтических белков.

В таблице 26 приведена только небольшая часть пегилированных биофармацевтических препаратов. Однако даже эта малая доля препаратов, безусловно, огромный шаг в лечении многих тяжелых заболеваний. Таких как тяжелого комбинированного иммунодефицита (*Adagen*) [Bax B. E., et al., 2000; Booth C. et al., 2007], острого лимфобластного лейкоза (*Oncaspar*) [Broome J. D., 1961; Killander D. et al., 1976], хронического гепатита C (*Pegasys*) [Rajender R. K., et al., 2002]. Синтезированы соединения для преодоления нежелательных свойств антител (*Fab's*) [Constantinou A. et al., 2008; Kontermann R. E., 2009; Chen C., et al., 2011], лечения болезни Крона и ревматоидного артрита (*Certolizumab Pegol*) [Humphreys D. P. et al., 2007; Liddell J. M., 2009].

Таблица 26. ПЭГилированные биофармацевтические препараты [Jevs'evan S. et al., 2010].

Название препарата	Компания	Оригинальный белок	Терапевтическое показание	Обоснование разработки	Год выпуска
Adagen	Enzon	Бычий аденозин Деамидаза	Тяжелый комбинированный иммунодефицит	Увеличение периода полураспада в сыворотке	1990
Oncaspar® (Pegaspargase)	Enzon	Аспагиназа	Острый лимфобластный лейкоз	Увеличение периода полураспада в сыворотке, уменьшение аллергических реакций	1994
PEG-Intron® (Пегилированный IFN- $\alpha$ 2b)	Schering-Plough / Enzon	IFN- $\alpha$ 2b	Гепатит C	Увеличение периода полураспада в сыворотке	2001



Название препарата	Компания	Оригинальный белок	Терапевтическое показание	Обоснование разработки	Год выпуска
Pegasys® (Пегилированный IFN-α2a)	Hoffmann-La Roche	IFN-α2a	Гепатит С	Увеличение периода полураспада в сыворотке	2002
Neulasta® (pegfilgrastim)	Amgen / Nektar	G-CSF	Нейтропения	Увеличение периода полураспада в сыворотке	2002
Somavert® (Pegvisomant)	Pfizer / Nektar	hGH mutein	Акромегалия	Антагонист hGH-рецепторов	2003
Macugen® or Macuverse®	Pfizer	Анти-VEGF аптамер (РНК олигонуклеотид)	Лечение глазных сосудистых заболеваний		2004
MIRCERA Пегилированный epoetin-β	Hoffmann-La Roche	Epoetin-β	Анемия, связанная с хронической почечной недостаточностью	Увеличение периода полураспада в сыворотке	2007
Certolizumab pegol (Cimzia)	UCB	Анти TNF Fab	Ревматоидный артрит и болезнь Крона	Увеличение периода полураспада в сыворотке	2008

Технология химического синтеза пегилированных лекарственных препаратов является многостадийной, сложной, с использованием высокотоксичных соединений, требующей очистки готового продукта [Hamidi M. et al., 2006].

Существующие отечественные достижения в области фундаментальной медицины, биотехнологии, молекулярной биологии, не уступают лучшим мировым разработкам, представляют серьезную базу для создания прорывных фармакологических технологий и лекарственных средств нового поколения с активностью, превышающей известные зарубежные аналоги. Как наиболее удачный пример можно привести оригинальную технологию электронно-лучевой иммобилизации белков с помощью ускорителя ИЛУ-10 (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», ООО «СФМ-Фарм», г. Новосибирск) [Vereschagin E. I. et al. 2001]. С помощью физического пегилирования был создан ряд фармакологически активных композиций: пегилированный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), пегилированные олигонуклеотиды и др. [Дыгай А. М. и др., 2009; Андреева Т. В. и др., 2010; Дыгай А. М., и др., 2010; Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н., Жданов В. В., 2011; Дыгай А. М. и др., 2011]. Результатом конъюгации низкомолекулярных препаратов с высокомолекулярным полимерным носителем является высокомолекулярное пролекарство. По специфической активности созданные высокомолекулярные пролекарства не уступают известным нативным аналогам. При этом сохраняется их механизм действия – взаимодействие лиганда и рецептора. Примечательно, что активно развивающееся новое направление пегилирования с использованием технологии электронно-лучевого синтеза положительно отличается от химического синтеза несопоставимо малыми временными и финансовыми затратами.

### 6.3. Эффекты и механизм действия модифицированной физическим пегилированием гиалуронидазы при пневмофиброзе

Большую привлекательность как фармакологически активный конъюгат представляет собой пегилированная на полиэтиленоксиде гиалуронидаза. Созданный с помощью ионизирующего излучения (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск) пролекарственный конъюгат, хорошо защищен от ферментативной деградации, высокая его концентрация в тканях сохраняется значительно дольше, чем при введении нативной гиалуронидазы. Технология электронно-лучевой иммобилизации белков позволила снизить риск развития побочных эффектов и токсичность.

На первом этапе исследования специфической активности были изучены противовоспалительные и антифибротические эффекты пегилированной гиалуронидазы (пегГД) в сравнении с нативной гиалуронидазой (ГД) у мышей линии C57BL/6 на модели токсического частично обратимого пневмофиброза, вызванного однократным интратрахеальным введением блеомицина. ПегГД и ГД вводили в фазу острого воспаления (профилактический режим) или в фазу активного отложения фибротических масс (терапевтический режим) интраназально (ИН), внутривенно (ВВ) или внутрижелудочно (ВЖ).

Как видно из рисунка 16 и таблицы 22, основные эффекты вводимых ИН в профилактическом режиме пегГД и нативной гиалуронидазы (доза 8 ЕД и 16 ЕД / 18 мкл буфера /мышь) связаны с блокадой повреждения блеомицином альвеолярного эпителия и уменьшением содержания коллагеновых волокон в легких. При этом пегилированный фермент более эффективно замедляет отложение фиброзных масс по сравнению с нативной гиалуронидазой. Интенсивность воспалительной реакции в блеомициновых легких под воздействием соединений в целом не изменяется. Различия состоят в том, что у больных не леченых мышей инфильтрат локализуется преимущественно у корня легкого, при лечении пневмофиброза наблюдается диффузная инфильтрация воспалительными клетками (рисунок 27). Изучение лейкоцитарной формулы позволило выявить тенденцию к увеличению количества макрофагов и снижению числа нейтрофилов в инфильтрате блеомициновых легких животных, получавших нативную гиалуронидазу или пегГД.

Таблица 27. Влияние пегилированной гиалуронидазы при внутривенном и внутрижелудочном введении на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при частично обратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ ).

День исследования	Интактный контроль	Пневмофиброз	Пневмофиброз + ВВ пегГД	Пневмофиброз + ВЖ пегГД
7	1,13 $\pm$ 0,07	3,05 $\pm$ 0,11 *	2,98 $\pm$ 0,32	3,07 $\pm$ 0,37
14	1,14 $\pm$ 0,03	3,97 $\pm$ 0,12 *	4,01 $\pm$ 0,39 *	3,85 $\pm$ 0,40
21	1,15 $\pm$ 0,06	4,22 $\pm$ 0,17 *	3,75 $\pm$ 0,23 *	4,10 $\pm$ 0,35

Примечание – \* – отмечена достоверность различия ( $P < 0,05$ ) показателя от интактного контроля.

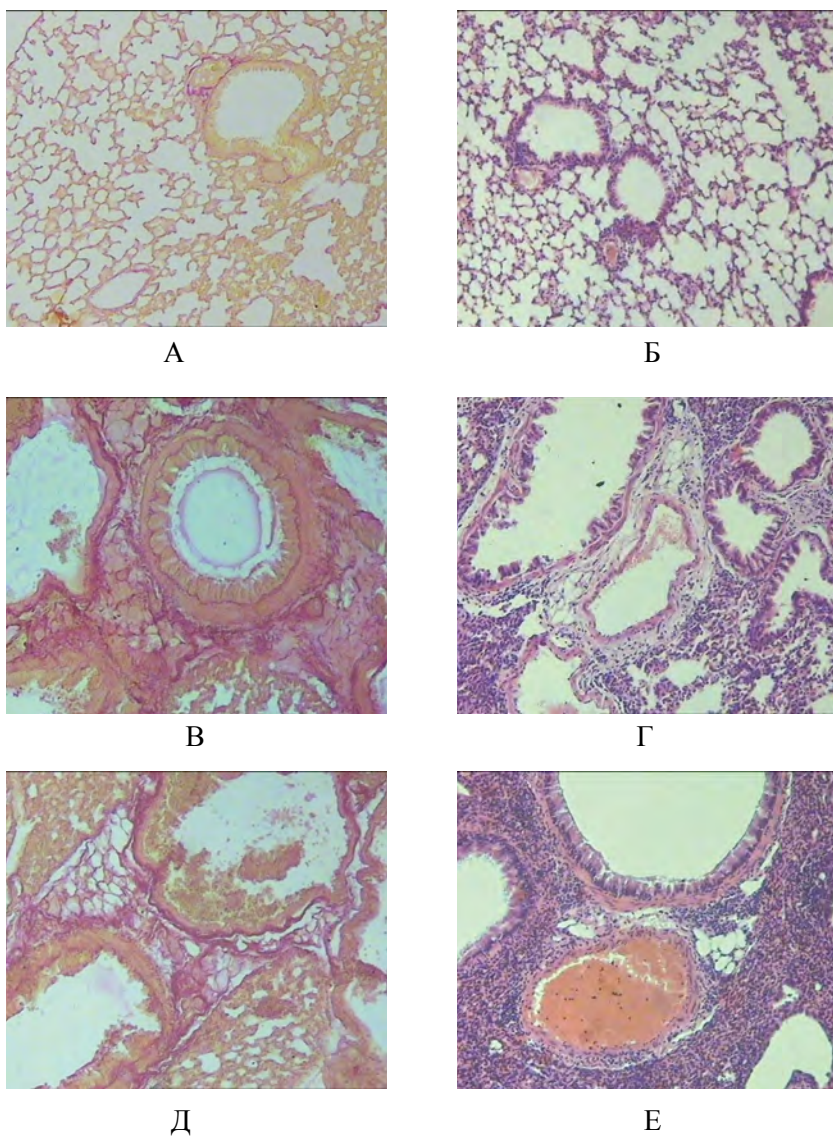


Рисунок 16. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 интактного контроля (А, Б), в условиях частично обратимого пневмофиброза (В, Г) и в условиях частично обратимого пневмофиброза, леченных внутривенным введением пегГД в профилактическом режиме (Д, Е), на 21-й день эксперимента. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (А, В, Д) и гематоксилином и эозином (Б, Г, Е), ув.  $\times 100$ .

Таким образом, ИН введение пегГД в профилактическом режиме изменяет характер воспалительной реакции и препятствует отложению фибротических масс в паренхиме легких у мышей при частично обратимом пневмофиброзе. Как видно из результатов гистологических исследований, антифибротический эффект 8 ЕД и 16 ЕД пегилированного фермента более выражен, чем у 8 ЕД и 16 ЕД нативной гиалуронидазы соответственно. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что лечебный эффект 8 ЕД пегГД значительно превышает таковой у 16 ЕД нативной гиалуронидазы. С нашей точки зрения, это связано с улучшением фармакокинетического профиля гиалуронидазы вследствие пегилирования, в частности, с низкой скоростью деградации в агрессивной среде. В дальнейших экспериментах для демонстрации большей эффективности пегилированной гиалуронидазы конъюгат вводили в меньшей в 2 раза дозе (8 ЕД/18 мкл буфера / мышь), чем нативную гиалуронидазу (16 ЕД/18 мкл буфера /мышь).

Различные транспортные системы, в том числе нетоксичный и низкоиммунотогенный полиэтиленоксид, способствуют проникновению активных молекул через гистогематические барьеры и клеточные мембраны [Сейфулла Р. Д. и др., 2008]. Однако при ВВ и ВЖ введении в профилактическом режиме 8 ЕД пегГД не оказывают влияния на воспаление и отложение фибротических масс в блеомициновых легких (таблица 28). Исходя из этого, мы полагаем, что прохождение пегилированного фермента через второй "эшелон" гистогематических барьеров затруднено.

Таблица 28. Влияние нативной гиалуронидазы и пегилированной гиалуронидазы при интраназальном введении на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при частично обратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ ).

		День исследования		
		7	14	21
Интактный контроль		1,13 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,06
Пневмофиброз		3,07 $\pm$ 0,07 *	3,91 $\pm$ 0,07 *	4,26 $\pm$ 0,14 *
Лечение пневмофиброза	8 ЕД нативной гиалуронидазы	3,08 $\pm$ 0,11 *	3,14 $\pm$ 0,28 *, #	3,54 $\pm$ 0,19 *
	8 ЕД пегГД	2,35 $\pm$ 0,16 *, #	2,33 $\pm$ 0,15 *, #	2,90 $\pm$ 0,11 *, #
Лечение пневмофиброза	16 ЕД нативной гиалуронидазы	3,05 $\pm$ 0,17 *	2,60 $\pm$ 0,21 *, #	3,24 $\pm$ 0,07 *
	16 ЕД пегГД	2,01 $\pm$ 0,18 *, #	1,85 $\pm$ 0,12 *, #	2,17 $\pm$ 0,13 *, #

Примечание –  $P < 0,05$  – отмечена достоверность различия показателя: от интактного контроля – \*, от блеомицинового контроля – #.

Полученные данные гистологических исследований позволяют рассматривать пегилированную гиалуронидазу как потенциальное антифибротическое соединение. Между тем вопрос о перспективах лечения хронических фиброзных заболеваний легких пегГД далек от разрешения. При поиске потенциальных антифибротических соединений необходимо различать лекарства, обладающие высокой активностью во время воспаления и синтеза соединительной ткани, и лекарства, препятствующие отложению соединительной ткани и прогрессированию фиброза. Вторая группа соединений

более значима для клинического применения, и это предопределило оценку активности пегГД в условиях интенсивного фиброгенеза.

Модель токсического пневмофиброза, вызванная однократным ИТ введением блеомицина, наиболее широко применяется в экспериментальных исследованиях для изучения патогенеза и поиска возможных способов лечения фиброзных заболеваний легких. Считается, что легкие содержат низкие уровни такого фермента как блеомицин-гидролаза. Это и обуславливает высокую чувствительность к блеомицин-индуцированному повреждению ткани [Sebti S. M. et al., 1989]. Блеомицин вызывает субплевральное рубцевание аналогичное человеческому заболеванию [Chua F., et al., 2005]. Внутри-альвеолярные почки, интрамуральные включения коллагена и закрытие альвеолярного пространства присутствуют у пациентов с ИЛФ и у животных, леченых блеомицином [Usuki J., Fukuda Y., 1995]. Однако, несмотря на явные преимущества обсуждаемой модели, следует упомянуть о частичной обратимости фиброза в условиях введения блеомицина [Izbicki G. et al., 2002]. Аспект медленного и необратимого прогрессирования болезни у пациентов с ИЛФ у экспериментальных животных, получавших блеомицин однократно, невоспроизводим [Chua F., et al., 2005].

Идиопатический фиброз легких, развивается в силу многократно повторяющихся ("циклических") травм альвеолярного эпителия. Это формирует ситуацию неполной регенерации, что, в конечном итоге, приводит к прогрессирующему и постоянному фиброзному "шраму". Независимыми группами исследователей, опираясь на положительные стороны модели однократного ИТ введения блеомицина, разработаны модели необратимого пневмофиброза [Moeller A. et al., 2008; Degryse A. L. et al., 2010; Degryse A. L., Lawson W. E., 2011; Mouratis M. A., Aidinis V., 2011]. В основе животной модели повторяющихся эпизодов повреждения легкого выступает многократное внутри-трахеальное введение блеомицина через процедуру интубации. По мнению Degryse A. L. и его коллег (2010), гистологические показатели легких при введении блеомицина раз в две недели, более коррелируют с гистопатологическими показателями у человека с ИЛФ, чем однократная инстилляционная цитостатика. Для проведения этих процедур авторы анестезировали животных изофлураном (ингаляция). В настоящем исследовании мы отказались от повторяющихся (каждые две недели) наркотических воздействий в силу возможного необратимого действия на нервную систему и извращения эффектов исследуемых конъюгатов. После первого интратрахеального последующие введения блеомицина производили ИН раз в неделю. Целесообразность выбранного подхода была подтверждена гистологическими исследованиями. В качестве доказательства хронического легочного фиброза выступает наличие у животных, леченных блеомицином курсом, гиперпластических альвеолярных эпителиальных клеток, наблюдаемых у больных ИЛФ, и прогрессирующее накопление в легких фибротических масс (рисунок 17, 18). Кроме этого, начиная с 40-го дня опыта, наблюдалась гибель животных, получавших блеомицин курсом (необратимый пневмофиброз), чего не наблюдалось у мышей с однократной инстилляцией цитостатика. К окончанию наблюдения популяция животных сократилась на 30%.

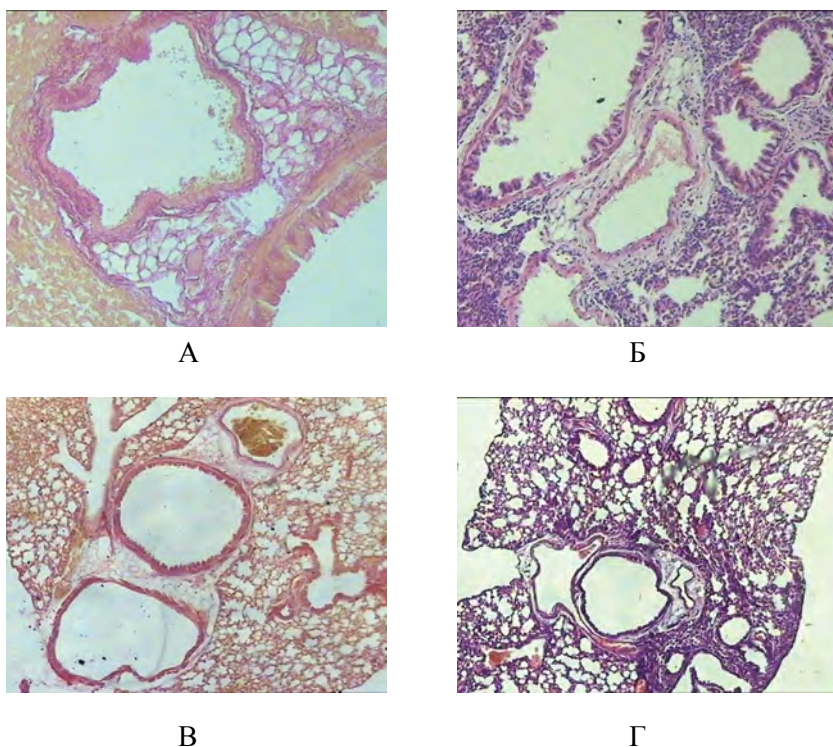


Рисунок 17. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 в условиях однократного введения блеомицина (А, Б; 21-й день опыта) и в условиях курсового введения блеомицина (В, Г; 60-й день опыта). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (А, В) и гематоксилином и эозином (Б, Г), ув.  $\times 100$ .

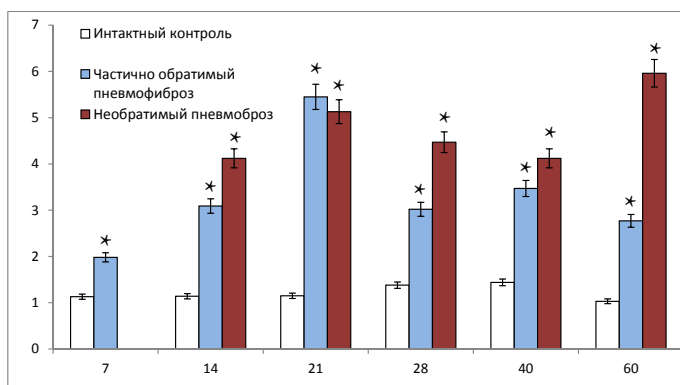


Рисунок 18. Содержание соединительной ткани в легких мышей линии C57BL/6 в условиях однократного введения блеомицина (частично обратимый пневмофиброз) и курсового введения блеомицина (необратимый пневмофиброз). По оси абсцисс – сроки исследования (день), по оси ординат – содержание коллагеновых волокон в легких (% от площади легочной ткани) ( $M \pm m$ ), \* – достоверность различия с животными интактного контроля ( $P < 0,05$ ).

В условиях многократно повторяющегося повреждения альвеолярного эпителия было получено подтверждение высокой эффективности пегилированного фермента. Введение 8 ЕД пегГД в фибротическую фазу болезни (терапевтический режим) препятствовало отложению коллагеновых волокон в паренхиме легких (таблица 29). Антифибротические свойства 8 ЕД пегГД более выражены, чем у 16 ЕД нативной гиалуронидазы.

Таким образом, ИН вводимая пегилированная гиалуронидаза эффективна не только при профилактическом введении, но и во время фибротической фазы развития болезни. По этому критерию пегилированный фермент может рассматриваться как "истинный" противофибротический фактор [Chaudhary N. I. et al., 2006]. Следует отметить, что при отмене лечения необратимого фиброза (42-й день) в легочной ткани вновь наблюдается прогрессивное отложение коллагена (60-й день). Это обстоятельство указывает на необходимость длительного введения пегГД.

Таблица 29. Влияние нативной гиалуронидазы и пегилированной гиалуронидазы при интраназальном введении на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при необратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ )

Группы	Сутки эксперимента		
	21 сутки	40 сутки	60 сутки
Интактный контроль	1,15 $\pm$ 0,12	1,12 $\pm$ 0,3	1,23 $\pm$ 0,07
Необратимый пневмофиброз	5,13 $\pm$ 0,2 *	4,12 $\pm$ 0,14 *	5,96 $\pm$ 0,11 *
Необратимый пневмофиброз + нативная гиалуронидаза	2,84 $\pm$ 0,32 *, #	2,61 $\pm$ 0,41 *, #	5,90 $\pm$ 0,79 *
Необратимый пневмофиброз + пегилированная гиалуронидаза	1,86 $\pm$ 0,19 #	2,09 $\pm$ 0,19 *, #	4,78 $\pm$ 0,64 *

Примечание –  $P < 0,05$  – отмечена достоверность различия показателя: от интактного контроля – \*, от блеомицинового контроля – #.

Подводя итог, разделу работы, посвященному поиску оптимальных путей и режимов введения конъюгата, следует сказать, что в доклинических исследованиях потенциальных антифибротических соединений целесообразно использовать обе модели блеомицинового поражения легких. В силу простоты и высокой степени воспроизводимости фиброгенеза в условиях однократного введения блеомицина следует проводить скрининг и оценку профилактических свойств соединений. На модели повторяющихся токсических травм альвеолярного эпителия необходимо оценивать их терапевтический эффект.

В нашей работе мы стремились изучить основы эффектов пегилированной гиалуронидазы на модели частично обратимого фиброза легких. Как было уже выше отмечено, основная мишень гиалуронидазы – гиалуроновая кислота (ГК). ГК задействована во многих физиологических процессах, включая эмбриональное развитие, воспаление, регенерацию тканей, вовлекается в регуляцию клеточной адгезии, миграции и пролиферации [Pilarski L. M. et al., 1999; Turley E. A. et al 2002; Solis M. A. et al., 2012]. Не исключается возможность участия ГК в развитии рака [Toole B. P., 2004] и ангиогенезе [Rooney P. et al., 1995]. Во внеклеточном матриксе ГК выполняет структурную функцию, связываясь с клетками и другими компонентами при помощи специфических



и неспецифических взаимодействий. Взаимодействуя с протеогликанами (агрекан, версикан), гиалуроновая кислота участвует в организации фибрина, фибронектина и коллагена [Delpech B. et al., 1997].

В предыдущих главах были представлены результаты собственных исследований, демонстрирующих качественное изменение клеточного контура легких у мышей в условиях однократной ИТ инстилляцией блеомицина. Острое воспаление сопровождается притоком в легкие CD45<sup>+</sup> пан-гемопоэтических клеток и ГСК. Отложению коллагена сопутствует накопление прогениторных фибробластных клеток и МСК-подобных клеток [Дыгай А. М., Скурихин Е. Г. 2012; Скурихин Е. Г. и др., 2012; Скурихин Е. Г. и др., 2012]. В культуре МСК-подобные клетки легких больных животных избирательно дифференцируются в фибробластные клетки (основные продуценты коллагена) [Pershina O. et al., 2012], а ГСК – в гранулоцито-макрофагальные и гранулоцитарные клетки-предшественники [Skurikhin E. et al., 2013]. Массированной инфильтрации легких СК и прогениторными клетками гемопоэтического и мезенхимального происхождения предшествует последовательная активация этих клеток в костном мозге и крови.

При лечении пегилированной гиалуронидазой частично обратимого пневмофиброза у животных мы отмечали снижение инфильтрации интерстиция альвеол гемопоэтическими клетками: ГСК в острую стадию воспаления (7-й день) и пан-гемопоэтических CD45<sup>+</sup>-клеток в фибротическую фазу развития болезни (21-й день) (рисунок 19).

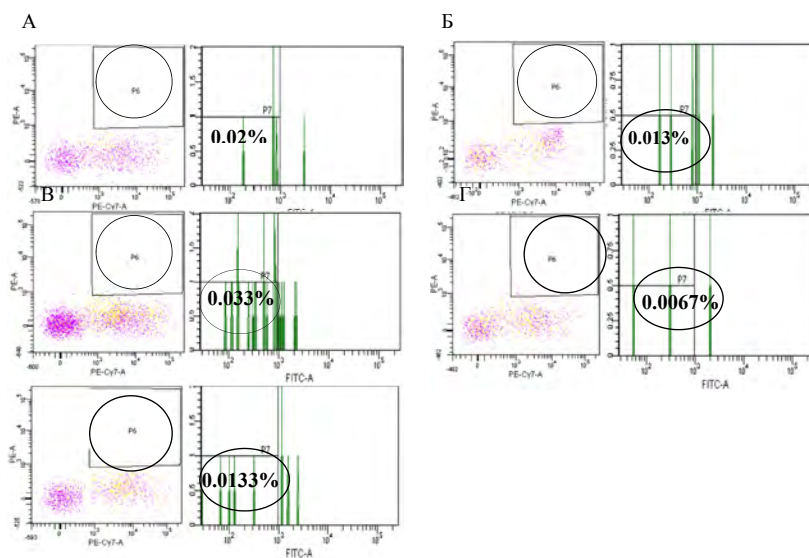


Рисунок 19. Дот-плоты, представляющие данные анализа количественной и качественной экспрессии (CD3, CD45R (B220), Ly6C, Ly6G (Gr1), CD11b, TER-119, CD34) и Sca-1+, c-Kit+, полученные с помощью флуоресцентной цитометрии, на неприлипающих клетках, выделенных из легких мышей линии C57BL/6 на 7-й день эксперимента. А – интактный контроль; Б – частично обратимый пневмофиброз; В – частично обратимый пневмофиброз, леченный спипероном; Г – частично обратимый пневмофиброз, леченный пегГД; Д – частично обратимый пневмофиброз, леченный пегГД и спипероном.



Реакция клеток мезенхимального происхождения в ответ на назначение пегГД была противоположной. Так, в легочной ткани увеличивается число прогениторных фибробластных клеток и МСК отрицательных по маркерам CD31, CD34, CD45 и положительных по маркерам CD44, CD73, CD90, CD106 на 21-й день болезни (рисунок 20). При этом популяция костномозговых МСК сокращается.

Таким образом, пегилированная гиалуронидаза препятствовала блеомин-индуцированной инфильтрации легких гемопоэтическими стволовыми клетками (фаза воспаления) и пан-гемопоэтическими клетками (фаза отложения коллагена). При этом пул костномозговых CD45<sup>+</sup>-клеток, и в том числе ГСК, оставался без изменений. С другой стороны, лечение увеличивает представительство клеток мезенхимального происхождения в легких в сроки наиболее интенсивного отложения фибротических масс.

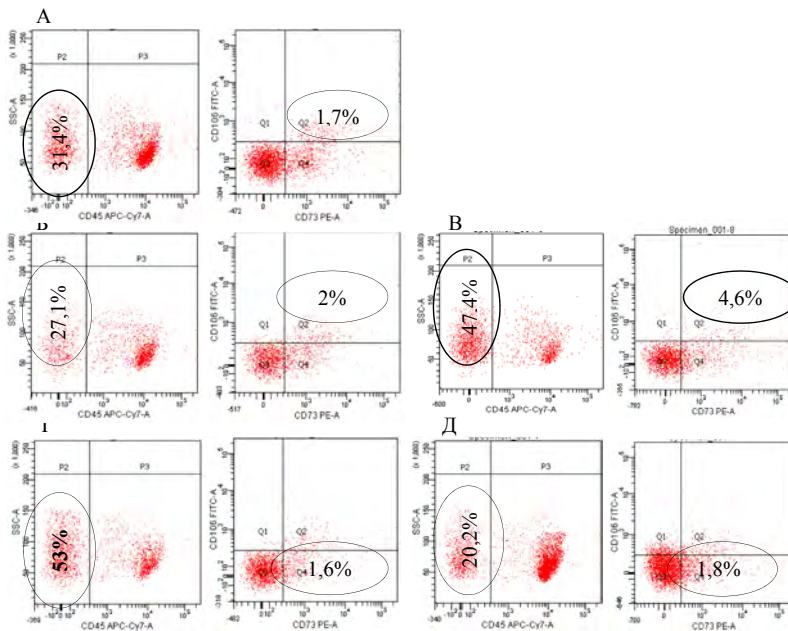


Рисунок 20. Дот-плоты, представляющие данные анализа количественной и качественной экспрессии CD45, CD73, CD106, полученные с помощью флуоресцентной цитометрии, на прилипающих клетках, выделенных из легких мышей линии C57BL/6 на 21-й день эксперимента. А – интактный контроль; Б – частично обратимый пневмофиброз; В – частично обратимый пневмофиброз, леченный пегГД; Г – частично обратимый пневмофиброз, леченный спипероном; Д – частично обратимый пневмофиброз, леченный пегГД и спипероном.

Объяснение качественным изменениям клеточного состава в блеомициновых легких при лечении пегГД нам видится в изменении физико-химических свойств матрикса гиалуронана. Известно, что при блеомин-индуцированном и радиационном пневмофиброзе концентрация ГК в легких экспери-

ментальных животных повышается в разы [Bitencourt C. S. et al., 2011]. Это обусловлено повреждением паренхимы и воспалением [Savani R. C. et al., 2000; Dentener M. A. et al., 2002; Jiang D. et al., 2007]. Считается, что повышение концентрации ГК обеспечивается стромальными и эпителиальными клетками [Pasonen-Seppanen et al., 2003]. ГК синтезируется и "выдавливается" из клетки через плазматическую мембрану в межклеточное пространство. ГК-цепочки во внеклеточном матриксе достигают огромных размеров (105 и 107 Da). Из-за сильного отрицательного заряда карбоксильных групп молекулы гиалуроновой кислоты взаимно отталкиваются, в водных растворителях полимер занимает неоправданно большой объем. Сформированные "полости" занимают молекулы воды. Возникающая структура обеспечивает устойчивость и пластичность тканей, а повышение внутреннего давления приводит к физическому разделению структуры гиалуронана и образованию так называемых "автомобильных дорог" (пространство для миграции клеток) [Toole B. P., Trelstad R. L., 1971; Pratt R. M. et al., 1975]. Совпадение миграции клеток воспаления с накоплением ГК известно давно [Toole B. P., Trelstad R. L., 1971], позднее это было продемонстрировано для стволовых клеток [Christophis C. et al., 2011; Jha A. K. et al., 2011]. В этих условиях уменьшаются межклеточные контакты, ослабляется крепление клеток с внеклеточным матриксом, нарушается межклеточная коммуникация, облегчается деление моноклеоров [Culp L. A. et al., 1979]. С озвученных выше позиций, вероятно, вводимая интраназально пегГД изменяет структурно-пространственную организацию матрикса гиалуронана (разрушает "автомобильные дороги") и тем самым нарушает инфильтрацию паренхимы легких ГСК.

