



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук»  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ  
И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Е.Д. ГОЛЬДБЕРГА

А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, Э.С. Пан

**ХРОНИЧЕСКАЯ  
ОБСТРУКТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ ЛЁГКИХ:  
ПЕРСПЕКТИВЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ  
РЕГУЛЯЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
В КЛИНИКЕ**

Москва  
2022

УДК 616.24-002-07

ББК 54.12

Д 87

Рецензенты:

*А.А. Кубатиев, академик РАН*

*А.Л. Хохлов, член-корреспондент РАН*

**Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Пан Э.С.** Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике. М.: РАН, 2022. – с. 248, 26 ил.

DOI : 10.31857/S9785907036444000001

В монографии представлен материал об этиологии, эпидемиологии и патогенезе хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ) и эмфиземы лёгких. Обобщён мировой опыт лечения эмфиземы и ХОБЛ лекарственными препаратами, трансплантацией лёгких, клеточной терапией и клеточным продуктом. Проанализированы данные литературы и результаты собственных исследований роли стволовых клеток в патогенезе и регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия при эмфизематозном поражении лёгких. Особое внимание уделено половым особенностям ангиогенеза и эпителиогенеза лёгких при эмфиземе, осложнённой метаболическими нарушениями. Представлены доказательства в пользу необходимости использования костно-мозговых, циркулирующих в крови и резидентных (лёгкие) стволовых клеток в качестве мишеней для лекарственной терапии, маркеров диагностики и прогноза лечения эмфиземы лёгких и ХОБЛ. При этом показана эффективность различных подходов фармакологической регуляции стволовых клеток в целях стимуляции регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия.

Для патофизиологов, пульмонологов, фармакологов и других специалистов.

# СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	8
<b>Глава 1. ХРОНИЧЕСКАЯ ОБСТРУКТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ ЛЁГКИХ И ЭМФИЗЕМА</b> .....	12
<b>1.1. Этиология и эпидемиология</b> .....	12
<b>1.2. Патогенез</b> .....	19
1.2.1. Генетическая предрасположенность и эпигенетические факторы .....	19
1.2.2. Воспаление .....	22
1.2.3. Нарушение баланса протеаз-антипротеаз .....	26
1.2.4. Окислительный стресс .....	27
<b>1.3. Лечение</b> .....	28
1.3.1. Нефармакологические методы .....	29
1.3.2. Лекарственная терапия .....	29
1.3.3. Хирургические методы .....	32
1.3.4. Клеточная терапия .....	33
<b>Глава 2. МОДЕЛИ ЭМФИЗЕМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ</b> .....	38
<b>Глава 3. СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА</b> .....	49
<b>3.1. Общие сведения</b> .....	49
<b>3.2. Стволовые клетки костного мозга</b> .....	50
<b>3.3. Рекрутирование</b> .....	56
<b>3.4. Стволовые и прогениторные клетки лёгких</b> .....	60
<b>3.5. Воспаление и стволовые клетки</b> .....	69
<b>Глава 4. NOTCH СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ</b> .....	72
<b>4.1. Общие сведения</b> .....	72
<b>4.2. Заболевания лёгких</b> .....	74
<b>Глава 5. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЁГКИХ</b> .....	78

<b>Глава 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЁГКИХ</b> .....	103
<b>6.1. Современные подходы использования стволовых клеток в лечении хронических заболеваний</b> .....	103
<b>6.2. Блокада дофаминовых D2-рецепторов как новый подход в ускорении регенерации повреждённого эндотелия при эмфиземе лёгких</b> .....	105
6.2.1. Сосудистый гомеостаз и лёгочные эффекты дофамина .....	105
6.2.2. Спиперон .....	108
6.2.3. Фармакологические эффекты спиперона при эмфиземе лёгких .....	110
<b>6.3. Пегилированный аналог глюкагоноподобного пептида 1 как средство гендерного выбора лечения сочетанной патологии МС и ХОБЛ и стимуляции регенерации микрососудистой сети</b> .....	118
6.3.1. Гендерные различия в реакциях стволовых клеток эндотелия при сочетании метаболических нарушений и эмфиземы лёгких .....	118
6.3.2. Общие сведения о фармакологических эффектах глюкагоноподобного пептида 1 .....	123
6.3.3. Влияние пегилированного глюкагоноподобного пептида 1 на сочетанную патологию метаболических нарушений и эмфиземы лёгких .....	125
<b>6.4. Противовоспалительная активность симпатолитика как основа терапевтических эффектов при эмфиземе лёгких</b> .....	128
6.4.1. Роль катехоламинов в развитии ХОБЛ .....	128
6.4.2. Фармакологические эффекты и механизм действия резерпина .....	130
6.4.3. Фармакологические эффекты и механизм действия резерпина в условиях экспериментальной эмфиземы лёгких .....	134
<b>6.5. Противовоспалительные и регенеративные эффекты Триамида при экспериментальной эмфиземе лёгких</b> .....	146
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	153
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	157
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	225

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А1АТ	– альфа1-антитрипсин (или ААТ, $\alpha$ 1-антитрипсин)
ААТД	– дефицит альфа-1 антитрипсина
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
БАЛ	– бронхоальвеолярный лаваж
БАСК	– бронхоальвеолярные стволовые клетки
балМСК	– мезанхимальные стволовые бронхоальвеолярной жидкости
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВСК	– стволовые клетки взрослого организма (или постнатального развития)
ГН	– глутамата натрия
ГПП-1	– глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1, Glucagon-like peptide-1)
ГСК	– гемопоэтические стволовые клетки
ГТТ	– глюкозотолерантный тест
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМТ	– индекс массы тела
ИФЛ	– идиопатический фиброз лёгких
КОЕ	– колониеобразующие единицы
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПС	– липополисахарид
лМСК	– мезенхимальные стволовые клетки лёгких
МС	– метаболический синдром
МСК	– мезенхимальные стволовые клетки
МЭПК	– малые эмбрионально-подобные клетки
НИР	– научно-исследовательская работа
ОФВ1	– объём форсированного выдоха за первую секунду
pegГПП-1	– пегилированный аналог ГПП-1 (pegGLP-1)
ПТГ	– паратиреоидный гормон
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РТПХ	– реакции «трансплантат против хозяина»
СД2	– сахарный диабет 2 типа
СК	– стволовые клетки
СМФ	– система мононуклеарных фагоцитов
ССКЖП	– стромальные стволовые клетки жирового происхождения
ТГ	– триглицериды
УЕ	– условная единица
ХОБЛ	– хроническая обструктивная болезнь лёгких
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ЭВ	– экстрацеллюлярные везикулы
ЭР	– эндоплазматический ретикулум
ЭПК	– эндотелиальные прогениторные клетки
ЭСД	– экстракт сигаретного дыма (анг. cigarette smoke extract, CSE)
ЭСК	– эмбриональные стволовые клетки
AECOPD	– Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease
AGEs	– Advanced glycation end products
ADAM	– Proteinase a disintegrin and metalloproteinase
Ang-1	– Angiopoietin 1
ATRA	– All-trans retinoic acid
AUC	– Area Under Curve
BOLD	– Burden of obstructive lung disease
CGRP	– Calcitonin gene-related peptide
C1P	– Ceramide-1-phosphate
DI	– destructive index
DLL-4	– Delta like ligand 4
EGF	– Epidermal growth factor
eNOS	– Endothelial nitric oxidesynthase
FGF2	– Fibroblast growth factor 2
GC	– Gastric cancer
G-CSF	– Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	– granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOLD	– Global initiative for chronic lung disease
GSI	– Gamma secretase inhibitor
GSTP1	– Glutathione S-transferase pi gene
GWAS	– Genome-wide association studies
HDACs	– Histone deacetylases
HGF	– Hepatocyte growth factor
HIF-1 $\alpha$	– Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$
HGF	– Hepatocyte growth factor
HNE	– Human neutrophil elastase
IDO	– Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	– Interferon gamma
IGF-1	– Insulin-like growth factor I
IL(1 $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 23)	– Interleukin (1 $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 23)
Lm	– Mean linear intercept, MLI (или Lm; средний линейный перехват)
LTB4	– Leukotriene B4 (лейкотриен B4, ЛТВ4)
LVRS	– Lung volume reduction surgery
MCP1	– Monocyte Chemoattractant Protein 1

MMP (1, 2, 9, 10, 12)	– Matrix metalloproteinases (1, 2, 9, 10, 12)
NICD	– Notch intracellular domain
NEXT	– Notch extracellular truncated form
NF- $\kappa$ B	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NUMB	– Inhibitor of the Numb / Notch signaling pathway
PDGF	– Platelet-derived growth factor
PGE2	– Prostaglandin E2
PPARs	– Peroxisome proliferator-activated receptors
PPE	– Porcine pancreatic elastase
RAGE	– Receptor for advanced glycation end products
ROS	– Reactive oxygen species
SDF-1	– stromal cell-derived factor 1
S1P	– Sphingosine-1-phosphate
SDF-1	– Stromal cell-derived factor-1
SP-C	– Surfactant-associated polypeptide C
TGF- $\beta$	– Transforming growth factor beta
TIMP	– Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- $\alpha$	– Tumor necrosis factor-alpha
TSNA	– Tobacco-specific nitrosamines
VEGF(2)	– Vascular endothelial growth factor (2)
VEGFR-2	– Vascular endothelial growth factor receptor 2
VMAT	– Vesicular monoamine transporter

## **ВВЕДЕНИЕ**

В последнее время огромное внимание уделяется заболеваниям лёгких, приводящим к инвалидизации населения. К таковым относят хроническую обструктивную болезнь лёгких (ХОБЛ). ХОБЛ представляет собой хроническое воспалительное заболевание лёгких, развивающееся постепенно и возникающее вследствие воздействия вдыхаемых вредных веществ, побочного действия лекарственных препаратов, генетических аномалий, преждевременного рождения (в силу недоразвития лёгких), детских респираторных инфекций и дефицита альфа-1-антитрипсина [Roche N. et al., 2016; Grahn K, Gustavsson P, Andersson T, et al., 2021; Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). World Health Organization, 2022]. В 2015 году ХОБЛ затронула примерно 299 миллионов человек, что на 174 миллиона человек или 44% больше в сравнении с 1990 годом, при этом смертность составила более 3 миллионов человек во всём мире, что на 12% больше по сравнению с тем же периодом наблюдения [Ruvuna L., Sood A., 2021].

Предполагалось, что к 2030 году ХОБЛ переместится на третье место в мире в структуре смертности населения [De Cunto G. et al., 2020]. Между тем, есть публикации, в которых указывается, что на настоящий момент ХОБЛ является третьей наиболее распространённой причиной смертности от болезней во всём мире [Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2022]. Финансовые затраты на лечение ХОБЛ огромны. По оценкам, от 5% до 10% населения в целом старше 40 лет страдают ХОБЛ средней или тяжёлой степени, и до 50% пожилых курильщиков могут страдать этим заболеванием [Lundback B, Lindberg A, Lindstrom M, et al., 2003; Backman H, Vanfleteren L, Lindberg A, et al., 2020].

Диагноз ХОБЛ основывается на клинических признаках, таких, как кашель, выделение мокроты, одышка, оценке вредного действия различных факторов и хронической обструкции воздушного потока, подтверждённой спирометрией. Рекомендуемое лечение включает отказ от курения, лёгочную реабилитацию (физическая активность и диетическое лечение) и фармакологическое лечение в основном бронходилататорами и противовоспалительными препаратами [Läkemedelsverkets riktlinjer för behandling av kroniskt obstruktiv lungsjukdom [The Swedish Medical Products Agency's guidelines for treatment of chronic obstructive pulmonary disease] [homepage on the Internet]; 2022].

Примерно у 80% пациентов с ХОБЛ отмечаются сопутствующие хронические заболевания. Сопутствующие заболевания, как правило, значительно ухудшают прогноз ХОБЛ и усложняют лечение [Elixhauser A, Steiner C, Harris DR, Coffey RM., 1998; Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR., 1987]. Например, достаточно распространены при ХОБЛ нарушения метаболизма глюкозы и резистентность к инсулину при метаболическом синдроме (МС) и сахарном диабете 2 типа (СД2) [Cebon Lipovec N., et



al., 2016]. Кроме того, высказывается точка зрения, что ХОБЛ является предиктором развития СД2 [Jones P.W. et al., 2014], это выступает одной из причин более высокой распространённости СД2 у пациентов с ХОБЛ, чем в общей популяции. Объяснение сочетания этих заболеваний видится в системном воспалении, которое участвует в формировании симптоматики ХОБЛ и МС, СД2 [Duncan B.V. et al., 2003; Muhammad I.F. et al., 2016]. Было обнаружено, что заболеваемость ХОБЛ выше у пациентов с СД2, чем у лиц без диабета [Ehrlich S.F. et al., 2010]. МС, резистентность к инсулину и системное воспаление также были признаны важными маркерами риска снижения функции лёгких у здоровых некурящих пациентов [Lim SY, Rhee E-J, Sung K-C., 2010].

Многие специалисты первичной медико-санитарной помощи считают современные методы диагностики ХОБЛ и эмфиземы неточными, сложными, трудоёмкими и, следовательно, непрактичными. В клинической практике не существует надёжных, установленных лабораторных тестов для оценки различных клинических фенотипов ХОБЛ у пациентов. Во многом такое положение объясняет ошибки в диагностировании и прогнозе, что, в свою очередь, может приводить к неправильному лечению и уходу [Blonde L, Khunti K, Harris SB, Meizinger C, Skolnik NS., 2018].

В этой связи существует потребность в новых подходах диагностики (в том числе, в лучшем понимании субъективных потребностей пациента, клинического фенотипирования и эндотипирования), прогнозирования и лечения ХОБЛ, что может сделать оценку статуса ХОБЛ и прогноза более персонализированной и точной.