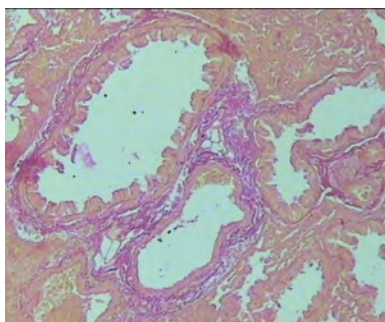
Иная картина наблюдается в легких после отмены лечения пегГД. К 21-у дню опыта матрикс гиалуронана, по всей видимости, восстанавливается. В этот период в легочной ткани увеличивается количество CD45-клеток, в частности МСК. Напрашивается вывод об активации мезенхимальной составляющей фиброгенеза, в частности дифференцировки МСК в фиброциты [Pershina O. et al., 2012]. Однако в этот период гистопатологические показатели легких больных животных улучшаются. Ранее C. S. Bitencourt с коллегами (2011) показал, что при блеомицин-индуцированном пневмофиброзе тесткулярная гиалуронидаза увеличивает количество МСК бронхо-альвеолярного пространства. Блокаду фиброза и нарушение отложения коллагена на фоне расширения пула МСК авторы объяснили мезенхимально-эпителиальным переходом и снижением продукции трансформирующего фактора роста (transforming growth factor – TGF- $\beta$ ) [Bitencourt C. S. et al., 2011]. Не исключено, что активность МСК реализуется через противовоспалительную паракринную программу действия. Подобный механизм, вероятно, реализуется и в результате лечения пегГД.

Обсуждая вопрос повышения в легких уровня CD45-клеток в условиях лечения, мы хотели бы обратить внимание на участие фибробластных клеток в ремодулировании легочной ткани. Как известно, в эту фазу фиброциты / фибробласты мигрируют вдоль границы внеклеточного матрикса и ремодулируют повреждение. После чего наблюдается апоптическая гибель фибробластов. Одновременно из раны удаляются клетки воспаления и наиболее интенсивно

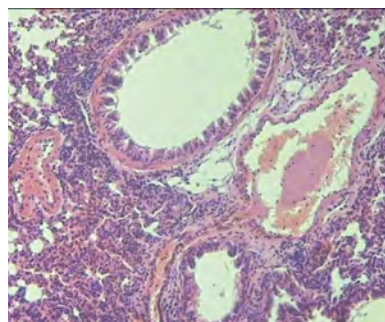
$\alpha$ -SMA миофибробласты [Fattman C. L., 2008]. Кроме этого, фибробластоподобные клетки способны дифференцироваться в миофибробласты, которые, в свою очередь, активно сокращают раневую поверхность [Maharjan A. S. et al., 2011]. Нами не исключается активация такого механизма опосредованно через высокомолекулярные остатки ГК, концентрация которых повышается в присутствии гиалуронидазы. ВМ-ГК способствует дифференцировке моноцитов в фиброциты [Wang J. F. et al., 2007]. Возможно, ВМ-ГК привлекает для ремодуляции циркулирующие в крови фиброциты [Maharjan A. S. et al., 2011]. Вовлечение прогениторных фибробластных клеток в процесс увеличения количества легочных фиброцитов маловероятно, так как их клональная активность (формирование КОЕ-Ф) под влиянием пегилированного фермента падает [Perschina O. et al., 2012].

Вопрос о повышении эффективности медикаментозного лечения является основным для любого заболевания. Известны примеры, когда назначение экзогенных СК и/или прогениторных клеток более выигрышно, чем другая терапия [Inamdar A. C. et al., 2013]. Однако терапевтические эффекты донорских клеток единичны и на фоне значительных побочных эффектов это сдерживает назначение клеточной терапии, в том числе при заболеваниях легких. Как было выше нами заявлено с приведением убедительных доводов в виде результатов собственных экспериментальных исследований, регуляция эндогенных СК нейротропными препаратами эффективна и безопасна в коррекции фиброза легкого. Проанализировав новые свойства (противовоспалительные и антифибротическое действие при пневмофиброзе) таких нейротропных соединений как резерпин, кетансерин и ципрогенптадин, спиперон и галоперидол, оценив механизмы их действия (модуляция пролиферации, дифференцировки, мобилизация в кровь, трансэндотелиальный переход стволовых и прогениторных клеток), мы предположили, что избирательное действие антагониста D2 дофаминовых рецепторов спиперона на мобилизацию и трансэндотелиальный переход СК и прогениторных клеток при восстановлении матрикса гиалуронана легких пегилированной гиалуронидазой (что приводит к улучшению хоминга к участку травмы, повышению выживаемости и реализации регенераторного потенциала) можно попытаться решить задачу полного выздоровления при пневмофиброзе.

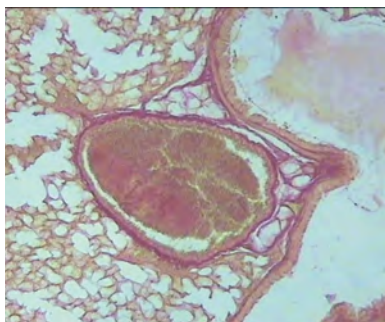
Из результатов гистологических исследований следует, что последовательно вводимые в профилактическом режиме пегГД и спиперон более эффективны при лечении частично обратимого пневмофиброза, чем при изолированном введении соединений: отложение коллагена в легких больных животных не регистрировалось (таблица 21; рисунок 21). Как позитивное свойство "комплексного" лечения следует отметить противовоспалительный эффект, приобретенный с введением в схему спиперона.



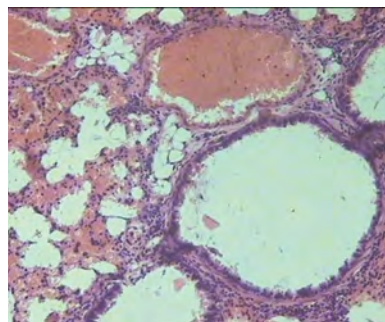
**А**



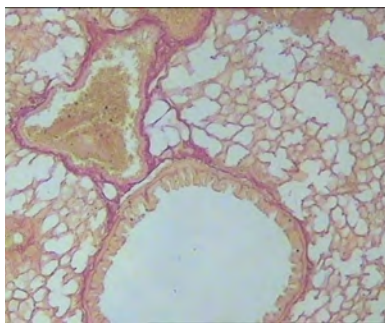
**Б**



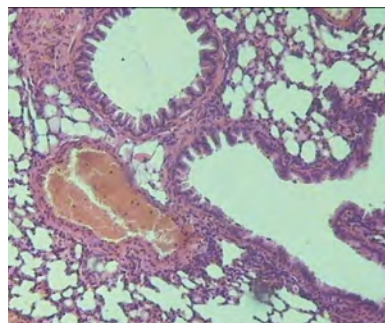
**В**



**Г**



**Д**



**Е**

Рисунок 21. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 в условия частично обратимого пневмофиброза не леченного (А, Б) и леченного спироном (В, Г) и пегГД и спироном (Д, Е). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (А, В, Д) и гематоксилином и эозином (Б, Е, Е), ув.  $\times 100$ , 21-й день эксперимента.

Таблица 21. Влияние изолированного и совместного с пегилированной гиалуронидазой введения спиперона на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при частично обратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ )

Сроки исследования (дни)	Интактный контроль	Обратимый пневмофиброз	Обратимый пневмофиброз + Спиперон	Обратимый пневмофиброз + Спиперон + пегГД
7	$1,12 \pm 0,05$	$3,07 \pm 0,07 *$	$2,09 \pm 0,11 \#$	$1,45 \pm 0,18 \#$
14	$1,13 \pm 0,02$	$3,91 \pm 0,07 *$	$2,75 \pm 0,12 * \#$	$1,22 \pm 0,14 \#$
21	$1,15 \pm 0,07$	$4,26 \pm 0,14 *$	$2,12 \pm 0,13 * \#$	$1,40 \pm 0,20 \#$

Примечание –  $P < 0.05$  – отмечена достоверность различия показателя от интактного контроля – \*; от блеомицинового контроля – #.

Примечательно, что последовательное назначение пегилированной гиалуронидазы и спиперона более эффективно, чем их изолированное использование, и в терапии необратимого пневмофиброза. В условиях повторяющихся токсических травм лечение начиналось в фибротическую фазу развития болезни (таблица 31, рисунок 22).

Таблица 26. Влияние изолированного и совместного с пегилированной гиалуронидазой введения спиперона на содержание соединительной ткани (% от общей площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 при необратимом пневмофиброзе ( $M \pm m$ )

Интактный контроль	Необратимый пневмофиброз	Необратимый пневмофиброз + Спиперон	Необратимый пневмофиброз + Спиперон + пегГД
<b>21-й день опыта</b>			
$1,15 \pm 0,06$	$5,13 \pm 0,75 *$	$1,86 \pm 0,18 \#$	$1,05 \pm 0,08 \#$
<b>40-й день опыта</b>			
$1,12 \pm 0,18$	$4,12 \pm 0,40 *$	$1,52 \pm 0,20 \#$	$1,52 \pm 0,20 \#$
<b>60-й день опыта</b>			
$1,23 \pm 0,16$	$5,96 \pm 0,93 *$	$4,96 \pm 1,34 *$	$2,78 \pm 0,42 *, \#$

Примечание.  $P < 0.05$  – отмечена достоверность различия показателя от интактного контроля – \*; от блеомицинового контроля – #.

Представленные данные гистологических исследований подтверждают состоятельность гипотезы о перспективности изменения структурно-пространственной организации матрикса гиалуронана фиброзированных легких (пегилированной гиалуронидазой) с последующей модуляцией функциональной активности нервной системы (антагонистами дофаминовых рецепторов) в лечении такового хронического заболевания, как фиброз легких.



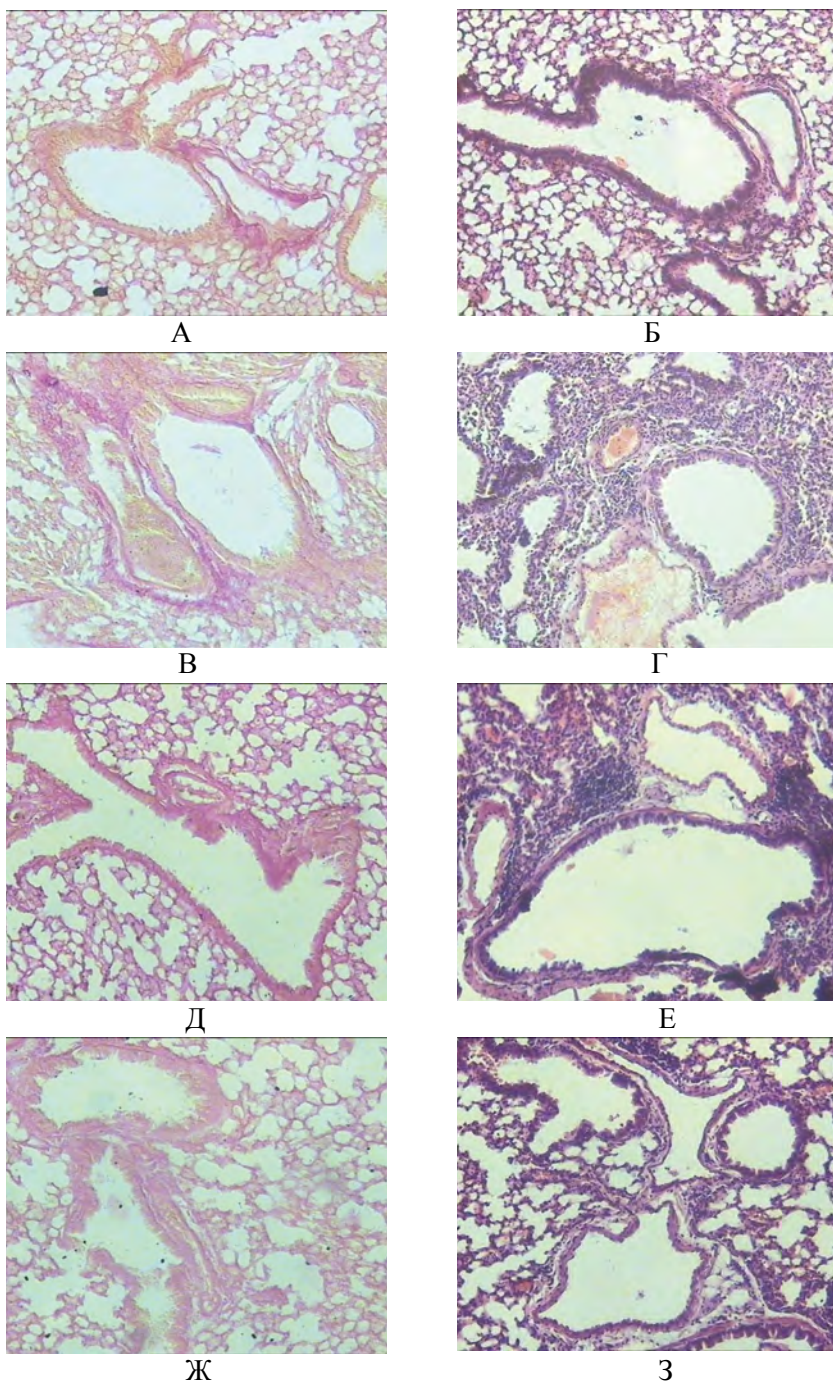


Рисунок 22. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 интактного контроля (А, Б), в условиях не леченного необратимого пневмофиброза (В, Г) и леченного спипероном (Д, Е) и последовательно вводимыми пегГД и спипероном (Ж, З). Окраска пикрофуксин по Ван-Гизону (А, В, Д, Ж) и гематоксилином и эозином (Б, Г, Е, З), ув.  $\times 100$ , 21-й день эксперимента.

## 6.4. Мицеллярная гиалуронидаза при пневмофиброзе

Для доставки фармакологически активной молекулы к мишени и защиты ее от гидролиза в агрессивной среде используют не только микроэмульсии, липосомы, полиэтиленгликоль и др. В качестве новых и более безопасных носителей предлагаются плуроники, представляющие собой блок-сополимеры полиоксиэтилена и поликиспропилена [Nishiyama N, Kataoka K., 2006]. Полимерные наночастицы синтезируются химическим путем и в определенных условиях образуют наноагрегаты (мицеллы). Мицелла может состоять из комбинации двух плуроников или полиэтиленгликоля с плуроником [Katragadda U. et al., 2011]. В основном подобные структуры пытаются использовать для таргетной терапии [Katragadda U. et al., 2011; Krupka T. M., Exner A. A., 2011; Wang K. et al., 2013; Chen L. et al., 2013]. Синтезирована и испытана в эксперименте полимерная мицелла итраконазол для лечения легочной грибковой инфекции у пациентов с иммуносупрессией [Moazeni E. et al., 2012]. По мнению Y. T. Xie (2012), полимерные мицеллы способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и поступать в мозг, что открывает новые перспективы в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Нами были исследованы специфические эффекты конъюгатов полимерных носителей плуроника L31 (преобладание гидрофобных свойств) и плуроника F68 (амфифильные свойства) с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой в сравнении с ферментом гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы (все субстанции произведены ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск). Конъюгаты получали с использованием технологии иммобилизации белков с помощью ионизирующего излучения (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск). Конъюгаты и фермент вводили в воспалительную (профилактический режим – 1–5-е день эксперимента) и фибротическую (терапевтический режим – 10–20-й день эксперимента) фазы развития пневмофиброза. Ежедневная доза гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы (ГН) в конъюгатах и целевого фермента составляла 16 ЕД.

В 1 серии эксперимента было показано, что в условиях частично обратимого пневмофиброза ИН введение конъюгатов плуроника L31 с ГН и плуроника F68 с ГН препятствовало отложению коллагена в ткани легких у мышей (рисунок 26). Так, окрашивание по Ван-Гизону выявило уменьшение площади отложения фиброзных масс в легких больных животных, получавших F68-ГН в профилактическом режиме, практически в 2 раза ( $p=0,0063$ ) по сравнению с патологическим контролем (1 группа). Однако даже при таком интенсивном уменьшении площадь соединительной ткани не достигала значений в интактном контроле. Профилактика пневмофиброза L31-ГН более эффективна, чем конъюгатом на основе плуроника и ГН. Как видно из рисунка 2, площадь коллагеновых волокон во 2 группе уменьшалась до уровня интактного контроля. Антифибротическая активность конъюгатов наблюдалась и при ИН введении в фибротическую фазу развития болезни: по сравнению с не леченным частично обратимым пневмофиброзом содержание

соединительной ткани в легких при назначении L31-ГН уменьшалось в 2,25 раза ( $p=0,0037$ ), при введении F68-ГН – в 1,7 раза ( $p=0,0047$ ) (рисунок 23, 24).

Таким образом, в условиях однократной блеомициновой травмы альвеолярного эпителия ИН введение в профилактическом режиме конъюгатов плюроника L31 с ГН и плюроника F68 с ГН препятствует формированию фибротических масс в легких. Примечательно, что назначение конъюгатов в терапевтическом режиме способствует рассасыванию уже сформировавшихся очагов фиброза. Следует отметить, во-первых, то обстоятельство, что антифибротическая активность конъюгатов значительно превосходит способность гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы снижать содержание соединительной ткани в легких. Во-вторых, эффект конъюгата на основе гидрофобного плюроника L31 более выражен, чем у конъюгата на основе амфифильного плюроника F68.

При поиске оптимального способа введения (*2 серия экспериментов*) на модели частично обратимого пневмофиброза изучалась специфическая активность конъюгатов плюроника L31 с ГН при внутривенном и внутрижелудочном введениях в сравнении с полоксамер-гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой. Оказалось, что ВВ и ВЖ назначения конъюгата и фермента в профилактическом и терапевтическом режимах не влияли на гистологическую картину легких больных мышей.

В клинической практике не только крайне редко удается диагностировать ИЛФ на стадии воспаления, но и не возможно прогнозировать развитие заболевания. В этой связи, наиболее значимыми для клинического применения выступают лекарственные средства, препятствующие прогрессированию фиброза легких [Дыгай А. М. и др., 2012]. Считается, что эффективные в наиболее тяжелую фазу заболевания (прогрессивное отложение коллагеновых волокон) соединения могут рассматриваться как «истинные» противофибротические факторы [Chaudhary N. I., Schnapp A., Park J. E., 2006]. В *3 серии экспериментов* на модели повторяющихся блеомициновых травм альвеолярного эпителия нами показано, что интраназальная инокуляция на 10–20-й день опыта L31-ГН препятствует повреждению легких и блокирует фиброгенез (рисунок 25). Выживаемость больных животных, получавших субстанцию, существенно повышается. В этих условиях целевой фермент практически не влияет на фиброгенез. Примечательно, что сокращение курса лечения с 10 дней (12 группа) до 6 дней (13 группа) практически не повлияло на положительный эффект L31- ГН.

Итак, конъюгат на основе гидрофобного плюроника L31 и гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы эффективен в условиях необратимого пневмофиброза при назначении в фазу отложение коллагеновых волокон. Это позволяет заявить L31-ГН как новый и перспективный инструмент для лечения легочного фиброза. Повышенный интерес к представленной фармакологической конструкции заключается и в том, что полимеросома как носитель фермента позволяет варьировать длительность лечения без потери его эффективности.



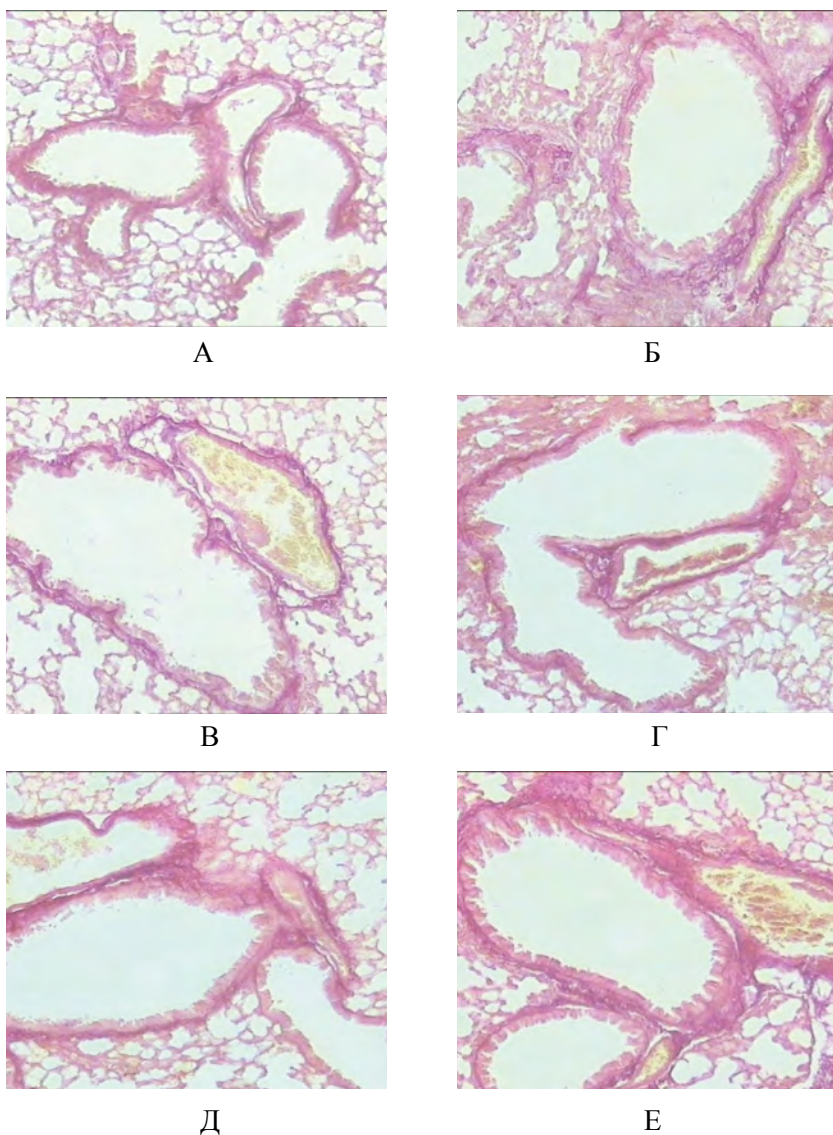


Рисунок 23. Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 в условиях частично обратимого пневмофиброза на 21-й день эксперимента. А – интактный контроль; Б – частично обратимый пневмофиброз – ОПФ (1 группа); В – лечение ОПФ введением конъюгата полимерного носителя плуроника L31 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой в профилактическом режиме – 1–5-й день опыта (2 группа); Г – лечение ОПФ введением конъюгата полимерного носителя плуроника F68 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой в профилактическом режиме – 1–5-й день опыта (3 группа); Д – лечение ОПФ введением конъюгата полимерного носителя плуроника L31 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой в терапевтическом режиме – 10–20-й день опыта (5 группа); Е – лечение ОПФ введением конъюгата полимерного носителя плуроника F68 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой в терапевтическом режиме – 10–20-й день опыта (6 группа). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону;  $\times 100$ .

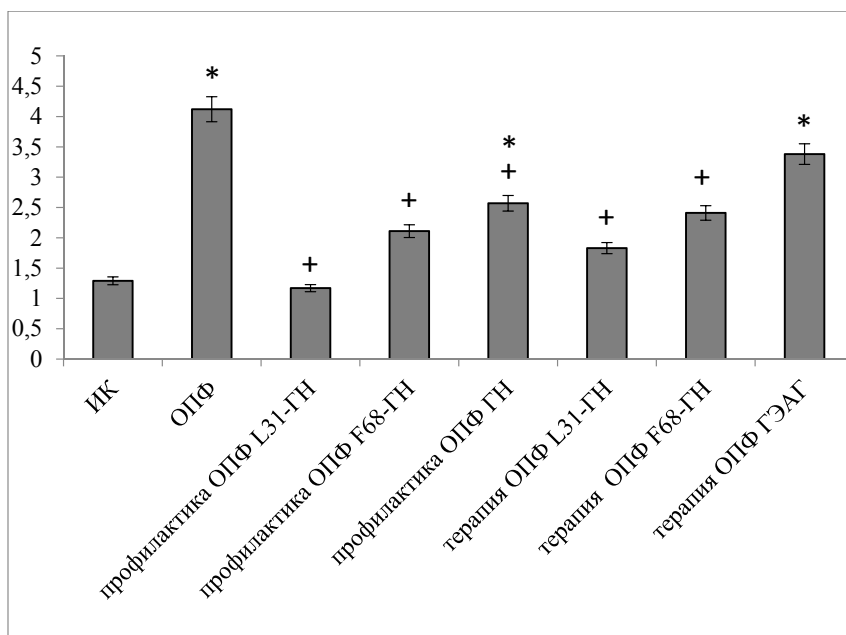


Рисунок 24. Содержание соединительной ткани в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях частично обратимого пневмофиброза на 21-й день эксперимента. ИК – интактный контроль; ОПФ – частично обратимый пневмофиброз (1 группа); профилактика ОПФ L31-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроника L31 с гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазой на 1–5-й день эксперимента (2 группа); профилактика ОПФ F68-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроника F68 с гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазой на 1–5-й день (3 группа); профилактика ОПФ ГН – введение гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы на 1–5-й день (4 группа); терапия ОПФ L31-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроника L31 с гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазой на 10–20-й день (5 группа); терапия ОПФ F68-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроника F68 с гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазой на 10–20-й день (6 группа); терапия ОПФ ГН – введение гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы на 10–20-й день (7 группа). По оси абсцисс – группы животных, по оси ординат – содержание коллагеновых волокон в легких (% от площади легочной ткани), \* – достоверность различия с животными интактного контроля ( $P < 0,05$ ), + достоверность различия с больными животными без лечения ( $P < 0,05$ ).

В литературе обсуждаются механизмы действия полимеросом. По некоторым данным, полимеросомы адсорбируются на базальной и клеточной мембране [Krupka TM et al., 2010]. При этом отмечают изменения физико-химических свойств мембран (вязкости, проницаемости) [Kabanov A. V., 2006], после чего происходит деградация полимеросомы [Coelho J. F. et al., 2010]. На этом фоне реализуется действие лекарственных средств. Исследуемые в настоящей работе конъюгаты размерами около 100 нм. Частицы таких размеров носят название «респираторная фракция» и обладают максимальным фармакологическим эффектом, так как проникают без разрушения в альвеолы, где после деградации полимерного носителя гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидаза реализует свое действие – ремодулирует матрикс гиалуронана.

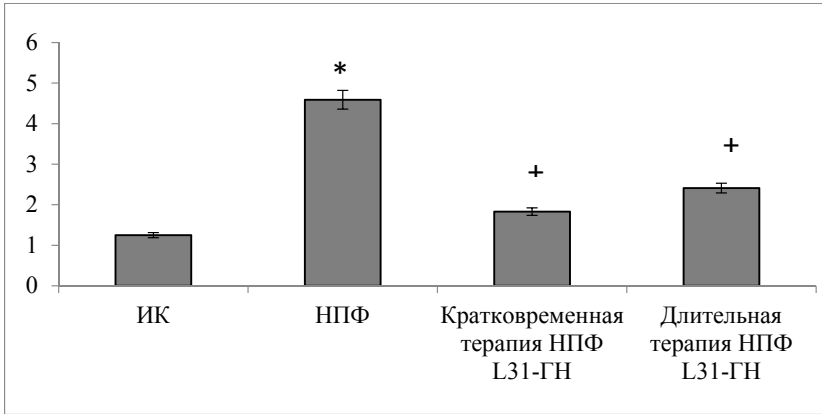


Рисунок 25. Содержание соединительной ткани в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях необратимого пневмофиброза на 21-й день эксперимента. ИК – интактный контроль; НПФ – необратимый пневмофиброз (14 группа); Кратковременная терапия НПФ L31-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроники L31 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой на 10–15-й день (13 группа); длительная терапия НПФ L31-ГН – введение конъюгата полимерного носителя плюроники L31 с гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазой на 10–20-й день (12 группа). По оси абсцисс – группы животных, по оси ординат – содержание коллагеновых волокон в легких (% от площади легочной ткани), \* – достоверность различия с животными интактного контроля ( $P < 0,05$ ), + – достоверность различия с больными животными без лечения ( $P < 0,05$ ).

## Заключение

По оценкам зарубежных экспертов и специалистов Российской Федерации, около 45% всех случаев смерти могут быть отнесены к заболеваниям, где фиброз играет важную патогенетическую роль. Фиброз является основным компонентом патологических процессов многих распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы, печени, легких и почек, ведущим патологическим признаком хронических аутоиммунных заболеваний (склеродермия, ревматоидный артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, миелофиброз, системная красная волчанка). Фиброз может влиять на опухолевую инвазию и метастазирование, хроническое отторжение трансплантата и многие прогрессирующие миопатии. Это ставит фиброз в ряд ведущих и не разрешенных до сих пор проблем современной медицины. Независимо от этиологии и тканевой принадлежности общая формула фиброза – это накопление молекул экстрацеллюлярного матрикса, представляющих собой рубцовую ткань, что, в конечном итоге, приводит к нарушению архитектуры ткани и полиорганной недостаточности [Gribbin J., Hubbard R.B., Jeune I. L. et al., 2006; Fernandez Perez E. R., Daniels C. E., Schroeder D. R. et al., 2010; Wynn T.A., 2011; Borthwick L.A., Wynn T.A., Fisher A.J., 2013].

Триггером, способным запустить развитие фиброзной болезни, выступают наследственные генетические нарушения, многократные воздействия токсинов, курение, хроническое аутоиммунное воспаление, реакция трансплан-

тат против хозяина при терапии донорскими клетками, инфаркт миокарда, высокий уровень холестерина в сыворотке крови, ожирение, диабетические нарушения и гипертония [Wynn T.A., 2008]. Хроническое воспаление играет важную роль в инициации фиброза [Spesa S. et al., 2012]. Важность клеток воспаления в поддержании легочного фиброза у животных и людей не подвергается сомнению. После повреждения альвеолярного эпителия нейтрофилы, а позднее макрофаги мигрируют к травмированной ткани, очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, при этом продуцируют различные цитокины и хемокины, в том числе, провоспалительные и профибротические [Bringardner B. D., Baran C. P., 2008]. Так, интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-13 и трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) увеличивают количество клеток воспаления в области травмы и вызывают пролиферацию резидентных фибробластов.

За последние 10 лет были достигнуты существенные успехи в понимании патогенеза ИЛФ. Акцент с преимущественно провоспалительной компоненты заболевания сместился в сторону фибробластического процесса, нефизиологического ремодулирования тканей, чрезмерного накопления белков внеклеточного матрикса (коллагена) и ангиогенеза. Однако ни Европейское медицинское агентство (European Medicines Agency, EMEA) и Северо-американское агентство (FDA) по лекарственным средствам, ни соответствующие структуры в других ведущих странах мира, в том числе Китае, России и Японии, на настоящий момент не могут предложить эффективную антифибротическую терапию. Активно внедряемый в клиническую практику препарат для лечения ИЛФ пирфенидон замедляет, но не останавливает фиброз, применение его вызывает различные побочные эффекты. Это подчеркивает настоятельную необходимость поиска новых медикаментозных методов лечения фиброза.

В последнее время уделяется огромное внимание такому направлению лечения, как терапия стволовыми клетками (СК) [Siniscalco D., Sullo N., Maione S. et al., 2008; Uccelli A., Moretta I., Pistoia V., 2008]. Трансплантация гемопоэтических СК (ГСК) используется для лечения Т-клеточного лейкоза у взрослых, лимфомы, множественной миеломы и др. Известны случаи лечения донорскими мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) нейродегенеративных и гастроинтестинальных заболеваний, инфарктов и инсультов, лейкозов, лимфом, реакции «трансплант против хозяина», диабета, костных (хрящевых) заболеваний [Tounson A., Thakar R. G., Lomax G. et al., 2011]. Клеточная терапия с использованием МСК рассматривается как перспективный подход лечения хронических заболеваний легких, в том числе, легочного фиброза [Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C. et al., 2003; Loebinger M. R., Aquilar S., Janes S. M., 2008; Siniscalco D., Sullo N., Maione S. et al., 2008; Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. et al., 2009; Shukla M. N., Rose J. L., Ray R. et al., 2009].

Помимо лечебных эффектов аллогенная трансплантация СК оказывает неспецифическое иммуносупрессивное действие. У пациентов, получающих МСК-терапию, повышается риск развития вирусных, грибковых и бактериальных инфекционных заболеваний, аллергических реакций [Benjamin D. K. Jr., Miller W. C., Bayliff S. et al., 2002; Engelhard D., Cordonnier C., Shaw P. J. et al.,

2002]. Возможен рецидив лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза» [Horowitz M. M., Gale R. P., Sondel P. M. et al., 1990]. В клинике для клеточной терапии применяются прекультивированные моноклеары. В некоторых случаях это может привести к изменению фенотипа и функций СК [Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al., 2000; Banfi A., Bianchi G., Notaro R. et al., 2002], в том числе, приобретению неопластических свойств [Lalu M. M., McIntyre L., Pugliese C. et al., 2012]. Выделенные из костного мозга реципиентов МСК в различные сроки после трансплантации демонстрируют черты частичного, а чаще, полного химеризма [Lee S. T., Jang J. H., Cheong J. W. et al., 2002; Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B. et al., 2007]. Существуют данные о достаточно большой вариабельности иммуномодулирующих свойств МСК [Tse W. T., Pendleton J. D., Beyer W. M. et al., 2003]. Ряд авторов придерживается мнения, что эффекты трансплантированных МСК связаны с паракринными механизмами [Kang S. K., Shin I. S., Ko M. S. et al., 2012]. В этой связи можно говорить о том, что при клеточной терапии донорские МСК не реализуют свой регенераторный потенциал.

До настоящего времени 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 [Muraglia A., Cancedda R., Quarto R., 2000; Tremain N., Korkko J., Ibberson D. et al., 2001]. Такая нестабильность эффектов клеточной терапии, отсутствие стандартизированных и эффективных методов получения достаточного количества клеточного материала с заданными свойствами для трансплантации выступают серьезным препятствием для развития терапии СК [Garcia-Castro J., Trigueros C., Madrenas J. et al., 2008]. Есть сомнения в том, что индуцированные донорские плюрипотентные СК взрослого организма эквивалентны эмбриональным СК (ЭСК) по свойствам [Robinton D. A., Daley G. Q., 2012]. Вышеизложенные негативные эффекты трансплантации предопределили поиск новых подходов лечения стволовыми клетками.

Практически во всех органах и тканях существуют так называемые регионарные СК [Meirelles L. S., Chagastelles P. C., Nardi N. B., 2006; Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D. et al., 2006; Krampera M., Franchini M., Pizzolo G. et al., 2007]. Фармакологическая модуляция функций регионарных СК может явиться более безопасным методом лечения многих хронических заболеваний по сравнению с трансплантацией СК. Однако на сегодняшний день роль регионарных СК различных тканей и органов в патогенезе хронических заболеваний и процессах регенерации остается малоизученной. Это затрудняет разработку тактики медикаментозного лечения с использованием средств, модулирующих функции эндогенных СК взрослого организма.

Продemonстрировано, что одновременно с инфильтрацией интерстиция альвеол и альвеолярных ходов воспалительными клетками (лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги и нейтрофилы) отмечается лейкоцитоз в периферической крови и гиперплазия костномозгового гемопоэза. В фазу воспаления причиной системного увеличения количества морфологически распознаваемых гемопоэтических клеток (лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов, клеток системы моноклеарных макрофагов) в костном мозге

с последующей их мобилизацией в кровь и миграцией в легкие выступает стимуляция костномозговых «долго живущих» ГСК и гемопоэтических прогениторных клеток, формирующих *in vitro* гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные, гранулоцитарные и эритроидные колонии. Фибротическая фаза заболевания характеризуется экспансией легких фибробластными прогениторными клетками с высокой клональной активностью (образование фибробластных колоний) и МСК, интенсивно дифференцирующимися в фибробластные клетки. Кроме этого, в костном мозге и крови выявлено существенное повышение числа фибробластных предшественников и прилипающих к пластику клеток, демонстрирующих МСК-подобный фенотип.

В настоящей монографии представлен новый материал, раскрывающий различные аспекты этиологии и патогенеза ИЛФ. Основу материала составляют данные о жизнедеятельности различных клонов СК и прогениторных клеток (гемопоэтические, мезенхимальные, эндотелиальные, эпителиальные) костного мозга, крови, легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения блеомицина. Оригинальные результаты позволили сформировать представление о роли глубокого резерва организма в восстановлении количества и функций клеток и тканей, а также выявить причину невозможности реализации регенеративного потенциала СК и прогениторных клеток взрослого организма при пневмофиброзе. По результатам доклинических исследований предложены новые маркеры воспаления и фиброза легких, мишени для медикаментозного лечения: ГСК, ММСК, эндотелиальные и эпителиальные прогениторные клетки.

Открытые новые факты жизнедеятельности СК и прогениторных клеток на блеомицин-индуцированной модели фиброза легких позволили заняться нам разработкой оригинальных высокоэффективных медикаментозных подходов коррекции воспаления, нарушения микрососудистого русла, альвеолярного эпителия, фиброза и эмфиземы легких. Так, ряд исследователей связывают выход из эндостальной «ниши» и мобилизацию в циркуляцию и миграцию в очаг травмы костномозговых ГСК с симпатической регуляцией такого регулятора активности ГСК как остеобласт. Исходя из этого, возникла гипотеза о том, что соединения, модулирующие активность симпатической системы, могут влиять на предшественники клеток крови и таким образом модулировать воспаление в легких.

В зарубежной и отечественной литературе представлены результаты экспериментальных и клинических исследований, указывающие на зависимость фибробластического процесса во многих тканях, в том числе в паренхиме легких, от серотонина. Вполне закономерно возникает предположение о том, что эффективное лечение больных с ИЛФ может быть связано с регуляцией серотонинового звена патогенеза фиброза. Оценку роли серотонина в пролиферации фибробластов и синтезе коллагена фибробластами при легочном фиброзе провел A. Fabre с коллегами (2008). Между тем, эта работа оставила без ответа вопрос о взаимодействии серотонина со стволовыми и прогениторными клетками гемо- и мезенхимопоэза.

Трансэндотелиальная миграция во многом зависит от такого амина как дофамин. Между тем, поиск эффективных препаратов, способных ингибировать дофаминовую составляющую трансэндотелиальной миграции стволовых клеток, участвующих в патогенезе и регенерации альвеолярной ткани при фиброзе легких, не проводится.

В качестве потенциального антифибротического средства предлагаются соединения, ремодулирующие легочный матрикс гиалуронана (в частности, гиалуронидаза) [Дыгай А. М. и др., 2012]. Однако период полувыведения из ткани гиалуронидазы не превышает 3–5 минут, что существенно уменьшает продолжительность терапевтического эффекта [Girish K. S., Kemparaju K., 2007; Edith S. A. Hofinger et al., 2007]. В этой связи возникает вопрос о подходах сохранения гиалуронидазы в агрессивной среде. На сегодняшний день модификация молекул химическим или физическим пегилированием – активно развивающееся направление фармакологии. Присоединение белков к полиэтиленгликолю практически не влияет на фармакологическую активность базовой для конъюгата молекулы, но улучшает ее фармакинетические свойства: удлиняется период полураспада, замедляется выведение, отсутствуют пики плазменной / тканевой концентрации, понижаются токсичность, иммуногенность и аллергенность [Piedmonte D. M., Treuheit M. J., 2008; Jain N. K., Nahar Manoj, 2010]. В этой связи интересен для антифибротической терапии при ИЛФ пегилированный аналог гиалуронидазы, созданный с помощью ионизирующего излучения (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск).

Итак, изменяя структурную организацию матрикса гиалуронана легких, снижая активность симпатического звена мобилизации ГСК и гемопоэтических прогениторных клеток из костномозговой ниши в кровь, ингибируя серотониновый механизм дифференцировки МСК и синтеза коллагена фибробластами, влияя на миграцию СК и прогениторных клеток из микрососудистого русла в ткань блокаторами дофаминовых рецепторов, мы добились снижения воспаления и интенсивности фибропластического процесса в альвеолярной ткани. При этом отмечается усиление физиологической регенерации альвеолярного эпителия и микрососудистого русла, восстановление эластического межклеточного пространства.

## Литература

1. Авдеев, С. Н. Интерстициальные идиопатические пневмонии. В кн. Респираторная медицина: монография / С. Н. Авдеев; Под ред. А. Г. Чучалина. – М.: «Гэотар», 2007, Т. 2. – С. 217–250.

2. Андреева, Т. В. Роль стромальных и Thy 1,2<sup>+</sup>-клеток в механизмах действия иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при цитостатической миелосупрессии / Т. В. Андреева, А. В. Артамонов, А. А. Бекарев и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – Т. 150, № 11. – С. 523–528.

3. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2 / под ред. М. А. Пальцева – М.: Изд-во «Медицина», 2009. – 456 с.

4. Венгеровский, А. И. Лекции по фармакологии для врачей и провизоров / А. И. Венгеровский. – М.: Физико-математическая литература, 2007. – 704 с.

5. Гольдберг, Е. Д. Фармакологическая регуляция системы крови при экспериментальных невротических воздействиях / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. В. Жданов и др. – Томск, Изд-во ТГУ, 2007. – 155 с.

6. Девойно, Л. В. Нейромедиаторные системы в психоиммунномодуляции: допамин, серотонин, ГАМК, нейропептиды / Л. В. Девойно, Р. Ю. Ильющенко. – Новосибирск, изд-во ЦЭРИС, 1993. – 240 с.

7. Дегтярева, Ю. С. Бюллетень медицинских Интернет-конференций [Электронный ресурс] / Ю. С. Дегтярева. – 2013. – Том 3. № 3. – С. 759. Режим доступа (ISSN2224-6150) ID: 2013-03-8-T-1949.

8. Дыгай, А. М. Механизмы гранулоцитопозстимулирующей активности иммуобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, Е. И. Верещагин, В. В. Жданов и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2009. – № 7. – С. 60–64.

9. Дыгай, А. М. Создание нового класса лекарственных препаратов на основе нанотехнологий / А. М. Дыгай, А. В. Артамонов, Е. И. Верещагин, и др. // Сборник тезисов докладов участников Второго Международного форума по нанотехнологиям. – Москва, 2009. – С. 607–609.

10. Дыгай, А. М. Гемопозстимулирующая активность препаратов иммуобилизованных олигонуклеотидов и гиалуронидазы в условиях цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, О. В. Першина и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – Т. 150, № 11. – С. 545–549.

11. Дыгай, А. М. Гемостимулирующие эффекты иммуобилизованной гиалуронидазы и механизмы их развития при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, А. В. Артамонов, А. А. Бекарев и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – № 5. – С. 528–531.

12. Дыгай, А. М. Действие иммуобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на кроветворные предшественники различных классов при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – Т. 148, № 3. – С. 255–260.

13. Дыгай, А. М. Роль кроветворных предшественников различных классов в механизмах действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на кроветворение при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, О. В. Першина и др. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – Т. 148, № 4. – С. 400–404.

14. Дыгай, А. М. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты / А. М. Дыгай, В. В. Жданов. – М.: Изд-во РАМН, 2010. – 138 с.

15. Дыгай, А. М. Моноаминергическая регуляция кроветворения при экстремальных воздействиях / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, № 2. – С. 132–139.

16. Дыгай, А. М. Гемостимулирующие свойства иммуобилизованного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза эритропоэтина / А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 2. – С. 207–210.

17. Дыгай, А. М. Иммуобилизованный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор / А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов др. – Томск: Изд-во: ООО «Печатная мануфактура», 2011. – 149 с.

18. Дыгай, А. М. Противофибротическая и противовоспалительная активность нейролептика при пневмофиброзе / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 12. – С. 618–622.



19. Дыгай, А. М. Противофибротическая и противовоспалительная активность нейролептика при пневмофиброзе / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 206–210.
20. Дыгай, А. М. Реакции системы крови и стволовых клеток в условиях блеомициновой модели фиброза легких / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 8. – С. 132–136.
21. Дыгай, А. М. Эффекты и механизмы гемопоэзстимулирующего действия иммобилизованных олигонуклеотидов при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, В. Е. Гольдберг, А. В. Артамонов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 10. – С. 432–437.
22. Дыгай, А. М. Особенности регуляции катехоламинами стромальных предшественников и стволовых кроветворных клеток при цитостатической миелосупрессии / А. М. Дыгай, Е. С. Хмелевская, Е. Г. Скурихин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 12. – С. 665–671.
23. Дыгай, А. М. Стволовая клетка. Новые подходы в терапии дегенеративных заболеваний / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 2. – С. 3–13.
24. Дыгай, А. М. Антифибротическая активность иммобилизованной на полиэтиленоксиде гиалуронидазы в условиях блеомицининдуцированного пневмофиброза / А. М. Дыгай, Е. Г. Скурихин, Н. Н. Ермакова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 9. – С. 375–379.
25. Илькович, М. М. Интерстициальные болезни легких: в кн.: Заболевания органов дыхания / М. М. Илькович. – СПб, 1998. – С. 109–318.
26. Каверина, Н. В. Влияние резерпина на центральные моноаминергические механизмы регуляции кровообращения / Н. В. Каверина, Ю. Б. Розанов // Третья национальная конференция Болгарского общества физиологических наук. – Варна. – 1967. – С. 28.
27. Клинические рекомендации. Пульмонология / под ред. А. Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР «Медиа», 2007. – 238 с.
28. Кругляков, П. В. Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма / П. В. Кругляков, Е. А. Лохматова, В. Б. Климович, А. Ю. Зарицкий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 3. – С. 36–41.
29. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. / М. Д. Машковский. – М.: «Новая волна», 2006. – 1206 с.
30. Новикова, Л. Н. Оценка влияния антибиотиков на развитие экспериментального блеомицинового пневмофиброза / Л. Н. Новикова, Е. С. Лебедева, И. В. Двораковская и др. // Пульмонология. – 2008. – Т. 2. – С. 82–85.
31. Окорочков, А. Н. Диагностика и лечение болезней внутренних органов / А. Н. Окорочков. – Электрон. дан., 2003–1 электрон.опт. диск (CD-ROM). – Загл. с экрана.
32. Самцов, А. В. Клинический опыт применения препаратов на основе гиалуронидазы: комплексная терапия рубцовых деформаций кожи / А. В. Самцов, Е. Н. Лучина. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2012. – № 6. – С. 33–37.
33. Сейфулла, Р. Д. Проблемы использования нанотехнологий в фармакологии / Р. Д. Сейфулла, А. Б. Тимофеев, З. Г. Орджоникидзе и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 1. – С. 60–69.
34. Скофилд, Р. Самоподдержание кроветворных клеток-предшественников / Р. Скофилд, Т. М. Декстер // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1982. – № 7. – С. 13–18.

35. Скурихин, Е. Г. Влияние антисеротонинового препарата на развитие фиброза легких и систему крови при интратрахеальном введении блеомицина / Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева, Е. С. Хмелевская и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 12. – С. 618–622.
36. Скурихин, Е. Г. Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на развитие блеомицинового фиброза легких / Е. Г. Скурихин, Т. В. Андреева, Е. С. Хмелевская и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 1. – С. 30–33.
37. Скурихин, Е. Г. Дифференцировка мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток легких при пневмофиброзе / Е. Г. Скурихин, Е. С. Хмелевская, О. В. Першина и др. // Клеточные технологии в биол. и медицине. – 2012. – № 4. – С. 192–199.
38. Скурихин, Е. Г. Механизмы противовоспалительного и антифибротического действия симпатолитика в условиях токсического пневмофиброза / Е. Г. Скурихин, Е. С. Хмелевская, О. В. Першина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 5. – С. 590–595.
39. Скурихин, Е. Г. Противовоспалительный и антифибротический эффекты спиронола и иммобилизированной гиалуронидазы при совместном введении на моделях токсического частично обратимого и необратимого пневмофиброза / Е. Г. Скурихин, Н. Н. Ермакова, А. М. Резцова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 7. – С. 64–69.
40. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и их применение / А. Д. Турова, Э. Н. Сапожникова. – М.: Медицина, 1984. – 304 с.
41. Шмелев, Е. И. Дифференциальная диагностика интерстициальных болезней легких / Е. И. Шмелев // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 15–19.
42. Abbott, J. D. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury / J. D. Abbott, Y. Huang, D. Liu et al. // Circulation. – 2004. – Vol. 110(21). – P. 3300–3305.
43. Abdala-Valencia, H. Inhibition of allergic inflammation by supplementation with 5-hydroxytryptophan / H. Abdala-Valencia, S. Berdnikovs, C. A. McCary, D. Urick, R. Mahadevia et al. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2012. – Vol. 303(8). – P. L642–L660.
44. Abdel-Latif, A. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / A. Abdel-Latif, R. Bolli, E. K. Zuba-Surma et al. // Am Heart J. – 2008. – Vol. 156(2). – P. 216–226.
45. Abdollahi, A. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. / A. Abdollahi, M. Li, G. Ping // J Exp Med. – 2005. – Vol. 201. – P. 925–935.
46. Abdouh, M. 5-HT $_{1A}$ -mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF-kappaB to the nucleus / M. Abdouh, P. R. Albert, E. Drobetsky, J. G. Filep, E. Kouassi // Brain Behav Immun. – 2004. – Vol. 18. – P. 24–34.
47. Abdouh, M. Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT $_{1A}$  receptor mRNA and protein in activated B and T lymphocytes / M. Abdouh, J. M. Storrington, M. Riad, et al. // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 4382–4388.
48. Abe, R. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites / R. Abe, S. C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, C. N. Metz // Journal of Immunology. – 2001. – Vol. 166. – P. 7556–7562.

49. *Abuchowski, A.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol / A. Abuchowski, T. van Es., N. C. Palczuk et al. // *The Journal of Biological Chemistry.*– 1977.– Vol. 252, № . 11.– P. 3578–3581.
50. *Abuchowski, A.* Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase / A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk // *The Journal of Biological Chemistry.*– 1977.– Vol. 252, № . 11.– P. 3582–3586.
51. *Adamali, H. I.* Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis / H. I. Adamali, T. M. Maher // *Drug Design, Development and Therapy.*– 2012.– Vol. 6.– P. 261–272.
52. *Agostini, C.* Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. / C. Agostini, C. Gurrieri // *Proc. Am. Thorac Soc.*– 2006.– Vol.3.– P. 357–363.
53. *Aguilar, S.* Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis / S. Aguilar, C. J. Scotton, K. McNulty et al. // *PLoS ONE.*– 2009.– Vol. 11.– P. 1–13.
54. *Ahern, G. P.* 5-HT and the immune system / G. P. Ahern // *Current Opinion in Pharmacology.*– 2011.– Vol. 11.– P. 29–33.
55. Akron. 2009. The Chemical Database. The Department of Chemistry at the University of Akron. <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd> and search on CAS number. Last accessed: 10/22/09.
56. *Alagappan, V. K.* Angiogenesis and Vascular Remodeling in Chronic Airway Diseases / V. K. Alagappan, W. I. de Boer, V. K. Misra et al. // *Cell Biochem Biophys.*– 2013.– Vol. 67, № 2.– P. 219–234.
57. *Alder, J. K.* Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis / J. K. Alder, J. J.-L. Chen, L. Lancaster et al. // *PNAS.*– 2008.– Vol. 105.– P. 13051–13056.
58. *Alder, J. K.* Ancestral mutation in telomerase causes defects in repeat addition processivity and manifests as familial pulmonary fibrosis / J. K. Alder, J. D. Cogan, A. F. Brown et al. // *PLoS Genet.*– 2011.– Vol. 7.– P. 1–9.
59. *Ali, E. N.* Boswellic acids extract attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin and oxidative stress from gamma irradiation in rats / E. N. Ali, S. Z. Mansour // *Chinese Medicine.*– 2011.– Vol.36.– P. 1–14.
60. *Aliannejad, R.* Hepatitis C and pulmonary fibrosis / R. Aliannejad, M. Ghanei // *Hepatitis Monthly.*– 2011.– Vol. 11.– P. 71–73.
61. *Allen, S. J.* Lung hyaluronan during development: a quantitative and morphological study. / S. J. Allen, E. G. Sedin, A. Jonzon et al. // *Am J Physiol.*– 1991.– Vol. 260 – P. H1449–H1454
62. *Almeida, I.* Systemic sclerosis refractory disease: from the skin to the heart / I. Almeida, R. Faria, P. Vita, C. Vasconcelos // *Autoimmun. Rev.*– 2011.– Vol. 10.– P. 693–701.
63. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement // *Am J Respir Crit Care Med.*– 2000.– Vol. 161.– P. 646–664.
64. American Thoracic Society; European Respiratory Society. International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. // *Am J Respir Crit Care Med.*– 2001.– Vol. 165.– P. 277–304.
65. *Andersson-Sjöland, A.* Fibrocytes and the tissue niche in lung repair / A. Andersson-Sjöland, K. Nihlberg, L. Eriksson, et al. // *Respiratory Research.*– 2011.– 12:76. doi: 10.1186/1465-9921-12-76

66. Andersson-Sjoland, A. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. / A. Andersson-Sjoland, C.G. de Alba, K. Nihlberg, et al. // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 2129–2140.
67. Antonini, A. Fibrotic heart-valve reactions to dopamine-agonist treatment in Parkinson's disease / A. Antonini, W. Poewe // *Lancet Neurol.* – 2007. – Vol. 6. – P. 826–829.
68. Arase, Y. Hepatitis C virus enhances incidence of idiopathic pulmonary fibrosis / Y. Arase, F. Suzuki, Y. Suzuki et al. // *The world journal of gastroenterology.* – 2008. – Vol. 38. – P. 5880–5886.
69. Arciniegas, E. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. / E. Arciniegas, M. G. Frid, I. S. Douglas et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – L1–L8.
70. Arreola, R. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine / Arreola R., Alvarez-Herrera S. et al. // *Journal of Immunology Research.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–31.
71. Asahara, T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan et al. // *Science.* – 1997. – Vol. 275(5302). – P. 964–967.
72. Asahara, T. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine / T. Asahara, A. Kawamoto, H. Masuda // *Stem Cells.* – 2011. – Vol. 29(11). – P. 1650–1655.
73. Askari, A. T. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy / A. T. Askari, S. Unzek, Z. B. Popovic et al. // *Lancet.* – 2003. – Vol. 362(9385). – P. 697–703.
74. Atamas, S. P. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. / S. P. Atamas // *Life Sci.* – 2002. – Vol. 72. – P. 631–643.
75. Azuma, A. Exploratory analysis of a phase III trial of pirfenidone identifies a subpopulation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis as benefiting from treatment / A. Azuma, Y. Taguchi, T. Ogura et al. // *Respiratory Research.* – 2011. – Vol. 43. – P. 1–11.
76. Bae, K. S. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / K. S. Bae, J. B. Park, H. S. Kim et al. // *Yonsei Med J.* – 2011. – Vol. 52(3). – P. 401–412.
77. Bailey, A. S. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium / A. S. Bailey, H. Willenbring, S. Jiang et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – Vol. 103(35). – P. 13156–13161.
78. Bailey, F. E. Poly(Ethylene Oxide) / F. E. Bailey, J. V. Koleske. – New York: Academic Press, 1976
79. Baksh, D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy / D. Baksh, L. Song, R. S. Tuan // *J Cell Mol Med.* – 2004. – Vol. 8, № 3. – P. 301–316.
80. Balabanian, K. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes / K. Balabanian, B. Lagane, S. Infantino et al. // *J Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280(42). – P. 35760–35766.
81. Baldridge, M. T. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection / M. T. Baldridge, K. Y. King, N. C. Boles N. C., D. C. Weksberg, M. A. Goodell // *Nature.* – 2010. – Vol. 465(7299). – P. 793–797.
82. Balsam, L. B. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium / L. B. Balsam, A. J. Wagers, J. L. Christensen et al. // *Nature.* – 2004. – Vol. 428(6983). – P. 668–673.
83. Bando, M. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis / M. Bando, S. Ohno, K. Oshikawa et al. // *Respiratory Medicine.* – 2001. – Vol. 95. – P. 935–942.

84. *Banerjee, E. R.* Human embryonic stem cells differentiated to lung lineage-specific cells ameliorate pulmonary fibrosis in a xenograft transplant mouse model / E. R. Banerjee, M. A. Laflamme, T. Papayannopoulou et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. 1–15.
85. *Banerjee, E. R.* Characterization of lung stem cell niches in a mouse model of bleomycin-induced fibrosis / E. R. Banerjee, W. R. Jr. Henderson // Stem Cell Research & Therapy. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–21.
86. *Banfi, A.* Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells / A. Banfi, G. Bianchi, R. Notaro et al. // Tissue Engineering. – 2002. – Vol. 8. – P. 901–910.
87. *Banfi, A.* Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy / A. Banfi, A. Muraglia, B. Dozin et al. // Experimental Hematology. – 2000. – Vol. 28. – P. 707–715.
88. *Banks, D. E.* Coal workers' pneumoconiosis. / D. E. Banks. – In: Schwarz M. I., King T. E., editors. – Interstitial lung disease. – 4th edition. – Ontario (Canada): BC Decker, 2003. – P. 402–417.
89. *Barbera, J. A.* Vascular progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease. / J. A. Barbera, V. I. Peinado // Proc Am Thorac Soc. – 2011. – Vol. 8. – P. 528–534.
90. *Barry, F. P.* Mesenchymal stem cell transplantation for tissue repair / F. P. Barry, J. M. Murphy, T. O'Brien, B. Mahon // Seminars in plastic surgery. – 2005 – Vol. 19. – P. 229–239.
91. *Basbaum, C. B.* Airway secretion: a cell-specific analysis. / C. B. Basbaum, W. E. Finkbeiner. // Horm Metab Res. – 1988. – Vol. 20. – P. 661–667.
92. *Baumgartner, K. B.* Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis / K. B. Baumgartner, J. M. Samet, C. A. Stidley, T. V. Colby, J. A. Waldron // Am J Respir Crit Care Med. – 1997. – Vol. 155(1). – P. 242–248.
93. *Baumgartner, K. B.* Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study / K. B. Baumgartner, J. M. Samet, D. B. Couts et al. // Am J Epidemiol. – 2000. – Vol. 152. – P. 307–315.
94. *Bayer, H.* Serotonergic receptors on human airway epithelial cells / H. Bayer, T. Muller, D. Myrtek et al. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2007. – Vol. 36. – P. 85–93.
95. *Bax, B. E.* In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycolconjugated and native adenosine deaminase / B. E. Bax, M. D. Bain, L. D. Fairbanks // British Journal of Haematology. – 2000. – Vol. 109, №. 3. – P. 549–554.
96. *Behr, J.* Lung function in idiopathic pulmonary fibrosis – extended analyses of the IFIGENIA trial / J. Behr, M. Demedts, R. Buhl et al. // Respiratory Research. – 2009. – Vol. 10. – P. 1–9.
97. *Belema-Bedada, F.* Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2 / F. Belema-Bedada, S. Uchida, A. Martire, S. Kostin, T. Braun // Cell Stem Cell. – 2008. – Vol. 2(6). – P. 566–575.
98. *Bellinger, D. L.* Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease / D. L. Bellinger, B. A. Millar, S. Perez et al. // CellImmunol. – 2008. – Vol. 252. – P. 27–56.
99. *Belperio, J. A.* Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. / J. A. Belperio, M. P. Keane, M. D. Burdick et al. // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169. – P. 1037–1049.
100. *Belperio, J. A.* Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. / J. A. Belperio, M. P. Keane, M. D. Burdick et al. // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108. – P. 547–556.

101. *Belperio, J. A.* Role of CXCR2/ CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. / J. A. Belperio, M. P. Keane, M. D. Burdick, et al. // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115. – P. 1150–1162.
102. *Benjamin, D. K. Jr.* Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation / D. K. Jr. Benjamin, W. C. Miller, S. Bayliff et al. // The Pediatric Infectious Disease Journal. – 2002. – Vol. 21. – P. 227–234
103. *Bensadoun, E. S.* Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. / E. S. Bensadoun, A. K. Burke, J. C. Hogg et al. // Am J Respir Crit Care Med. – 1996. – Vol. 154. – P. 1819–1828
104. *Berg, R. A.* Regulation of collagen production by the beta-adrenergic system / R. A. Berg, J. Moss, B. J. Baum, R. G. Crystal // Journal of clinical investigation. – 1981. – Vol. 67. – P. 1457–1462.
105. *Berger, M.* The expanded biology of serotonin / M. Berger, J. A. Gray, B. L. Roth // Annu. Rev. Med. – 2009. – Vol. 60. – P. 355–366.
106. *Bhattacharya, R.* The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium / R. Bhattacharya, S. Sinha, S.-P. Yang et al. // Journal of Molecular Signaling. – 2008. – Vol. 3:14. – P. 1–11.
107. *Biasi, S. D.* Levels of circulating endothelial cells are low in idiopathic pulmonary fibrosis and are further reduced by anti-fibrotic treatments / S. D. Biasi, S. Cerri, E. Bianchini et al. // BMC Medicine. – 2015. – Vol. 13:277.
108. *Bjerkner, L.* Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. / L. Bjerkner, R. Lundgren, R. Hallgren // Thorax. – 1989. – Vol. 44. – P. 126–131.
109. *Bjerknes, M.* Gastrointestinal stem cells: II. Intestinal stem cells / M. Bjerknes, H. Cheng // American journal of physiology – gastrointestinal and liver physiology. – 2005. – Vol. 289. – P. 381–387.
110. *Biernacka, A.* TGF-beta signaling in fibrosis. / A. Biernacka, M. Dobaczewski, N. G. Frangogiannis // Growth Factors. – 2011. – Vol. 29. – P. 196–202.
111. *Biondi, M. L.* Plasma free and intraplatelet serotonin in patients with Raynaud's phenomenon / M. L. Biondi, B. Marasini, E. Bianchi, A. Agostoni // Int. J. Cardiol. – 1988. – Vol. 19. – P. 335–339.
112. *Bitencourt, C. S.* Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis / C. S. Bitencourt, P. A. T. Pereira, S. G. Ramos et al. // Fibrogenesis & Tissue Repair. – 2011. – Vol. 4. № 1. – P. 14040–14903.
113. *Blanpain, C.* Epidermal stem cells of the skin / C. Blanpain, E. Fuchs // Annual review of cell and developmental biology. – 2006. – Vol. 22. – P. 339–373.
114. *Bleul, C. C.* The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry / C. C. Bleul, M. Farzan, H. Choe et al. // Nature. – 1996. – Vol. 382 (6594). – P. 829–833.
115. *Bockaert, J.* GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions / J. Bockaert, G. Roussignol, C. Becamel et al. // Biochem. Soc. Trans. – 2004. – Vol. 32. – P. 851–855.
116. *Boehme, S. A.* Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin / S. A. Boehme, F. M. Lio, L. Sikora et al. // J. Immunol. – 2003. – Vol. 173. – P. 3599–3603.
117. *Boers, J. E.* Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium / J. E. Boers, A. W. Ambergen, F. B. Thunnissen // American journal of respiratory and critical care medicine. – 1998. – Vol. 157. – P. 2000–2006.
118. *Bois, R. M.* Cryptogenic fibrosing alveolitis/idiopathic pulmonary fibrosis. / R. M. Bois, A. U. Wells // Eur Respir J. – 2001. – Vol. 32, Suppl 1. – P. 43–55.