В последнее время огромное внимание уделяется терапии стволовыми клетками (СК) [Ahmadian-Moghadam H., Sadat-Shirazi M.-S., Zarrindast M.-R., 2020; Biressi S., Filareto A., Rando T.A., 2020; Gauthier-Fisher A., Kauffman A., Librach C.L., 2020; Götherström C., Walther-Jallow L., 2020; Pixley J.S., 2020; Rehakova D., Souralova T., Koutna I., 2020; Vasanthan J., Gurusamy N., Rajasingh S. et al. 2020; Yamanaka S., 2020; Watanabe Y., Tsuchiya A., Terai S., 2021; Zeng X., Geng W., Jia J. et al., 2021]. Трансплантация гемопоэтических СК (ГСК) используется в настоящее время для лечения Т-клеточного лейкоза у взрослых, множественной миеломы, лимфомы и др. Клеточная терапия ГСК предлагается для лечения заболеваний лёгких. Донорскими мезенхимальными СК (МСК) лечат гастроинтестинальные и нейродегенеративные заболевания, инсульты и инфаркты, лейкозы, лимфомы, костные (хрящевые) заболевания, диабет, противодействуют реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [Trounson A. et al., 2011]. Клеточная терапия МСК рассматривается как новый перспективный подход лечения хронических заболеваний лёгких, в том числе идиопатического фиброза лёгких (ИФЛ) и ХОБЛ [Shigemura N. et al., 2006; Siniscalco D. et al., 2008; Moodley Y. et al., 2009; Shukla M.N. et al., 2009; Huh J.W. et al., 2011; Guan X.J. et al., 2012; Gu W. et al., 2015].

Несмотря на тот огромный путь, который проделала клеточная терапия, до настоящего времени не совсем понятно, с какими из СК связаны её лечебные эффекты. Отдельно взятые клоны СК, составляющие одну популяцию, отличаются друг от друга по фенотипу, экспрессии генов, пролиферативной активности и способности к дифференцировке [Muraglia A. et al., 2000; Tremain N. et al., 2001]. Кроме лечебных эффектов клеточная терапия СК повышает риск развития аллергических реакций, бактериальных, вирусных и грибковых инфекционных заболеваний [Benjamin D.K. et al., 2002; Engelhard D. et al., 2002]. В клинической практике для клеточной терапии применяются прекультивированные мононуклеары. Эти манипуляции приводят к изменению фенотипа и функций стволовых клеток [Banfi A. et al., 2000; Banfi A. et al., 2002], в том числе, к приобретению неопластических свойств [Lalu M.M. et al., 2012]. После проведения клеточной терапии выделенные из костного мозга пациентов МСК доноров демонстрируют черты частичного или полного химеризма [Lee S.T. et al., 2002; Le Blanc K. et al., 2007]. Имеются данные об иммуномодулирующих свойствах МСК: в зависимости от ситуации одна популяция может демонстрировать провоспалительную и противовоспалительную активности [Tse W.T. et al., 2003]. Общеизвестно, что время жизни СК донора в организме пациента ограничено часами. Как известно, процессы регенерации требуют значительного времени. В этой связи трудно ожидать от клеточной терапии существенного ускорения регенерации повреждённых и утраченных клеток. В этой связи иммуномодулирующие и другие кратковременные эффекты клеточной терапии можно объяснить исключительно паракринной активностью клеток [Kang S.K. et al., 2012].

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

Таким образом, поиск новых эффективных, нетоксичных и малозатратных подходов лечения ХОБЛ и эмфиземы лёгких жизненно необходим. Прогресс в лечении этих хронических заболеваний лёгких нам видится в фармакологической регуляции стволовых и прогениторных клеток.

В настоящей монографии представлен оригинальный материал, касающийся изучения особенностей реакций СК и прогениторных клеток лёгких,

костного мозга и крови (МСК, фибробластные прогениторные клетки, фиброциты, эндотелиальные прогениторные клетки, VEGF<sup>+</sup> эндотелиальные клетки, предшественники ангиогенеза, стволовые клетки лёгких, эпителиальные прогениторные клетки и др.), а также «вспомогательных» клеток ангиогенеза в ответ на моделирование симптомов ХОБЛ и, прежде всего, эмфиземы лёгких.

При обсуждении полученных нами результатов экспериментальных исследований использовался широкий спектр зарубежных и отечественных публикаций по заявленной проблематике. Внимание в монографии уделено не только анализу результатов исследования регенеративного потенциала СК и прогениторных клеток, но и изучению их роли в патогенезе эмфиземы лёгких. Особый интерес составили гендерные различия в механизмах регенерации тканей лёгких при сочетанной патологии метаболических нарушений и эмфиземы лёгких.

Приведён значительный массив оригинальных научных разработок, подтверждающих высокую эффективность новых и известных фармакологически активных соединений в условиях экспериментальной эмфиземы лёгких, в том числе, при её сочетании с метаболическими нарушениями. Предложен новый подход ускорения восстановления эндотелиальных и эпителиальных клеток при эмфиземе лёгких у животных, основанный на блокаде дофаминовых  $D_2$ -рецепторов. Пегилированный аналог глюкагоноподобного пептида 1 представлен как средство гендерного выбора лечения сочетанной патологии МС и ХОБЛ и стимуляции регенерации микрососудистой сети. Патогенетически обоснована необходимость нарушения симпатического звена регуляции воспаления в целях коррекции эмфиземы и процесса регенерации. В качестве противовоспалительного агента с высокой регенеративной активностью представлена новая молекула – бисамидная производная дикарбоновой кислоты, которая предлагается как перспективное соединение для разработки на её основе новых лекарственных средств для лечения эмфиземы и ХОБЛ.

Положения и выводы части монографии, в которой представлены собственные результаты исследования, были использованы нами в качестве теоретической основы для выявления новых информативных биомаркеров диагностики, прогнозирования и возникновения осложнений ХОБЛ и эмфиземы лёгких.

## Глава 1.

# ХРОНИЧЕСКАЯ ОБСТРУКТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ ЛЁГКИХ И ЭМФИЗЕМА

### 1.1. Этиология и эпидемиология

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) – это группа респираторных заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением лёгких, возникающим вследствие действия различных повреждающих факторов, разрушением лёгочной паренхимы, формированием эмфиземы, стойким ограничением скорости воздушного потока в дыхательных путях и, как правило, носящим неуклонно прогрессирующий характер [Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease, 2014; Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р. и др., 2014; Chilosi, M. et al., 2012; From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2018; Biener A.I., Decker S.L. and Rohde F., 2019; Vogelmeier CF, et al., 2017]. Ограничение воздушного потока связано с хроническим воспалением дыхательных путей [Biaoxue R, et al., 2018]. В дополнение к прогрессирующему снижению функции лёгких ХОБЛ часто ассоциируется с различными системными проявлениями [Huertas, A. & Palange, P., 2011], в частности, с потерей мышечной массы и силы у пациентов, частично обусловленные системным воспалением и малоподвижным образом жизни [Wust, R. C. & Degens, H., 2007; Gosselink, R., Troosters, T. & Decramer, M., 2000] и являющиеся предикторами смертности у больных ХОБЛ [Swallow, E. B. et al., 2007].

В клинике ХОБЛ может быть дополнительно разделена на подтипы в соответствии с фенотипами [Kovacs, G. et al., 2018]. Среди них особое внимание приковано к острому обострению ХОБЛ (*анг.* acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, АЕСОРD). АЕСОРD характеризуется острым обострением респираторных симптомов, требующим неотложного лечения [Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007]. Основные симптомы АЕСОРD включают повышенную одышку, частый кашель и хрипы, а также увеличение объёма мокроты и гнойность [Anthonisen NR, et al., 1987]. АЕСОРD может быть вызван рядом факторов, включая бактериальную или вирусную инфекцию, загрязнители окружающей среды, холодную погоду и прерывание регулярного лечения [Murtagh E, Heaney L, Gingles J, et al., 2005; Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al., 2007]. АЕСОРD ассоциируется с временной или постоянной потерей функции лёгких и быстрым снижением физической работоспособности и качества жизни, что приводит к госпитализации или иногда к смерти [Kim V, Aaron SD., 2018]. Каждое острое обострение ХОБЛ усугубляет лёгочную функцию и осложнения пациентов, а также увеличивает риск повторной госпитализации [Rabe, K. F. et al., 2007].

В настоящее время диагностика АЕСОРD опирается исключительно на клиническую картину пациента, что затрудняется сложностью и неоднородностью течения заболевания. Несколько исследований оценили характеристики АЕСОРD. Традиционный подход заключается в использовании клинического фенотипа для классификации пациентов на группы на основе сходных клинических симптомов, прогноза и ответа на лечение. Например, испанские рекомендации по ХОБЛ (GesPOC) определяют различные клинические фенотипы следующим образом: фенотип без обострения с хроническим бронхитом или эмфиземой; синдром перекрытия астмы и ХОБЛ; фенотип частого обострения с эмфиземой [Trigueros Carrero JA., 2013]. Однако этот метод классификации ХОБЛ ограничен перекрытием фенотипов и возможностью существования различных биологических механизмов заболевания в пределах одной и той же фенотипической группы.

ХОБЛ и тем более АЕСОРD имеют не только серьёзные клинические, но и социально-экономические последствия [Ko, F.W. et al., 2016]. Экономические расходы на одного больного, связанные с лечением ХОБЛ, в три раза выше, чем на одного больного с бронхиальной астмой. Наибольший экономический ущерб приносит лечение обострений ХОБЛ. В Европейском союзе затраты на лечение пациентов с ХОБЛ составляют около 38,6 млрд евро, в США этот показатель составляет примерно 29,5 млрд долларов [ред. А.Г. Чучалин, 2008]. В России экономическое бремя ХОБЛ составляет 24,1 млрд рублей [Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза, 2010]. На настоящий день достигнут прогресс в лечении симптомов и профилактике острых обострений ХОБЛ, но достижения в лечении и препятствовании прогрессирования заболевания незначительные.

Однако определение точного распространения и ущерба, наносимого этим респираторным заболеванием и его осложнений затруднено вследствие отсутствия точных сведений по эпидемиологии, а также малочисленностью исследований и ограниченным пониманием патогенеза ХОБЛ [Игнатъев В.А., Титова О.Н., Гульяева О.И., 2007]. В эпидемиологических исследованиях оценка распространённости ХОБЛ часто основана на диагнозе, поставленном при врачебном осмотре или экспертном мнении. Точность и адекватность оценки распространённости ХОБЛ в популяции в первую очередь определяется тем, какие методы были выбраны в качестве диагностических критериев. Наиболее низкое значение распространённости ХОБЛ регистрируется при врачебной диагностике (5,2% в общей популяции), наиболее высокое – при диагностике, основанной на данных рентгенологического и физикального обследования (13,7%) [Mannino, D.M. et al., 2002]. Распространённым методом оценки ХОБЛ в популяции служит спирометрия, которая используется в качестве диагностического критерия исходя из положения глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни лёгких (Global initiative for chronic

lung disease – GOLD) о необходимости применения спирометрии при постановке диагноза ХОБЛ. К примеру, в одном отчёте определённая спирометрией общая распространённость ХОБЛ в Китае составила 8,6% [Wang C, Xu J, Yang L, et al., 2018]. Однако есть мнение, что ХОБЛ имеет гораздо большую распространённость, чем указано в официальных источниках, не только в Китае, но и в других странах.

По статистике ХОБЛ чаще всего поражает наиболее трудоспособную часть населения: начиная с возраста 29-39 лет и до 60 лет. Данные глобального исследования BOLD (*анг.* Burden of Obstructive Lung Disease) свидетельствуют, что распространённость ХОБЛ среди лиц старше 40 лет составляет более 10%. Отмечена зависимость заболевания от пола и возраста. Результаты BOLD свидетельствуют, что распространённость ХОБЛ II стадии и выше среди лиц старше 40 лет составила  $10,1 \pm 4,8\%$ , при этом данный параметр у мужчин составил  $11,8 \pm 7,9\%$ , у женщин –  $8,5 \pm 5,8\%$ . Основной причиной смерти пациентов ХОБЛ является прогрессирование основного заболевания: около 50-80% больных умирают от респираторных причин, от 8,5 до 27% больных – от опухолей лёгких, остальные – от других респираторных заболеваний [Kessler, R. et al., 2016].

Исследование летальных случаев в промежутке между 1990 и 2010 годами показало, что смертность от ХОБЛ составляет 2,9 миллиона человек в год [Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Murray C.J., 2012; Roche N., Laurendeau C., Raheison C., Fuhrman C., Burgel P.-R., 2016]. В 2007 г. ХОБЛ являлась четвёртой ведущей причиной смерти в мире [Buist, A. S. et al., 2007]. В 2010 году ХОБЛ затрагивала 329 миллионов человек во всём мире, что составляет около 5% мирового населения [Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al., 2012]. В 2012 г. погибло более 3 миллионов человек, что составило 6% от общего числа смертей во всём мире [Lozano R., Naghavi M., Foreman K. et al., 2012]. Заболеваемость постоянно увеличивается из-за постоянного воздействия факторов риска ХОБЛ и старения населения [Kessler, R. et al., 2014]. На 2016 г. смертность от ХОБЛ не уменьшилась по отношению к 2012 г. [Hattab Y, Alhassan S, Balaan M, Lega M, Singh AC., 2016]. Было спрогнозировано, что ХОБЛ станет третьей ведущей причиной смертности во всём мире к 2030 году [Decramer M, Janssens W, Miravittles M., 2012]. Однако, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), уже сейчас (2021 г.) ХОБЛ занимает 3-е место в рейтинге причин смерти от всех заболеваний [World Health Organization. The top 10 causes of death. 24 May 2018. <http://.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, (accessed 2020-5-3)].