119. Bollyky, P.L. Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. / P.L. Bollyky, S.P. Evanko, R.P. Wu et al. // *Cell Mol Immunol.*– 2010.– Vol. 7.– P. 211–220.
120. Bonniaud, P. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF- $\beta$ -mediated pulmonary fibrosis. / P. Bonniaud, M. Kolb, T. Galt et al. // *J. Immunol.*– 2004.– Vol. 173.– P. 2099–2108.
121. Border, W.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. / W.A. Border, N.A. Noble. // *N. Engl. J. Med.*– 1994.– Vol. 331.– P. 1286–1292.
122. Borlongan, C.V. The great migration of bone marrow derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders /C.V.Borlongan, L.E. Glover, N. Tajiri, Y. Kaneko, T.B. Freeman // *Prog Neurobiol.*– 2011.– Vol. 95(2).– P. 213–228.
123. Borthwick, D.W.. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium / D.W. Borthwick, M Shahbazian., Q.T. Krantz et al.// *American journal of respiratory cell and molecular biology* – 2001.– Vol. 24.– P. 662–670.
124. Booth, C. Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop / C. Booth, M. Hershfield, L. Notarangelo et al. // *Clinical Immunology.*– 2007.– Vol. 123, № 2.– P. 139–147.
125. Boureux, A. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes /A. Boureux, E. Vignal, S. Faure, P. Fort // *Mol Biol Evol.*– 2007.– Vol. 24 (1).– P. 203–216.
126. Bozyk P.D., Moore B.B. Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.*– 2011.– Vol. 45.– P. 445–452
127. Brandao, D. Endogenous vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 expression in critical limb ischemia / D. Brandao, C. Costa, A. Canedo, G. Vaz, D. Pignatelli // *Int Angiol.*– 2011.– Vol. 30(1).– P. 25–34.
128. Brauninger, S. Allogeneic donor peripheral blood “stem cell” apheresis: prospective comparison of two apheresis systems /S. Brauninger, H. Bialleck, K. Thorausch et al. // *Transfusion.*– 2012.– Vol. 52(5).– P. 1137–1145.
129. Bringardner, B.D. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis / B.D. Bringardner, C.P. Baran, T.D. Eubank et al. // *Antioxid. Redox Signal.*– 2008.– Vol. 10.– P. 287–301.
130. Brody, J.S. Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation / J.S. Brody, M.C. Williams // *Annual review of physiology.*– 1992.– Vol. 54.– P. 351–371.
131. Broome, J.D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. / J.D. Broome // *Nature.*– 1961.– Vol. 191, № 4793.– P. 1114–1115.
132. Brown, M.B. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin / M.B. Brown, S.A. Jones // *JEADV.*– 2005.– Vol. 19.– P. 308–318.
133. Broxmeyer, H.E. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis /H.E. Broxmeyer, G. Hangoc, S. Cooper et al. // *Ann N Y Acad Sci.*– 2007.– Vol. 1106.– P. 1–19.
134. Bruzzzone, P. Occurrence of dopaminergic (D(2)) receptors within the rabbit pulmonary circulation. / P. Bruzzzone, V. D’Andrea, C. Motta et al. // *Pulm Pharmacol Ther.*– 2002.– Vol. 15.– P. 393–398
135. Burger, J.A. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1 /J.A. Burger, N. Tsukada, M. Burger et al. // *Blood.*– 2000.– Vol. 8(96).– P. 2655–2663.

136. Burns, J.M. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development / J.M. Burns, B. C. Summers, Y. Wang at al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203(9). – P. 2201–2213.

137. Burst, V.R. Poor cell survival limits the beneficial impact of mesenchymal stem cell transplantation on acute kidney injury / V.R. Burst, M. Gillis, F. Putsch, et al. // *Nephron Exp Nephrol.* – 2010. – Vol. 114(3). – P. 107–116.

138. Bustelo, X.R. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo / X.R. Bustelo, V. Sauzeau, I. M. Berenjeno // *Bioessays.* – 2007. – Vol. 29(4). – P. 356–370.

139. Cai, S. X. Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling promotes mesenchymal stem cells to repair injured alveolar epithelium induced by lipopolysaccharide in mice / S. X. Cai, A. R. Liu, S. Chen et al. // *Stem Cell Res Ther.* – 2015. – Vol. 6:65.

140. Cai, Y. Separation of exenatide analogue mono-PEGylated with 40 kDa polyethylene glycol by cation exchange chromatography. / Y. Cai, P. Yue // *J Chromatogr A.* – 2011. – Vol. 1218. – P. 6953–6960.

141. Calvi, L. M. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, at al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 425(6960). – P. 841–846.

142. Campo, G. M. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. / G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al. // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92. – P. 204–215

143. Camus, P. Interstitial lung disease associated with drug therapy / P. Camus, S. Kudoh, M. Ebina // *British Journal of Cancer.* – 2004. – Vol. 91. – P. 18–23.

144. Cancelas, J. A. RacGTPases differentially integratesignals regulating hematopoietic stem cell localization / J. A. Cancelas, A. W. Lee, R. Prabhakar et al. // *Nature Medicine.* – 2005. – Vol. 11. – P. 886–891.

145. Cantin, A. M. Hyaluronan (hyaluronic acid) in lung lavage of asbestos-exposed humans and sheep. / A. M. Cantin, P. Larivee, M. Martel et al. // *Lung.* – 1992. – Vol. 170. – P. 211–220.

146. Cantor, J. O. Potential therapeutic applications of hyaluronan in the lung / J. O. Cantor // *International Journal of COPD.* – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 283–288.

147. Caramori, G. Circulating endothelial stem cells are not decreased in pulmonary emphysema or COPD / G. Caramori, G. M. Rigolin, F. Mazzoni, et al. // *Thorax.* – 2010. – Vol. 65. – P. 554–555.

148. Cargnoni, A. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placentalderived cells reduces bleomycin-induced lungfibrosis. / A. Cargnoni, L. Gibelli, A. Tosini, et al. // *Cell Transplant.* – 2009. – Vol. 18. – P. 405–422.

149. Cargnoni, A. Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis / A. Cargnoni, L. Ressel, D. Rossi et al. // *Cytotherapy.* – 2012. – Vol. 14. – P. 153–161.

150. Carmichael, S. W. Uptake of nucleotides and catecholamines by chromaffin granules from pig and horse adrenal medulla / S.W. Carmichael, A. Weber, H. Winkler // *Journal of Neurochemistry.* – 1980. – Vol. 35. – P. 270–272.

151. Ceradini, D. J. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. / D. J. Ceradini, A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan et al. // *Nat Med.* – 2004. – Vol. 10. – P. 858–864.

152. Challen, G. A. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis / G. A. Challen, N. Boles, K. K. Lin, M. A. Goodell // *Cytometry A.* – 2009. – Vol. 75(1). – Vol. 14–24.



153. *Chamberlain, G.* Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear /G. Chamberlain, H. Smith, G. E. Rainger, J. Middleton // PLoS One. – 2011. – Vol 6(9). – e25663.
154. *Chambers, D.C.* A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis / D. C. Chambers, D. Enever, N. Ilic et al. // Respirology. – 2014. – Vol. 19. – P. 1013–1018.
155. *Chan, C. K.* Endochondrial ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation /C.K. Chan, C. C. Chen, C. A. Luppen et al. // Nature. – 2008. – Vol. 457 (7228). – P. 490–494.
156. *Chao, M. P.* Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy / M. P. Chao, J. Seita, I. L. Weissman // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 2008. – Vol. 73. – P. 439–449.
157. *Chakroborty, D.* Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization / D. Chakroborty, U. R. Chowdhury, C. Sarkar et al., // The Journal of Clinical Investigation. – 2008. – Vol. 118, № 4. – P. 1380–1389.
158. *Chaudhary, N. I.* Pharmacologic Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin Model. / N. I. Chaudhary, A. Schnapp, J. E. Park // Am J Respir Crit Care Med. – 2006. – Vol. 173, № 7. – P. 769–776.
159. *Chavakis, E.* Role of  $\beta$ 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells /E. Chavakis E, A. Aicher, C. Heeschen et al. //J Exp Med. – 2005. – Vol. 201(1). – P. 63–72.
160. *Chavakis, E. S.* Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy /E. Chavakis, C. Urbich, S. Dimmeler //J Mol Cell Cardiol. – 2008. – Vol. 45(4). – P. 514–522.
161. *Chen, C.* Constantinou A, Deonarain M Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers. / C. Chen, A. Constantinou, M. Deonarain // Expert Opin Drug Deliv. – 2011. – Vol. 8. – P. 1221–1236.
162. *Chen, F. M.* Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives /F.M. Chen, L. A. Wu, M. Zhang, R. Zhang, H. H. Sun // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32(12). – P. 3189–3209.
163. *Chen, J.* Bleomycins: towards better therapeutics. / J. Chen, J. Stubbe // Nat. Rev. Cancer. – 2005. – Vol. 5. – P. 102–112.
164. *Chen, J.* Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media / J. Chen, S. K. Spear, J. G. Huddleston et al. // GreenChem. – 2005. – Vol. 7. – P. 64–82.
165. *Chen, L.* Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats / L. Chen, T. Wang, X. Wang et al. // Respiratory Research. – 2009. – Vol. 55. – P. 1–8.
166. *Chen, L.* Pluronic P105/F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation / L. Chen, X. Sha, X. Jiang, Y. Chen, Q. Ren, X. Fang // Int J Nanomedicine. – 2013. – Vol. 8. – P. 73–84.
167. *Chen, X.* Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oxymatrine is associated with regulation of fibroblast proliferation and collagen production in primary culture / X. Chen, R. Sun, J. Hu et al. // Basic & clinical pharmacology & toxicology. – 2008. – Vol. 103. – P. 278–286.
168. *Chen, Y.* Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver / Y. Chen, L. X. Xiang, J. Z. Shao et al. //J Cell Mol Med. – 2010. – Vol. 14(6B). – P. 1494–1508.

169. Cheng, J. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34 / J. Cheng, S. Baumhueter, G. Cacalano et al. // *Blood*.— 1996.— Vol. 87.— P. 479–490.
170. Chhetri, D. K. Hyaluronic acid for the treatment of vocal fold scars. / D. K. Chhetri, A. H. Mendelsohn // *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*.—2010.— Vol. 18, № 6.— P. 498–502.
171. Chibbar, R. Familial interstitial pulmonary fibrosis: a large family with atypical clinical features / R. Chibbar, J. A. Gjevre, F. Shih et al. // *Canadian Respiratory Journal*.— 2010.— Vol. 17.— P. 269–274.
172. Chilosi, M. The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil? / M. Chilosi, V. Poletti, A. Rossi // *Respir Res*. 2012.— Vol. 13(1).
173. Chistiakov, D. A. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation / D. A. Chistiakov // *Journal of Biomedical Science*.— 2010.— Vol. 17.— P. 1–9
174. Chong, P. P. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells // P. P. Chong, L. Selvaratnam, A. A. Abbas, T. Kamarul // *J Orthop Res*.— 2012.— Vol. 30(4).— P. 634–642.
175. Christopher, M. J. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. / M. J. Christopher, F. Liu, M. J. Hilton et al. // *Blood*.— 2009.— Vol. 114.— P. 1331–1339.
176. Christophis, C. Shear Stress Regulates Adhesion and Rolling of CD44+ Leukemic and Hematopoietic Progenitor Cells on Hyaluronan / C. Christophis, I. Taubert, G. R. Meseck et al. // *Biophysicol Journal*.— 2011.— Vol. 101, Issue 3.— P. 585–593.
177. Chua, F. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. / F. Chua, J. Gauldie, G. J. Laurent // *Am J Respir Cell Mol Biol*.— 2005.— Vol. 33, № 1.— P. 9–13
178. Churg, A. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. / A. Churg, J. Dai, H. Tai et al. // *Am J Respir Crit Care Med*.— 2002.— Vol. 166.— P. 849–854.
179. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease / H. Clevers // *Cell*.—2006.— Vol. 127(3).— P. 469–480.
180. Clineschmidt, B. V. Appetite stimulant activity of 3-carboxy-10,11-dihydrocycloheptadine / B. V. Clineschmidt, H. M. Hanson, J. C. McGuffin et al. // *Arch Int Pharmacodyn Ther*.— 1976.— Vol. 223.— P. 287–300.
181. Cloez-Tayarani, I. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective / I. Cloez-Tayarani, J. P. Changeux // *J Leukoc Biol*.— 2007.— Vol. 81.— P. 599–606.
182. Cloutier, N. Platelets can enhance vascular permeability / N. Cloutier, A. Pare, R. W. Farndale et al. // *Blood*.— 2012.— Vol. 120.— P. 1334–1343.
183. Codd, E. E. Diabetogenic effect of a series of tricyclic delta opioid agonists structurally related to cycloheptadine / E. E. Codd, J. Baker, M. R. Brandt et al. // *Toxicol Sci*.— 2010.— Vol. 117.— P. 493–504.
184. Coelho, J. F. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments / J. F. Coelho, P. C. Ferreira, P. Alves et al. // *EPMA Journal*.— 2010.— Vol. 1.— P. 164–209.
185. Coker, R. K. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis / R. K. Coker, G. J. Laurent, S. Shahzeidi et al. // *Am. J. Pathol*.— 1997.— Vol. 150.— P. 981–991.

186. Conboy, I. M. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment / I. M. Conboy, M. J. Conboy, A. J. Wagers et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 433(7027). – P. 760–764.
187. Constantinou, A. Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation / A. Constantinou, A. A. Epenetos, D. Hreczuk-Hirst et al. // *Bioconjug Chem.* – 2008. – Vol. 19. – P. 643–650.
188. Conway, H. Corticotropin (ACTH) in treatment of keloids. / H. Conway, R. Stark // *AMA Arch Surg.* – 1952. – Vol. 64, № 1. – P. 47–50.
189. Corvol, H. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease / H. Corvol, F. Flamein, R. Epaud, A. Clement, L. Guillot // *The international journal of biochemistry & cell biology.* – 2009. – Vol. 41. – P. 1643–1651.
190. Crapo, J. D. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage / J. D. Crapo // *Eur. Respir. J. Suppl.* – 2003. – Vol. 44. – P. 4–6.
191. Cronkhite, J. T. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis / J. T. Cronkhite, C. Xing, G. Raghu et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2008. – Vol. 178. – P. 729–737.
192. Cross, D. P. Stromal-derived factor-1  $\alpha$ -loaded PLGA microspheres for stem cell recruitment / D. P. Cross, C. Wang // *Pharm Res.* – 2011. – Vol. 28(10). – P. 2477–2489.
193. Cruz-Orengo, L. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity / L. Cruz-Orengo, D. W. Holman, D. Dorsey et al. // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208 (2). – P. 327–339.
194. Crystal, R. G. Lung collagen: definition, diversity and development / R. G. Crystal // *Federation proceedings.* – 1974. – Vol. 33. – P. 2248–2255.
195. Crystal, R. G. Airway epithelial cells: current concepts and challenges / R. G. Crystal, S. H. Randell, J. F. Engelhardt et al. // *Proc Am Thorac Soc.* – 2008. – Vol. 5. – P. 772–777.
196. Csoka, A. B. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. / A. B. Csoka, G. I. Frost, R. Stern // *Matrix Biol.* – 2001. – Vol. 20. – P. 499–508.
197. Csoka, A. B. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ironic acid / A. B. Csoka, R. Stern // *Glycobiology.* – 2013. – Vol. 23, № 4. – P. 398–411.
198. Culp, L. A. Fibronectin and proteoglycans as determinants of cell-substratum adhesion. / L. A. Culp, B. A. Murray, B. J. Rollins // *Journal of Supramolecular and Cellular Biochemistry.* – 1979. – Vol. 11, № 3. – P. 401–427.
199. Da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. Da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, N. B. Nardi // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119. – P. 2204–2213.
200. Dai, Y. Transglutaminase-catalyzed transamidation: a novel mechanism for Rac1 activation by 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor stimulation / Y. Dai, N. L. Dudek, T. B. Patel, N. A. Muma // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2008. – Vol. 326. – P. 153–162.
201. Daniels, C. E. Imatinibmesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- $\beta$  and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis / C. E. Daniels, M. C. Wilkes, M. Edens et al. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2004. – Vol. 114. – P. 1308–1316.
202. Datta, A. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis / A. Datta, C. J. Scotton, R. C. Chambers // *British Journal of Pharmacology.* – 2011. – Vol. 163. – P. 141–172.
203. Davies, J. C. Bone marrow stem cells do not repopulate the healthy upper respiratory tract / J. C. Davies, M. Potter, A. Bush et al. // *Pediatr Pulmonol.* – 2002. – Vol. 34. – P. 251–256.

204. *Dawn, B.* Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction / B. Dawn, S. Tiwari, M. J. Kucia et al. // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26(6). – P. 1646–1655.
205. *Day, B. J.* Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis / B. J. Day // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2008. – Vol. 2. – P. 355–370.
206. *Dayan, V.* Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction / V. Dayan, G. Yannarelli, F. Billia et al. // *Basic Res Cardiol*. – 2011. – Vol. 106(6). – P. 1299–1310.
207. *De Andrade, J. A.* Innovative approaches to the therapy of fibrosis / J. A. De Andrade, V. J. Thannickal // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2009. – Vol. 6. – P. 649–655.
208. *De La Garza-Rodea, A. S.* Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice / A. S. De La Garza-Rodea, I. Van Der Velde, H. Boersma et al. // *Cell Transplant*. – 2011. – Vol. 20(2). – P. 217–231.
209. *Deed, R.* Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. / R. Deed, P. Rooney, P. Kumar et al. // *Int J Cancer*. – 1997. – Vol. 71. – P. 251–256.
210. *Dees, C.* Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis / C. Dees, A. Akhmetshina, P. Zerr et al. // *J. Exp. Med*. – 2011. – Vol. 208. – P. 961–972.
211. *Degryse, A. L.* Progress toward improving animal models for IPF / A. L. Degryse, W. E. Lawson // *The American Journal of Medical Sciences*. – 2011. – Vol. 341. – P. 444–449.
212. *Degryse, A. L.* Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis / A. L. Degryse, H. Tanjore, X. C. Xu et al. // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2010. – Vol. 299. – P. 442–452.
213. *Delmage, J. M.* The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid / J. M. Delmage, D. R. Powars, P. K. Jaynes et al. // *Ann Clin Lab Sci*. – 1986. – Vol. 16. – P. 303–310.
214. *Delpesch, B.* Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer / B. Delpesch, N. Girard, P. Bertrand et al. // *J. Intern. Med*. – 1997. – Vol. 242. – P. 41–48.
215. *Demedts, M.* High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis / M. Demedts, J. Behr, R. Buhl et al. // *N. Engl. J. Med*. – 2005. – Vol. 353. – P. 2229–2242.
216. *Demetrius, L.* Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans / L. Demetrius // *EMBO Rep*. – 2005. – Vol. 6(Spec No). – P. S39–S44.
217. *Demoulin, J. C.* 5-HT<sub>2</sub>-receptor blockade in the treatment of heart failure. A preliminary study / J. C. Demoulin, M. Bertholet, D. Soumagne, J. L. David, H. E. Kulbertus // *Lancet*. – 1981. – P. 1186–1188.
218. *Dempsie, Y.* Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system / Y. Dempsie, M. R. MacLean // *Br J Pharmacol*. – 2008. – Vol. 155. – P. 455–462.
219. *Deng, J.* Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue / J. Deng, Z. M. Zou, T. L. Zhou et al. // *Neurol Sci*. – 2011. – Vol. 32(4). – P. 641–651.
220. *Denham, J. W.* The radiotherapeutic injury – a complex ‘wound’ / J. W. Denham, M. Hauer-Jensen // *Radiother. Oncol*. – 2002. – Vol. 63. – P. 129–145.
221. *Dentener, M. A.* Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation / M. A. Dentener, J. H. Vernooij, S. Hendriks et al. // *Thorax*. – 2005. – Vol. 6. – P. 114–119.

222. Dhillon, G. S. Lung transplant airway hypoxia / G. S. Dhillon, M. R. Zamora, J. E. Roos et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2010. – Vol. 182. – P. 230–236.
223. Diaz de Leon, A. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations / A. Diaz de Leon, J. T. Cronkhite, A. Katzenstein et al. // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – P. 1–12.
224. Dingels, C. Squaric Acid Mediated Chemoselective PEGylation of Proteins: Reactivity of Single-Step-Activated  $\alpha$ -Amino Poly(ethylene glycol)s / C. Dingels, F. Wurm, M. Wagner et al. // *Chem. Eur. J.* – 2012. – Vol. 18. – P. 16828–16835.
225. Discher, D. E. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells / D. E. Discher, D. J. Mooney, P. W. Zandstra // *Science*. – 2009. – Vol. 324(5935). – P. 1673–1677.
226. Dodson, M. V. Skeletal muscle stem cells from animals I. Basic cell biology / M. V. Dodson, G. J. Hausman, L. Guan et al. // *Int J Biol Sci.* – 2010. – Vol. 6(5). – P. 465–474.
227. Dogan, O. T. Pulmonary toxicity of chronic exposure to tobacco and biomass smoke in rats / O. T. Dogan, S. Elagoz, S. L. Ozsahin et al. // *Clinics*. – 2011. – Vol. 66. – P. 1081–1087.
228. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8. – P. 315–317.
229. Droogmans, S. Cyproheptadine prevents pergolide-induced valvulopathy in rats: an echocardiographic and histopathological study / S. Droogmans, B. Roosens, B. Cosyns et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2009. – Vol. 296. – P. 1940–1948.
230. Drukala, J. Stem cells, including a population of very small embryonic-like stem cells, are mobilized into peripheral blood in patients after skin burn injury / J. Drukala, E. Paczkowska, M. Kucia M et al. // *Stem Cell Rev.* – 2012. – Vol. 8(1). – P. 184–194.
231. Dumitrascu, R. Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats / R. Dumitrascu, C. Kulcke, M. Konigshoff et al. // *Eur. Respir. J.* – 2011. – Vol. 37. – P. 1104–1118.
232. Durk, T. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HT<sub>2</sub> subtypes / T. Durk, E. Panther, T. Muller et al. // *Int. Immunol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 599–606.
233. Dworniczak, S. Human cytomegalovirus DNA level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis / S. Dworniczak, D. Ziora, M. Kapral et al. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2004. – Vol. 55. – P. 67–75.
234. Ebina, M. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis / M. Ebina, M. Shimizukawa, N. Shibata et al. // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2004. – Vol. 169(11). – P. 1203–1208.
235. Ebrahimkhani, M. R. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT<sub>2</sub>(B) receptor in chronic liver disease / M. R. Ebrahimkhani, F. Oakley, L. B. Murphy, J. Mann, et al. // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1668–1673.
236. Eddahibi, S. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia / S. Eddahibi, C. Guignabert, A. M. Barlier-Mur et al. // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P. 1857–1864.
237. Eiden, L. E. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine / L. E. Eiden, M. K. Schäfer, E. Weihe, B. Schütz // *Pflügers Arch.* – 2004. – Vol. 447. – P. 636–640.

238. *Elefteriou, F.* Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART / F. Elefteriou, J. D. Ahn, S. Takeda et al. // *Nature*. 2005. – Vol. 434. – P. 514–520.

239. *Elovic, A.E.* IL-4-dependent regulation of TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 expression in human eosinophils / A. E. Elovic, H. Ohyama, A. Sauty et al. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 6121–6127.

240. *Engelhard, D.* Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey / D. Engelhard, C. Cordonnier, P. J. Shaw et al. // *British Journal of Haematology*. – 2002. – Vol. 117. – P. 444–450.

241. *Esteve, J.M.* Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling / J. M. Esteve, J. M. Launay, O. Kellermann // *Cell Biochem Biophys*. – 2007. – Vol. 47. – P. 33–44.

242. *Evanko, S.P.* Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells / S. P. Evanko, J. C. Angello, T. N. Wight // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 1004–1013.

243. *Evans, M.J.* Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO<sub>2</sub> / M. J. Evans, L. J. Cabral, R. J. Stephens, G. Freeman // *Experimental and Molecular Pathology*. – 1975. – Vol. 22. – P. 142–150.

244. *Fabre, A.* Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice / A. Fabre, J. Marchal-Somme, S. Marchand-Adam et al. // *European Respiratory Journal*. – 2008. – Vol. 32. – P. 426–436.

245. *Fadini, G.P.* Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus / G. P. Fadini, M. Miorin, M. Facco et al. // *J Am Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 45(9). – P. 1449–1457.

246. *Fadini, G.P.* Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. / G. P. Fadini, M. Schiavon, M. Cantini et al. // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P. 1806–1813.

247. *Fahim, A.* Gastroesophageal reflux and idiopathic pulmonary fibrosis / A. Fahim, M. Crooks, S. P. Hart // *Pulmonary Medicine*. – 2010. – Vol. 11. – P. 1–7.

248. *Farkas, L.* VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats / L. Farkas, D. Farkas, K. Ask et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – V. 119. – P. 1298–1311.

249. *Fan, Y.* Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice / Y. Fan, F. Shen, T. Frenzel et al. // *Ann Neurol*. – 2010. – Vol. 67(4). – P. 488–497.

250. *Fang, A.* Elevated pulmonary artery pressure is a risk factor for primary graft dysfunction following lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis / A. Fang, S. Studer, S. M. Kawut et al. // *CHEST*. – 2011. – Vol. 139. – P. 782–787.

251. *Fattman, C.L.* Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? / C. L. Fattman // *Antioxid. Redox Signal*. – 2008. – Vol. 10. – P. 379–385.

252. *Fausto, N.* Liver regeneration. / N. Fausto, J. S. Campbell, K. J. Riehle // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43. – P. 45–53.

253. *Feldman, B.J.* Glucocorticoids influence on mesenchymal stem cells and implications for metabolic disease / B. J. Feldman // *Pediatric research*. – 2009. – Vol. 65. – P. 249–251.

254. *Felton, V.M.* N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition / V.M. Felton, Z. Borok, B. C. Willis // *American journal of physiology – lung cellular and molecular physiology.* – 2009. – Vol. 297. – P. 805–812.
255. *Feng, J.* Perivascular cells as mesenchymal stem cells / J. Feng, A. Mantesso, P. T. Sharpe // *Expert Opin Biol Ther.* – 2010. – Vol. 10(10). – P. 1441–1451.
256. *Fernandez Perez, E. R.* Incidence, prevalence and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis / E. R. Fernandez Perez, C. E. Daniels, D. R. Schroeder et al. // *CHEST.* – 2010. – Vol. 137. – P. 129–137.
257. *Filpula, D.* Releasable PEGylation of proteins with customized linkers / D. Filpula, H. Zhao // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2008. – Vol. 60, № 1. – P. 29–49.
258. *Finnema, S. J.* Current State of Agonist Radioligands for Imaging of Brain Dopamine D2/D3 Receptors In Vivo with Positron Emission Tomography/ S. J. Finnema, B. Bang-Andersen, H. V. Wikström, C. Halldin // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1477–1498.
259. *Flanders, K. C.* Smad3 as a mediator of the fibrotic response / K. C. Flanders // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2004. – Vol. 85. – P. 47–64.
260. *Fries, J. F.* Scleroderma-like lesions and the carcinoid syndrome / J. F. Fries, J. A. Lindgren, J. M. Bull // *Arch. Intern. Med.* – 1973. – Vol. 131. – P. 550–553.
261. *Fontana, A.* Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase / A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 13–28.
262. *Force, S. D.* Bilateral lung transplantation offers better long-term survival, compared with single-lung transplantation, for younger patients with idiopathic pulmonary fibrosis / S. D. Force, P. Kilgo, D. C. Neujahr et al. // *The Annals of Thoracic Surgery.* – 2011. – Vol. 91. – P. 244–249.
263. *Forteza, R.* Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense / R. Forteza, T. Lieb, T. Aoki et al. // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15. – P. 2179–2186.
264. *Forteza, R.* Hyaluronan in the airways / R. Forteza, G. E. Conner, M. Salathe // *Chemistry and biology of hyaluronan.* Elsevier Ltd. – 2004. – P. 323–337.
265. *Fowles, R. E.* Endocardial fibrosis associated with fenfluramine-phentermine / R. E. Fowles, T. V. Cloward, R. L. Yowell // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338 (18). – P. 1316.
266. *Fujino, N.* Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs / N. Fujino, H. Kubo, T. Suzuki et al. // *Laboratory Investigation.* – 2011. – Vol. 91. – P. 363–378.
267. *Fujita, M.* Doxycycline attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice / M. Fujita, Q. Ye, H. Ouchi et al. // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 2006. – Vol. 50. – P. 739–743.
268. *Fukuda, T.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a / T. Fukuda, L. Chen, T. Endo et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105(8). – P. 3047–3052.
269. *Fukui, M.* Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype / M. Fukui, R. M. Rodriguez, J. Zhou et al. // *Journal of Neuroscience.* – 2007. – Vol. 39. – P. 10520–10529.
270. *Furrer, K.* Serotonin reverts age-related capillarization and failure of regeneration in the liver through a VEGF-dependent pathway / K. Furrer, A. Rickenbacher, Y. Tian et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 2945–2950.
271. *Gabbiani, G.* The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases / G. Gabbiani // *J. Pathol.* – 2003. – Vol. 200. – P. 500–503.

272. *Gan, Y.* Pirfenidone treatment of idiopathic pulmonary fibrosis / Y. Gan, E. L. Herzog, R. H. Gomer // Therapeutics and Clinical Risk Management. – 2011. – Vol. 7. – P. 39–47.

273. *Garbuzenko, E.* Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis / E. Garbuzenko, A. Nagler, D. Pickholtz et al. // Clin. Exp. Allergy. – 2002. – Vol. 32. – P. 237–246.

274. *Garcia-Alvarez, J.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis / J. Garcia-Alvarez, R. Ramirez, M. Checa et al. // Exp. Lung Res. – 2006. – Vol. 32. – P. 201–214.

275. *Garcia-Castro, J.* Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modeling tool / J. Garcia-Castro, C. Trigueros, J. Madrenas et al. // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2008. – Vol. 12. – P. 2552–2565.

276. *Garcia-de-Alba, C.* Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing / C. Garcia-de-Alba, C. Becerril, V. Ruiz et al. // Am J Respir Crit Care Med. – 2010. – Vol. 182. – P. 1144–1152.

277. *Garcia-Gomez, I.* Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications / I. Garcia-Gomez, G. Elvira, A. G. Zapata et al. // Expert Opin Biol Ther. – 2010. – Vol. 10. – P. 1453–1468.

278. *Garsia, C. K.* Idiopathic pulmonary fibrosis update on genetic discoveries / C. K. Garsia // Proceedings of the American Thoracic Society. – 2011. – Vol. 8. – P. 158–162.

279. *Gaude, G. S.* Pulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease / G. S. Gaude // Annals of Thoracic Medicine. – 2009. – Vol. 4. – P. 115–123.

280. *Ge, W.* Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression / W. Ge, J. Jiang, J. Arp et al. // Transplantation. – 2010. – Vol. 90(12). – P. 1312–1320

281. *Gehling, U. M.* Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis / U. M. Gehling, M. Willems, K. Schlagner et al. // World J Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16(2). – P. 217–224.

282. *Generini, S.* Raynaud's phenomenon and vascular disease in systemic sclerosis / S. Generini, M. M. Cerinic // Adv. Exp. Med. Biol. – 1999. – Vol. 455. – P. 93–100.

283. *Gensch, C.* The PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells / C. Gensch, Y. P. Clever, C. Werner et al. // Atherosclerosis. – 2007. – Vol. 192(1). – P. 67–74.

284. *George, J.* Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury / J. George, R. Stern // Clinica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 348. – P. 189–197.

285. *George, S.* Phase I trial of PEG-interferon and recombinant IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma / S. George, T. E. Hutson, T. Mekhail et al. // Cancer Chemother Pharmacol. – 2008. – Vol. 62. – P. 347–354.

286. *Germano, D.* Proliminin- 1/CD133+ lung epithelial progenitors protect from bleomycin-induced pulmonary fibrosis / D. Germano, P. Blyszczuk, A. Valaperti et al. // Am J Respir Crit Care Med. – 2009. – Vol. 179. – P. 939–949.

287. *Gharaee-Kermani, M.* Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast / M. Gharaee-Kermani, B. Hu, S. H. Phan et al. // Curr Med Chem. – 2009. – Vol. 16. – P. 1400–1417.

288. *Ghia, J. E.* Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis / J. E. Ghia, N. Li, H. Wang, M. Collins et al. // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137(5). – P. 1649–1660.



289. *Giangreco, A.* Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar dust junction / A. Giangreco, S.D. Reynolds, B.R. Stripp // *American Journal of Pathology*. – 2002. – Vol. 161. – P. 173–182.
290. *Gill, S.E.* Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing / S.E. Gill, W.C. Parks // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 1334–1347.
291. *Gimble, J.M.* Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells / J.M. Gimble, F. Guilak, B.A. Bunnell // *Stem Cell Res Ther.* – 2010. – Vol. 1. – P. 19.
292. *Ginis, I.* Differences between human and mouse embryonic stem cells / I. Ginis, Y. Luo, T. Miura et al. // *Dev Biol.* – 2004. – Vol. 269(2). – P. 360–380.
293. *Giri, S.N.* Impairment in coupled beta-adrenergic receptor and adenylatecyclase system during bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters / S.N. Giri, D.A. Jr. Sanford, T.W. Robinson, N.K. Tyler // *Experimental Lung Research*. – 1987. – Vol. 13. – P. 401–416.
294. *Girish, K.S.* The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview / K.S. Girish, K. Kemparaju // *Life Sci.* – 2007. – № 80. – P. 1921–1943.
295. *Glassberg, M.K.* Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial. / M.K. Glassberg, J. Minkiewicz, R.L. Toonkel et al. // *Chest*. – 2017. – Vol. 151. – P. 971–981.
296. *Gold, M.H.* Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face / M.H. Gold // *Clin Interv Aging*. – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 369–376.
297. *Goldberg, L.I.* The dopamine vascular receptor / L.I. Goldberg // *Bmchemical Pharmacology*. – 1975. – Vol. 24. – P. 651–653.
298. *Golembiowska, K.* The effect of adenosine A2A receptor antagonists on hydroxyl radical, dopamine, and glutamate in the striatum of rats with altered function of VMAT2 / K. Golembiowska, A. Dziubina // *Neurotoxicity Research*. – 2012. – Vol. 22. – P. 150–157.
299. *Gomer, R.H.* Investigational approaches to therapies for idiopathic pulmonary fibrosis / R.H. Gomer, M.L. Lupher // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2010. – Vol. 19. – P. 737–745.
300. *Gomperts B.N.* Fibrocytes in lung disease / B.N. Gomperts, R.M. Strieter // *J Leukoc Biol.* – 2007. – Vol. 82. – P. 449–456.
301. *Gopalakrishnan, A.* Identification of the substrate binding region of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT-2) using iodoaminoflisopolol as a novel photoprobe / A. Gopalakrishnan, M. Sievert, A.E. Ruoho // *Mol Pharmacol.* – 2007. – Vol. 72, № 6. – P. 1567–1575.
302. *Goudie, A.J.* Cyproheptadine resembles clozapine in vivo following both acute and chronic administration in rats / A.J. Goudie, G.D. Cooper, J.C. Cole, H.R. Sumnall // *J Psychopharmacol.* – 2007. – Vol. 21. – P. 179–190.
303. *Graham, J.R.* Cardiac and pulmonary fibrosis during methysergide therapy for headache / J.R. Graham // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 1969. – Vol. 78. – P. 79–92.
304. *Greco, S.J.* A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters / S.J. Greco, C. Zhou, J.-H. Ye, P. Rameshwar // *Biological procedures online*. – 2008. – Vol. 10. – P. 90–101.
305. *Green, A.R.* Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine / A.R. Green // *Br J Pharmacol.* – 2006. – Vol. 147(Suppl 1). – P. 145–152.
306. *Gressner, A.M.* Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis / A.M. Gressner, R. Weiskirchen, K. Breitkopf, S. Dooley // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 793–807.
307. *Grewal, J.S.* Serotonin 5-HT2A receptor induces TGF-b1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals / J.S. Grewal, Y.V. Mukhin,

M. N. Garnovskaya, J. R. Raymond, E. L. Greene // *Am J Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 922–930.

308. *Gribbin, J.* Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK / J. Gribbin, R. B. Hubbard, I. L. Jeune et al. // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61. – P. 980–985.

309. *Grotendorst, G. R.* Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils / G. R. Grotendorst, G. Smale, D. Pencev // *J. Cell Physiol.* – 1989. – Vol. 140. – P. 396–402.

310. *Grove, J. E.* Plasticity of bone marrow-derived stem cells / J. E. Grove, E. Bruscia, D. S. Krause // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22, № 4. – P. 487–500.

311. *Guillot, T. S.* Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons / T. S. Guillot, G. W. Miller // *Molecular Neurobiology.* – 2009. – Vol. 2. – P. 149–170.

312. *Gundlach, A. L.* 125I-Spiperone: a novel ligand for D2 dopamine receptors / A. L. Gundlach, B. L. Largent, S. H. Snyder // *Life Sci.* – 1984. – Vol. 35(19). – P. 1981–1988.

313. *Gupte, V. V.* Overexpression of fibroblast growth factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / V. V. Gupte, S. K. Ramasamy, R. Reddy et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2009. – Vol. 180. – P. 424–436

314. *Gustafson, T.* Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis / T. Gustafson, A. Dahlman-Hoglund, K. Nilsson et al. // *Respir Med.* – 2007. – Vol. 110. – P. 2207–2212.

315. *Haider, H.* IGF-1-over expressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling to promote myocardial repair / H. Haider, S. Jiang, N. M. Idris, M. Ashraf // *Circ Res.* – 2008. – Vol. 103(11). – P. 1300–1308.

316. *Hamada, H.* Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction / H. Hamada, M. K. Kim, A. Iwakura et al. // *Circulation.* – 2006. – Vol. 114(21). – P. 2261–2270.

317. *Hamada, K.* Possible Involvement of Endogenous 5-HT in Aggravation of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice / K. Hamada, M. Yoshida, H. Isayama et al. // *J Pharmacol Sci.* – 2007. – Vol. 105. – P. 240–250.

318. Hamman L., Rich A. R. Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs // *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* – 1935. – Vol. 51. – P. 154–163.

319. *Hamidi, M.* Pharmacokinetic consequences of pegylation / M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei // *Drug Delivery.* – 2006. – Vol. 13. – P. 399–409.

320. *Hamou, C.* Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization / C. Hamou, M. J. Callaghan, H. Thangarajah et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* 2009. – Vol. 123 (2 Suppl). – P. 45–55.

321. *Hannoush, E. J.* Impact of enhanced mobilization of bone marrow derived cells to site of injury / E. J. Hannoush, Z. C. Sifri, I. O. Elhassan et al. // *J Trauma.* – 2011. – Vol. 71. – № 2. – P. 283–289.

322. *Hardie, W. D.* Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis / W. D. Hardie, S. W. Glasser, J. S. Hagood // *American Journal of Pathology.* – 2009. – Vol. 175. – P. 3–16.

323. *Hashimoto, N.* Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis / N. Hashimoto, H. Jin, T. Liu et al. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2004. – Vol. 113. – P. 243–252.

324. *Hasselblatt, M.* Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and G-CSF receptor expression in human ischemic stroke / M. Hasselblatt, A. Jeibmann, B. Riesmeier et al. // *Acta Neuropathol.* – 2007. – Vol. 113 – № 1. – P. 45–51.
325. *Hattori, K.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells / K. Hattori, S. Dias, B. Heissig et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193(9). – P. 1005–1014.
326. *Hatzistergos, K. E.* Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation / K. E. Hatzistergos, H. Quevedo, B. N. Oskoue et al. // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 107(7). – P. 913–922.
327. *Hawkins, B. S.* Inhibition of insulin synthesis by cyproheptadine: effects on translation / B. S. Hawkins, L. J. Fischer // *Toxicol. Sci.* – 2004. – Vol. 79. – P. 258–265.
328. *Hayashi, S.* Adenovirus infections and lung disease / S. Hayashi, J. C. Hogg // *Current Opinion in Pharmacology.* – 2007. – Vol. 7. – P. 237–243.
329. He, Y-L. Cyproheptadine Enhances the IK of Mouse Cortical Neurons through Sigma-1 Receptor-Mediated Intracellular Signal Pathway / Y-L. He, C-L. Zhang, X-F. Gao et al. // *PLoS ONE.* – 2012 – Vol. 7(7).
330. *Hegewald, A. A.* Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study / A. A. Hegewald, J. Ringe, J. Bartel et al. // *Tissue Cell.* – 2004. – Vol. 36. – P. 431–438.
331. *Heissig, B.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand / B. Heissig, K. Hattori, S. Dias et al. // *Cell.* – 2002. – Vol. 109(5). – P. 625–637.
332. *Heldin, P.* Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation / P. Heldin // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* – 2003. – Vol. 36. – P. 967–973.
333. *Henry, J. P.* Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter / J. P. Henry, C. Sagne, D. Botton, M. F. Isambert, B. Gasnier // *Advances in Pharmacology.* – 1998. – Vol. 42. – P. 236–239.
334. *Hesse, M.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism / M. Hesse, M. Modolell, A. C. La Flamme et al. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 6533–6544.
335. *Hiasa, K.* Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization / K. Hiasa, M. Ishibashi, K. Ohtani et al. // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109(20). – P. 2454–2461.
336. *Hidalgo, A.* Chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells / A. Hidalgo, F. Sanz-Rodriguez, J. L. Rodriguez-Fernandez et al. // *Exp. Hematol.* – 2001. – Vol. 29(3). – P. 345–355.
337. *Hinds, K. D.* Protein conjugation, cross-linking, and PEGylation: biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids / K. D. Hinds. – R. I. Mahato, Ed. – CRC Press, Boca Raton, Fla, USA. – 2005. – P. 119–185
338. *Hisatomi, K.* Pirfenidone inhibits TGF- $\beta$ 1-induced overexpression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells / K. Hisatomi, H. Mukae, N. Sakamoto // *Pulmonary Medicine.* – 2012. – Vol. 24. – P. 1–9.
339. *Hind, M.* Is a regenerative approach viable for the treatment of COPD? / M. Hind, M. Maden, // *Br J Pharmacol.* – 2011. – Vol. 163(1). – P. 106–115.

340. *Herzog, E. L.* Threshold of lung injury required for the appearance of marrow-derived lung epithelia / E. L. Herzog, J. Van Arnam, B. Hu, D. S. Krause // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, № 8. – P. 1986–1992.

341. *Hodgson, U.* ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis / U. Hodgson, V. Pulkkinen, M. Dixon et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2006. – Vol. 79. – P. 149–154

342. *Hoffman, B. J.* Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system / B. J. Hoffman, S. R. Hansson, E. Mezey, M. Palkovits // *Frontiers in Neuroendocrinology.* – 1998. – Vol. 3. – P. 187–231.

343. *Hofinger, E. S.* Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases / E. S. Hofinger, J. Hoechstetter, M. Oettl et al. // *Glycoconj. J.* – 2008. – Vol. 25. – P. 101–109.

344. *Hofinger, E. S.* Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: Comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction / E. S. Hofinger, G. Bernhardt, A. Buschauer // *Glycobiology.* – 2007. – Vol. 17, № 9. – P. 963–971.

345. *Holgate, S. T.* Pathogenesis of asthma / S. T. Holgate // *Clin. Exp. Allergy.* – 2008. – Vol. 38. – P. 872–897.

346. *Hong, K. U.* Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion / K. U. Hong, S. D. Reynolds, A. Giangreco, C. M. Hurley, B. R. Stripp // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* – 2001. – Vol. 24. – P. 671–681.

347. *Hong, S. J.* Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair / S. J. Hong, D. O. Traktuev, K. L. March // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2010. – Vol. 15. – P. 86–91.

348. Hoover-Plow, J. Challenges for heart disease stem cell therapy / J. Hoover-Plow, Y. Gong // *Vasc. Health. Risk Manag.* – 2012. – Vol. 8. – P. 99–113.

349. *Hopkins, S. P.* Controlled delivery of vascular endothelial growth factor promotes neovascularization and maintains limb function in a rabbit model of ischemia / S. P. Hopkins, J. P. Bulgrin, R. L. Sims // *J. Vasc. Surg.* – 1998. – Vol. 27(5). – P. 886–894.

350. *Horowitz, J. C.* Idiopathic pulmonary fibrosis: new concepts in pathogenesis and implications for drug therapy / J. C. Horowitz, V. J. Thannickal // *Treatment in respiratory medicine.* – 2006. – Vol. 5. – P. 325–342.

351. *Horowitz, M. M.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation / M. M. Horowitz, R. P. Gale, P. M. Sondel et al. // *Blood.* – 1990. – Vol. 75. – P. 555–562.

352. *Horton, M. R.* Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mlg and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages / M. R. Horton, C. M. McKee, C. Bao et al. // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 35088–35094.

353. *Horwitz, E. M.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement / E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici et al. // *Cytotherapy.* – 2005. – Vol. 7. – P. 393–395.

354. *Hoshino, T.* Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta in bleomycin-induced lung injury in humans and mice / T. Hoshino, M. Okamoto, Y. Sakazaki et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2009. – Vol. 41. – P. 661–670.

355. *Hsu, E.* Insulin-like growth factor-II is increased in systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and contributes to the fibrotic process via Jun N-terminal kinase- and phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathways / E. Hsu, C. A. Feghali-Bostwick // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 172. – P. 1580–1590.

356. Hu, J Site-specific PEGylation of bone morphogenetic protein-2 cysteine analogues / J. Hu, V. Duppatla, S. Harth et al. // *Bioconjug Chem.* – 2010. – Vol. 21. – P. 1762–1772.
357. Huang, M. IL-7 inhibits fibroblast TGF- $\beta$  production and signaling in pulmonary fibrosis / M. Huang, S. Sharma, L. X. Zhu et al. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2002. – Vol. 109. – P. 931–937.
358. Huang, M. Double knockdown of prolyl hydroxylase and factor-inhibiting hypoxia-inducible factor with nonviral minicircle gene therapy enhances stem cell mobilization and angiogenesis after myocardial infarction / M. Huang, P. Nguyen, F. Jia et al. // *Circulation.* – 2011. – Vol. 124(Suppl 11). – P. 46–54.
359. Hubbard, R. Risk of cryptogenic fibrosing alveolitis in metal workers / R. Hubbard, M. Cooper, M. Antaoniak et al. // *Lancet.* – 2000. – Vol. 355. – P. 466–467.
360. Hughey, C. C. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: a role in minimizing abnormalities in cardiac-specific energy metabolism / C. C. Hughey, V. L. Johnsen, L. Ma et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 302(2). – P. 163–172.
361. Huleihel, L. The potential of cell-based therapy in lung diseases. / L. Huleihel, M. Levine, M. Rojas // *Expert Opin Biol Ther.* – 2013. – Aug 28.
362. Humphreys, D. P. Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering / D. P. Humphreys, S. P. Heywood, A. Henry et al. // *Protein Eng Des Sel.* – 2007. – Vol. 20. – P. 227–234.
363. Hutcheson, J. D. Serotonin receptors and heart valve disease – it was meant 2B / J. D. Hutcheson, V. Setola, B. L. Roth, W. D. Merryman // *Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 132. – P. 146–157.
364. Idzko, M. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release / M. Idzko, E. Panther, C. Stratz // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 6011–6019.
365. Ihn, H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF / H. Ihn // *Curr Opin Rheumatol.* – 2002. – Vol. 14. – P. 681–685.
366. Inamdar, A. C. Mesenchymalstemcelltherapyin lung disorders: Pathogenesis of lung diseases and mechanism of action of mesenchymalstemcell / A. C. Inamdar, A. A. Inamdar // *Exp Lung Res.* – 2013. – Aug 30
367. Inamoto, Y. Late effects of blood and marrow transplantation / Y. Inamoto, S. J. Lee // *Haematologica.* – 2017. – Vol. 102(4). – P. 614–625.
368. Inazaki, K. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction / K. Inazaki, Y. Kanamaru, Y. Kojima et al. // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 66. – P. 597–604.
369. Ingram, J. L. IL-13 and IL-1beta promote lung fibroblast growth through coordinated up-regulation of PDGF-AA and PDGF-R alpha / J. L. Ingram, A. B. Rice, K. Geisenhoffer et al. // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1132–1134.
370. Ishida, Y. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration / Y. Ishida, A. Kimura, T. Kondo et al. // *Am J Pathol.* – 2007. – Vol. 170. – P. 843–854.
371. Iso, Y. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment / Y. Iso, J. L. Spees, C. Serrano et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 354(3). – P. 700–706.
372. Itano, N. Mammalian hyaluronan synthases / N. Itano, K. Kimata // *IUBMB Life.* – 2002. – Vol. 54. – P. 195–199.

373. *Ito, T.* Hyaluronan and proximal tubular cell migration / T. Ito, J.D. Williams, S. Al-Assaf et al. // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 65. – P. 823–833.

374. *Ito, T.* Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization / T. Ito, J.D. Williams, D.J. Fraser et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 25326–25332.

375. *Izbicki, G.* Time course of bleomycin-induced lung fibrosis / G. Izbicki, M.J. Segel, T.G. Christensen // *Int J Exp Pathol.* – 2002. – Vol. 83, № 3. – P. 111–119.

376. *Jacobson, A.* Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli / A. Jacobson, J. Brinck, M.J. Briskin et al. // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 348, Pt. 1. – P. 29–35.

377. *Jaffre, F.* Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy / F. Jaffre, P. Bonnin, J. Callebort et al. // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 104. – P. 113–123.

378. *Jaffre, F.* Involvement of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha cytokine production by ventricular fibroblasts / F. Jaffre, J. Callebort, A. Sarre et al. // *Circulation.* – 2009. – Vol. 110. – P. 969–974.

379. *Jain, N.K.* PEGylated Nanocarriers for Systemic Delivery Cancer / N.K. Jain, N. Manoj // *Nanotechnology, Methods in Molecular Biology.* – 2010. – Vol. 624. – P. 221–234.

380. *Jaiswal, S.* Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance / S. Jaiswal, M.P. Chao, R. Majeti, I.L. Weissman // *Trends. Immunol.* – 2010. – Vol. 31(6). – P. 212–219.

381. *Jaiswal, S.* CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis / S. Jaiswal, C.H. Jamieson, W.W. Pang // *Cell.* – 2009. – Vol. 138(2). – P. 271–285.

382. *Jakab, G.J.* Sequential virus infections, bacterial superinfections, and fibrogenesis / G.J. Jakab // *American Review of Respiratory Disease.* – 1990. – Vol. 142. – P. 374–379.

383. *Jakubzick, C.* Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis / C. Jakubzick, S.L. Kunkel, R.K. Puri et al. // *Immunol Res.* – 2004. – Vol. 30. – P. 339–349.

384. *Janeway, C.A. Jr.* Innate immune recognition / C.A. Jr Janeway, R. Medzhitov // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 197–216.

385. *Jayanthy, L.D.* Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization/ L.D. Jayanthi, D.J. Samuvel, S. Ramamoorthy // *J. Biol. Chem.* 2004. – Vol. 279. Iss.193. – P. 15–26.

386. *Jerie, P.* Milestones of cardiovascular therapy. IV. Reserpine / P. Jerie // *Casopis Lekaru Ceskych.* – 2007. – Vol. 146. – P. 573–577.

387. *Jevš'evar, S.* PEGylation of therapeutic proteins / S. Jevš'evar, M. Kunstelj, V.G. Porekar // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol. 5. – P. 113–128.

388. *Jha, A.K.* Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks / A.K. Jha, X. Xu, R.L. Duncan et al. // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 10. – P. 2466–2478.

389. *Jian, B.* Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-b1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells / B. Jian, J. Xu, J. Connolly et al. // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161. – P. 2111–2121.

390. *Jiang, C.* Adverse events of pirfenidone for the treatment of pulmonary fibrosis: a meta-analysis of randomized controlled trials / C. Jiang, H. Huang, J. Liu et al. // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1–8.

391. Jiang, D. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. / D. Jiang, J. Liang, J. Hodge et al. // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 114. – P. 291–299.
392. Jiang, D. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan / D. Jiang, J. Liang, J. Fan et al. // Nat Med. – 2005. – Vol. 11. – P. 1173–1179.
393. Jiang, D. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair / D. Jiang, J. Liang, W. P. Noble // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2007. – Vol. 23. – P. 435–461.
394. Jiang, D. Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4 / D. Jiang, J. Liang, G. S. Campanella et al. // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 120. – P. 2049–2057.
395. Jiang, D. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases / D. Jiang, J. Liang, W. P. Noble // Physiol Rev. – 2011. – Vol. 91. – P. 221–264.
396. Jiang, Y. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt et al. // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 41–49.
397. Johnson, D. E. Pulmonary neuroendocrine cells. Their secretory products and their potential roles in health and chronic lung disease in infancy / D. E. Johnson, M. K. Georgieff // Am. Rev. Respir. Dis. – 1989. – Vol. 140. – P. 1807–1812.
398. Jokerst, J. V. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy / J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare et al. // Nanomedicine (Lond). – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 715–728.
399. Joshi, B. H. Role of interleukin-13 in cancer, pulmonary fibrosis, and other T(H)2-type diseases / B. H. Joshi, C. Hogaboam, P. Dover et al. // Vitam Horm. – 2006. – Vol. 74. – P. 479–504.
400. Jui, H. Y. Autologous mesenchymal stem cells prevent transplant arteriosclerosis by enhancing local expression of interleukin-10, interferon- $\gamma$ , and indoleamine 2,3-dioxygenase / H. Y. Jui, C. H. Lin, W. T. Hsu et al. // Cell Transplant. – 2012. – Vol. 21(5). – P. 971–984.
401. Jun, D. The pathology of bleomycin induced fibrosis is associated with loss of resident lung mesenchymal stem cells which regulate effector T-cell proliferation / D. Jun, C. Garat, J. West et al. // Stem Cells. – 2011. – Vol. 29. – P. 725–735.
402. Kabanov, A. V. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines / A. V. Kabanov // Adv Drug Deliv Rev. – 2006. – Vol. 58(15). – P. 1597–1621.
403. Kadler, K. E. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators / K. E. Kadler, A. Hill, E. G. Canty-Laird // Curr. Opin. Cell Biol. – 2008. – Vol. 20. – P. 495–501.
404. Kajstura, J. Evidence for human lung stem cells / J. Kajstura, M. Rota, S. R. Hall et al. // The New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 364. – P. 1795–1806.
405. Kaminski, A. Endothelial NOS is required for SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit<sup>+</sup> bone marrow stem cells / A. Kaminski, N. Ma, P. Donndorf et al. // Lab Invest. – 2008. – Vol. 88(1). – P. 58–69.
406. Kang, S. K. Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy / S. K. Kang, I. S. Shin, M. S. Ko, J. Y. Jo, J. C. Ra // Stem Cells International. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–11.
407. Kanner, B. I. Reserpine as a competitive and reversible inhibitor of the catecholamine transporter of bovine chromaffin granules / B. I. Kanner, H. Fishkes, R. Maron, I. Sharon, S. Schuldiner // FEBS Letters. – 1979. – Vol. 100. – P. 175–178.
408. Kasper, G. Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment / G. Kasper, N. Dankert, J. Tuischer et al. // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25(4). – P. 903–910.
409. Katayama, Y. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow / Y. Katayama, M. Battista, W. M. Kao et al. // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 407–421.

410. Katragadda, U. Multi-drug delivery to tumor cells via micellar nanocarriers / U. Katragadda, Q. Teng, B. M. Rayaprolu, T. Chandran, C. Tan // *Int J Pharm.* – 2011. – Vol. 419(1–2). – P. 281–286.
411. Katsha, A. M. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury within an alginate layer culture system / A. M. Katsha, S. Ohkouchi, H. Xin et al. // *Mol. Ther.* – 2011. – Vol. 19(1). – P. 196–203
412. *Kavalkovich, K. W.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using an alginate layer culture system / K. W. Kavalkovich, R. E. Boynton, J. M. Murphy et al. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2002. – Vol. 38. – P. 457–466.
413. *Kavanagh, D. P.* Hematopoietic stem cell homing to injured tissues / D. P. Kavanagh, N. Kalia // *Stem Cell Rev.* – 2011. – Vol. 7(3). – P. 672–682.
414. *Kaviratne, M.* IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent / M. Kaviratne, M. Hesse, M. Leusink et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173. – P. 4020–4029.
415. Kawabe-Yako, R. Cilostazol activates function of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for re-endothelialization in a carotid balloon injury model / R. Kawabe-Yako, I. Masaaki, O. Masuo // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(9). – P. 246–346.
416. *Kawahara, K.* Induction of high mobility group box 1 release from serotonin-stimulated human umbilical vein endothelial cells / K. Kawahara, T. Hashiguchi, K. Kikuchi et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 22. – P. 639–644.
417. *Kekewska, A.* Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells / A. Kekewska, T. Gornemann, F. Jantschak // *J. Pharm. and Exp. Ther.* – 2012. – Vol. 340. – No. 2. – P. 369–376.
418. *Khalil, N.* Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment / N. Khalil, R. O'Connor // *Canadian medical association journal.* – 2004. – Vol. 171. – P. 153–160.
419. *Khandare, J.* Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs / J. Khandare, T. Minko // *Progress in Polymer Science.* – 2006. – Vol. 31, № 4. – P. 359–397.
420. *Kiel, M. J.* Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells / M. J. Kiel, S. J. Morrison // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – № 4. – P. 290–301.
421. *Kiel, M. J.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells / M. J. Kiel, O. H. Yilmaz, T. Iwashita et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 121(7). – P. 1109–1121.
422. *Killander, D.* Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia / D. Killander, A. Dohlwitz, L. Engstedt // *Cancer.* – 1976. – Vol. 37, № 1. – P. 220–228.
423. *Kim, C.F.B.* Identification of bronchioalveolar stem cell in normal lung and lung cancer / C.F.B. Kim, E. L. Jackson, A. E. Woolfenden et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 121. – P. 823–835.
424. *Kim, D. S.* Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias / D. S. Kim, H. R. Collard, T. E. Jr. King // *Proceedings of the American thoracic society.* – 2006. – Vol. 4. – P. 285–292.
425. *Kim, J. H.* Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon- $\gamma$  / J. H. Kim, H. Y. Kim, S. Kim et al. // *American Journal of Pathology.* – 2005. – Vol. 167. – P. 1231–1241.
426. *Kim, K. K.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix / K. K. Kim, M. C. Kugler, P. J. Wolters et al. // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103. – P. 13180–13185.



427. Kim, Y. Transglutaminase II interacts with rac1, regulates production of reactive oxygen species, expression of snail, secretion of Th2 cytokines and mediates in vitro and in vivo allergic inflammation / Y. Kim, S. Eom, K. Kim // *Mol. Immunol.* – 2010. – Vol. 47. – P. 1010–1022.
428. Kim, Y.K. Clinical characteristics of idiopathic pulmonary fibrosis patients with diabetes mellitus: the national survey in Korea from 2003 to 2007 / Y. K. Kim, J.-W. Park, S. Y. Kyung et al. // *Journal of Korean Medical Science.* – 2012. – Vol. 27. – P. 756–760.
429. King, T.E. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality / T.E. King, M.I. Schwarz, K. Brown et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – P. 1025–1032.
430. King, T.E. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicenter, randomised, placebo-controlled trial / T.E. King, C. Albera, W.Z. Bradford et al. // *Lancet.* – 2009. – Vol. 374. – P. 222–228.
431. Kinstler, O. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates / O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit et al. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2002. – Vol. 54. – P. 477–485.
432. Klimiuk, P.S. Platelet serotonin in systemic sclerosis / P.S. Klimiuk, A. Grennan, C. Weinkove, M.I. Jayson // *Ann. Rheum. Dis.* – 1989. – Vol. 48. – P. 586–589.
433. Knop, K. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives / K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer et al. // *Angewandte Chemie – International Edition.* – 2010. – vol. 49, № 36. – P. 6288–6308.
434. Ko, I.K. Combined systemic and local delivery of stem cell inducing/recruiting factors for in situ tissue regeneration / I.K. Ko, Y.M. Ju, T. Chen, et al. // *FASEB J.* – 2012. – Vol. 26(1). – P. 158–168.
435. Kobayashi, Y. Localization of dopamine receptors in the rabbit lung vasculature / Y. Kobayashi, A. Ricci, F. Amenta et al. // *J. Vasc. Res.* – 1995. – Vol. 32. – P. 200–206.
436. Kodama, T. A technological advance comparing epithelial lining fluid from different regions of the lung in smokers / T. Kodama, H. Kanazawa, Y. Tochino et al. // *Respir. Med.* – 2009. – Vol. 103. – P. 35–40.
437. Kohn, A.D. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways / A.D. Kohn, R. T. Moon // *Cell Calcium.* – 2005. – Vol. 38(3–4). – P. 439–446.
438. Kondo, K. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis / K. Kondo, S. Shintani, R. Shibata et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 61–66.
439. Konigshoff, M. Increased expression of 5-hydroxytryptamine-2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention / M. Konigshoff, R. Dumitrescu, S. Udalov et al. // *Thorax.* – 2010. – Vol. 65. – P. 949–955.
440. Konigshoff, M. Human lung stem cells: oh, the places you'll go / M. Konigshoff, J. Schwarz, O. Eickelberg // *EMBO Molecular Medicine.* – 2011. – Vol. 3. – P. 575–577.
441. Kontermann, R.E. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies / R.E. Kontermann // *BioDrugs.* – 2009. – Vol. 23. – P. 93–109.
442. Korthagen, N.M. Association between variations in cell cycle genes and idiopathic / N.M. Korthagen, C.H.M. van Moorsel, N.P. Barlo et al. // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. – P. 1–6.
443. Korthagen, N.M. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study / N.M. Korthagen, C.H.M. van Moorsel, K.M. Kazemier et al. // *Grutters Immunogenetics.* – 2012. – Vol. 64. – P. 371–377.
444. Kosaki, R. Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity / R. Kosaki, K. Watanabe, Y. Yamaguchi // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 1141–1145.

445. *Kosmider, B.* Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke / B. Kosmider, E. M. Messier, H. W. Chu, R. J. Mason // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 12. – P. 1–11.
446. *Kosztowski, T.* Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas / T. Kosztowski, H. A. Zaidi, A. Quinones-Hinojosa // Expert review of anticancer therapy. – 2009. – Vol. 9. – P. 597–612.
447. *Kotake, H.* On the ionic mechanism of cyproheptadine-induced bradycardia in a rabbit sinoatrial node preparation / H. Kotake, M. Saitoh, K. Ogino // Eur. J. Pharmacol. – 1987. – Vol. 139. – P. 307–313.
448. *Kotton, D. N.* Lung stem cells: New paradigms / D. N. Kotton, R. Summer, A. Fine // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2004. – Vol. 32. – P. 340–343.
449. *Kotton, D. N.* Lung stem cells. / D. N. Kotton, A. Fine // Cell Tissue Res. – 2008. – 331. – P. 145–156
450. *Kotton, D. N.* A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity / D. N. Kotton, A. J. Fabian, R. C. Mulligan // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 1574–1580.
451. *Koval, M.* Keratinocyte growth factor improves alveolar barrier function: keeping claudins in line / M. Koval // American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2010. – Vol. 299. – P. 721–723.
452. *Kraft, M.* IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma / M. Kraft, C. Lewis, D. Pham et al. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2001. – Vol. 107. – P. 602–606.
453. *Krampera, M.* Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use / M. Krampera, M. Franchini, G. Pizzolo, G. Aprili // Blood Transfusion. – 2007. – Vol. 5. – P. 120–129.
454. *Krause, D. S.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell / D. S. Krause, N. D. Theise, M. I. Collector et al. // Cells. – 2001. – Vol. 105. – P. 369–377.
455. *Krupka, T. M.* Formulation and characterization of echogenic lipid-Pluronic nanobubbles / T. M. Krupka, L. Solorio, R. E. Wilson, H. Wu, N. Azar, A. A. Exner // Mol Pharm. – 2010. – Vol. 7(1). – P. 49–59.
456. *Krupka, T. M.* Structural parameters governing activity of Pluronic triblock copolymers in hyperthermia cancer therapy / T. M. Krupka, A. A. Exner // Int J Hyperthermia. – 2011. – Vol. 27(7). – P. 663–671.
457. *Kubera, M.* Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 / M. Kubera, M. Maes, G. Kenis // Psychiatry Res. – 2005. – Vol. 134. – P. 251–258.
458. *Kucia, M.* A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow / M. Kucia, R. Reca, F. R. Campbell et al. // Leukemia. – 2006. – Vol. 20(5). – P. 857–869.
459. *Kucia, M. J.* Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood / M. J. Kucia, M. Wysoczynski, W. Wu et al. // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26(8). – P. 2083–2092.
460. *Kumamoto, M.* Minimally cultured bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate fibrotic lung injury / M. Kumamoto, T. Nishiwaki, N. Matsuo et al. // Eur Respir J. – 2009. – Vol. 34. – P. 740–748.
461. *Kunkel, S. L.* Interleukin-8 (IL-8): The major neutrophil chemotactic factor in the lung/ S. L. Kunkel, T. Standiford, K. Kasahara, R. M. Strieter // Exp. Lung Res. – 1991. – Vol. 17. – P. 17–23.