Распространённость и смертность вследствие ХОБЛ сильно различается в разных странах [Игнатъев В.А., Титова О.Н., Гультьева О.И., 2007]. К примеру, в Чили число больных ХОБЛ очень высоко и превышает 20% от всего населения, в Мексике, напротив, количество больных не превышает 6% [Российское респираторное общество, 2014]. Причинами такой вариации

бельности могут служить различия в образе жизни людей и интенсивность контакта с разнообразными повреждающими лёгкие агентами. Последние исследования показывают, что распространённость ХОБЛ в Китае составляет 13,6% для людей старше 40 лет, 8,1% для женщин и 19,0% для мужчин. Эпидемиологические исследования, проведённые в 12 регионах Российской Федерации в 2014 году, показали среднюю распространённость ХОБЛ в 15,3 % [Chuchalin A.G., Khaltayev N., Antonov N.S. et al., 2014], в то время как более поздние исследования показали распространённость ХОБЛ в России от 6,8% до 21% в зависимости от региона [Andreeva E., Pokhaznikova M., Lebedev A. et al., 2016].

Этиология ХОБЛ до конца не выяснена. Развитие и прогрессирование заболевания связывают с рядом эндогенных факторов и воздействием окружающей среды. Наиболее вероятными причинами развития ХОБЛ выступают генетическая предрасположенность, пол, ингаляционные воздействия токсических веществ, социально-экономический статус, бактериальные и вирусные инфекции, такие заболевания, как бронхиальная астма и бронхиальная гиперреактивность.

**Курение.** Курение сигарет рассматривается как основной элемент риска многих заболеваний, особенно сердечно-сосудистых и лёгочных заболеваний [Mons U, Muezzinler A, Gellert C, et al., 2015]. Курение считается одним из ключевых факторов развития ХОБЛ [ред. А.Г. Чучалин, 2008; MacNee W., 2006; E. Bradford, S Jacobson, J Varasteh, et al., 2017]. В индустриальных странах курение вносит вклад в смертность около 60% женщин и 80% мужчин, в развивающихся странах эти цифры немного меньше: у 45% мужчин и у 20% женщин [Eisner M.D., Anthonisen N., Coultas D. et al., 2010; Lamprecht B., McBurnie M.A., Vollmer W.M., et al, 2011]. Для курильщиков характерен дозозависимый риск развития ХОБЛ. Возраст, в котором начато курение, общее количество пачек-лет и текущий статус курения являются прогностическими показателями смертности от ХОБЛ. Однако заболевание развивается не у всех курильщиков, что позволяет предположить влияние генетических факторов на величину риска у каждого конкретного человека. Действие табачного дыма на лёгкие курильщиков активизирует множество процессов. К примеру, происходит выброс протеолитических ферментов, мобилизуются нейтрофилы и макрофаги, развивается оксидативный стресс и ингибируется  $\alpha_1$ -антитрипсин в лёгочной ткани, нарушается баланс между протеиназами и ингибиторами протеиназ, что приводит к разрушению межклеточного матрикса и развитию эмфиземы [MacNee W., 2006]. Кроме табачного дыма в лёгкие поступает огромное количество других вредных веществ. У постоянных курильщиков развивается хронический бронхит и гиперсекреция слизи, что приводит к обструкции бронхиальных путей [Guerra S., Sherrill D.L., Venker C. et al. 2009; Allinson J.P., Hardy R., Donaldson G.C. et al., 2016].

**Половые различия в развитии ХОБЛ.** По сравнению с мужчинами, женщины более восприимчивы к табачному дыму. При эквивалентном потреблении сигарет осложнения у женщин более серьёзные, чем у мужчин [Lopez Varela M.V., Montes de Oca M., Halbert. R.J et al., 2010; Silverman E.K., Weiss S.T., Drazen J.M. et al., 2000]. Это клиническое наблюдение позднее было подтверждено на животных моделях эмфиземы лёгких, индуцированной табачным дымом [Tam A., Churg A., Wright J.L. et al., 2016]. Считается доказанным, что пассивное курение выступает фактором риска развития ХОБЛ [Yin P., Jiang C.Q., Cheng K.K. et al., 2007]. Активное и пассивное курение женщин во время беременности негативно сказывается на развитии лёгких плода [Tager I.B., Ngo L., Hanrahan J.P., 1995].

**Инфекции лёгких.** Затяжные инфекционные заболевания лёгких могут самостоятельно приводить к развитию и прогрессированию ХОБЛ [De Marco R., Accordini S., Marcon A. et al., 2011; From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2019. Available from: <http://goldcopd.org>. Accessed December 11, 2018]. Перенесенная в детстве тяжёлая респираторная инфекция может приводить к снижению функции лёгких и более частым респираторным симптомам в зрелом возрасте. Опубликованы данные о том, что ВИЧ-инфицированные пациенты склонны к инфекциям верхних дыхательных путей, которые характеризуются хроническим течением [Drummond M.B., Kirk G.D. 2014], это обуславливает более раннее формирование эмфиземы, связанной с курением, чем у курящих пациентов без ВИЧ [ред. А.Г. Чучалин, 2008]. Туберкулез также идентифицирован как самостоятельный фактор развития ХОБЛ [Byrne A.L., Marais B.J., Mitnick C.D. et al., 2015].

**Генетическая предрасположенность.** Помимо того, что курение является распространённой причиной ХОБЛ, значительную роль в развитии заболевания играют гены [Decramer M., Janssens W, Miravittles M., 2012].

Наиболее изученным генетическим фактором развития ХОБЛ является тяжёлый наследственный дефицит альфа1-антитрипсина [Stoller J.K., Aboussouan L.S., 2005]. Альфа1-антитрипсин (серпин, ААТ) относится к семейству сериновых протеаз. Главной функцией ААТ является инактивация протеаз, в том числе, секретлируемых лейкоцитами во время воспалительных реакций [Carrell R.W., Lomas D.A., Sidhar S., Foreman R., 1996]. Эластаза является довольно агрессивным ферментом для лёгочной ткани. В норме эластаза – это элемент неспецифической защиты организма, она депонируется в азурофильных гранулах нейтрофилов, из которых выбрасывается эластаза. При нормальном содержании ААТ длительность действия эластазы на лёгочную ткань не превышает 20 миллисекунд. Однако при дефиците ААТ влияние эластазы может превышать даже 80 миллисекунд, что



неизбежно приводит к деструкции эластических волокон лёгких. В результате эластичные волокна замещаются соединительной тканью, лёгкие теряют свою эластичность, развивается обструкция и формируются эмфизематозные расширения [Knight K.R., Burdon J. G., Cook L. et al., 1997; Campbell E.J., Campbell M.A., Boukedes S.S., Owen C.A, 1999; Silverman E.K., Mosley J.D. et al., 2002]. Существуют и другие генетические мутации, предрасполагающие к развитию ХОБЛ: дефекты трансмембранного регулятора муковисцидоза, витамин D-связанного протеина,  $\alpha 2$ -микроглобулина, цитохрома P450 A1, антигенов группы крови, локуса человеческого лейкоцитарного антигена, иммуноглобулиновая недостаточность.

Проведено много исследований, которые позволили предположить, что такие гены, как CTFR, TP53, ADAM17, ABCB1, SERPINE1 вовлечены в возникновение и развитие различных заболеваний лёгких, в том числе ХОБЛ [Fernandez Fernandez E, De Santi C, De Rose V, Greene CM., 2018; Siganaki M, Koutsopoulos AV, Neofytou E, Vlachaki E, Psarrou M, Soultziz N, et al., 2010; Stolarczyk M, Scholte BJ., 2018; Wang XW, Zhang YL, Xiong Y, 2015; Xu X, Wang H, Li H, Cui X, Zhang H., 2016]. В настоящее время нет подробного отчёта о ХОБЛ и Locus105375199, но известные результаты исследований предполагают участие Locus105375199 в возникновение ХОБЛ. В этой связи необходимо изучать взаимосвязь между полиморфизмом Locus105375199 и риском развития ХОБЛ, что может обеспечить разработку новых перспективных подходов профилактики, скрининга и лечения ХОБЛ.

MIR4300HG представляет собой некодирующую РНК, расположенную на хромосоме 11 человека. Сообщения о MIR4300HG в основном связаны с заболеваниями позвоночника [Ogura Y, Kou I, Takahashi Y, Takeda K, Minami S, Kawakami N, et al., 2017]. Ряд исследований показал, что многие гены на хромосоме 11 связаны с ХОБЛ. T Ishii et al. выявлено, что полиморфизм гена глутатион S-трансферазы P1 (GSTP1), расположенного на 11-й хромосоме, связан с ХОБЛ [Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, et al., 1999]. Paul Stoll et al. установлено, что пациенты с ХОБЛ имели высокий уровень BDNF в сыворотке крови, который кодируется геном BDNF на хромосоме 11 [Stoll P, Wuertemberger U, Bratke K, Zingler C, Virchow JC, Lommatzsch M., 2012]. Многочисленные исследования показали, что цитокин IL18, расположенный на хромосоме 11, играет важную роль в воспалении ХОБЛ [De Falco G, Colarusso C, Terlizzi M, Popolo A, Pecoraro M, Commodo M, et al., 2017; Dima E, Koltzida O, Katsaounou P, Vakali S, Koutsoukou A, Koulouris NG, et al., 2015; Sayan M, Mossman BT, 2016]. Эти публикации позволили группе исследователей под руководством Dan Xu (исследования закончены в 2021 г. на базе The COPD Laboratory of Clinical Research Base; The Clinical Research Base Laboratory, Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region; Department of Comprehensive Internal Medicine, the Eighth People's Hospital

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

of Xinjiang Uygur Autonomous Region; Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region; The COPD Laboratory of Clinical Research Base, the Eighth People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region) провели исследование случай-контроль ассоциации между генетическими полиморфизмами Locus 105375199/MIR4300HG и восприимчивостью к ХОБЛ. Действительно, Dan Xu et al. (2021) показали потенциальную связь между вариантами rs78750958, rs4719841 и rs7934083 и предрасположенностью к ХОБЛ в китайской популяции провинции Хань.

**Профессиональные вредности.** Профессиональные вредности являются причиной развития нарушений функции лёгких, характерных для ХОБЛ, в 10–20% случаев. ХОБЛ может быть вызвана длительным воздействием пыли неорганического и смешанного происхождения (угольной, кремниевой пыли, растительной пыли), кадмиевого дыма и химических агентов [О.С. Васильева и др., 2013; Mehta A.J., Miedinger D., Keidel D. et al., 2012]. При сжигании биологических остатков в плохо вентилируемых помещениях отмечается аналогичная картина [Orozco-Levi M., Garcia-Aymerich J., Villar J. et al., 2006]. Наиболее часто ХОБЛ развивается у работников сельского хозяйства, где воздействие пылевых факторов наиболее агрессивно [A. Guillien, M. Puugaveau, T. Soumagne et al., 2016]. На развитие болезни и тяжесть оказывают прямое влияние стаж работы, характер пыли и её концентрация во вдыхаемом воздухе.

Увеличение числа пациентов с заболеваниями органов дыхания может быть связано с ростом уровня загрязнения атмосферного воздуха [пер. с англ. под ред. А.С. Белевского, 2014]. Роль данного фактора в развитии ХОБЛ до конца не ясна, и, по-видимому, невелика по сравнению с воздействием сигаретного дыма. Трудно также оценить влияние отдельных поллютантов при длительном воздействии атмосферного загрязнения.

**Бронхиальная астма и бронхиальная гиперреактивность.** Бронхиальная астма вносит большой вклад в развитие ХОБЛ. Исследование, проведённое в США, показало увеличение в 12 раз риска развития ХОБЛ у пациентов с астмой, чем у пациентов без астмы [Silva G.E., Sherrill D.L., Guerra S., Varbee R.A., 2004].

В других исследованиях обнаружено нарушение функции лёгких у детей, болеющих бронхиальной астмой [McGeachie M.J., Yates K.P., Zhou X. et al., 2016]. Это указывает на необходимость более внимательно относиться к этому фактору риска в свете контроля ХОБЛ у детей.

В отсутствие диагноза «бронхиальная астма» гиперреактивность бронхиальных путей может быть самостоятельным фактором развития ХОБЛ и снижения качества жизни у пациентов [Hospers J.J., Postma D.S., Rijcken B., Weiss S.T., Schouten J.P., 2000].

**Социально-экономический статус.** Имеются данные, что риск развития ХОБЛ находится в обратной зависимости от социально-экономического статуса [пер. с англ. под ред. А.С. Белевского, 2014]. Однако неясно, связано ли это с воздействием загрязнения воздуха внутри помещений и атмосферного воздуха, скученностью людей, плохим питанием либо с другими факторами, которые определяются низким социально-экономическим статусом [ред. А.Г. Чучалин, 2008].

## 1.2. Патогенез

По современным представлениям патогенез ХОБЛ представляет собой сложный многофакторный процесс. Патоморфологические изменения в лёгких при ХОБЛ сочетают эмфизему лёгких, воспаление и фиброз, образование рубцов, гипертрофия гладкой мускулатуры, окружающей мелкие дыхательные пути, гиперсекреция слизи, нарушения микроциркуляции и структуры эндотелия. Все эти изменения оказывают негативное действие на большие и малые бронхи и паренхиму лёгких (альвеолы), приводят к уменьшению эластичности лёгочной ткани и спаданию малых бронхов во время экспирации [Barnes P.J., Shapiro S.D., Pauwels R.A., 2003].

Структурные изменения в лёгких при ХОБЛ обусловлены воздействием факторов внешней среды и хроническим воспалением, генетической предрасположенностью, оксидативным стрессом, повышением активности протеиназ [MacNee, W., 2006].

### 1.2.1. Генетическая предрасположенность и эпигенетические факторы

Согласно ранним публикациям (2006 г.), примерно у 10-15% курильщиков развивается ХОБЛ, но поскольку на ранних стадиях заболевание у курящих пациентов может протекать бессимптомно, то курение и его стаж недооценивается в клинической практике [Rennard, S.I. et al., 2006]. С другой стороны, есть понимание, что у пациентов со сходным стажем курения ХОБЛ может проявиться или нет. В этой связи актуальны исследования, направленные на поиск генетических факторов ХОБЛ. Одним из первых выявленных генов, связанных с развитием болезни, был ген, кодирующий  $\alpha 1$ -антитрипсин.

Дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТД) представляет собой аутосомно-доминантное генетическое заболевание, характеризующееся низким уровнем циркулирующего белка альфа-1 антитрипсина (ААТ). ААТ является ингибитором сериновой протеиназы, синтезируется и секретируется главным образом гепатоцитами, а также иммунными и другими клетками [Stockley R.A., 2014]. Из крови путём диффузии ААТ проникает в ткани, включая лёгкие, где связывает и ингибирует протеиназы, включая нейтро-

фильную эластазу (NE), катепсин G и протеиназу 3, проявляет противовоспалительные свойства [Bergin DA, Hurley K, McElvaney NG., 2012]. Низкие уровни ААТ приводят к повышенной вероятности развития эмфиземы, особенно в раннем возрасте (30–40 лет), с другой стороны, накопленный в гепатоцитах белок может привести к заболеванию печени [Stockley RA., 2014]. У курящих людей с гомозиготной мутацией данного гена тяжёлая степень ХОБЛ развивается очень быстро. Из всех больных ХОБЛ 1–2% имеют генетически опосредованный дефицит  $\alpha$ 1-антитрипсина.

ААТД вызывается генетической мутацией гена SERPINA1, кодирующего белок ААТ, и приводит к низкому циркулирующему уровню белка ААТ в варианте ZZ. По официальным данным от ААТД во всём мире страдают 3,4 миллиона человек [Stoller JK, Aboussouan LS., 2012; Blanco I, et al., 2020]. Зарегистрированы более 120 мутаций в гене SERPINA1. Наиболее распространёнными являются мутации S и Z, которые затрагивают 1,4 миллиона и 250 тысяч человек во всём мире соответственно [Society AT, Society ER., 2003]. Эти мутации приводят к неправильному свертыванию ААТ. В случае варианта SS около 40% белка сохраняется в гепатоцитах, но его уровень в плазме крови снижается, не оказывая при этом влияние на восприимчивость к заболеваниям печени или лёгких [Tan L, et al., 2014].

Мутация Z встречается более чем у 95% диагностированных пациентов с ААТД и вызывает неправильное свертывание и полимеризацию ААТ. Такой полимер не обладает соответствующей активностью к нейтрофильной эластазе и накапливается в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) клеток. 85% неправильно свёрнутого и полимеризованного белка удерживается в гепатоцитах и только его небольшая часть деградирует в ЭР, в то время как оставшиеся 15% секретируются в сыворотку в виде мономеров. Удерживание «патологического» белка в ЭР вызывает повреждение клеток через стресс ЭР, что приводит прежде к заболеванию печени, и, в конечном итоге, к заболеванию лёгких из-за недостаточности циркулирующего ААТ [Stockley RA., 2014; Naq I, et al., 2016].

Изучение ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками ХОБЛ (англ. genome-wide association studies, GWAS) выявило следующие локусы, имеющие общегеномное значение для развития ХОБЛ: FAM13A на 4q22, у восходящего энхансера ННП на 4q31, IREB2 и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (CHRNA3 и CHRNA5) 15q25, локус 19q13 с генами RAB4B, EGLN2 и CYP2A6, RIN3 14q32, MMP12 11q22 и TGFB2 1q41 [Hobbs B.D., Hersh C.P., 2014; Yu X.L., Zhang J., Zhao F. et al., 2014; Castaldi P.J., Cho M.H., Zhou X. et al., 2015]. Метаанализ выявил связь шести локусов в гене дезинтегрина и MMP33 (ADAM33) с риском развития ХОБЛ [Zhou D.C., Zhou C.F., Toloo S. et al., 2015]. Существуют другие гены, связанные с развитием ХОБЛ. Это гены, кодирующие матриксную металлопротеиназу 9 (MMP9), гены окислительного стресса (EPHX1, HMOX1, GSTP1), гены, участвующие в иммунном ответе (TNF- $\alpha$ , GC) [Wan, E.S. et al., 2009]. Аномалии указанных генов повышают риск возникновения ХОБЛ.

В одном из популяционных исследований генетический анализ показал, что ИЛ-1 $\beta$  и полиморфизмы IL1RN (VNTR) связаны с риском ХОБЛ у жителей Восточной Азии [Xie Z., Huang Q., Huang J., Xie Z., 2014], IREB2 (rs13180) связан с ХОБЛ в популяции жителей Китая [Guo Y., Gong Y., Pan C. et al., 2012], генотип ТТ гена MDR-1 значительно чаще встречается у пациентов с ХОБЛ из эгейской части Турции [Toru U., Ayada C., Genc O. et al., 2014].

Ezzie M.E. и соавторы провели скрининг образцов лёгких у курильщиков с ХОБЛ и без ХОБЛ для профилей микроРНК [Ezzie M.E., Crawford M., Cho J.-H., et al., 2012]. Они обнаружили 70 микроРНК, экспрессированных при ХОБЛ, и предложили несколько членов семейства miR15/107, которые заслуживают дальнейшего изучения в регуляции передачи сигналов TGF- $\beta$  при ХОБЛ. Метилирование ДНК также является важным регулятором транскрипции генов, который сильно изменяется под воздействием факторов окружающей среды. В крупномасштабном геноспецифическом исследовании меток метилирования ДНК, которые ассоциируются с ХОБЛ, Qiu W. и соавторы идентифицировали уже известные гены (например, SERPINA1) и выявили новых кандидатов в биомаркеры-гены (такие как FUT7) [Qiu W., Vaccarelli A., Carey V.J. et al., 2012].

Кроме генетической предрасположенности эпигенетические изменения оказывают влияние на развитие ХОБЛ. Исследования в данном направлении являются относительно новыми. Между тем уже существуют факты, подтверждающие участие эпигенетических изменений в ХОБЛ. Так, ацетилирование гистонов приводит к усилению транскрипции генов, в свою очередь ацетилирование контролируется ферментом гистон-деацетилазой, удаляющим ацетильные группы. С увеличением степени тяжести заболевания происходит снижение активности гистон-деацетилазы и, как следствие, увеличение ацетилированных гистонов в клетках лёгких больных ХОБЛ [Ito, K. et al, 2005]. Увеличение ацетилирования и транскрипционной активности может приводить к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов. У больных ХОБЛ одновременно с повышением ацетилирования наблюдается повышение экспрессии гена IL-8 [Ito, K. et al., 2005]. Эти данные клинических наблюдений подтверждаются исследованиями на животных: у крыс, подвергнутых воздействию сигаретного дыма, наблюдалось снижение активности гистон-деацетилазы и усиление связывания транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [Marwick, J.A. et al., 2004]. Считается, что после воздействия сигаретным дымом активность гистон-деацетилазы снижается за счёт убиквитинирования и деградации [Adenuga, D., 2009].

Курение способно приводить к эпигенетическим изменениям в бронхиальном эпителии опосредовано через эпигенетические механизмы оказывать воздействие на воспалительные процессы в дыхательных путях [Belinsky, S.A. et al., 2002]. Можно предположить, что регуляция эпигенетических механизмов способна оказать терапевтическое действие при ХОБЛ.

В настоящее время выявлено 349 CpG сайтов, которые связаны с различной тяжестью ХОБЛ и снижением лёгочных функций [Qiu, W. et al., 2012]. Сигаретный дым в малых бронхах и бронхиальных эпителиальных клетках способен воздействовать на различные CpG сайты ДНК, приводя к гипо- или гиперметилированию. Обнаружена корреляция между курением и увеличением метилирования промотора белка p16 и репрессора рецептора AhR. Сигаретный дым вызывает изменение метилирования ядерного фактора NRF2 и связанного с G-белком рецептора 15 в клетках мелких бронхов и лейкоцитах периферической крови. Локус cg03636183, расположенный в гене F2RL2, имеет более низкое метилирование у курильщиков. У больных ХОБЛ ген  $\alpha$ 1-антитрипсина (A1AT) имеет низкий уровень метилирования [Schamberger, A.C. et al., 2014].

В сигаретном дыме содержится около 1017 молекул окислителей, активных форм кислорода и азота [MacNee, W. et al., 2000]. Больные ХОБЛ имеют повышенный уровень выдыхаемых  $H_2O_2$ , 8-изопростана и NO. Дополнительно наблюдается снижение антиоксидантов и увеличение количества окислительных липидов и белков в плазме крови и тканях пациентов [MacNee, W. et al., 2005]. Эти молекулы выступают косвенными маркерами окислительного стресса.

### **1.2.2. Воспаление**

**Макрофаги.** Воспалительный процесс является врождённым защитным ответом иммунной системы, обеспечивающей первичную защиту организма при длительном вдыхании различных токсичных газов или частиц. В воспалительном процессе при ХОБЛ задействованы различные клетки воспаления. Первой линией защиты являются система мукоцилиарного клиренса и макрофаги, которые осуществляют очистку нижних дыхательных путей от инородных частиц. При ХОБЛ оба этих механизма в значительной мере являются ослабленными. Второй линией защиты служит экссудация плазмы и циркулирующих клеток в большие и малые бронхи, данный процесс контролируется множеством провоспалительных цитокинов [MacNee, W., 2006]. До сих пор сохраняется ограниченное понимание роли и взаимосвязей между различными популяциями клеток воспаления при ХОБЛ.

Как известно, макрофаги поддерживают тканевой гомеостаз, регулируют ангиогенез, участвуют в воспалительном ответе [Wynn T.A. et al., 2013]. У больных ХОБЛ наблюдается увеличение макрофагов в дыхательных путях, паренхиме лёгких, бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и мокроте в 5–10 раз [Shapiro S.D., 1999]. Клинические исследования показали 25-кратное увеличение числа макрофагов в тканях и альвеолярном пространстве больных ХОБЛ по сравнению с курящими людьми, не страдающими ХОБЛ [Retamales, I. et al., 2001]. У больных ХОБЛ макрофаги чаще всего локали-

зуются на участках разрушения альвеолярных стенок [Finkelstein, R. et al., 1995]. Содержание макрофагов в дыхательных путях коррелирует с тяжестью ХОБЛ [Di Stefano A., Capelli A., Lusuardi M. et al., 1998].

Активация альвеолярных макрофагов при ХОБЛ происходит напрямую через Toll подобные рецепторы 2, 4, 9 типов или опосредованно через фрагменты апоптотических или некротизированных клеток [Pappas, K. et al., 2013]. В ответ на воздействие сигаретного дыма макрофаги секретируют цитокины (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , лейкотриен B4 (LTB4)), MMP-2, 9, 12 (*анг.* Matrix metalloproteinases, матриксные металлопротеиназы), активные формы кислорода (*анг.* Reactive oxygen species, ROS), катепсины K, L, S и ранее поглощённую нейтрофильную эластазу [Russell, R.E.K. et al., 2002; Bagdonas E., Raudoniute J., Bruzauskaite I., Aldonyte R., 2015; Punturieri A., Filippov S., Allen E. et al., 2000; Russell R.E.K., Thorley A., Culpitt S.V. et al., 2002]. Высвобождение трансформирующего ростового фактора и фактора роста соединительной ткани стимулирует пролиферацию фибробластов и развитие фиброза. Активированные макрофаги способствуют распространению воспаления, высвобождая ряд хемоаттрактантов: фактор некроза опухоли  $\alpha$ , IL-8, СХС-хемокины, MCP-1, LTB4 и многие другие [Barnes P.J., Shapiro S.D., Pauwels R.A., 2003] и индуцируют окислительный стресс, стимулируя апоптоз эндотелиальных и эпителиальных клеток [Pappas, K. et al., 2013].

Синтез большинства воспалительных белков макрофагов регулируется ядерным фактором транскрипции  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B активируется в альвеолярных макрофагах у больных ХОБЛ, и особенно значительно во время обострений [Di Stefano, A. et al., 2002].

Кортикостероиды ингибируют *in vitro* высвобождение IL-8, TNF- $\alpha$  и MMP-9 макрофагами БАЛ у здоровых курящих и не курящих людей. Однако у больных ХОБЛ кортикостероиды малоэффективны в подавлении воспалительного процесса в лёгочной ткани [Culpitt, S.V. et al., 2003]. Причина устойчивости к кортикостероидам при ХОБЛ, вероятнее всего, кроется в снижении активности гистон-деацетилазы (HDAC), которая взаимодействует с активными провоспалительными генами под воздействием глюкокортикоидных рецепторов. Снижение активности HDAC в макрофагах коррелирует с повышенной секрецией цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-8 и снижением реакции на кортикостероиды [Ito, K. et al., 2001].

**Нейтрофилы.** Немаловажную роль в патогенезе ХОБЛ играют нейтрофилы. В мокроте и бронхоальвеолярном лаваже больных ХОБЛ обнаружено значительное увеличение числа нейтрофилов [Baraldo, S. et al., 2004]. Миграция нейтрофилов из капиллярного русла в альвеолы регулируется рядом таких цитокинов, как ФНО- $\alpha$ , IL-1 и эндогенными хемоаттрактантами (LTB4, IL-8). Интегрины семейства  $\beta$ 2 регулируют трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов [Bagdonas E., Raudoniute J., Bruzauskaite I., Aldonyte R., 2015]. В дыхательных путях и лёгочной паренхиме эта

популяция клеток возрастала незначительно. Такое распределение нейтрофилов объясняется их быстрой миграцией через дыхательные пути и лёгочную паренхиму.