462. Kushnir-Sukhov, N.M. 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration / N.M. Kushnir-Sukhov, A. M. Gilfillan, J. W. Coleman et al. // *J. Immunol.*– 2006.– Vol. 177.– P. 6422–6432.
463. Kuwano K., Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction / K. Kuwano, Y. Nomoto, R. Kunitake et al. // *The European Respiratory Journal.*– 1997.– Vol. 10.– P. 1445–1449.
464. Kwon, S.M. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization / S.M. Kwon, M. Eguchi, M. Wada et al. // *Circulation.*– 2008.– Vol. 118(2).– P. 157–165.
465. Lakos, G. Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma / G. Lakos, S. Takagawa, S.J. Chen et al. // *Am. J. Pathol.*– 2004.– Vol. 165.– P. 203–217.
466. Lalu, M.M. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): A systematic review and meta-analysis of clinical trials / M.M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese et al. // *PLoS ONE.*– 2012.– Vol. 7.– P. 1–21.
467. Lam, C.F. Transplantation of endothelial progenitor cells improves pulmonary endothelial function and gas exchange in rabbits with endotoxin-induced acute lung injury / C.F. Lam, J.N. Roan, C.H. Lee et al. // *Anesth Analg.*– 2011.– Vol. 112(3).– P. 620–627.
468. Lang, P.A. Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin / P.A. Lang, C. Contaldo, P. Georgiev et al. // *Nat. Med.*– 2008.– Vol. 14.– P. 756–761.
469. Larochelle, A. Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers/ A. Larochelle, M. Savona, M. Wiggins et al. // *Blood.*– 2011.– Vol. 117(5).– P. 1550–1554.
470. Lasithiotaki, I. Detection of herpes simplex virus type-1 in patients with fibrotic lung diseases / I. Lasithiotaki, K. M. Antoniou, V.-M. Vlahava et al. // *PLoS ONE.*– 2011.– Vol. 12.– P. 1–13.
471. Lataillade, J.J. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival / J.J. Lataillade, D. Clay, C. Dupuy et al. // *Blood.*– 2000.– Vol. 95(3).– P. 756–768.
472. Launay, J. M. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension / J.M. Launay, P. Herve, K. Peoc'h // *Nat. Med.*– 2002.– Vol. 8.– P. 1129–1135.
473. Laurila, J. P. Human embryonic stem cell derived mesenchymal stromal cell transplantation in rat hind limb injury model / J.P. Laurila, L. Latikainen, M. D. Castellone et al. // *Cytotherapy.*– 2009.– Vol. 11.– P. 726–737.
474. Lauweryns, J.M. Postnatal development of the pulmonary neuroepithelial bodies in various animal species / J.M. Lauweryns, A. van Lommel // *Journal of the autonomic nervous system.*– 1997.– Vol. 65.– P. 17–24.
475. Lawson, W.E. The genetic approach in pulmonary fibrosis can it provide clues to this complex disease? / W.E. Lawson, J.E. Loyd // *Proceedings of the American Thoracic Society.*– 2006.– Vol. 3.– P. 345–349.
476. Lawson, W.E. Genetics in pulmonary fibrosis – familial cases provide clues to the pathogenesis of IPF / W.E. Lawson, J.E. Loyd, A. L. Degryse // *American Journal of the Medical Sciences.*– 2011.– Vol. 341.– P. 439–443.
477. Lawson, W.E. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF / W.E. Lawson, S.W. Grant, V. Ambrosini et al. // *Thorax.*– 2004.– Vol. 59.– P. 977–980.
478. Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells: progress toward promise / K. Le Blanc, M. Pittenger // *Cytotherapy.*– 2005.– Vol. 7.– P. 36–45.

479. Le Blanc, K. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells / K. Le Blanc, H. Samuelsson, B. Gustafsson et al. // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21. – P. 1733–1738.

480. Lee, C. G. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1) / C. G. Lee, R. J. Homer, Z. Zhu et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 194. – P. 809–821.

481. Lee, S. H. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis / S. H. Lee, A. S. Jang, Y. E. Kim et al. // *Respir Res.* – 2010. – Vol. 11. – P. 16.

482. Lee, S. L. Regulation of serotonin-induced DNA synthesis of bovine pulmonary artery smooth muscle cells / S. L. Lee, W. W. Wang, J. J. Lanzillo, B. L. Fanburg // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. L53–60.

483. Lee, S. T. 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 / S. T. Lee, J. H. Jang, J. W. Cheong et al. // *British Journal of Haematology*. – 2002. – Vol. 118. – P. 1128–1131

484. Leibacher, J. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem / stromal cells / J. Leibacher, R. Henschler // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2016. – Vol. 7:7.

485. Lele, R. D. Beyond reverse pharmacology: mechanism-based screening of ayurvedic drugs / R. D. Lele // *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. – 2010. – Vol. 4. – P. 257–265.

486. Lennon, F. E. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology / F. E. Lennon, P. A. Singleton // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2011. – Vol. 301. – P. L137–L147.

487. Leon-Ponte, M. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor / M. Leon-Ponte, G. P. Ahern, P. J. O'Connell // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – P. 3139–3146.

488. Lesurtel, M. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration / M. Lesurtel, R. Graf, B. Aleil et al. // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 104–107.

489. Letterio, J. J. Regulation of immune responses by TGF-beta / J. J. Letterio, A. B. Roberts // *Annu. Rev. Immunol.* – 1998. – Vol. 16. – P. 137–161.

490. Levite, M. Dopamine and T cells: dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases / M. Levite // *Acta Physiol (Oxf)*. – 2016. – Vol. 216(1). – P. 42–89.

491. Levesque, J. P. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide / J. P. Levesque, J. Hendy, Y. Takamatsu et al. // *J Clin Invest*. – 2003. – Vol. 111(2). – P. 187–196.

492. Lewellis, S. W. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations / S. W. Lewellis, H. Knaut // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2012. – Vol. 3 (23). – P. 333–340.

493. Leysen, J. E. Spiperone: a ligand of choice for neuroleptic receptors. 1. Kinetics and characteristics of in vitro binding / J. E. Leysen, W. Gommeren, P. M. Laduron // *Biochem Pharmacol.* – 1978. – Vol. 27(3). – P. 307–316.

494. Leysen, J. E. Serotonergic component of neuroleptic receptors / J. E. Leysen, C. J. Niemegeers, J. P. Tollenaere, P. M. Laduron // *Nature*. – 1978. – Vol. 272(5649). – P. 168–171.

495. Li, N. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha / N. Li, X. Lu, X. Zhao et al. // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27(4). – P. 961–970.
496. Li, Y. Irradiation induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and induction of types I and III collagen gene expression/ Y. Li, M. Rahmanian, C. Widstrom et al. // *Am J Resp Cell Mol Biol*. – 2000. – Vol. 23. – P. 411–418.
497. Li, Y. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction / Y. Li, Y. Hiroi, S. Ngoy et al. // *Circulation*. – 2011. – Vol. 123(8). – P. 866–876.
498. Li, Y.J. Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats / Y.J. Li, A. Azuma, J. Usuki et al. // *Thorax* 1998. – Vol. 53. – P. 186–189.
499. Li, Y.J. Prostaglandin E2 inhibits human lung fibroblast chemotaxis through disparate actions on different E-prostanoid receptors / Y.J. Li, X.-Q. Wang, T. Sato et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 44. – P. 99–107.
500. Li, Y.J. Comparative study of mesenchymal stem cells from C57BL/10 and mdx mice / Y.J. Li, C. Zhang, F. Xiong et al. // *BMC Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 24–29.
501. Li, X. Mesenchymal stem cells in idiopathic pulmonary fibrosis / X. Li, S. Yue, Z. Luo // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 60. – P. 102600–102616.
502. Li, X. HMG-CoA reductase inhibitor regulates endothelial progenitor function through the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signal transduction pathway / X. Li, B. Xu // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2009. – Vol. 157(3). – P. 545–553.
503. Li, V.S. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex / V. S. Li, S. S. Ng, P. J. Boersema et al. // *Cell*. – 2012. – Vol. 149(6). – P. 1245–1256.
504. Li, Z. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction / Z. Li, J. Guo, Q. Chang, A. Zhang // *Biol Pharm Bull*. – 2009. – Vol. 32(8). – P. 1343–1346.
505. Liang, L. Spiperone, identified through compound screening, activates calcium-dependent chloride secretion in the airway / L. Liang, K. MacDonald, E. M. Schwiebert, P. L. Zeitlin, W. B. Guggino // *Am J Physiol Cell Physiol* 2009. – Vol. 296(1). – P. 131–141.
506. Liddell, J.M. Production strategies for antibody fragment therapeutics / J.M. Liddell // *BioPharm Int*. – 2009. – Vol. 2. – P. 36–42.
507. Lin, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies / H. Lin // *Nat. Rev. Gen.* – 2002. – Vol. 3. – № 12. – P. 931–940.
508. Lin, F. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice / F. Lin, K. Cordes, L. Li et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14(5). – P. 1188–1199.
509. Lin, Y. Possible Dopaminergic Stimulation of Locus Coeruleus  $\alpha$ 1-Adrenoceptors Involved in Behavioral Activation / Y. Lin, D. Quartermain, A. J. Dunn, D. Weinshenker, E. A. Stone // *Synapse*. – 2008. – Vol. 62(7). – P. 516–523.
510. Liu, F. Csf3r mutations in mice confer a strong clonal HSC advantage via activation of Stat5 / F. Liu, G. Kunter, M. M. Krem et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118(3). – P. 946–955.
511. Liu, F. Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contribute to liver graft regeneration after partial orthotopic liver transplantation / F. Liu, X. Pan, G. Chen et al. // *Liver Transpl.* – 2006. – Vol. 12(7). – P. 1129–1137.
512. Liu, T. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / T. Liu, M. J. Chung, M. Ullenbruch et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – Vol. 117. – P. 3800–3809.

513. *Liu, A.* Wnt5a through noncanonical Wnt/JNK or Wnt/PKC signaling contributes to the differentiation of mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells in vitro / A. Liu, S. Chen, S. Cai et al. // PLoS One. – 2014; – Vol. 9.

514. *Liu, X.* The CC chemokine ligand 2 (CCL2) mediates fibroblast survival through IL-6 / X. Liu, A. M. Das, J. Seideman et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2007. – Vol. 37. – P. 121–128.

515. *Liu, X.* SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion / X. Liu, B. Duan, Z. Cheng et al. // Protein Cell. – 2011. – Vol. 2(10). – P. 845–854.

516. *Liu, Y.* Role of protein transamidation in serotonin-induced proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells / Y. Liu, L. Wei, D. L. Laskin, B. L. Fanburg // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2011. – Vol. 44. – P. 548–555.

517. *Lee, J.S.* Chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis? / J.S. Lee, H. R. Collard, G. Raghu et al. // American Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 123. – P. 304–311.

518. *Lo Celso, C.* Analysis of the hematopoietic stem cell niche / C. Lo Celso, R. J. Klein, D. T. Scadden // Curr. Protoc. Stem Cell Biol. – 2007. – Unit 2A.5.

519. *Lo Celso, C.* Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche / C. Lo Celso, H. E. Fleming, J. W. Wu et al. // Nature. – 2009. – Vol. 457. – № 7225. – P. 92–96.

520. *Lodi, D.* Stem cells in clinical practice: applications and warnings / D. Lodi, T. Iannitti, B. Palmieri // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2011. – Vol. 30. – P. 1–20.

521. *Loebinger, M.R.* Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls / M. R. Loebinger, S. Aquilar, S. M. Janes // Clinical science (lond). – 2008. – Vol. 114. – P. 99–108.

522. *Loric, S.* Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation / S. Loric, L. Maroteaux, O. Kellermann, J. M. Launay // Mol. Pharmacol. – 1995. – Vol. 47. – P. 458–466.

523. *Lu, D.* Spiperone enhances intracellular calcium level and inhibits the Wnt signaling pathway / D. Lu, Carson // BMC Pharmacol. – 2009. Vol. 9:13.

524. *Lu, K. W.* Hyaluronan decreases surfactant inactivation in vitro. / K. W. Lu, J. Goerke, J. A. Clements et al. // Pediatr Res. – 2005. – Vol. 57. – P. 237–241.

525. *Luke, H. J.* Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells / H. J. Luke, P. Prehm // Biochem J. – 1999. – Vol. 343, Pt 1. – P. 71–75.

526. *Maassen Van Den Brink, A.* Crosstalk of vascular 5-HT<sub>1</sub> receptors with other receptors: clinical implications / A. Maassen Van Den Brink, D. Centurion, C. M. Villalon // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55. – P. 986–993.

527. *Macdonald, R. A.* Dermal fibrosis following subcutaneous injections of serotonin creatinine sulphate / R. A. Macdonald, S. L. Robbins, G. K. Mallory // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1958. – Vol. 97. – P. 334–337.

528. *Macias-Barragan, J.* The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets / J. Macias-Barragan, A. Sandoval-Rodriguez, J. Navarro-Partida, J. Armendariz-Borunda // Fibrogenesis & Tissue Repair. – 2010. – Vol. 16. – P. 1–11.

529. *Maclean, M. R.* The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited / M. R. Maclean, Y. Dempsie // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – Vol. 661. – P. 309–322.

530. MacLean, M.R. 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension / M. R. MacLean, P. Herve, S. Eddahibi, S. Adnot // *Br. J. Pharmacol.*– 2000.– Vol. 131.– P. 161–168.
531. MacLean, M. R. Serotonin and pulmonary hypertension – from bench to bedside? / M. R. MacLean, Y. Dempsie // *Curr Opin Pharmacol.*– 2009.– Vol. 9.– P. 281–286.
532. MacLean, M. R. The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited / M. R. MacLean, Y. Dempsie // *Adv Exp Med Biol.*– 2010.– Vol. 661.– P. 309–322.
533. MacLean, M. R. Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now? / M. R. MacLean // *Int. J. Clin. Pract.*– 2007.– Suppl 156.– P. 27–31.
534. Maharjan, A. S. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation / A. S. Maharjan, D. Pilling, R. H. Gomer // *PLoS ONE.*– 2011.– Vol. 6.– Issue 10.
535. Maher, T. M. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis / T. M. Maher, I. C. Evans, S. E. Bottoms et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*– 2010.– Vol. 182.– P. 73–82.
536. Majka, S. M. Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the side population / S. M. Majka, M. A. Beutz, M. Hagen et al. // *Stem Cells.*– 2005.– Vol. 23.– P. 1073–1081.
537. Majumdar, M. K. Characterization and functionality of cells surface molecules on human mesenchymal stem cell / M. K. Majumdar, M. Keane-Moore, D. Buyaner et al. // *Journal of Biomedical Science.*– 2003.– Vol. 10.– P. 228–241.
538. Malavia, N. K. IL-13 induces a bronchial epithelial phenotype that is profibrotic / N. K. Malavia, J. D. Mih, C. B. Raub et al. // *Respir. Res.*– 2008.– Vol. 9.– P. 27.
539. Malli, F. Endothelial progenitor cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: an evolving concept / F. Malli, A. Koutsokera, E. Paraskeva et al., // *PLoS One.*– 2013.– Vol. 8(1).– P. 1–8.
540. Malliaras, K. The stuttering progress of cell therapy for heart disease / K. Malliaras, M. Kreke, E. Marban // *Clin Pharmacol Ther.*– 2011.– Vol. 90(4).– P. 532–541
541. Mark, A. L. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure / A. L. Mark, Z. Sun, D. S. Warren et al. // *Ann Surg.*– 2010.– Vol. 252(4).– P. 591–596.
542. Mandela, P. Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles / P. Mandela, M. Chandley, Y.-Y. Xu, M.-Y. Zhu, G. A. Ordway // *Neurochemistry International.*– 2010.– Vol. 56.– P. 760–767.
543. Mandela, P. The norepinephrine transporter and its regulation / P. Mandela, G. A. Ordway // *Journal of Neurochemistry.*– 2006.– Vol. 97.– P. 310–333.
544. Mann, D. A. Serotonin paracrine signaling in tissue fibrosis / D. A. Mann, F. Oakley // *Biochimica et Biophysica Acta.*– 2013.– Vol. 1832.– P. 905–910.
545. Mao, X. Cyproheptadine displays preclinical activity in myeloma and leukemia / X. Mao, S. B. Liang, R. Hurren et al. // *Blood.*– 2008.– Vol. 112.– P. 760–769.
546. Mark, A. L. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure / A. L. Mark, Z. Sun, D. S. Warren et al. // *Ann Surg.*– 2010.– Vol. 252(4).– P. 591–596.
547. Marshall, R. P. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury / R. P. Marshall, P. Gohlke, R. C. Chambers et al. // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology.*– 2004.– Vol. 286.– P. 156–164.
548. Martin, J. Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential / J. Martin, K. Helm, P. Ruegg et al. // *Cytotherapy.*– 2008.– Vol. 10.– P. 140–151.

549. Martinez-Pomares, L. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies / L. Martinez-Pomares, D. M. Reid, G. D. Brown et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 73. – P. 604–613.
550. Massberg, S. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo / S. Massberg, I. Konrad, K. Schurzinger et al. // *J Exp Med.* – 2006. – Vol. 203(5). – P. 1221–1233.
551. Massberg, S. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues / S. Massberg, P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica et al. // *Cell.* – 2007. – Vol. 131(5). – P. 994–1008.
552. Mason, R. J. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus / R. J. Mason, M. C. Williams // *The American review of respiratory disease.* – 1977. – Vol. 115. – P. 81–91.
553. Massa, M. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction / M. Massa, V. Rosti, M. Ferrario et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 105(1). – P. 199–206.
554. Masuda, T. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma / T. Masuda, H. Tanaka, M. Komai et al. // *Clin. Exp. Allergy.* – 2003. – Vol. 33. – P. 705–713.
555. Mathie, A. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents / A. Mathie, J. R. Wooltorton, C. S. Watkins // *Gen Pharmacol.* – 1998. – Vol. 30. – P. 13–24.
556. Matondo, R. B. Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration / R. B. Matondo, C. Punt, J. Homberg et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 296. – P. G963–G968.
557. Matsuno, O. Drug-induced interstitial lung disease: mechanisms and best diagnostic approaches / O. Matsuno // *Respiratory Research.* – 2012. – Vol. 39. – P. 1–9.
558. Matsusaka, S. 5-Hydroxytryptamine as a potent migration enhancer of human aortic endothelial cells / S. Matsusaka, I. Wakabayashi // *FEBS Lett.* – 2005. – Vol. 579. – P. 6721–6725.
559. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self / P. Matzinger // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 301–305.
560. Maye, P. Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway / P. Maye, J. Zheng, L. Li, D. Wu // *J Biol Chem* 2004. – Vol. 279(23). – P. 24659–24665.
561. McCubrey, J. A. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response / J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell et al. // *Oncotarget.* – 2012. – Vol. 3. – P. 954–987.
562. McQualter, J. L. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung / J. L. McQualter, K. Yuen, B. Williams, I. Bertoncello // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1414–1419.
563. Meirelles, L. S. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. S. Meirelles, P. C. Chagastelles, N. B. Nardi // *Journal of Cell Science.* – 2006. – Vol. 119. – P. 2204–2213.
564. Melishchuk, A. Loss of shaker K channel conductance in 0K<sup>+</sup> solutions: role of the voltage sensor / A. Melishchuk, A. Loboda, C. M. Armstrong // *Biophys J.* – 1998. – Vol. 75. – P. 1828–1835.
565. Meltzer, E. B. Idiopathic pulmonary fibrosis / E. B. Meltzer, P. W. Noble // *Orphanet journal of rare diseases.* – 2008. – Vol. 3. – P. 1–15.
566. Meran, S. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype / S. Meran, D. Thomas, P. Stephens et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 25687–25697.



567. Meran, S. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation / S. Meran, D. W. Thomas, P. Stephens et al. // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 6530–6545.
568. Mendoza, M. C. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation / M. C. Mendoza, E. E. Er, J. Blenis // *Trends Biochem Sci.* – 2011. – Vol. 6 (36). – P. 320–328.
569. Meyer, K. P. The polysaccharide of the vitreous humor / K. P. Meyer, W. John // *J Biol Chem.* – 1934. – Vol. 107. – P. 629–634.
570. Meyer, K. P. Hyaluronidases. / K. P. Meyer, P. D. Boyer (Ed.) // *The Enzymes.* Academic press, New York, 1971. – P. 307–320
571. Millan, M. J. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions / M. J. Millan, P. Marin, J. Bockaert et al. // *Trends Pharmacol.* – 2008. – Vol. 29. – P. 454–464
572. Millar, A. B. IL-10: another therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis? / A. B. Millar // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61. – P. 835–836.
573. Milman, N. Hyaluronan and procollagen type III amino terminal peptide in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary sarcoidosis/ N. Milman, M. S. Kristensen, K. Bentsen et al. // *Sarcoidosis.* – 1995. – Vol. 12. – P. 38–41.
574. Mizutani, K. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors / K. Mizutani, K. Yoon, L. Dang // *Nature.* – 2007. – Vol. 449(7160). – P. 351–355
575. Moazeni, E. Preparation and evaluation of inhalable itraconazole chitosan based polymeric micelles / E. Moazeni, K. Gilani, A. R. Najafabadi et al. // *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2012. – Vol. 20:85.
576. Moeller, A. Models of pulmonary fibrosis / A. Moeller, J. C. Rodriguez-Lecompte, L. Wang et al. // *Drug Discovery Today: Disease Models.* – 2006. – Vol. 3, No. 3. – P. 243–249.
577. Moeller, A. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? / A. Moeller, K. Ask, D. Warburton // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40, № 3. – P. 362–382.
578. Mohamadzaheh, M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion/ M. Mohamadzaheh, H. DeGrendele, H. Arizpe et al. // *J Clin Invest.* – 1998. – Vol. 101. – P. 97–108.
579. Molina-Molina, M. Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis / M. Molina-Molina, A. Serrano-Mollar, O. Bulbena et al. // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61. – P. 604–610.
580. Molineux, G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta) / G. Molineux // *Curr. Pharm. Des.* – 2004. – Vol. 10. – P. 1235–1244.
581. Monassier, L. Serotonin 5-HT(2B) receptor blockade prevents reactive oxygen species-induced cardiac hypertrophy in mice / L. Monassier, M. A. Laplante, F. Jaffre et al. // *Hypertension.* – 2008. – Vol. 52. – P. 301–307.
582. Monzon, M. E. Identification of glycosaminoglycans in human airway secretions. / M. E. Monzon, S. M. Casalino-Matsuda, R. M. Forteza // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2006. – Vol. 34. – P. 135–141.
583. Monzon, M. E. Hyaluronidase Expression and Activity Is Regulated by Pro-Inflammatory Cytokines in Human Airway Epithelial Cells / M. E. Monzon, D. Manzanares, N. Schmid et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2008. – Vol 39. – P. 289–295.
584. Moodley, Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury / Y. Moodley, D. Atienza, U. Manuelpillai et al. // *The American journal of pathology.* – 2009. – Vol. 175. – P. 303–313.

585. Moon, A. Doxycycline impairs neutrophil migration to the airspaces of the lung in mice exposed to intratracheal lipopolysaccharide / A. Moon, S. Gil, S. E. Gill, P. Chen, G. Matute-Bello // *Journal of Inflammation*.— 2012.— Vol. 31.— P. 1–6.
586. Moon, R. T. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies / R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. De Ferrari, A. Kaykas // *Nat Rev Genet*.— 2004.— Vol. 5(9).— P. 691–701.
587. Moore, K. A. Stem cells and their niches / K. A. Moore, I. R. Lemischka // *Science*.— 2006.— № 311.— P. 1880–1885.
588. Moore, B. B. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling / B. B. Moore, R. Paine, P. J. Christensen, et al // *J. Immunol.*— 2001.— Vol. 167.— P. 4368–4377.
589. Moore, B. B. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury / B. B. Moore, J. E. Kolodnick, V. J. Thannickal, et al. // *Am. J. Pathol.*— 2005.— Vol. 166.— P. 675–684.
590. Moore, B. B. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis / B. B. Moore, L. Murray, A. Das et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*— 2006.— Vol. 35.— P. 175–181.
591. Mora, A. L. Aging and lung injury repair: a role for bone marrow derived mesenchymal stem cells / A. L. Mora, M. Rojas. // *J Cell Biochem*.— 2008.— Vol. 105.— P. 641–47.
592. Morecroft, I. Effect of tryptophan hydroxylase 1 deficiency on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension / I. Morecroft, Y. Dempsie, M. Bader // *Hypertension*.— 2007.— Vol. 49.— P. 232–236.
593. Morecroft, I. 5-Hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT1B receptor / I. Morecroft, R. P. Heeley, H. M. Prentice // *Br. J. Pharmacol.*— 1999.— Vol. 128.— P. 730–734.
594. Morikawa, S. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow / S. Morikawa, Y. Mabuchi, Y. Kubota et al. // *J Exp Med*.— 2009.— Vol. 206(11).— P. 2483–2496.
595. Mossner, R. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions / R. Mossner, K. P. Lesch // *Brain Behav Immun*.— 1998.— Vol. 12.— P. 249–271.
596. Mossman, B. T. Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos / B. T. Mossman, M. Lippmann, T. W. Hesterberg et al. // *Journal of Toxicology and Environmental Health*.— 2011.— Vol. 14.— P. 76–121.
597. Mouratis, M. A. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin / M. A. Mouratis, V. Aidinis // *Curr Opin Pulm Med*.— 2011.— Vol. 17, № 5.— P. 355–61
598. Mozaffarian, A. Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis / A. Mozaffarian, A. W. Brewer, E. S. Trueblood et al. // *J Immunol*.— 2008.— Vol. 181.— P. 7243–7253.
599. Muller, T. 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo / T. Muller, T. Durk, B. Blumenthal et al. // *PLoS ONE*.— 2009.— Vol. 4.
600. Munitz, A. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis / A. Munitz, E. B. Brandt, M. Mingler et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 2008.— Vol. 105.— P. 7240–7245.
601. Munson, J. C. Factors associated with the use of corticosteroids in the initial management of idiopathic pulmonary fibrosis / J. C. Munson, M. Kreider, Z. Chen et al. // *Pharmacoepidemiol Drug Safety*.— 2010.— Vol. 19.— P. 756–762.

602. *Muraglia, A.* Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model / A. Muraglia, R. Cancedda, R. Quarto // *Journal of cell science.* – 2000. – Vol. 113. – P. 1161–1166.
603. *Murray, L. A.* Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFβ1, IL-13 and CCL2 / L. A. Murray, R. L. Argentieri, F. X. Farrell et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 2174–2182.
604. *Murray, L. A.* Antifibrotic role of vascular endothelial growth factor in pulmonary fibrosis / L. A. Murray, D. M. Habel, M. Hohmann et al. // *JCI Insight.* – 2017. – Vol. 2(16). – P. 1–15.
605. *Muro, A. F.* An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis / A. F. Muro, F. A. Moretti, B. B. Moore et al. // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 177. – P. 638–645.
606. *Naik, P. K.* Viral infection and aging as cofactors for the development of pulmonary fibrosis / P. K. Naik, B. B. Moore // *Expert Review of Respiratory Medicine.* – 2010. – Vol. 6. – P. 759–771.
607. *Nakagome, K.* In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-β in the lung / K. Nakagome, M. Dohi, Okunishi K. et al. // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61. – P. 886–894.
608. *Nakamura, T.* Essential Roles of ECAT15–2/Dppa2 in Functional Lung Development / T. Nakamura, M. Nakagawa, T. Ichisaka et al. // *Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 21. – P. 4366–4378.
609. *Namba, T.* Suppression of expression of heat shock protein 70 by Gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis / T. Namba, K.-I. Tanaka, T. Hoshino, A. Azuma, T. Mizushima // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 11. – P. 1–12.
610. *Nau, F. Jr.* Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Activation Blocks TNF-α Mediated Inflammation In Vivo / F. Jr. Nau, B. Yu, D. Martin, C. D. Nichols // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(10).
611. *Nebigil, C. G.* Serotonin 2B receptor is required for heart development / C. G. Nebigil, D. S. Choi, A. Dierich et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – Vol. 97. – P. 9508–9513.
612. *Nebigil, C. G.* Overexpression of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy / C. G. Nebigil, F. Jaffre, N. Messaddeq // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 3223–3229.
613. *Necas J.* Hyaluronic acid (hyaluronan): a review / J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner et al. // *Veterinarni Medicina.* – 2008. – Vol. 53, № 8. – P. 397–411.
614. *Nelson, C. A.* Inhibiting TGF-β activity improves respiratory function in mdx mice / C. A. Nelson, R. B. Hunter, L. A. Quigley et al. // *The American Journal of Pathology.* – 2011. – Vol. 178. – P. 2611–2621.
615. *Nemeth, K.* Bone marrow stromal cells use TGF-β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma / K. Nemeth, A. Keane-Myers, J. M. Brown et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 5652–5657.
616. *Nguyen, B. K.* Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors / B. K. Nguyen, S. Maltais, L. P. Perrault et al. // *J Cardiovasc Transl Res.* – 2010. – Vol. 3(5). – P. 547–558.
617. *Nichols, D. E.* Serotonin receptors / D. E. Nichols, C. D. Nichols // *Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 108. – P. 1614–1641.
618. *Nishihira, K.* Inhibition of 5-hydroxytryptamine receptor prevents occlusive thrombus formation on neointima of the rabbit femoral artery / K. Nishihira, A. Yamashita, N. Tanaka // *J Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 4. – P. 247–255.

619. *Nishiyama, N.* Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery / N. Nishiyama, K. Kataoka // *Pharmacol Ther.*— 2006.— Vol. 112(3).— P. 630–648.
620. *Noble, P. W.* Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair / P. W. Noble // *Matrix Biology.*— 2002.— Vol. 21.— P. 25–29.
621. *Noble, P. W.* Matrix Regulation of Lung Injury, Inflammation, and Repair / P. W. Noble, D. Jiang // *Proc Am Thorac Soc.*— 2006.— Vol. 3, № 5.— P. 401–404.
622. *Nocito, A.* Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice / A. Nocito, P. Georgiev, F. Dahm et al. // *Hepatology.*— 2007.— Vol. 45.— P. 369–376.
623. *Nusse, R.* Wnt signaling in disease and in development / R. Nusse // *Cell Res.*— 2005.— Vol. 15(1).— P. 28–32.
624. *Oettl, M.* Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations / M. Oettl, J. Hoechstetter, I. Asen et al. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*— 2003.— Vol. 18.— P. 267–277.
625. *Ogushi, F.* Decreased prostaglandin E2 synthesis by lung fibroblasts isolated from rats with bleomycin-induced lung fibrosis / F. Ogushi, T. Endo, K. Tani et al. // *International Journal of Experimental Pathology.*— 1999.— Vol. 80.— P. 41–49.
626. *Oh, C. K.* Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis / C. K. Oh, L. A. Murray, N. A. Molfino // *Pulmonary Medicine.*— 2012.— Vol. 12.— P. 1–13.
627. *Oh, I. Y.* Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle / I. Y. Oh, C. H. Yoon, J. Hur et al. // *Blood.*— 2007.— Vol. 110(12).— P. 3891–3899.
628. *Ohishi, K.* Notch signaling in hematopoiesis / K. Ohishi, N. Katayama, H. Shiku, et al. // *Cell and Development Biology.*— 2003.— Vol. 14.— P. 143–150.
629. *Oladipupo, S.* VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting / S. Oladipupo, S. Hu, J. Kovalski et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.*— 2011.— Vol. 108(32).— P. 13264–13269.
630. *Olczyk, P.* Hyaluronan: structure, metabolism, functions, and role in wound healing / P. Olczyk, K. Komosinska-Vassev, K. Winsz-Szczotka et al. // *Postepy Hig Med Dosw.*— 2008.— Vol. 62.— P. 651–659.
631. *Olson, A. L.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Epidemiology / A. L. Olson, J. J. Swigris // *Clin. Chest Med.*— 2012.— Vol. 33.— P. 41–50.
632. *Omenetti, A.* Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults / A. Omenetti, L. Yang, R. R. Gainetdinov et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*— 2011.— Vol. 300.— P. G303–G315.
633. *Orlic, D.* Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti et al. // *Ann N Y Acad Sci.*— 2001.— Vol. 938.— P. 221–229.
634. *Ortiz, L. A.* Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. / L. A. Ortiz, J. Lasky, R. F. Jr Hamilton et al. // *Exp Lung Res.*— 1998.— Vol. 24.— P. 721–743.
635. *Ortiz, L. A.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury / L. A. Ortiz, DuTreil M., Fattman C. et al. // *PNAS.*— 2007.— Vol. 104.— P. 11002–11007.
636. *Ortiz, L. A.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects / L. A. Ortiz, F. Gambelli, C. McBride et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.*— 2003.— Vol. 100.— P. 8407–8411.

637. *Osinga, T.E.* Emerging role of dopamine in neovascularization of pheochromocytoma and paraganglioma / T.E. Osinga, T.P. Links, R.P. F. Dullaart et al. // *The FASEB Journal*.– 2017.– Vol. 3.– P. 1–15.
638. *Otto, W.R.* Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic / W.R. Otto, N.A. Wright // *Fibrogenesis & Tissue Repair*.– 2011.– Vol. 20.– P. 1–14.
639. *Ozawa, H.* Effect of dopamine on perfusion pressure in rat peripheral blood vessels// H. Ozawa, H. Aihara, M. Sasajima, I. Tanaka // *Nihon Yakurigaku Zasshi*.– 1975.– Vol. 71(1).– P. 61–69.
640. *Ozkan, M.* Dopamine acting at D1-like, D2-like and  $\alpha$ 1-adrenergic receptors differentially modulates theta and gamma oscillatory activity in primary motor cortex / M. Ozkan, N.W. Johnson, U.S. Sehirli, G.L. Woodhall, I.M. Stanford // *PLoS ONE*.– 2017.– Vol. 12 (7).– P. 1–15.
641. *Paczkowska, E.* Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke / E. Paczkowska, M. Kucia, D. Koziarska et al. // *Stroke*.– 2009.– Vol. 40(4).– P. 1237–1244.
642. *Pal, A.* Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe / A. Pal, A.R. Hajipour, D. Fontanilla et al. // *Mol Pharmacol*.– 2007.– Vol. 72.– P. 921–933.
643. *Palumbo, K.* The transcription factor JunD mediates transforming growth factor {beta}-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis / K. Palumbo, P. Zerr, M. Tomcik // *Ann. Rheum. Dis*.– 2011.– Vol. 70.– P. 1320–1326.
644. *Papakonstantinou, E.* Increased hyaluronic acid content in idiopathic pulmonary arterial hypertension / E. Papakonstantinou, F.M. Kouri, G. Karakiulakis et al. // *Eur Respir J*.– 2008.– Vol. 32.– P. 1504–1512.
645. *Papakonstantinou, E.* The ‘sweet’ and ‘bitter’ involvement of glycosaminoglycans in lung diseases: pharmacotherapeutic relevance / E. Papakonstantinou, G. Karakiulakis // *British Journal of Pharmacology*.– 2009.– Vol. 157.– P. 1111–1127.
646. *Park, C.H.* Ionomycin downregulates beta-catenin/Tcf signaling in colon cancer cellline / C.H. Park, E.R. Hahm, J.H. Lee et al. // *Carcinogenesis*.– 2005.– Vol. 26(11).– P. 1929–1933.
647. *Park, D.* Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments / D. Park, S.S. Choi, K.S. Ha // *Amino Acids*.– 2010.– Vol. 39.– P. 619–631.
648. *Park, D.* Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration / D. Park, J.A. Spencer, B.I. Koh, et al. // *Cell Stem Cell*.– 2012.– Vol. 10(3).– P. 259–272.
649. *Park, J.B.* Role of hyaluronan in glioma invasion / J.B. Park, H.J. Kwak, S.H. Lee // *Cell Adhesion & Migration*.– 2008.– Vol. 2, № 3.– P. 202–207.
650. *Parker, J.N.* Reserpine – a comparison of chronic toxicity in animals with clinical toxicity / J.N. Parker, C.W. Murphy // *Canada M. AX. Journal*.– 1961.– Vol. 84.– P. 1177–1180.
651. *Pasonen-Seppanen, S.* EGF upregulates, whereas TGF beta down-regulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation / S. Pasonen-Seppanen, S. Karvinen, K. Torronen et al. // *J Invest Dermatol*.– 2003.– Vol. 120.– P. 1038–1044.
652. *Pat. 4,874,766* Method of promoting wound-healing / L.A.A. Ooms, A.A.Y. Degryse.– Publ. 17.10.1989.
653. *Pat. WO1993012789 A1, PCT/US1992/011205* Use of spiperone or spiperone derivatives as immunosuppressant agents / K.A. Arndt, S.J. Galli, P.C. Meltzer, R.K. Razdan, H.P. Sard, R.J. Sharpe.– Publ. 08.06.1993.

654. Pat. US5244902 A, US08/120,218 Topical application of spiperone or derivatives thereof for treatment of pathological conditions associated with immune responses / K. A. Arndt, S. J. Galli, R. J. Sharpe. – Publ. 17.06.1997.

655. *Pati, S.* Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock / S. Pati, M. H. Gerber, T. D. Menge et al. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(9).

656. *Paulus, P.* Deguelin attenuates reperfusion injury and improves outcome after orthotopic lung transplantation in the rat / P. Paulus, P. Ockelmann, S. Tacke et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. 1–16.

657. *Pavlovic, M.* Regression of sclerodermatous skin lesions in a patient with carcinoid syndrome treated by octreotide / M. Pavlovic, P. Saiag, J. P. Lotz // Arch. Dermatol. – 1995. – Vol. 131. – P. 1207–1209.

658. *Pazianos, G.* The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective / G. Pazianos, M. Ugozwa, T. Reya // Biotechniques. – 2003. – Vol. 35. – № 6. – P. 1240–1247.

659. *Peinado, V.I.* Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. / V.I. Peinado, J. Ramirez, J. Roca et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2006. – Vol. 34. – P. 257–263.

660. *Peled, A.* The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34+ cells on vascular endothelium under shear flow / A. Peled, V. Grabovsky, L. Habler et al. // J Clin Invest. – 1999. – Vol. 104(9). – P. 1199–1211.

661. *Peroutka, S.J.* Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions / S. J. Peroutka, R. V. Lebovitz, S. H. Snyder // Science. – 1981. – Vol. 212. – P. 827–829.

662. *Pershina, O.* MSCs of pulmonary in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Antifibrotic effect of pegylated hyaluronidase / O. Pershina, E. Skurikhin, E. Khmelevskaya. – USA: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co, 2012. – 53p.

663. *Peters, M.A.* Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis / M. A. Peters, A. M. Walenkamp, I. P. Kema et al. // Drug Resist Updat. – 2014. – Vol. 17(4–6). – P. 96–104.

664. *Petrigni, G.* Aerosolised hyaluronic acid prevents exercise-induced bronchoconstriction, suggesting novel hypotheses on the correction of matrix defects in asthma. / G. Petrigni, L. Allegra // Pulm Pharmacol Ther. – 2006. – Vol. 19. – P. 166–171.

665. *Phan, S.H.* New strategies for treatment of pulmonary fibrosis / S. H. Phan // Thorax. – 1995. – Vol. 50. – P. 415–421.

666. *Phillips, R.J.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis / R. J. Phillips, M. D. Burdick, K. Hong et al. // J Clin Invest. – 2004. – Vol. 114. – P. 438–446.

667. *Phillips, R.J.* Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXCR4 chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  / R. J. Phillips, J. Mestas, M. Gharaee-Kermani et al. // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 22473–22481.

668. *Piedmonte, D.M.* Formulation of Neulasta (pegfilgrastim) / D. M. Piedmonte, M. J. Treuheit // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. – Vol. 60. – P. 50–58.

669. *Pietri, M.* Reactive oxygen species-dependent TNF- $\alpha$  converting enzyme activation through stimulation of 5-HT<sub>2B</sub> and  $\alpha$ 1D autoreceptors in neuronal cells / M. Pietri, B. Schneider, S. Mouillet-Richard et al. // FASEB J. – 2005. – Vol. 19. – P. 1078–1087.

670. *Pilarski, L. M.* Potential role for hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM in mobilization and trafficking of hematopoietic progenitor cells / L. M. Pilarski, E. Pruski, J. Wizniak et al. // *Blood.* – 1999. – Vol. 93. – P. 2918–2927.
671. *Pinheiro, G. A.* Occupational risks for idiopathic pulmonary fibrosis mortality in the United States / G. A. Pinheiro, V. C. Antao, J. M. Wood et al. // *Int J Occup Environ Health.* – 2008. – Vol. 14. – P. 117–123.
672. *Pinsker, K. L.* Usual interstitial pneumonia following Texas A2 influenza infection / K. L. Pinsker, B. Schneyer, N. Becker, S. L. Kamholz // *Chest.* – 1981. – Vol. 80. – P. 123–126.
673. *Pitchford, S. C.* Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow / S. C. Pitchford, R. C. Furze, C. P. Jones // *Cell Stem Cell.* – 2009. – Vol. 4(1). – P. 62–72.
674. *Pittenger, M. F.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck et al. // *Science.* – 1999. – Vol. 284(5411). – P. 143–147.
675. *Pittenger, M. F.* Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1451–1461.
676. *Pittenger, M. F.* Dual-modality monitoring of targeted intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia / M. F. Pittenger, P. Walczak, J. Zhang et al. // *Stroke.* – 2008. – Vol. 39. – P. 1569–1574.
677. *Ploemacher, R. E.* An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse / R. E. Ploemacher, J. P. van der Sluijs, J. S. Voerman, N. H. Brons // *Blood.* – 1989. – Vol. 74. – P. 2755–2263.
678. *Pochetuhnen, K.* Complex regulation of pulmonary inflammation and fibrosis by CCL18 / K. Pochetuhnen, I. G. Luzina, V. Locketell et al. // *Am J Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – P. 428–437.
679. *Polak, J. M.* Lung endocrine cell markers, peptides and amines/ J. M. Polak, K. L. Becker, E. Cutz et al. // *Anatomical record.* – 1993. – Vol. 236. – P. 169–171.
680. *Pongratz, G.* The sympathetic nervous response in inflammation / G. Pongratz, R. H. Straub // *Arthritis Research & Therapy.* – 2014. – Vol. 504, № 16. – P. 1–12.
681. *Potenzieri, C.* Activation of mouse bronchopulmonary C-fibres by serotonin and allergen-ovalbumin challenge / C. Potenzieri, S. Meeker, B. J. Undem // *J Physiol.* – 2012. – Vol. 590(Pt 21). – P. 5449–5459.
682. *Pottier, N.* Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions / N. Pottier, T. Maurin, B. Chevalier et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 8. – P. 1–16.
683. *Poulsom, R.* CD44 and hyaluronan help mesenchymal stem cells move to a neighborhood in need of regeneration / R. Poulsom // *Kidney Int.* – 2007. – Vol. 72. – P. 389–390.
684. *Powell J. D.* Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. / J. D. Powell, M. R. Horton // *Immunol Res.* – 2005. – Vol. 31. – P. 207–218.
685. *Powell, N. D.* Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via beta-adrenergic induction of myelopoiesis / N. D. Powell, E. K. Sloan, M. T. Bailey et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 16574–16579.
686. *Prasse, A.* A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18 / A. Prasse, D. V. Pechkovsky, G. B. Toews et al. // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173. – P. 781–792.

687. *Prasse, A.* Serum CCchemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis / A. Prasse, C. Probst, E. Bargagli et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 179. – P. 717–723.

688. *Pratt, R. M.* Migration of cranial neural crest cells in a cell-free hyaluronate-rich matrix / R. M. Pratt, M. A. Larsen, M. C. Johnston // *Developmental Biology.* – 1975. – Vol. 44, № 2. – P. 298–305.

689. *Prunet-Marcassus, B.* From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences / B. Prunet-Marcassus, B. Cousin, D. Caton et al. // *Experimental Cell Research.* – 2006. – Vol. 312. – P. 727–736.

690. *Puri, V.* Single-lung transplantation in the setting of aborted bilateral lung transplantation / V. Puri, T. Guthrie, M. Scavuzzo et al. // *Journal of Transplantation.* – 2011. – Vol. 4. – P. 1–4.

691. *Qian, H.* Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells / H. Qian, H. Yang, W. Xu et al. // *Int J Mol Med.* – 2008. – Vol. 22(3). – P. 325–332.

692. *Quelch, D. R.* The influence of different cellular environments on PET radioligand binding: An application to D2/3-dopamine receptor imaging / D. R. Quelch, S. L. Withey, D. J. Nutt, R. J. Tyacke, C. A. Parker // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 85. – P. 305–313.

693. *Raghu, G.* Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis / G. Raghu, D. Weycker, J. Edelsberg et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006. – Vol. 174, № 7. – P. 810–816.

694. *Rai, S. K.* Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation / S. K. Rai, F. M. Duh, V. Vigdorovich et al. // *Proc Natl Acad Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 4443–4448.

695. *Rajender, R. K.* Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C / R. K. Rajender, M. W. Modi, S. Pedder // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2002. – Vol. 54, № 4. – P. 571–586.

696. *Rankin, S. M.* Chemokines and adult bone marrow stem cells / S. M. Rankin // *Immunol Lett.* – 2012. – Vol. 145. – P. 47–54.

697. *Rankin, S. M.* Mesenchymal stem cells / S. M. Rankin // *Thorax.* – 2012. – Vol. 67. – P. 565–566.

698. *Rapport, M. M.* Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid, from hyaluronic acid / M. M. Rapport, B. Weissmann, A. Linker et al. // *Nature.* – 1951. – Vol. 168. – P. 996–997.

699. *Ratajczak, M. Z.* Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity / M. Z. Ratajczak, E. K. Zuba-Surma, D. M. Shin, J. Ratajczak // *Exp Gerontol.* – 2008. – Vol. 43(11). – P. 1009–1017.

700. *Richter, D. W.* Serotonin receptors: guardians of stable breathing / D. W. Richter, T. Manzke, B. Wilken // *Trends Mol Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 542–548.

701. *Ries, C.* MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines / C. Ries, V. Egea, M. Karow et al. // *Blood.* – 2007. – Vol. 109(9). – P. 4055–4063.

702. *Reiman, R. M.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity / R. M. Reiman, R. W. Thompson, C. G. Fenget al. // *Infect Immun.* – 2006. – Vol. 74. – P. 1471–1479.

703. *Remy, D. C.* A comparison of the antiserotonin, antihistamine, and anticholinergic activity of cyproheptadine with analogues having furan nuclei fused to the 10,11-vinylene bridge / D. C. Remy, A. W. Raab, K. E. Rittle // *J Med Chem.* – 1977. – Vol. 20. – P. 836–838.



704. Rennert, R. C. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative / R. C. Rennert, M. Sorkin, R. K. Garg // *Medicine. Regen Med.* – 2012. – Vol. 7(6). – P. 833–850.
705. Reimund, E. Methysergide and retroperitoneal fibrosis / Reimund E. // *Lancet.* – 1987. – Vol. 1. – P. 443.
706. Reynolds, S. D. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration/ S. D. Reynolds, A. Giangreco, J. H. Power, B. H. Stripp // *American journal of pathology.* – 2000. – Vol. 156. – P. 269–278.
707. Reynolds, S. D. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells / S. D. Reynolds, K. U. Hong, A. Giangreco et al. // *American journal of physiology– lung cellular and molecular physiology.* – 2000. – Vol. 278. – P. 1256–1263.
708. Ricciardi, M. Comparison of epithelial differentiation and immune regulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human lung and bone marrow / M. Ricciardi, G. Malpeli, F. Bifari et al. // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. – P. 1–10
709. Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers / H. Ringsdorf // *Journal of Polymer Science Part C.* – 1975. – № 51. – P. 135–153.
710. Robinton, D. A. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy / D. A. Robinton, G. Q. Daley // *Nature.* – 2012. – Vol. 481. – P. 295–305.
711. Rock, J. R. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition / J. R. Rock, C. E. Barkauskas, M. J. Cronic et al. // *PNAS.* – 2011. – Vol. 108. – P. 1475–1583.
712. Roddie, I. C. The action of 5-hydroxytryptamine on the blood vessels of the human hand and forearm / I. C. Roddie, J. T. Shepherd, R. F. Whelan // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1995. – Vol. 10. – P. 445–450.
713. Rodriguez, S. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis / S. Rodriguez, A. Chora, B. Goumnerov et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 114(19). – P. 4064–4076.
714. Rogers, T. B. Use of thapsigargin to study Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiac cells / T. B. Rogers, G. Inesi, R. Wade, W. J. Lederer // *Bioscience Reports.* – 1995. – Vol. 15(5).
715. Rojas, M. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung / M. Rojas, J. Xu, C. R. Woods et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* – 2005. – Vol. 33. – P. 145–152.
716. Rooney, P. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review) / P. Rooney, S. Kumar, J. Ponting et al. // *International Journal of Cancer.* – 1995. – Vol. 60, № 5. – P. 632–636.
717. Rosier, R. N. Hyaluronic acidtherapy / R. N. Rosier, R. J. O’Keefe // *Instr Course Lect.* – 2000. – Vol. 49. – P. 495–502.
718. Rothman, R. B. Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications / R. B. Rothman, M. H. Baumann, J. E. Savage et al. // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P. 2836–2841.
719. Ruddell, R. G. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis / R. G. Ruddell, F. Oakley, Z. Hussain et al. // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 169. – P. 861–876.
720. Ruster, B. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells / B. Ruster, S. Gottig, R. J. Ludwig et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108(12). – P. 3938–3944.

721. *Ryu, J.H.* Advances in the management of idiopathic pulmonary fibrosis / J.H. Ryu, C. E. Daniels // *F1000 Medicine Reports*.– 2010.– Vol. 28.– P. 1–4.
722. *Saito, S.* Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant-negative inhibitor of CCL2 greatly attenuate bleomycin-induced lung damage / S. Saito, T. Nakayama, N. Hashimoto et al. // *The American Journal of Pathology*.– 2011.– Vol. 179.– P. 1088–1094.
723. *Samara, K. D.* Smoking and pulmonary fibrosis: novel insights / K. D. Samara, G. Margaritopoulos, A. U. Wells et al. // *Pulmonary Medicine*.– 2011.– Vol. 2.– P. 1–4.
724. *Sandri, M.* Maximal exercise, limb ischemia and endothelial progenitor cells / M. Sandri, E. B. Beck, V. Adams et al. // *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*.– 2011.– Vol. 18(1).– P. 55–64.
725. *Sarkar, C.* Dopamine is a safe anti-angiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia / C. Sarkar, D. Chakroborty, P. S. Dasgupta, S. Basu // *Int J Cancer*.– 2015.– Vol. 137(3).– P. 744–749.
726. *Sasaki, M.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type / M. Sasaki, R. Abe, Y. Fujita et al. // *J Immunol*.– 2008.– Vol. 180(4).– P. 2581–2587.
727. *Sasaki, T.* Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  improves infarcted heart function through angiogenesis in mice / T. Sasaki, R. Fukazawa, S. Ogawa et al. // *Pediatr Int*.– 2007.– Vol. 49(6).– P. 966–971.
728. *Satchi-Fainaro, R.* Synthesis and characterization of a catalytic antibody- HPMACopolymer-conjugate as a tool for tumor selective prodrug activation. / R. Satchi-Fainaro, W. Wrasidlo, H. N. Lode et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.– 2002.– vol. 10, № 9.– P. 3023–3029.
729. *Sato, H.* Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins / H. Sato // *Adv. Drug Deliv. Rev*.– 2002.– Vol. 54.– P. 487–504.
730. *Savani, R. C.* A role for hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury / R. C. Savani, G. Hou, P. Liu et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*.– 2000.– Vol. 23.– P. 475–484.
731. *Scadding, J. G.* Diffuse fibrosing alveolitis (diffuse interstitial fibrosis of the lungs). Correlation of histology at biopsy with prognosis / J. G. Scadding, K. F. Hinson // *Thorax*.– 1967.– Vol. 22.– P. 291–304.
732. *Scaffidi, A. K.* Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts / A. K. Scaffidi, S. E. Mutsaers, Y. P. Moodley et al. // *Br J Pharmacol*.– 2002.– Vol. 136.– P. 793–801.
733. *Scanzano, A.* Adrenergic regulation of innate immunity: a review / A. Scanzano, M. Cosentino // *Front. Pharmacol*.– 2015.– Vol. 6, A. 171.– P. 1–18.
734. *Scheibner, K. A.* Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2 / K. A. Scheibner, M. A. Lutz, S. Boodoo et al. // *J Immunol*.– 2006.– Vol. 177.– P. 1272–1281.
735. *Schenk, S.* Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor / S. Schenk, N. Mal, A. Finan et al. // *Stem Cells*.– 2007.– Vol. 25(1).– P. 245–251.
736. *Schofield, R.* The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis / R. Schofield // *Blood cells*.– 1978.– Vol. 4 (1–2)– P. 7–25.
737. *Schuh, A.* Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model / A. Schuh, E. A. Liehn, A. Sasse et al. // *Basic Res Cardiol*.– 2008.– Vol. 103(1).– P. 69–77.

738. Schuldiner, S. Reserpine binding to a vesicular amine transporter expressed in Chinese hamster ovary fibroblasts / S. Schuldiner, Y. Liu, R. H. Edwards // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 1. – P. 29–34.
739. Schwaiblmair, M. Drug induced interstitial lung disease/ M. Schwaiblmair, W. Behr, T. Haecke et al. // *The Open Respiratory Medicine Journal.* – 2012. – Vol. 6. – P. 63–74.
740. Scott, J. E. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy / J. E. Scott, F. Heatley // *Biomacromolecules.* – 2002. – Vol. 3. – P. 547–553.
741. Scumpia, P. O. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling / P. O. Scumpia, K. M. Kelly-Scumpia, M. J. Delano et al. // *J Immunol.* – 2010. – Vol. 184(5). – P. 2247–2251.
742. Sebti, S. M. Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. / S. M. Sebti, J. E. Mignano, J. P. Jani // *Biochemistry.* – 1989. – Vol. 28, № 16. – P. 6544–6548.
743. Seibold, M. A. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis / M. A. Seibold, A. L. Wise, M. C. Speer et al. // *New England Journal of Medicine.* – 2011. – Vol. 364. – P. 1503–1512.
744. Selman, M. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? / M. Selman, V. Ruiz, S. Cabrera et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. L562–L574.
745. Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians / M. Selman, T. E. King, A. Pardo // *Ann. Intern. Med.* – 2001. – Vol. 134. – P. 136–151.
746. Selman, M. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers / M. Selman, A. Pardo // *Proceedings of the American thoracic society.* – 2006. – Vol. 4. – P. 364–372.
747. Sempowski, G. D. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. / G. D. Sempowski, M. P. Beckmann, S. Derdak et al. // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 152. – P. 3606–3614.
748. Setola, V. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro / V. Setola, S. J. Hufeisen, K. J. Grande-Allen et al. // *Mol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1223–1229.
749. Sharpe, R. J. Inhibition of cutaneous contact hypersensitivity in the mouse with systemic or topical spiperone: topical application of spiperone produces local immunosuppression without inducing systemic neuroleptic effects / R. J. Sharpe, A. Chandrasekar, K. A. Arndt et al. // *J Invest Dermatol.* – 1992. – Vol. 99, № 5. – P. 594–600.
750. Shashwat, S. B. Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications / S. B. Shashwat, A. Naval, P. Rajesh et al. // *Hindawi Publishing Corporation Journal of Drug Delivery.* – 2012.
751. Shen, N. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammatory responses are mediated by EGR-1/GGPPS/MAPK signaling / N. Shen, T. Gong, J.-D. Wang et al. // *The American Journal of Pathology.* – 2011. – Vol. 178. – P. 110–118.
752. Shepherd, R. M. Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100 / R. M. Shepherd, B. J. Capoccia, S. M. Devine et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108(12). – P. 3662–3667.

753. *Shi, X.-L.* Magnetically labeled mesenchymal stem cells after autologous transplantation into acutely injured liver / X.-L. Shi, J.-Y. Gu, B. Han et al. // *World Journal of Gastroenterology*.– 2010.– Vol. 16.– P. 3674–3679.

754. *Shin, D. M.* Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin / D. M. Shin, R. Liu, I. Klich et al. // *Leukemia*.– 2010.– Vol. 24(8).– P. 1450–1461.

755. *Shin, J. W.* Combined effects of hematopoietic progenitor cell mobilization from bone marrow by granulocyte colony stimulating factor and AMD3100 and chemotaxis into the brain using stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in an Alzheimer's disease mouse model / J. W. Shin, J. K. Lee, J. E. Lee et al. // *Stem Cells*.– 2011.– Vol. 29(7).– P. 1075–1089.

756. *Shome, S.* Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis / S. Shome, P. S. Dasgupta, S. Basu // *PLoS ONE*.– 2012.– Vol. 7.– P. 1–12.

757. *Shorr, A. F.* Pulmonary hypertension in patients with pulmonary fibrosis awaiting lung transplant / A. F. Shorr, J. L. Wainright, C. S. Cors et al. // *The European Respiratory Journal*.– 2007.– Vol. 30.– P. 715–721.

758. *Shukla, M. N.* Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7 / M. N. Shukla, J. L. Rose, Ray R. et al. // *American journal of respiratory cell and molecular biology*.– 2009.– Vol. 40.– P. 643–653.

759. *Si, Y.* CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice / Y. Si, C. L. Tsou, K. Croft, I. F. Charo // *J Clin Invest*.– 2010.– Vol. 120(4).– P. 1192–1203.

760. *Sides, M. D.* The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 synergistically induce epithelial–mesenchymal transition in lung epithelial cells / M. D. Sides, R. C. Klingsberg, B. Shan et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.– 2011.– Vol. 44.– P. 852–862.

761. *Sims, M. W.* Effect of single vs bilateral lung transplantation on plasma surfactant protein D levels in idiopathic pulmonary fibrosis/ M. W. Sims, M. F. Beers, V. N. Ahya et al. // *CHEST*.– 2011.– Vol. 140.– P. 489–496.

762. *Singleton, P. A.* High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness / P. A. Singleton, T. Mirzapourzadeh, Y. Guo et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.– 2010.– Vol. 299.– P. L639–L651.

763. *Singleton, P. A.* Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family / P. A. Singleton, S. M. Dudek, S. F. Ma et al. // *J Biol Chem*.– 2006.– Vol. 281.– P. 34381–34393.

764. *Siniscalco, D.* Stem cell therapy: the great promise in lung disease / D. Siniscalco, N. Sullo, S. Maione, F. Rossi, B. D'Agostino // *Therapeutic advances in respiratory disease*.– 2008.– Vol. 2.– P. 173–177.

765. *Skurikhin, E. G.* Mechanisms of the Anti-Inflammatory and Antifibrotic Activity of a Sympatholytic Agent during Toxic Pulmonary Fibrosis / E. G. Skurikhin, E. S. Khmelevskaya, O. V. Pershina et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*.– 2012.– Vol. 153, № 5.– P. 638–643.

766. *Skurikhin, E.* Pathogenesis of pulmonary fibrosis and new approaches to the therapy. Neurotropic drugs modulate the activity of stem and progenitor cell / E. Skurikhin, O. Pershina, A. Dygai.– LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co, 2013.– 45 p

767. *Skurikhin, E. G.* Modulation of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis by Pegylated Hyaluronidase and Dopamine Receptor Antagonist in Mice / E. G. Skurikhin, O. V. Pershina, A. M. Reztsova et al. // *PLoS ONE*.– 2015.– Vol. 10(4).

768. *Skurikhin, E. G.* Modulation of Stem and Progenitor Cells and Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Spiperone in Mice / E. G. Skurikhin, O. V. Pershina, E. S. Khmelevskaya et al. // *J Stem Cell Res Ther.*– 2014.– Vol. 4.– P. 210.
769. *Slauson, D. O.* Mechanisms of serotonin-induced lymphocyte proliferation inhibition / D. O. Slauson, C. Walker, F. Kristensen // *Cell. Immunol.*– 1984.– Vol. 84.– P. 240–252.
770. *Slotkin, T. A.* Effects of reserpine on the adrenal medulla of the spontaneously hypertensive rat / T. A. Slotkin // *British Journal of Pharmacology.*– 1975.– Vol. 53.– P. 349–356.
771. *Slotkin, T. A.* Effects of reserpine on the content and properties of rat adrenal medullary storage vesicles / T. A. Slotkin, K. Edwards // *Biochemical Pharmacology.*– 1973.– Vol. 22.– P. 549–560.
772. *Smadja, D. M.* Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis / D. M. Smadja, L. Mauge, H. Nunes et al. // *Angiogenesis.*– 2013ю – Vol. 16(1).– P. 147–57.
773. *Snyder, S. H.* Receptor mechanisms in antipsychotic drug action: focus on sigma receptors / S. H. Snyder, B. L. Largent // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*–1989.– Vol. 1(1).– P. 7–15.
774. *Soderberg, M.* Increased hyaluronan (hyaluronic acid) levels in bronchoalveolar lavage fluid after histamine inhalation / M. Soderberg, L. Bjermer, R. Hallgren et al. // *Int Arch Allergy Appl Immunol.*–1989.– Vol. 88.– P. 373–376.
775. *Soga, F.* Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis / F. Soga, N. Katoh, T. Inoue, S. Kishimoto // *J. Invest. Dermatol.*– 2007.– Vol. 127.– P. 1947–1955.
776. *Solis, M. A.* Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells / M. A. Solis, Y. H. Chen, T. Y. Wong et al. // *Biochem Res Int.*– 2012.–346972.
777. *Sorrentino, S. A.* Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist rosiglitazone / S. A. Sorrentino, F. H. Bahlmann, C. Besler et al. // *Circulation.*– 2007.– Vol. 116(2).– P. 163–173.
778. *Sovalat, H.* Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34+/CD133+/CXCR4+/Lin-CD45– cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells / H. Sovalat, M. Scrofani, A. Eidenschenk et al. // *Exp Hematol.*– 2011.– Vol. 39(4).– P. 495–505.
779. *Spallicci, M. D.* Use of hyaluronidase for cervical ripening: a randomized trial. / M. D. Spallicci, M. A. Chiea, J. M. Singeret al. // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*– 2007.– Vol. 130.– P. 46–50.
780. *Spangler, D. L.* Efficacy and central nervous system impairment of newer-generation prescription antihistamines in seasonal allergic rhinitis / D. L. Spangler, S. Brunton // *South Med J.*– 2006.– Vol. 99.– P. 593–599.
781. *Specia, S.* Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis / S. Specia, I. Giusti, F. Rieder, G. Latella // *World J Gastroenterol.*– 2012.– Vol. 18(28).– P. 3635–3661.
782. *Spees, J. L.* Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function / J. L. Spees, R. H. Lee, C. A. G. Spees et al. // *Stem Cell Research & Therapy.*– 2016.– Vol. 7:125.
783. *Spicer, A. P.* Hyaluronan and morphogenesis. Birth Defects Research / A. P. Spicer, J. Y. L. Tien // *Embryo Today.*– 2004.– Vol. 72.– P. 89–108.
784. *Spitalieri, P.* Rescue of murine silica-induced lung injury and fibrosis by human embryonic stem cells / P. Spitalieri, M. C. Quitadamo, A. Orlandi et al. // *Eur Respir J.*– 2012.– Vol. 39.– P. 446–457.