Нейтрофилы выделяют сериновые протеазы, такие, как нейтрофильная эластаза, катепсин G, протеиназа-3, а также матриксные металлопротеиназы 8 и 9 [Finkelstein, R. et al., 1995]. Высвобождаемые нейтрофилами ферменты и катионные пептиды способны расщеплять коллаген на фрагменты, что вызывает деструкцию эластического матрикса лёгких [Bagdonas E., Raudoniute J., Bruzauskaite I., Aldonyte R., 2015]. В свою очередь, продукты распада коллагена и эластина активируют клетки воспаления и запускают процесс хронического воспаления [Overbeek S.A., Braber S., Koelink P.J. et al., 2013]. Такие медиаторы, как IL-8, CXCL-2 и LTB<sub>4</sub>, концентрация которых повышается в силу повреждения эпителия и эндотелия, дополнительно привлекают нейтрофилы в очаг воспаления [Kobayashi S.D., DeLeo F.R., 2009; Kobayashi S.D., Voyich J.M. et al., 2005]. Подтверждение решающей роли нейтрофилов в смещении протеазного / антипротеазного баланса в сторону усиления протеолиза мы нашли в публикации, в которой показано, что нокаутные по гену нейтрофильной эластазы мыши частично защищены от развития ХОБЛ при воздействии сигаретным дымом на лёгкие [Shapiro, S.D. et al., 2003].

***Т-лимфоциты.*** На сегодняшний день роль Т-лимфоцитов в развитии ХОБЛ однозначно не определена. Как описано Cosio M.G. и соавт., у курильщиков с ХОБЛ увеличивается количество всех Т-клеточных фенотипов [Cosio M.G., Majo J., Cosio M.G., 2002]. У больных ХОБЛ средней тяжести общее количество Т-лимфоцитов увеличивается в паренхиме больших и малых бронхов. При тяжёлых формах Т-лимфоциты дополнительно располагаются в лимфоидных фолликулах, прилегающих к дыхательным путям [Hogg, J.C. et al., 2004]. Считается, что при ХОБЛ в результате разрушения межклеточного матрикса часть Т-клеток становится специфичной к эластину лёгких. Кроме этого распознавание антигенов приводит к сильному воспалению и экспрессии провоспалительных медиаторов [Zhao, M.Q. et al., 2000].

В эмфизематозно расширенной паренхиме лёгких курильщиков из всех Т-клеток наиболее повышается число CD8<sup>+</sup> Т-клеток [Majo J., Ghezzi H., Cosio M.G., 2001]. Экспрессирующие CD8 Т-клетки представляют собой подгруппу цитотоксических клеток, убивающих инфицированные или повреждённые клетки. При эмфиземе количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток коррелирует с тяжестью разрушения тканей, их накопление продолжается даже после прекращения курения [Wang J., Urbanowicz R.A. et al., 2013]. Результаты клинических и экспериментальных исследований позволяют сделать предположение, что развитие эмфиземы лёгких при ХОБЛ во многом опосредуется CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [Eppert, B.L. et al., 2013]. Одновре-



менно с CD8<sup>+</sup> Т-клетками в лёгких обнаруживается увеличение Т-клеток, экспрессирующих CD3 и CD4 [Majo J., Ghezzi H., Cosio M.G., 2001]. К примеру, Т-хелперные (CD4<sup>+</sup>) клетки (Th1 клетки) после активации высвобождают цитокины и регулируют активность других воспалительных клеток. Важность различных популяций Т-клеток в развитии эмфиземы была доказана на лабораторных животных. Так, Т-клетки от мышей, подвергшихся воздействию сигаретного дыма, после введения здоровым мышам, вызывали деструкцию лёгких, для этого требовалась совокупность CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток [Erpelt B.L., Wortham B.W. et al., 2013]. Цитокины Т-хелперных клеток (в том числе гамма-интерферон) участвуют в поддержании аутоиммунной реакции. Некоторые авторы относят эмфизему лёгких к заболеванию Th1-типа [Shirai T., Suda T. et al., 2010]. Таким образом, в развитии ХОБЛ возможен аутоиммунный механизм.

**Цитокины и хемокины.** При ХОБЛ цитокины и хемокины участвуют во множестве различных процессов, хоминг и активация макрофагов, нейтрофилов, Т-клеток, В-клеток и др. Также считается, что цитокины и хемокины участвуют в процессах ремоделирования дыхательных путей, гиперсекреции слизи и развитии эмфиземы лёгких. К числу многочисленных цитокинов и хемокинов, изменяющих свой уровень при ХОБЛ, относятся CCL1 / I-309, CCL2 / MCP-1, CCL3 / MIP-1 $\alpha$ , CCL4 / MIP-1 $\beta$ , CCL11 / эотаксин, XCL1 / GRO $\alpha$ , CXCL5 / ENA-78, CXCL8 / IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , IP-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$  и др. [Barnes, P.J. et al., 2004; Caramori G. et al., 2014]. Характеристика части цитокинов, принимающих участие в развитии ХОБЛ, представлена в таблице 1. Изменения концентраций цитокинов и хемокинов обнаруживаются в лёгочной ткани, мокроте и БАЛ. Изменения цитокинового баланса в лёгочной ткани коррелирует с тяжестью заболевания. Увеличение уровня цитокинов происходит за счёт ряда резидентных воспалительных клеток и эпителиальных клеток дыхательных путей [Chung, K.F. et al., 2008]. Роль других цитокинов также изменяется при ХОБЛ, однако их влияние ещё предстоит изучить. Эпителиальные клетки, подвергнутые действию сигаретного дыма, продуцируют TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , гранулоцитарно-макрофагальный колонии стимулирующий фактор (GMCSF), IL-8, моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP1) и LT $\beta$ 4 [Floreani, A.A. et al., 2003].

Исследования с использованием мышинных моделей показали, что нокаутные животные, у которых отключены гены цитокинов или их рецепторов, почти всегда демонстрировали меньшее развитие воспаления и эмфиземы лёгких, в то время как у животных с гиперэкспрессией провоспалительных медиаторов в лёгочной ткани развивалась эмфизема и воспаление [Sharipo, S.D. et al., 2003]. Таким образом, регуляция экспрессии генов цитокинов, возможно, один из подходов противовоспалительной терапии.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Табл. 1. Цитокины, принимающие участие в развитии ХОБЛ

Цитокины	Характеристика
ИЛ-1	Провоспалительный цитокин, продуцирующийся макрофагами, моноцитами и фибробластами. Стимулирует продукцию ММР-9 и нейтрофильных хемотаксических факторов альвеолярными макрофагами, индуцирует высвобождение интерферона- $\gamma$ , ФНО.
ИЛ-4	Продуцируется Th-клетками 2 типа, стимулирует пролиферацию фибробластов, способствует активации макрофагов.
ИЛ-6	Индуктор синтеза С-реактивного белка. В экспериментах стимулировал апоптоз альвеолярных клеток с последующим развитием эмфизематозных изменений.
ИЛ-8	Провоспалительный хемокин, синтезируемый эпителиальными, эндотелиальными клетками и макрофагами. Принимает участие в рекрутировании нейтрофилов.
ИЛ-17	Преимущественно продуцируется CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Индуцирует секрецию ряда хемокинов, таких, как CXCL1, CXCL8 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.
ИЛ-18	Продуцируется альвеолярными макрофагами и эпителиальными клетками дыхательных путей. Индуцирует высвобождение цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13) Th-клетками.
ФНО- $\alpha$ ,	Хемоаттрактант для нейтрофилов, регулирует экспрессию адгезивных молекул на эндотелиальных и эпителиальных клетках. Повышает экспрессию генов, ответственных за синтез цитокинов, хемокинов, молекул адгезии. Усиливает миграцию нейтрофилов, их адгезию, трансэндотелиальную и трансэпителиальную миграцию.

### 1.2.3. Нарушение баланса протеаз-антипротеаз

Наиболее полно изученным механизмом ХОБЛ является нарушение баланса между протеазами и антипротеазами. Дефицит альфа-1 антитрипсина является одной из наиболее важных причин ХОБЛ во всём мире, за исключением Восточной Азии, включая Японию. В здоровом лёгком протеолитические ферменты уравниваются антипротеазами. В 1964 г. эмфизема лёгких была впервые описана как заболевание, связанное с дефицитом антипротеаз [Laurell C.B., Eriksson S., 1964]. Как сообщалось ранее, сигаретный дым и другие повреждающие факторы профессиональной вредности (аэротоксины, инфекции, дым биомассы) привлекают в травмированные лёгкие нейтрофилы и макрофаги, которые производят и секретируют большое количество протеаз [Stockley R.A., 1999]. По такому механизму смещается баланс протеаз / антипротеаз в сторону протеолиза и создаётся протеолитическая среда, состоящая в основном из эластазы и металлопротеиназы ММР-12, катепсинов L и S, коллагеназы, ММР-2 и ММР-9 [Reilly J.J.J.,

Chen P., Sailor L.Z. et al., 1991; Shi G.P., Munger J.S., Meara J.P. et al., 1992; Churg A., Wang R.D., Tai H. et al., 2003; Molet S., Belleguic C., Lena H. et al., 2005; Atkinson J.J., Lutey B.A., Suzuki Y. et al., 2011; Barnes, P.J., 2003]. Кроме клеток воспаления протеазная активность повышается и у эпителиальных клеток лёгких [Cichy J, Potempa J, Travis J., 1997].

Образующиеся в результате протеолитической деградации фрагменты внеклеточного матрикса вовлечены в продукцию слизи и хоминг клеток воспаления в лёгочную ткань [Hautamaki R.D., Kobayashi D.K., Senior R.M. et al., 1997; Hunninghake G.W., Davidson J.M., Rennard S. et al., 1981]. Например, они активируют сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и усиливают выработку IL-8 путём активации NF- $\kappa$ B в фибробластах лёгких [Azghani A.O., Neal K., Idell S. et al., 2014].

В ответ на формирование протеолитической среды и снижения содержания эластина [Cosio M.G., Majo J., Cosio M.G., 2002] система антипротеиназ производит тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) и альфа-1-антитрипсин, являющийся ингибитором лейкоцитарной протеазы [Abboud R.T., Vimalanathan S., 2008]. Однако при длительном воздействии повреждающих факторов имеет место разрушение клеток, продуцирующих альфа-1-антитрипсин. В таких условиях эффективность системы антипротеаз значительно снижается и ХОБЛ прогрессирует.

Помимо лёгких в плазме крови и моче у пациентов с ХОБЛ уровень продуктов распада эластина более высок, чем у здоровых добровольцев [Harel S., Janoff A., Yu S.Y. et al., 1980; Schriver E.E., Davidson J.M., Sutcliffe M.C. et al., 1992]. В этой связи продукты распада эластина могут служить не только как белок острой фазы воспаления, но и биомаркером повреждения лёгких.

#### 1.2.4. Окислительный стресс

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе ХОБЛ. В конденсате выдыхаемого воздуха, мокроте и крови пациентов с ХОБЛ наблюдается повышенная экспрессия маркеров окислительного стресса [Singh, D. et al., 2019]. В частности, при заболевании наблюдается значительное увеличение продукции ROS. ROS продуцируются эпителиальными клетками дыхательных путей в ответ на карбонильный стресс, клетками гладкой мускулатуры – в ответ на воспаление [J.G. Yu, E.H. Zhang, A.J. Liu et al., 2013]. Увеличение концентрации ROS у курильщиков может быть связано с повышенным его образованием нейтрофилами и макрофагами. Сигаретный дым также является источником активных форм азота, которые способны вызывать нитрозативный стресс [Fischer, B.M. et al., 2014].

Повышение окислительной нагрузки при ХОБЛ вносит свой вклад в инактивацию антипротеаз. В частности, ингибирование  $\alpha$ 1-антитрипсина происходит за счёт окисления. Снижение концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина можно наблюдать в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), получен-

ной после воздействия сигаретного дыма [MacNee, W. et al., 2005]. Принято считать, что метаболиты оксидативного стресса индуцируют гиперплазию бронхиальных желез и гиперсекрецию слизи в клетках дыхательных путей, вызывают фиброз, апоптоз клеток альвеолярного эпителия и эндотелия [Domej W. et al., 2014]. Гибель клеток от окислительного стресса выступает важным звеном в развитии эмфиземы.

Под влиянием окислительного стресса происходит активация макрофагов, нейтрофилов, натуральных киллеров и усиливается опосредованное ими воспаление тканей [M. Pichavant, G. Rémy, S. Bekaert et al., 2014], увеличивается продукция многих провоспалительных цитокинов и хемокинов, в частности таких, как ядерный фактор NF-κB, IL-1, IL-8 [MacNee, W. et al., 2005]. Избыток ROS замедляет скорость разрешения воспаления, ускоряет процессы разрушения лёгочной ткани [L. Zuo, F. He, G.G. Sergakis et al., 2014].

Экстракт сигаретного дыма (*анг.* cigarette smoke extract, CSE) во многом усиливает окислительный стресс, что повышает экспрессию miR-21, которая индуцирует активацию ERK сигнального пути и экспрессию IL-8 в эпителиальных клетках бронхов человека [Pace, E. et al., 2019]. Выброс IL-8 в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ способствует инфильтрации, активации и повреждению тканей лёгких нейтрофилами [Pace, E. et al., 2010].

Благодаря реакции окисления окислительный стресс приводит к образованию конечных продуктов с улучшенным гликированием (*advanced glycation end products*, AGEs), который представлен классом ковалентно модифицированных белков, включающих сахар или продукты их распада [Vistoli, G. et al., 2013]. AGEs активирует иммунный ответ и участвует в патогенезе аутоиммунных заболеваний [Vistoli, G. et al., 2013]. Связываясь с AGE рецептором (RAGE), AGEs активирует этот сигнальный путь, что индуцирует повреждающие и провоспалительные эффекты [Oczurok, E.A., et al., 2017]. Считается, что AGEs является важным медиатором различных заболеваний легких, в том числе ХОБЛ.

RAGE представляет собой белок суперсемейства иммуноглобулинов и существует в двух основных формах: мембраносвязанный RAGE (mRAGE) и растворимый RAGE (sRAGE). mRAGE является трансмембранным рецептором, и при взаимодействии с AGEs активирует провоспалительный каскад через NF-κB [Tanaka, N., et al., 2000]. У пациентов с ХОБЛ, особенно в период обострения болезни (AECOPD) [Smith, D.J. et al., 2011], экспрессия растворимого sRAGE в крови снижается по сравнению со здоровыми добровольцами [Gopal, P. Ret al., 2014].

### **1.3. Лечение**

Российским респираторным обществом разработан комплекс рекомендаций по лечению ХОБЛ, включающих нефармакологические и фармакологические методы. В дополнительные группы можно выделить хирургические

методы лечения и клеточную терапию. Лечение ХОБЛ направлено на устранение симптомов болезни и повышение качества жизни пациента, профилактику возможных обострений и замедление прогресса болезни, уменьшение летальности [Российское респираторное общество, 2016].

### 1.3.1. Нефармакологические методы

**1. Прекращение курения.** Отказ от курения является одним из самых эффективных методов борьбы с ХОБЛ. Простой разговор с пациентом о вреде курения, психоэмоциональная поддержка родственников помогают достичь показателя отказа от курения у 20-30% пациентов [Pelkonen M., Notkola I.L., Tukiainen H. et al., 2001; Chandler M.A., Rennard S.I., 2010]. Дополнительно к прекращению курения можно добавить никотинозаместительную терапию, которая приводит к прекращению курения через 1 год уже у 35% пациентов с ХОБЛ [Anthonisen N.R., Connett J.E., Kiley J.P., 1994].

**2. Вакцинация.** У пациентов с ХОБЛ весьма тяжело протекают воспалительные заболевания лёгких. Вакцинация против гриппа и пневмококковой инфекции значительно снижает вероятность обострения ХОБЛ и риск заболеваемости инфекционными заболеваниями. Как следствие, это приводит к снижению числа случаев госпитализации [Poole P.J., Chacko E., Wood-Baker R.W., Cates C.J., 2006; Walters J.A., Smith S., Poole P. et al., 2010].

**3. Длительная кислородотерапия.** Хроническая дыхательная недостаточность является одним из наиболее тяжёлых осложнений ХОБЛ, развивающееся на поздних этапах заболевания. Гипоксемия не только сокращает продолжительность жизни больных, но и обладает целым рядом нежелательных последствий: полицитемия, аритмия, лёгочная гипертензия [Cranston J.M., Crockett A.J., Moss J.R., Alpers J.H., 2005]. Введение кислорода под давлением (кислородотерапия) способно устранить осложнения гипоксемии и снизить летальность больных ХОБЛ [Albert R.K., Au D.H., Blackford A.L. et al., 2016].

### 1.3.2. Лекарственная терапия

**1. Бронходилататоры:  $\beta_2$ -агонисты.** Назначение бронходилататоров приводит к снижению тонуса гладкой мускулатуры бронхов, улучшению спирометрических показателей лёгких (увеличение ОФВ<sub>1</sub>) и уменьшению гипервентиляции лёгких в покое и при физической нагрузке [Thomas M., Decramer M., O'Donnell D.E., 2013].  $\beta_2$ -агонисты различаются по времени действия: короткого действия (сальбутамол, фенотерол), эффект от которых составляет 3–6 часов, и длительного действия (вилантерол, сальметерол, формотерол), эффект от применения которых сохраняется на 12–24 часа

[Sestini P., Renzoni E., Robinson S. et al., 2002; Cope S., Donohue J.F., Jansen J.P., 2013]. Сальметерол и формотерол существенно снижают гиперинфляцию лёгких, что уменьшает обструкцию дыхательных путей и в целом улучшает качество жизни больных ХОБЛ. Кроме длительной бронходилатации, данные препараты имеют дополнительные эффекты: в нейтрофильных лейкоцитах накапливается цАМФ, что приводит к активации апоптоза [Johnson M., Rennard S., 2001].

$\beta_2$ -агонисты довольно хорошо переносятся пациентами. Однако при их назначении существует вероятность одновременной активации  $\beta$ -адренорецепторов сердца. Это, в свою очередь, может провоцировать ишемию, аритмию, сердечную недостаточность, а также повышать риск внезапной смерти [Decramer M.L., Hanania N.A., Lotvall J.O., Yawn B.P., 2013; Kew K.M., Mavergames C., Walters J.A.E., 2013]. Применение  $\beta_2$ -агонистов ограничено у больных сахарным диабетом вследствие развития кетоацидоза, поскольку стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов в печени вызывает расщепление гликогена и повышение уровня глюкозы в крови [Philipson L.H., 2002]. Вследствие этого у больных с сочетанием сахарного диабета и ХОБЛ лечение  $\beta_2$ -агонистами следует исключить. Ещё одним из наиболее характерных побочных эффектов  $\beta_2$ -агонистов, возникающих вследствие прямой стимуляции  $\beta$ -рецепторов скелетных мышц, является дозозависимый тремор, [Cazzola M., Matera M.G., 2012.], негативно влияющий на лёгочную функцию.

**2. Бронходилататоры: антихолинергические препараты.** Антихолинергические препараты блокируют сокращение гладкой мускулатуры бронхов под действием ацетилхолина, тем самым улучшая лёгочную функцию, качество жизни и снижают риск развития обострений при ХОБЛ. По длительности эффекта различают короткодействующие (ипратропий) и длительно действующие (аклидиний, тиотропий) антихолинергические препараты [Karner C., Chong J., Poole P., 2012; Kankaanranta H., Harju T., Kilpelainen M. et al., 2015]. Монотерапия антихолинергиками является достаточно эффективной в силу дополнительного ингибирующего воздействия на воспаление в дыхательных путях [Kistemaker E. M., Oenema T.A., Herman M., Gosens R., 2012]. Совместное применение с  $\beta_2$ -агонистами повышает эффективность антихолинергических препаратов [Vogelmeier C., Kardos P., Harari S. et al., 2008].

Клетки воспаления реагируют на активацию никотиновых и мускариновых рецепторов. Так, Т-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности  $M_1$  и  $M_5$  рецепторы [Mita Y., Dobashi K., Suzuki K., Mori M., Nakazawa T., 1996]. Воздействуя на эти рецепторы, ацетилхолин вызывает выброс IL-2 Т-клетками, усиливает их пролиферативную активность [Nomura J., Nozoi T., Okuma Y., Nomura Y., 2003]. Известно опосредованное действие ацетилхолина на клетки воспаления. В частности, избирательная активация  $M_1$  рецепторов человека стимулирует секрецию хемотаксических факторов

бронхиальными клетками, что усиливает миграцию в очаг повреждения моноцитов и нейтрофилов [Kooyama S., Rennard S. I., Robbins R. A., 1992].

Ингаляционные антихолинэргические препараты хорошо переносятся пациентами. Однако при таком введении блокада мускариновых рецепторов может вызывать различные побочные эффекты: тошноту, задержку мочи, повышение внутриглазного давления [Sharafkhaneh A., Majid H., Gross N.J., 2013].

**3. Ингаляционные глюкокортикостероиды.** Клинические наблюдения указывают, что монотерапия ингаляционными глюкокортикостероидами не приносит видимого лечебного эффекта пациентам с ХОБЛ [Yang I.A., Clarke M.S., Sim E.H.A., Fong K.M., 2012]. При этом при назначении глюкокортикостероидов возможны серьёзные побочные эффекты, среди которых отмечают недостаточность надпочечников, атрофию кожи, остеопороз, язвенную болезнь, гипертонию, диабет, катаракту, риск различных инфекций, гипердренокортицизм и др. [Smyllie H., Connolly C., 1968; McEvoy C. E., Niewoehner D. E., 2001].

**4. Муколитические препараты.** Муколитики (карбоцистеин, N-ацетилцистеин) способствуют разжижению и улучшению отхождения мокроты из бронхов, тем самым снижается риск обострения ХОБЛ. Однако на функции лёгких муколитические препараты не оказывают влияния [Poole P., Black P.N., Cates C.J., 2012].

**5. Ингибиторы фосфодиэстеразы (теофиллин).** О применении теофиллина в лечении ХОБЛ известно давно. Теофиллин расслабляет гладкую мускулатуру бронхов за счёт ингибирования фосфодиэстераз и увеличения концентрации цАМФ и цГМФ [Rabe K.F., Magnussen H., Dent G., 1995]. Однако исследования некоторых авторов, в частности Hirano T. и соавт., позволяют рассматривать его в качестве противовоспалительного препарата [Hirano T., Yamagata T., Gohda M. et al., 2006]. В большинстве рекомендаций по лечению ХОБЛ теофиллин предлагают назначать пациентам с тяжёлой формой ХОБЛ в сочетании с  $\beta_2$ -агонистами. Такая комбинация препаратов значительно улучшает клиническую картину заболевания [ZuWallack R.L., Mahler D.A., Reilly D. et al., 2001]. Отмечается, что для достижения хорошего эффекта необходимы высокие концентрации теофиллина в крови, что плохо переносится пациентами, поскольку имеются выраженные побочные эффекты за счёт ингибирования фосфодиэстеразы: головная боль, рвота, тошнота, дискомфорт в области живота, а также могут возникнуть судороги и сердечная аритмия [Kirsten D.K., Wegner R.E., Jorres R.A., Magnussen H., 1993; Zhang Z.-Y., Kaminsky L.S., 1995]. Этим обусловлено распространение в большинстве европейских стран той точки зрения, что терапия теофиллином считается неэффективной [Barnes P.J., 2005].

**6. Антибиотики.** Макролиды, такие, как эритромицин и азитромицин, снижают частоту и тяжесть обострений ХОБЛ. Однако быстрое развитие к макролидам резистентности со стороны бактерий и снижение слуха при длительных курсах существенно ограничивают их широкое применение [Donath E., Chaudhry A., Hernandez-Aya L.F., Lit L., 2013].

### **1.3.3. Хирургические методы**

**1. Операция уменьшения объёма лёгких (*Lung volume reduction surgery, LVRS*).** LVRS – это хирургическая процедура, при которой часть лёгкого удаляют для уменьшения гиперинфляции и увеличения механической эффективности респираторных мышц [Martinez F.J., De Oca M.M., Whyte R.I. et al., 1997; Criner G., Cordova F.C., Leyenson V. et al., 1998]. После этой операции улучшается скорость выдоха и уменьшается риск возможных обострений. У пациентов после LVRS отмечалось увеличение продолжительности и качества жизни. У пациентов с тяжёлой эмфиземой LVRS приводит к более высокой смертности, чем медикаментозное лечение. С другой стороны, результаты проспективного клинико-экономического исследования указывают на высокую стоимость LVRS по сравнению с консервативным лечением [Fishman A., Martinez F., Naunheim K. et al., 2003; Ramsey S.D., Berry K., Etzioni R. et al., 2003].

**2. Буллэктомия.** Буллэктомия – это хирургическая процедура для лечения буллезной эмфиземы, в ходе которой удаляют большую буллу, не выполняющую функцию газообмена в лёгких, что способствует декомпрессии окружающей паренхимы лёгких. Обычно операция даёт хороший эффект, но показана для ограниченного числа пациентов с ХОБЛ [Marchetti N., Criner G.J., 2015].

**3. Трансплантация лёгких.** У пациентов с очень тяжёлой формой ХОБЛ трансплантация лёгких улучшает состояние здоровья и функциональную работоспособность, но, к сожалению, не увеличивает продолжительность жизни [Christie J.D., Edwards L.B., Kucheryavaya A.Y., et al., 2012]. Средняя выживаемость всех пациентов с ХОБЛ, перенесших трансплантацию лёгких, увеличивается до 5,5 лет: 7 лет у пациентов с двусторонней трансплантацией лёгких и 5 лет у пациентов с односторонней трансплантацией лёгких [Stavem K., Vjortuft O., Borgan O., Geiran O., Bøe J., 2006]. Трансплантация лёгких ограничена нехваткой донорских органов, высокой стоимостью и многими развивающимися в послеоперационный период осложнениями: отторжение трансплантата, облитерирующий бронхиолит, оппортунистические инфекции, лимфопролиферативные заболевания [Theodore J., Lewiston N., 1990].



### 1.3.4. Клеточная терапия

Отсутствие эффективных лечебных процедур для восстановления структуры и функции лёгких пациентов с ХОБЛ и эмфиземой лёгких стимулирует поиск новых подходов к лечению этого заболевания. Для восстановления популяций утраченных клеток альвеолярного эпителия и эндотелия, замены повреждённых структур воздухоносных путей лёгких предлагают клеточную терапию, основанную на инфузии аллогенных или аутологичных стволовых клеток, и терапию хемокинами и ростовыми факторами, способными стимулировать регенераторно компетентные эндогенные стволовые клетки [Akram K.M., Patel N., Spiteri M.A. et al., 2016].

Одним из направлений клеточной терапии ХОБЛ является использование мезенхимальных стволовых клеток. На моделях эмфиземы лёгких были протестированы МСК из различных источников, включая жировую ткань [Shigemura N., Okumura M., Mizuno S. et al., 2006; Cho R.J., Kim Y.S., Kim J.Y., Oh Y.M., 2017; Hong Y., Kim Y.S., Hong S.H., Oh Y.M., 2016], легкие [Abreu S.C., Antunes M.A., Xisto D.G. et al., 2017; Ingenito E.P., Tsai L., Murthy S. et al., 2012], пуповинную кровь [Kim Y.S., Kim J.Y., Huh J.W. et al., 2015], амниотическую жидкость [Li Y., Gu C., Xu W. et al., 2014] и костный мозг [Chen Y.B., Lan Y.W., Chen L.G. et al., 2015; Gu W., Song L., Li X.M., Wang D. et al., 2015; Huh J.W., Kim S.Y., Lee J.H. et al., 2011; Tibboel J., Keijzer R., Reiss I., de Jongste J.C., Post M., 2014]. Общая популяция МСК весьма гетерогенна и представляет собой совокупность различных по иммунофенотипу клеток. Набор поверхностных антигенов клеток зависит от происхождения и тканевой принадлежности. Считается, что это определяет различия в иммуногенности, противовоспалительной активности и способности регенерировать ткани [Ostanin A.A., Petrovskii Y.L., Shevela E.Y., Chernykh E.R., 2011; Ricciardi M., Malpeli G., Bifari F. et al., 2012].