785. *Spradling, A.* Stem cells find their niche / A. Spradling, D. Drummond-Barbosa, T. Kai // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 98–104.
786. *Steele, M.* Asbestosis and asbestos-induced pleural fibrosis. / M. Steele, M. W. Peterson, D. A. Schwarz // *Interstitial lung disease*. 4th edition. – Ontario (Canada). – 2003. – P. 418–34.
787. *Stern, R.* Hyaluronan fragments: An information-rich system / R. Stern, A. A. Asari, N. K. Sugahara // *European Journal of Cell Biology*. – 2006. – Vol. 85. – P. 699–715.
788. *Stern, R.* The many ways to cleave hyaluronan. / R. Stern, G. Kogan, M. J. Jedrzejas et al. // *Biotechnol Adv.* – 2007. – Vol. 25. – P. 537–557.
789. *Stramer, B. M.* Selective reduction of fibrotic markers in repairing corneas of mice deficient in Smad3 / B. M. Stramer, J. S. Austin, A. B. Roberts et al. // *J. Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 203. – P. 226–232.
790. *Strieter, R. M.* The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. / R. M. Strieter, B. N. Gomperts, M. P. Keane // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 549–556.
791. *Strutz, F.* TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2) / F. Strutz, M. Zeisberg, A. Renziehausen et al. // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 59. – P. 579–592.
792. *Suda, T.* Proliferative kinetics and differentiation of murine blast cell colonies in culture: evidence for variable G0 periods and constant doubling rates of early pluripotent hemopoietic progenitors / T. Suda, J. Suda, M. Ogawa // *J. Cell Physiol.* – 1983. – Vol. 117. – P. 308–313.
793. *Summer, R.* Origin and phenotype of lung side population cells / R. Summer, D. N. Kotton, X. Sun, K. Fitzsimmons, A. Fine // *American journal of physiology – lung cellular and molecular physiology*. – 2004. – Vol. 287. – P. 477–483.
794. *Summer, R.* Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population / R. Summer, K. Fitzsimmons, D. Dwyer, J. Murphy, A. Fine // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2007. – Vol. 37. – P. 152–159.
795. *Sugino, N.* Pharmacological targeting of bone marrow mesenchymal stromal / stem cells for the treatment of hematological disorders / N. Sugino, T. Ichinohe, A. Takaori-Kondo, T. Maekawa, Y. Miura // *Inflammation and Regeneration*. – 2017. – Vol. 37:7.
796. *Sun, L.* New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis / L. Sun, M. C. Louie, K. M. Vannella et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2011. – Vol. 300. – P. L341–L353.
797. *Szardening-Kirchner, C.* Upregulation of mRNA expression of MCP-1 by TGF-beta1 in fibroblast cells from Peyronie's disease. / C. Szardening-Kirchner, L. Konrad, E. W. Hauck et al. // *World J. Urol.* – 2009. – Vol. 27, № 1. – P. 123–130.
798. *Taelman, V. F.* Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes / V. F. Taelman, R. Dobrowolski, J. L. Plouhinec et al. // *Cell*. – 2010. – Vol. 143(7). – P. 1136–1148.
799. *Taghavi, S.* Co-expression of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor mediates increased vascular permeability in lung grafts before reperfusion / S. Taghavi, D. Abraham, P. Riml et al. // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2002. – Vol. 21. – P. 600–603.
800. *Taichman, R. S.* Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche / R. S. Taichman // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 2631–2639.
801. *Takamiya, M.* Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury / M. Takamiya, M. Okigaki, D. Jin et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2006. – Vol. 26(4). – P. 751–757.

802. *Takatsu, K.* IL-5 and eosinophilia / K. Takatsu, H. Nakajima // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 288–294.
803. *Tamai, H.* Prediction of sustained response to low-dose pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in patients with genotype 1b and high hepatitis C virus level using viral reduction within 2 weeks after therapy initiation / H. Tamai, N. Shingaki, T. Shiraki et al. // *Hepatol Res.* – 2011. – Vol. 41. – P. 1137–1144.
804. *Tanaka, K.* Therapeutic effect of lung mixed culture-derived epithelial cells on lung fibrosis / K. Tanaka, T. Fujita, H. Umezawa et al. // *Lab Invest.* – 2014. – Vol. 94. – P. 1247–1259.
805. *Tang, N.* Lysophosphatidic acid accelerates lung fibrosis by inducing differentiation of mesenchymal stem cells into myofibroblasts / N. Tang, Y. Zhao, R. Feng et al. // *J Cell Mol Med.* – 2014. – Vol. 18. – P. 156–69.
806. *Tang, Y.L.* Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment / Y.L. Tang, K. Qian, Y.C. Zhang et al. // *Regul Pept.* – 2005. – Vol. 125(1–3). – P. 1–8.
807. *Tang, Y.-W.* Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis / Y.-W. Tang, J.E. Johnson, P.J. Browning et al. // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2003. – Vol. 41. – P. 2633–2640.
808. *Taniguchi, H.* The clinical significance of 5% change in vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: extended analysis of the pirfenidone trial / Taniguchi H., Kondoh Y., Ebina M. et al. // *Respiratory Research.* – 2011. – Vol. 93. – P. 1–9.
809. *Tanjore, H.* Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis / H. Tanjore, X.C. Xu, V.V. Polosukhin et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2009. – Vol. 180. – P. 657–665.
810. *Tanjore, H.* Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress / H. Tanjore, D.S. Cheng, A.L. Degryse et al. // *Journal of biological chemistry.* – 2011. – Vol. 286. – P. 30972–30980.
811. *Taskar, V.S.* Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? / V.S. Taskar, D.B. Coultas // *Proc Am Thorac Soc.* – 2006. – Vol. 3. – P. 293–298.
812. *Taylor, K.R.* Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4 / K.R. Taylor, J.M. Trowbridge, J.A. Rudisill et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 17079–17084.
813. *Teder, P.* Resolution of lung inflammation by CD44 / P. Teder, R.W. Vandivier, D. Jiang et al. // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 155–158.
814. *Teisanu, R.M.* Prospective isolation of bronchiolar stem cells based upon immunophenotypic and autofluorescence characteristics / R.M. Teisanu, E. Lagasse, J.F. Whitesides, B.R. Stripp // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27. – P. 612–622.
815. *Teng, C.J.* Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty / C.J. Teng, J. Luo, R.C. Chiu, D. Shum-Tim // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2006. – Vol. 132(3). – P. 628–632.
816. *Tepper, O.M.* Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells / O.M. Tepper, J.M. Capla, R.D. Galiano et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 105(3). – P. 1068–1077.
817. *Termeer, C.* Hyaluronan – magic glue for the regulation of the immune response? / C. Termeer, J.P. Sleeman, J.C. Simon // *Trends in Immunology.* – 2003. – Vol. 24. – P. 112–114.
818. *Termeer, C.* Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. / C. Termeer, F. Benedix, J. Sleeman et al. // *J Exp Med.* – 2002. – Vol. 195. – P. 99–111.

819. *Thankamony, S. P.* Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells / S. P. Thankamony, R. Sackstein // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – Vol. 108(6). – P. 2258–2263.

820. *Thannickal, V.J.* Mechanisms of pulmonary fibrosis. / V.J. Thannickal, G. B. Toews, E. S. White et al. // *Annu. Rev. Med.* – 2004. – Vol. 55. – P. 395–417.

821. *Theise, N.D.* Liver stem cells: the fall and rise of tissue biology / N.D. Theise // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38. – P. 804–806.

822. *Thomson, J.A.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro et al. // *Science.* – 1998. – Vol. 282. – P. 1145–1147.

823. *Tian, Y.* Activation of serotonin receptor-2B rescues small-for-size liver graft failure in mice / Y. Tian, R. Graf, A. M. El-Badry et al. // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 53. – P. 253–262.

824. *Timmermans, F.* Endothelial progenitor cells: identity defined? / F. Timmermans, J. Plum, M. C. Yoder et al. // *J Cell Mol Med.* – 2009. – Vol. 13(1). – P. 87–102.

825. *Timmermans, F.* Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors / F. Timmermans, F. Van Hauwermeiren, M. De Smedt et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – Vol. 27(7). – P. 1572–1579.

826. *Togel, F.* The role of multipotent marrow stromal cells (MSCs) in tissue regeneration / F. Togel, C. Westenfelder // *Organogenesis.* – 2011. – Vol. 7. – P. 96–100.

827. *Tomimori, Y.* Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / Y. Tomimori, T. Muto, K. Saito et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 478. – P. 179–185.

828. *Tondreau, T.* In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues / T. Tondreau, N. Meuleman, B. Stamatopoulos et al. // *Cytotherapy.* – 2009. – Vol. 11(5). – P. 559–569.

829. *Tong, Y.* The stem cell niches in bone / Y. Tong, L. Linheng // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 1195–1201.

830. *Tokuda, A.* Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice / A. Tokuda, M. Itakura, N. Onai et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 2745–2751.

831. *Toole, B. P.* Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick / B. P. Toole, R. L. Trelstad // *Developmental Biology.* – 1971. – Vol. 26. – № 1. – P. 28–35.

832. *Toole, B. P.* The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation / B. P. Toole, J. Gross // *Developmental Biology.* – 1971. – Vol. 25, № 1. – P. 57–77.

833. *Toole, B. P.* Hyaluronan in morphogenesis / B. P. Toole // *Journal of Internal Medicine.* – 1997. – Vol. 242, № 1. – P. 35–40.

834. *Toole, B. P.* Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue / B. P. Toole // *Nat Rev Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 528–539.

835. *Tremain, N.* 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 / N. Tremain, J. Korkko, D. Ibberson et al. // *Stem Cells.* – 2001. – Vol. 19. – P. 408–418.

836. *Trojanowska, M.* Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. / M. Trojanowska // *Rheumatology (Oxford).* – 2008. – Vol. 47. – P. v2–v4.



837. *Trounson, A.* Clinical trials for stem cell therapies / A. Trounson, R. G. Thakar, G. Lomax, D. Gibbons // BMC Medicine. – 2011. – Vol. 52. – P. 1–7.
838. *Tsakiri, K. D.* Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase / K. D. Tsakiri, J. T. Cronkhite, P. J. Kuan et al. // PNAS. – 2007. – Vol. 104. – P. 7552–7557.
839. *Tse, W. T.* Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W. T. Tse, J. D. Pendleton, W. M. Beyer et al. // Transplantation. – 2003. – Vol. 75. – P. 389–397.
840. *Tsukamoto, K.* Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis / K. Tsukamoto, H. Hayakawa, A. Sato et al. // Thorax. – 2000. – Vol. 55. – P. 958–961.
841. *Turino, G. M.* Hyaluronan in respiratory injury and repair / G. M. Turino, J. O. Cantor // Am J Respir Crit Care Med. – 2003. – Vol. 167. – P. 1169–1175.
842. *Turley, A. E.* Signaling properties of hyaluronan receptors / A. E. Turley, W. P. Noble, Y. W. L. Bourguignon // J Biol Chem. – 2002. – 277. – P. 4589–4592.
843. *Turpin, E. A.* Respiratory syncytial virus infection reduces lung inflammation and fibrosis in mice exposed to vanadium pentoxide / E. A. Turpin, A. Antao-Menezes, M. F. Cesta et al. // Respiratory Research. – 2010. – Vol. 20. – P. 1–11.
844. *Tzouvelekis, A.* Stem cell therapy in pulmonary fibrosis. / A. Tzouvelekis, A. Antoniadis, D. Bouros // Curr Opin Pulm Med. – 2011. – Vol. 17. – P. 368–373.
845. *Tzouvelekis, A.* Stem Cell Treatment for Chronic Lung Diseases / A. Tzouvelekis, P. Ntoliou, D. Bouros // Respiration. – 2013. – Vol. 85. – P. 179–192.
846. *Tzouvelekis, A.* A prospective, non-randomized, no placebo-controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis / A. Tzouvelekis, V. Paspaliaris, G. Koliakos et al. // J Transl Med. – 2012. – Vol. 11:171.
847. *Ullah, I.* Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective / I. Ullah, R. B. Subbarao, G. J. Rho // Biosci Rep. – 2015. – Vol. 35(2).
848. *Urao, N.* Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia / N. Urao, M. Okigaki, H. Yamada et al. // Circ Res. – 2006. – Vol. 98(11). – P. 1405–1413.
849. *Urbich, C.* Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells / C. Urbich, A. Aicher, C. Heeschen et al. // J Mol Cell Cardiol. – 2005. – Vol. 39(5). – P. 733–742.
850. *Usuki, J.* Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats / J. Usuki, Y. Fukuda // Pathol Int. – 1995. – Vol. 45. – P. 552–564.
851. *Uzunhan, Y.* Innovative therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis / Y. Uzunhan, H. Nunes, T. Gille et al. // Presse Medicale. – 2011. – Vol. 40. – P. 1100–1112.
852. *Van Der Spoel, T. I.* Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease / T. I. Van Der Spoel, S. J. Jansen of Lorkeers, P. Agostoni et al. // Cardiovasc Res. – 2011. – Vol. 91(4). – P. 649–658.
853. *Van der Veen, M. J.* Fatal pulmonary fibrosis complicating low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis / M. J. Van der Veen, J. J. Dekker, H. J. Dinant et al. // J. Rheumatol. – 1995. – Vol. 22. – P. 1766–1768.
854. *Vannella, K. M.* Latent herpesvirus infection augments experimental pulmonary fibrosis / K. M. Vannella, T. R. Luckhardt, C. A. Wilke et al. // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2010. – Vol. 181. – P. 465–477.

855. Vannella, K. M. Viruses as co-factors for the initiation or exacerbation of lung fibrosis/ K. M. Vannella, B. B. Moore // *Fibrogenesis & Tissue Repair*.– 2008.– Vol. 1.– P. 1–11.

856. Varnum-Finney, B. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling / B. Varnum-Finney, L. Xu, C. Brashem-Stein et al. // *Nat Med*.– 2000.– Vol. 6(11).– P. 1278–1281.

857. Vaughan, M. B. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast / M. B. Vaughan, E. W. Howard, J. J. Tomasek // *Exp. Cell Res*.– 2000.– Vol. 257.– P. 180–189.

858. Vega Lde, L. The 5-HT3 receptor antagonist tropisetron inhibits T cell activation by targeting the calcineurin pathway / L. Vega Lde, E. Munoz, M. A. Calzado et al. // *Biochem Pharmacol*.– 2005.– Vol. 70.– P. 369–380.

859. Vereschagin, E. I. Radiation Technology in the Preparation of Polyethylene Oxide Hydrophilic Gels and Immobilization of Proteases for Use in Medical Practice / E. I. Vereschagin, D. H. Khan, A. W. Troitsky et al. // *Arch. Pharm. Res*.– 2001.– Vol. 24.– N3.– P. 229–233.

860. Veronese, F. M. PEGylation, successful approach to drug delivery / F. M. Veronese, G. Pasut // *DDT*.– 2005.– Vol. 10, № 21.– P. 1451–1458.

861. Vohra, P. K. Dopamine inhibits pulmonary edema through the VEGF-VEGFR2 axis in a murine model of acute lung injury / P. K. Vohra, L. H. Hoepfner, G. Sagar et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.– 2012.– Vol. 302.– P. 185–192.

862. Vyalov, S. L. Rat alveolar myofibroblasts acquire alpha-smooth muscle actin expression during bleomycin-induced pulmonary fibrosis / S. L. Vyalov, G. Gabbiani, Y. Kapanci // *American Journal of Pathology*.– 1993.– Vol. 143.– P. 1754–1765.

863. Wagner, W. Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche / W. Wagner, P. Horn, S. Bork, A. D. Ho // *Exp. Gerontol*.– 2008.– Vol. 43 (11).– P. 974–980.

864. Walenta, K. L. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations / K. L. Walenta, S. Bettink, M. Bohm, E. B. Friedrich // *Basic Res Cardiol*.– 2011.– Vol. 106(2).– P. 299–305.

865. Walker, J. M. Sigma receptors: biology and function / J. M. Walker, W. D. Bowen, F. O. Walker et al. // *Pharmacol Rev*.– 1990.– Vol. 42.– P. 355–402

866. Walther, D. J. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release / D. J. Walther, J. U. Peter, S. Winter et al. // *Cell*.– 2003.– Vol. 115(7).– P. 851–862.

867. Wang, D. Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice / D. Wang, J. E. Morales, D. G. Calame et al. // *Mol Ther*.– 2010.– Vol. 18.– P. 625–634.

868. Wang, K. Novel micelle formulation of curcumin for enhancing antitumor activity and inhibiting colorectal cancer stem cells / K. Wang, T. Zhang, L. Liu et al. // *Int J Nanomedicine*.– 2012.– Vol. 7.– P. 487–497.

869. Wang, J. F. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. / J. F. Wang, H. Jiao, T. L. Stewart et al. // *Wound Repair Regen*.– 2007.– Vol. 15.– P. 113–121.

870. Wang, R. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor / R. Wang, O. Ibarra-Sunga, L. Verlinski, R. Pick, B. D. Uhal // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*.– 2000.– Vol. 279.– P. 143–151.

871. Wang, X.-Y. Novel method for isolation of murine clara cell secretory protein-expressing cells with traces of stemness / X.-Y. Wang, K. M. Keefe, S. M. Jensen-Taubman et al. // *PLoS ONE*.– 2012.– Vol. 8.– P. 1–10.

872. Wang, Y. C. Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4 / Y. C. Wang, X. B. Hu, F. He et al. // *J Biol Chem.*– 2009.– Vol. 284(23).– P. 15993–16003.
873. Warburton, D. Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration / D. Warburton, L. Perin, R. DeFilippo et al. // *Proceedings of the American thoracic society.*– 2008.– Vol. 5.– P. 703–706.
874. Watt, F. M. Out of eden: stem cells and their niches / F. M. Watt, B. L. M. Hogan // *Science.*– 2000.– Vol. 287.– P. 1427–1430.
875. Watts, S. W. Serotonylation of vascular proteins important to contraction / S. W. Watts, J. R. Priestley, J. M. Thompson // *PLoS ONE.*– 2009.– Vol. 4.
876. Way Kwok Wai Lau. The Role of MAPK and Nrf2 Pathways in Ketanserin-Elicited Attenuation of Cigarette Smoke-Induced IL-8 Production in Human Bronchial Epithelial Cells / Way Kwok Wai Lau, Stanley Chi Hang Chan, Andrew Chi Kin Law, Mary Sau Man Ip, Judith Choi Wo Mak // *Toxicological Sciences.*– 2012.– Vol. 125(2).– P. 569–577.
877. Weber, J. M. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells / J. M. Weber, S. R. Forsythe, C. A. Christianson et al. // *Bone.*– 2006.– Vol. 39.– № 3 – P. 485–493.
878. Webber, J. Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan / J. Webber, R. H. Jenkins, S. Meran et al. // *Am J Pathol.*– 2009.– Vol. 175.– P. 148–160.
879. Weiss, D. J. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases / D. J. Weiss, I. Bertoncello, Z. Borok et al. // *Proceedings of the American thoracic society.*– 2011.– Vol. 8.– P. 223–272.
880. Weiss, D. J. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases / D. J. Weiss, J. K. Kolls, L. A. Ortiz et al. // *Proceedings of the American thoracic society.*– 2008.– Vol. 5.– P. 637–667.
881. Weiss, D. J. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD / D. J. Weiss, R. Casaburi, R. Flannery, M. LeRoux-Williams, D. P. Tashkin // *Chest.*– 2013.– Vol. 143.– P. 1590–1598.
882. Weissman, D. N. Silicosis. / D. N. Weissman // *Interstitial lung disease.*– 4th edition.– Ontario (Canada): BC Decker.– 2003.– P. 387–401.
883. Welsh, D. J. Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine2A receptor and transporter / D. J. Welsh, M. Harnett, M. MacLean, A. J. Peacock // *Am J Respir Crit Care Med.*– 2004.– Vol. 170.– P. 252–259.
884. Wenzel, S. E. TGF-beta and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts / S. E. Wenzel, J. B. Trudeau, S. Barnes et al. // *J. Immunol.*– 2002.– Vol. 169.– P. 4613–4619.
885. Westergren-Thorsson, G. Lung fibroblast clones from normal and fibrotic subjects differ in hyaluronan and decorin production and rate of proliferation. / G. Westergren-Thorsson, P. Sime, M. Jordana et al. // *Int J Biochem Cell Biol.*– 2004.– Vol. 36.– P. 1573–1584.
886. Westerlind, U. Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response / U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.*– 2008.– Vol. 47.– P. 7551–7556.
887. Wilkinson, T. S. Pro- and anti-inflammatory factors cooperate to control hyaluronan synthesis in lung fibroblasts / T. S. Wilkinson, S. Potter-Perigo, C. Tsoi et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.*– 2004.– Vol. 31.– P. 92–99.

888. *Willert, K.* Wnt signaling: is the party in the nucleus? / K. Willert, K. A. Jones // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20(11). – P. 1394–1404.
889. *Willis, B. C.* Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung / B. C. Willis, R. M. du Bois, Z. Borok // *Proceedings of the American Thoracic Society.* – 2006. – Vol. 3. – P. 377–382.
890. *Willis, B. C.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis / B. C. Willis, J. M. Liebler, K. Luby-Phelps et al. // *Am J Pathol.* – 2005. – Vol. 166. – P. 1321–1332.
891. *Wilson, A.* Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches / A. Wilson, A. Trumpp // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6 (2). – P. 93–106.
892. *Wilson, M. S.* Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation / M. S. Wilson, T. A. Wynn // *Mucosal immunology.* – 2009. – Vol. 2. – P. 103–121.
893. *Wilson, M. S.* Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent / M. S. Wilson, S. K. Madala, T. R. Ramalingam et al. // *J Exp Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 535–552.
894. *Wimalasena, K.* Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry / K. Wimalasena // *Med Res Rev.* – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 483–519.
895. *White, E. S.* Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia / idiopathic pulmonary fibrosis / E. S. White, M. H. Lazar, V. J. Thannickal et al. // *Journal of Pathology.* – 2003. – Vol. 201. – P. 343–354.
896. *Wojakowski, W.* Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction / W. Wojakowski, M. Tendera, M. Kucia et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2009. – Vol. 53(1). – P. 1–9.
897. *Wolf, D.* Mesenchymal stem cells as cellular immunosuppressants. / D. Wolf, A. M. Wolf. // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371. – P. 1553–1554.
898. *Wooltorton, J. R.* Potent block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by the uncharged form of amitriptyline and related tricyclic compounds / J. R. Wooltorton, A. Mathie // *Br J Pharmacol.* – 1995. – Vol. 116. – P. 2191–2200.
899. *Wong, C. Y.* Differentiation of human mesenchymal stem cells into mesangial cells in post-glomerular injury murine model / C. Y. Wong, S. K. Cheong, P. L. Mok, C. F. Leong // *Pathology.* – 2008. – Vol. 40(1). – P. 52–57.
900. *Wu, J. Y.* Role of the osteoblast lineage in the bone marrow hematopoietic niches / J. Y. Wu, D. T. Scadden, H. M. Kronenberg // *J. Bone Miner Res.* – 2009. – Vol. 24 (5). – P. 759–764.
901. *Wu, X.* Effects of granulocyte-colony stimulating factor on the repair of balloon-injured arteries / X. Wu, K. Wang, L. Cui et al. // *Pathology.* – 2008. – Vol. 40(5). – P. 513–519.
902. *Wulff, H.* Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets / H. Wulff, N. A. Castle, L. A. Pardo // *Nat Rev Drug Discov.* – 2009. – Vol. 8. – P. 982–1001.
903. *Wynn, T. A.* IL-13 effector functions / T. A. Wynn // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 425–456.
904. *Wynn, T. A.* Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. / T. A. Wynn // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 583–594.
905. *Wynn, T. A.* Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T. A. Wynn // *J Pathol.* – 2008. – Vol. 214(2). – P. 199–210.
906. *Wynn, T. A.* Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis / T. A. Wynn // *J Exp Med.* – 2011. – Vol. 208. – P. 1339–1350.

907. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases / T. A. Wynn // *J. Clin. Invest.*— 2007.— Vol. 117.— P. 524–529.
908. Xie, Y. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging / Y. Xie, T. Yin, W. Wiegand et al. // *Nature*.— 2009.— Vol. 457(7225).— P. 97–101.
909. Xie, Y. T. Brain-targeting study of stearic acid-grafted chitosan micelle drug-delivery system / Y. T. Xie, Y. Z. Du, H. Yuan, F. Q. Hu // *Int J Nanomedicine*.— 2012. Vol. 7.— P. 3235–3244.
910. Xu, J. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT<sub>2</sub> receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells / J. Xu, B. Jian, R. Chu et al. // *Am J Pathol.*— 2002.— Vol. 161.— P. 2209–2218.
911. Xu, P. B. STY39, a novel alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue, attenuates bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice / P. B. Xu, Y. F. Mao, H. B. Meng et al. // *Shock*.— 2011.— Vol. 35.— P. 308–314.
912. Xu, X. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats / X. Xu, Z. Xu, Y. Xu, G. Cui // *Coron Artery Dis.*— 2005.— Vol. 16(4).— P. 245–255.
913. Xu, X. Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium / X. Xu, Z. Xu, Y. Xu, G. Cui // *Circ J.*— 2005.— Vol. 69(10).— P. 1275–1283.
914. Xue, J. The HLA class II allele DRB1\*1501 is over-represented in patients with idiopathic pulmonary fibrosis / J. Xue, B. R. Gochuico, A. S. Alawad et al. // *PLoS ONE*.— 2011.— Vol. 6.— P. 1–7.
915. Xynos, A. Bone marrow-derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a Pax-7 independent pathway / A. Xynos, P. Corbella, N. Belmonte // *Stem Cells*.— 2010.— Vol. 28(5).— P. 965–973.
916. Yang, I. V. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia / I. V. Yang, L. H. Burch, M. P. Steele et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.— 2007.— Vol. 175.— P. 45–54.
917. Yang, M. Promoting effects of serotonin on hematopoiesis: ex vivo expansion of cord blood CD34<sup>+</sup> stem/progenitor cells, proliferation of bone marrow stromal cells, and antiapoptosis / M. Yang, K. Li, P. C. Ng et al. // *Stem Cells*.— 2007.— Vol. 25(7).— P. 1800–1806.
918. Yang, M. Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT<sub>2</sub> receptor / M. Yang, A. Srikiatchakorn, M. Anthony, B. H. Chong // *Blood Coagul. Fibrinolysis*.— 1996.— Vol. 7 (2).— P. 127–133.
919. Yasuda, M. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy / M. Yasuda, K. Nakano, K. Yasumoto et al. // *Histol Histopathol.*— 2002.— Vol. 17.— P. 945–950.
920. Yin, J. 5-HT<sub>1B</sub> receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes / J. Yin, R. H. Albert, A. P. Tretiakova, B. A. Jameson // *J Neuroimmunol.*— 2006.— Vol. 181.— P. 68–81.
921. Yoder, M. C. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals / M. C. Yoder, L. E. Mead, D. Prater et al. // *Blood*.— 2007.— Vol. 109(5).— P. 1801–1809.
922. Yokoyama, H. O. Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy / H. O. Yokoyama, M. E. Wilson, K. K. Tsuboi, R. E. Stowell // *Cancer Res.*— 1953.— Vol. 13.— P. 80–85.
923. Yoo, S. Y. Angiogenesis and its therapeutic opportunities / S. Y. Yoo, S. M. Kwon. // *Mediators Inflamm.*— 2013.— P. 127–170.

924. Yoon, C.H. Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells / C.H. Yoon, J. Hur, I.Y. Oh et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*– 2006.– Vol. 26(5).– P. 1066–1072.

925. Yoon, C.H. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases / C.H. Yoon, J. Hur, K.W. Park et al. // *Circulation.*– 2005.– Vol. 112(11).– P. 1618–1627.

926. Yoon, C.H. Cigarette smoke extract- induced reduction in migration and contraction in normal human bronchial smooth muscle cells / C.H. Yoon, H.-J. Park, Y.-W. Cho et al. // *The Journal of Physiology and Pharmacology.*– 2011.– Vol. 15.– P. 397–403.

927. Youn, S.W. COMP-Ang1 stimulates HIF-1 $\alpha$ -mediated SDF-1 overexpression and recovers ischemic injury through BM-derived progenitor cell recruitment /S.W. Youn, S.W. Lee, J. Lee et al. // *Blood.*– 2011.– Vol. 117(16).– P. 4376–4386.

928. Young, M.R. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin /M.R. Young, J. L. Kut, M. P. Coogan at al. // *J. Immunology.*– 1993.– Vol. 80.– P. 395–400.

929. Yoshida, T. Pulmonary fibrosis in response to environmental cues and molecular targets involved in its pathogenesis/ T. Yoshida, A. Ohnuma, H. Horiuchi, T. Harada // *Journal of Toxicologic Pathology.*– 2011.– Vol. 24.– P. 9–24.

930. Yu, B. Serotonin 5-hydroxytryptamine (2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammation with extraordinary potency /B. Yu, J. Becnel, M. Zerfaoui et al. // *J Pharmacol Exp Ther.*– 2008.– Vol. 327.– P. 316–323.

931. Zaman, A. Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury / A. Zaman, Z. Cui, J. P. Foley et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.*– 2005.– Vol. 33.– P. 447–454.

932. Zhang, J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye et al. // *Nature.*– 2003.– Vol. 425(6960).– P. 836–841.

933. Zhao, H.W. An increase in hyaluronan by lung fibroblasts: a biomarker for intensity and activity of interstitial pulmonary fibrosis? / H.W. Zhao, C. J. Lu, R. J. Yu et al. // *Respirology.*– 1999.– Vol. 4.– P. 131–138.

934. Zhao, F. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. / F. Zhao, Y.F. Zhang, Y.G. Liu et al. // *Transplant Proc.*– 2008.– Vol. 40.– P. 1700–1705.

935. Zhao, N. Effects on neuroendocrinoimmune network of Lizhong Pill in the reserpine-induced rats with spleen deficiency in traditional Chinese medicine / N. Zhao, W. Zhang, Y. Guo et al. // *Journal of Ethnopharmacology.*– 2011.– Vol. 133.– P. 454–459.

936. Zhao, W. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis / W. Zhao, J. J. Li, D. Y. Cao et al. // *World J Gastroenterol.*– 2012.– Vol. 18(10).– P. 1048–1058.

937. Zhou, Q.L. Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Into Alveolar Epithelial Cells In Vitro for Use In Vivo / Q.L. Zhou, X. L. Ye, R. W. Sun et al. // *Stem Cell Transl Med.*– 2014.– Vol. 3.– P. 675–685.

938. Zhu, C.B. The proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  activate serotonin transporters / C.B. Zhu, R. D. Blakely, W.A. Hewlett // *Neuropsychopharmacology.*– 2006.– Vol. 31.– P. 2121–2131.

939. Zhu, P. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. / P. Zhu, L. Huang, X. Ge et al. // *Int J Exp Pathol.*– 2006.– Vol. 87.– P. 463–474.

940. Zhu, Z Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice. / Z. Zhu, C. G. Lee, T. Zheng et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – P. S67–S70.
941. Zohar, R. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry / R. Zohar, J. Sodek, C. A. McCulloch // *Blood.* – 1997. – Vol. 90. – P. 3471–3481.
942. Zolak, J. S. Idiopathic Pulmonary Fibrosis / J. S. Zolak, A. A. Joao // *Immunol Allergy Clin N Am.* – 2012. – Vol. 32. – P. 473–485.
943. Zoltan-Jones, A. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells / A. Zoltan-Jones, L. Huang, S. Ghatak et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 45801–45810.
944. Zuba-Surma, E. K. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies / E. K. Zuba-Surma, M. Kucia, W. Wu et al. // *Cytometry A.* – 2008. – Vol. 73A(12). – P. 1116–1127.
945. Zuk, P. A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – Vol. 7(2). – P. 211–228.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

# **ФИБРОЗ ЛЕГКИХ И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ**

**А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, В.А. Крупин**

Подписано в печать 28.11.2018. Формат 70х100 1/16.  
Гарнитура Times. Печ. л. 12,5.  
Тираж 300 экз. Заказ № 3570.

Издатель - Российская академия наук  
Оригинал - макет подготовлен ООО «Исток»

Публикуется в авторской редакции  
Отпечатано в типографии ООО «Исток»  
603024, г. Нижний Новгород, пер. Бойновский, д. 9

Издается по решению Научно-издательского совета Российской академии наук (НИСО РАН) и распространяется бесплатно