Эффекты *in vivo* во многом связаны с фенотипом МСК. Этот вывод был получен при проведении исследования эффективности лечения лабораторных животных с индуцированной эластазой эмфиземой лёгких введением МСК из костного мозга, жировой ткани и лёгких. При клеточной терапии МСК из этих тканей оказывали во многом однотипное терапевтическое действие на сердечно-лёгочную функцию и лёгкие, в частности, способствовали сокращению эмфиземы, снижали инфильтрацию нейтрофилами альвеолярной ткани и способствовали синтезу эластичных волокон. Между тем, некоторые результаты достигались введением только определённых типов МСК. Так, костно-мозговые МСК были более эффективны в противовоспалительной терапии, и это, по-видимому, связано с индукцией поляризации макрофагов в противовоспалительный фенотип [Ragni E., Montemurto T., Montelatici E. et al., 2013]. МСК из костного мозга в большей степени уменьшают лёгочную артериальную гипертензию и апоптоз эпителиальных и эндотелиальных клеток в лёгких при моделировании эмфиземы лёгких, чем

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

МСК из других тканей [Huh J.W., Kim S.Y., Lee J.H. et al., 2011; Antunes M.A., Abreu S.C., Cruz F.F. et al, 2014]. При клеточной терапии скорость приживания МСК в травмированных тканях очень низкая, поэтому основным механизмом, объясняющим их эффекты, независимо от источника, является паракринное действие. Многочисленные исследования показывают, что МСК, полученные из различных источников (костный мозг, жировая ткань, лёгкие, амниотическая жидкость), действуют путём выработки воспалительных и репаративных медиаторов, при этом присутствие трансплантированных клеток на месте поражения не обязательно [Antunes M.A., Abreu S.C., Cruz F.F. et al, 2014].

В эксперименте апробированы системный (внутривенный, внутривентрикулярный) и локальный (внутрибронхиальный, внутриплевральный, интраназальный) способы доставки МСК к очагу травмы [Antunes M.A., Abreu S.C., Cruz F.F. et al, 2014]. При эмфиземе лёгких клеточная терапия МСК эффективна при системном и локальном способах доставки клеточного материала. Между тем, опубликованы результаты, в которых указывается на то, что эффект клеточной терапии МСК зависит от способа введения клеток. Так, внутривенная инъекция более эффективна в иммуномодуляции (индукция поляризации макрофагов, пролиферация эндотелиальных клеток, продуцирование фактора роста эндотелия сосудов), в то время как внутрибронхиальное введение даёт более эффективную репарацию лёгочной ткани (снижение гиперинфляции и фиброза лёгких) на эластичных моделях ХОБЛ [Antunes M.A., Abreu S.C., Cruz F.F. et al., 2014].

ХОБЛ не следует рассматривать как исключительно лёгочное расстройство. У пациентов с ХОБЛ со временем развиваются сердечно-сосудистые нарушения, метаболический синдром и другие заболевания [Российское респираторное общество, 2014]. В этой связи одно из предъявляемых требований к клеточной терапии МСК – это снижение инвазивности процедур. Системный путь введения МСК наиболее часто используется в доклинических исследованиях. Однако для достижения терапевтического эффекта трансплантации необходима высокая концентрация сначала циркулирующих МСК и потом избирательно в лёгких, но не в других тканях во избежание побочных эффектов. При существующих технических подходах этого практически невозможно достичь. По этой причине местное введение МСК стало предпочтительным в лечении эмфиземы лёгких [Weiss D.J., Casaburi R., Flannery R., LeRoux-Williams M., Tashkin D.P., 2013].

Большинство исследований позиционирует клеточную терапию МСК как единственное лечение эмфиземы лёгких. Инъекции МСК способствуют восстановлению эмфизематозно расширенных лёгких у лабораторных животных. Клинические испытания показали безопасность клеточной терапии МСК у пациентов с ХОБЛ, при этом улучшение функции лёгких или снижение смертности не наблюдалось [Ribeiro-Paes J.T., Bilaqui A., Greco O.T. et al., 2011; Weiss D.J., Casaburi R., Flannery R., LeRoux-Williams M.,

Tashkin D.P., 2013]. Во многом это связано с отсутствием решения ряда вопросов, что сдерживает продвижение в клинику лёгочных заболеваний, в том числе ХОБЛ, монотерапии МСК. Во-первых, нет однозначного понимания фенотипа и характеристики популяции МСК для клеточной терапии; во-вторых, отсутствует стандартизированный протокол клеточной терапии, где чётко были бы прописаны время, продолжительность, предварительная подготовка, дозировка и частота введения, а также путь введения МСК больным ХОБЛ; в-третьих, мало данных о побочных действиях при использовании МСК [Broekman W., Khedoe P.P.S.J., Schepers K. et al., 2018; Sun Z., Li F., Zhou X. et al., 2018].

С учётом обозначенных выше проблем, многие авторы указывают на необходимость проведения сочетанной терапии стромальными клетками с классическими фармакологическим и / или нефармакологическим методами лечения [Cho R.J., Kim Y.S., Kim J.Y., Oh Y.M., 2017; Hong Y., Kim Y.S., Hong S.H., Oh Y.M., 2016; Peron J.P., De Brito A.A., Pelatti M. et al., 2015]. Не исключено, что в таком случае может быть потенцирование эффектов или появление регенераторных свойств МСК с восстановлением функции лёгочной ткани.

Известно, что пиоглитазон с пероксисом-пролифератором-активированным рецептором (PPAR)- $\gamma$ -агонистом усиливает дифференцировку адипоцитов. PPAR- $\gamma$  экспрессируется МСК. Применение пиоглитазона может изменять фенотип дифференцирующихся МСК и усиливать их пролиферацию и улучшать терапевтические эффекты МСК в сердце [Shinmura D., Togashi I., Miyoshi S. et al., 2011]. Hong Y. и соавт. трансплантировали жировые МСК, обработанные пиоглитазоном, мышам с эмфиземой лёгких, индуцированной эластазой или сигаретным дымом [Hong Y., Kim Y.S., Hong S.H., Oh Y.M., 2016]. Предварительно обработанные пиоглитазоном МСК из жировой ткани донора были более эффективны в сокращении участков эмфиземы у реципиента по сравнению с необработанными МСК.

Оптимизация условий культивирования МСК перед клеточной терапией подвергалась активному изучению для улучшения функций этих клеток. Наиболее часто МСК культивируют в двумерном монослое с использованием культуральных планшетов. В двухмерных культурах активность пролиферации и дифференцировки МСК в клетки стромальных линий может снижаться вплоть до исчезновения. Дополнительная лекарственная нагрузка для восстановления этих свойств *in vivo* может негативно сказаться на больных. По этой причине активно испытываются методики культивирования МСК в 3D-сфероидных культурах. Считается, что формирование сфероида предотвращает апоптоз клеток и облегчает дифференцировку из-за сохранения межклеточных взаимодействий [Yamaguchi Y., Ohno J., Sato A., Kido H., Fukushima T., 2014]. Межклеточные взаимодействия важны для выживания и образования колоний. В недавних исследованиях Cho R.J. и коллег изучалось влияние клеточной терапии сфероидными МСК и диссо-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

цированными МСК на индуцированную эластазой эмфизему лёгких у мышей [Cho R.J., Kim Y.S., Kim J.Y., Oh Y.M., 2017]. МСК получали из жировой ткани здоровой мышцы-донора. По результатам исследования сфероидные МСК представили более высокую экспрессию белка антиапоптотического медиатора Bcl-2 и более низкую экспрессию апоптотического регулятора Вах по сравнению с диссоциированными МСК. Кроме этого, сфероидные МСК демонстрировали лучшие терапевтические эффекты по сравнению с диссоциированными МСК: более выраженное сокращение эмфиземы, более высокая экспрессия FGF-2 в лёгочной ткани, большее снижение активности MMP-2 и экспрессии гена MMP-12, большее увеличение экспрессии генов тканевого ингибитора MMP-1 и ингибитора лейкоцитарной протеазы [Cho R.J., Kim Y.S., Kim J.Y., Oh Y.M., 2017].

Кроме МСК, стволовыми клетками лёгких человека называют базальные клетки, клетки Клара, с-kit позитивные стволовые клетки лёгких, а также альвеоциты II типа [Rawlins E.L., Okubo T., Que J., et al., 2008; Heise R.L., Link P.A., Farkas L., 2016; Jarvinen L., Badri L., Wettlaufer S. et al., 2008; Lama V.N., Smith L. Badri L. et al., 2007]. Сообщалось, что базальные клетки и альвеоциты II типа могут повторно входить в клеточный цикл из состояния покоя, размножаться и способствовать восстановлению тканей после травм лёгких [Rawlins E.L., Okubo T., Que J. et al., 2008]. Активность исследования клеточной терапии с использованием всех указанных лёгочных стволовых клеток крайне низка. Возможно, в силу низкого выхода клеточной массы при культивировании и высокого риска приобретения клетками неопластических свойств.

Доклинические исследования показали, что введение трансретиноевых кислот (АТРА) может активировать стволовые клетки лёгких на модели эмфиземы лёгких, индуцированной эластазой. Это приводило к уменьшению площади эмфиземы и регенерации лёгких, выразившееся в увеличении количества клеток в альвеолах [Ishizawa K., Kubo H., Yamada M. et al., 2004]. Эта работа показала возможность фармакологической (введение АТРА) стимуляции лёгочных СК для регенерации альвеол.

Интересные результаты были получены при доклиническом исследовании продуктов жизнедеятельности МСК, так называемых экстрацеллюлярных везикул (ЭВ). ЭВ синтезируются клетками и выходят в окружающую среду, способны оказывать паракринное действие на близлежащие ткани. ЭВ имеют размер от 20 до 100 нм и характеризуются их эндосомным происхождением, поскольку они образуются путём слияния мультивезикулярных эндосом с клеточной мембраной [Simpson R.J., Jensen S.S., Lim J.W., 2008; Biancone L., Bruno S., Deregibus M.C., Tetta C., Camussi G., 2012; Gyorgy B., Szabo T.G., Pasztoi M. et al., 2011]. Их выделение зависит от активации цитоскелета. ЭВ содержат большое количество эндосомальных маркеров, включая тетраспанины (CD63, CD81, CD9), белки теплового шока (Hsp60, Hsp70 и Hsp90), взаимодействующие с ALG-2 белок X (Alix), ген воспри-

имчивости опухоли 101 (Tsg101), HLA I и II класса. Кроме этого, в ЭВ часто присутствуют аннексины и клатрин. И самое главное, что в состав ЭВ включаются белки и РНК, которые являются специфическими для источника клеток и их состояния [Thery C., Ostrowski M., Segura E., 2009; Zhang B., Yin Y., Lai R.C. et al., 2014].

Есть мнение, что ЭВ имеют огромный потенциал для лечения различных заболеваний. Были проведены доклинические исследования терапевтического потенциала ЭВ и получен положительный эффект их применения при заболеваниях почек [He J., Wang Y., Sun S. et al., 2012], сердца [Lai R.C., Chen T.S., Lim S.K., 2011] и печени [Tan C.Y., Lai R.C., Wong W. et al., 2014]. Весьма интересные результаты были продемонстрированы и на лёгочной патологии. Например, при экспериментальной пневмонии ЭВ уменьшали количество клеток воспаления (нейтрофилы) в повреждённых альвеолах [Zhu Y.G., Feng X.M., Abbott J. et al., 2014]. На модели лёгочной гипертензии ЭВ снижали давление в лёгких и правом желудочке, препятствовали развитию гипертрофии правого желудочка и лёгочной артерии у крыс [Chen J.Y., An R., Liu Z.J. et al., 2014]. Cruz F.F. и соавт. показали, что системное введение ЭВ, полученных от МСК костного мозга, снижало гиперчувствительность дыхательных путей, воспаление лёгких и количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток у мышей с экспериментальной бронхиальной астмой [Cruz F.F., Borg Z.D., Goodwin, M. et al., 2015]. Kim Y.S. с коллегами сообщают об эффективности лечения эмфиземы лёгких назначением ЭВ, полученных от жировых МСК [Kim Y.S., Kim J.Y., Cho R. et al., 2017]. При этом авторы связывают терапевтический эффект ЭВ с FGF2-зависимым сигнальным путем.

## Глава 2

# МОДЕЛИ ЭМФИЗЕМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ

Поиск и разработка моделей заболеваний являются основополагающими для доклинических исследований. Актуальность в этих работах заключается в необходимости глубокого понимания клеточных и молекулярных механизмов развития заболеваний человека, а также регенерации повреждённых и/или утраченных тканей. Многие доступные модели заболеваний на лабораторных животных не повторяют полностью болезни человека, что затрудняет экстраполяцию результатов доклинических исследований в клиническую практику. В этой связи значительные усилия направлены на разработку более лучших моделей, имитирующих болезни человека.

Известны различные экспериментальные модели эмфиземы лёгких и ХОБЛ. У лабораторных животных характерные для эмфиземы лёгких и ХОБЛ нарушения вызываются введением протеиназ, твёрдых частиц, сигаретного дыма, некоторых химических веществ и проведением генетических манипуляций. Все эти подходы имеют свои достоинства и недостатки, и могут применяться совместно и дополнять друг друга. В литературе описано множество способов моделирования эмфиземы лёгких и других симптомов ХОБЛ у экспериментальных животных.

Важное значение для моделей эмфиземы лёгких и ХОБЛ имеет анатомическое строение лёгких лабораторных животных. Эмбриональное формирование лёгких и их постнатальное развитие различается у разных видов животных. Так, к моменту рождения морские свинки и обезьяны уже имеют развитую альвеолярную структуру, в то время как у крыс и мышей альвеолярная структура продолжает активно формироваться после рождения. Из этого следует, что животные с генетическими мутациями или с целенаправленно внесёнными генетическими изменениями могут иметь нарушения структуры лёгочной паренхимы и, вследствие этого, особенно восприимчивы к повреждениям, нарушающим формирование альвеол [Wright, J.L., et al., 2002].

У взрослых приматов и собак распределение бронхиальных желез во многом соответствует таковому у взрослого человека. Однако у грызунов бронхиальные железы располагаются в проксимальной части трахеи. Дополнительно, у грызунов, в отличие от человека, выявлено большое количество клеток Клара в малых бронхах [Fahy, J.V., et al., 2000].

У разных видов млекопитающих существуют различия в метаболизме, скорости всасывания, распределения в организме и выведения лекарственных препаратов по сравнению с человеком, что может значительно огра-

ничивать использование некоторых моделей при исследовании медикаментозных подходов лечения. Этот факт следует учитывать при проведении доклинических исследований лекарственных препаратов на моделях заболеваний лёгких. Кроме этого, следует обращать внимание на диету пациента, особенности которой способны влиять на результат исследований. Так, например, диета, богатая волокнами, способна снижать биодоступность перорально вводимых агентов [Vogaert, M.G., 1986].

Первый экспериментально воспроизведённый симптом ХОБЛ – эмфизема лёгких, моделировался нарушением протеазного / антипротеазного баланса. Интрахеальное введение папаина приводило к формированию эмфизематозных повреждений [Gross, P., et al., 1965]. Как известно, контроль протеазной активности осуществляется эндогенными ингибиторами протеаз, основным из которых является  $\alpha_1$ -антитрипсин [Pandey, K.C., et al., 2017]. Синтезируется  $\alpha_1$ -антитрипсин преимущественно гепатоцитами, а также может продуцироваться эпителиальными клетками лёгких и кишечника, островковыми клетками поджелудочной железы [Song, S., 2018]. Дисбаланс в системе протеиназ / антипротеиназ наблюдается при нарушении синтеза  $\alpha_1$ -антитрипсина или его чрезмерной инактивации под воздействием окислительного стресса [Pałgan K., Bartuzi Z., 2015]. Повышение миграции нейтрофилов, усиление их дегрануляции под влиянием цитокинов [Cadwallader, K.A., et al., 2004], гипоксии [McGovern, N.N. et al., 2011] приводит к повышению протеазной активности и усилению деструкции эластичного матрикса альвеол, и формированию эмфиземы лёгких. У пациентов с дефицитом  $\alpha_1$ -антитрипсина чаще всего наблюдается панлобулярная эмфизема, которая локализована преимущественно в нижних отделах лёгких [Hazari, Y.M., et al., 2017].

**Эластаза.** Для моделирования эмфиземы лёгких, вызванной дисбалансом в системе протеаз и антипротеаз, наиболее часто используется свиная панкреатическая эластаза (*анг.* Porcine pancreatic elastase, PPE). Эффективность протеазы обусловлена её эластолитической активностью. Возможно применение папаина (как это указано выше) и нейтрофильной эластазы человека (*анг.* Human neutrophil elastase, HNE) [Antunes M.A., Rocco P.R., 2011]. Мыши, крысы, морские свинки, хомяки, собаки и приматы обладают высокой чувствительностью к этой группе повреждающих факторов. Кроме расширения воздушного пространства в лёгочной ткани также происходит накопление нейтрофилов и макрофагов. Эластаза вводится интраназально, эндотрахеально или внутривентриально [Ghorani, V., et al., 2017]. Уже через три часа после интрахеального введения эластазы Van de Lest С.Н. с соавторами отмечал признаки острого повреждения лёгких (воспалительная инфильтрация, кровоизлияния), которые сохранялись в течение трёх дней. Эмфизематозные изменения лёгких регистрировались через две недели после инстилляций эластазы [Van de Lest, С.Н.,

et al., 1995]. Есть сообщения, в которых указывается на развитие эмфизематозных повреждений после введения эластазы в течение месяца, с последующей стабилизацией состояния [Shapiro, S.D., 2000]. Следует обратить внимание на то обстоятельство, что введение бактериальных коллагеназ не приводило к формированию эмфиземы у лабораторных животных.

Выраженность эластаза-индуцированных эмфизематозных изменений можно варьировать путём контроля дозы эластазы. Достоинством эластазной модели эмфиземы лёгких является простота воспроизведения и относительно низкая себестоимость. Эластаза во многом воспроизводит структурные и функциональные изменения, которые наблюдаются у пациентов с ХОБЛ: потеря эластина и коллагена, метаплазия секреторного эпителия, нарушение лёгочных функций, гипоксемия и гипертрофия правого желудочка [Antunes, M.A., Rocco, P.R., 2011; Mahadeva, R., Shapiro, S.D., 2005]. Со временем уровень эластина и коллагена в лёгочной ткани возвращается к норме, однако межклеточный матрикс и паренхима остаются повреждёнными, как и лёгочная гистоархитектоника [Kuhn, C., ete al., 1976]. Случаи прогрессирования эмфиземы лёгких напрямую связывают с хронизацией воспалительных процессов, в результате действия протеиназ, выделяемых клетками воспаления [Mahadeva, R., Shapiro, S.D., 2005].

***D-галактозамин гидрохлорид.*** Для воспроизведения дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина в лёгких используется D-галактозамин гидрохлорид. D-галактозоамин гидрохлорид по химическому строению это 2-амино-2-дезоксид-D-гидрохлорид галактопиранозы, D-хондросамин гидрохлорид («D-(+)-Galactosamine hydrochloride», «Sigma», США). Его применение приводит к поражению гепатоцитов и, как следствие, к снижению уровня альфа1-антитрипсина в сыворотке крови и ткани легких [Blackwood R.A. et al., 1979; Bolmer S.D., Kleinerman J., 1987]. D-галактозамин гидрохлорид широко применяется для моделирования острого и хронического повреждения печени [Deveza, L., Choi, F. Yang J., 2012; Ganai, A.A., Husain, M., 2017; Feng, L., et al., 2017; Lu, L., et al., 2016]. Под влиянием D-галактозамин гидрохлорида увеличивается образование активных форм кислорода и азота, снижается уровень глутатиона [Ganai, A.A., Husain, M., 2017]. Дефицит уридинтрифосфорной кислоты приводит к снижению синтеза РНК и белка.

Decker K. et al. обнаружили необратимые изменения гепатоцитов через 3 часа после введения D-галактозамин гидрохлорида [Decker K., Keppler, D., 1974]. Через 8 часов после внутрибрюшинного введения D-галактозамин гидрохлорида (700 мг/кг) и липополисахарида Wu Y.H. et al. наблюдали признаки апоптоза гепатоцитов (фрагментация и конденсация хроматина, образование апоптотических телец) [Wu, Y.H., et al., 2014]. В крови наблюдалось резкое снижение уровня  $\alpha_1$ -антитрипсина [Bolmer S.D., Kleinerman J., 1987] и увеличение содержание аланинаминотрансферазы и ФНО- $\alpha$  [Wu, Y.H., et al., 2014]. В просвете альвеол отмечалось увеличение числа полиморфноя-



дерных лейкоцитов. Введение D-галактозамин гидрохлорида в сочетании с эластазой [Blackwood, R.A., et al., 1979] или эндотоксином *Escherichia coli* [Blackwood, R.A., et al., 1984] сопровождалось более выраженным расширением воздушного пространства альвеол.

Нами были получены во многом сопоставимые с вышеизложенными результаты при моделировании эмфиземы лёгких сочетанным действием D-галактозамин гидрохлоридом и эластазы. После курсового внутрибрюшинного введения D-галактозамин гидрохлорида в дозе 100 мг/кг в 100 мкл NaCl 0,9% (в 0 час и на 8, 16, 24, 32, 40 час эксперимента) и однократного интраназального введения небольшой дозы свиной панкреатической эластазы в дозе 0,3 Ед/мышь в 50 мкл NaCl 0,9% (за 1 ч до первого введения D-галактозамин гидрохлорида) в печени мышей-самок линии C57Bl/6 развивались изменения, характерные для токсического гепатита умеренной степени выраженности. В частности, на 3 сутки эксперимента отмечались единичные моноцеллюлярные некрозы, слабо выраженная белковая дистрофия гепатоцитов, единичные митозы. При анализе препаратов лёгких мышей была выявлена картина очаговой эмфиземы. Так, альвеолы и альвеолярные ходы были растянуты, отмечались разрывы альвеолярных перегородок и стенок мелких бронхиол, обнаруживались ателектазы лёгочной ткани. Сосуды альвеолярных стенок были гиперемированы, имела место умеренная воспалительная инфильтрация паренхимы лёгких, инфильтрат представлен, главным образом, макрофагами и лимфоцитами. Количество капилляров в лёгких мышей, подвергнутых воздействию эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, значительно уменьшалось. Во всех отделах лёгких обнаруживались эмфизематозно расширенные альвеолы с разрушенными межальвеолярными перегородками. В верхнем ( $2,46 \pm 0,81$  % от нормальной ткани лёгкого) и среднем ( $4,2 \pm 1,33$  % от нормальной ткани лёгкого) лёгком развивалась умеренная эмфизема, в нижнем лёгком площадь эмфизематозно расширенной ткани достигала  $22,15 \pm 2,12$  % от нормальной ткани. Кроме этого, в лёгких животных в условиях сочетанного введения эластазы и D-галактозамин гидрохлорида обнаружено уменьшение экспрессии маркеров эпителиальных клеток и эндотелиальных клеток, концентрация тканевого MMP9 повышалась, а альфа1-антитрипсина, напротив, снижалась.

**SU5416.** Интересны были результаты моделирования эмфиземы лёгких у лабораторных животных подкожным введением SU5416 курсом в дозе 20 мг/кг в 100 мкл NaCl 0,9% на 0, 7, 14, 21 сутки эксперимента. SU5416 представляет собой ингибитор тирозинкиназ белка-рецептора фактора роста эндотелия сосудов (*англ.* Vascular endothelial growth factor, VEGF) («SU 5416», «Sigma», США). По химическому строению это 1,3-Дигидро-3-[(3,5-диметил-1Н-пиррол-2-ил)метил]-2Н-индол-2-один. По данным Kanazaw H. (2007) ингибитор индуцирует апоптоз в клетках блокадой рецепторов к VEGF. В ходе наших экспериментов было обнаружено, что на 45 сутки по-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

сле введения SU5416 большое число альвеол и альвеолярных ходов были умеренно увеличены в размерах за счёт растяжения альвеолярных стенок, выявлены разрывы альвеолярных перегородок и единичные ателектазы. Капилляры альвеолярных стенок имели слабое кровенаполнение, либо запустевали. Наблюдался перибронхиальный отёк, единичные перибронхиальные воспалительные инфильтраты, представленные преимущественно макрофагами, реже лимфоцитами. Площадь эмфизематозно-расширенной ткани в верхнем, среднем и нижнем отделе лёгких составила  $7,58 \pm 1,38 \%$ ,  $12,63 \pm 1,62 \%$  и  $17,42 \pm 2,65 \%$  от нормальной ткани соответственно.

**SO<sub>2</sub>**. К ХОБЛ способны приводить различные аэрополлютанты. В этой связи ингаляция различных химических соединений и частиц может выступать в качестве модели ХОБЛ и эмфиземы легких. Экспозиция в высоких концентрациях SO<sub>2</sub> (диоксида серы) в течение 4-8 недель приводит к нейтрофильному воспалению, гиперсекреции слизи, метаплазии слизистых клеток и повреждению реснитчатого эпителия у крыс и морских свинок [Groneberg, D.A., Chung, K.F., 2004]. При этом наблюдается гиперреактивность дыхательных путей. На данной модели показано высвобождение тахикининов и кальцитонин ген-связанного пептида (CGRP) нервной системой. В этой связи нервная система вместо того, чтобы способствовать развитию эмфизематозных повреждений, напротив, замедляет их развитие [Long, N.C., et al., 1997]. В итоге экспозиция в SO<sub>2</sub> вызывает диффузные повреждения альвеолярной ткани. Несмотря на то, что гистопатологические изменения при воспроизведении данной модели имеют близкое сходство с эмфиземой лёгких, модель в целом не достаточна для изучения ХОБЛ в силу вовлечения в этот процесс нервной системы.

**NO<sub>2</sub>**. Ещё одним газом, способным приводить к повреждениям лёгочной ткани, напоминающими ХОБЛ, является диоксид азота (NO<sub>2</sub>). Его высокие концентрации (94–282 мг/м<sup>3</sup>) приводят к гибели животных вследствие обширных лёгочных повреждений, таких, как отёк лёгких и кровоизлияния [Groneberg, D.A., Chung, K.F., 2004]. Кратковременная экспозиция в NO<sub>2</sub> вызывает двухфазную реакцию: вначале регистрируется поражение альвеолярной ткани, в след за которым наступает стадия восстановления, за счёт увеличения пролиферации клеток и ферментативной активности. Воздействие NO<sub>2</sub> в течение 7 дней в дозе 15 миллионных долей (мд.) приводит к увеличению потребления кислорода в лёгочной ткани. Повышение активности митохондрий фиксируется одновременно с усилением синтеза ДНК [Barth, P.J., Müller B., 1999]. В дозе 10 мд. NO<sub>2</sub> вызывает гибель реснитчатых клеток и гипертрофию бронхоальвеолярного эпителия [Rombout, P.J., et al., 1986], а доза в 15-20 мд. приводит к гиперплазии пневмоцитов II типа [Foster, J.R., et al., 1985].

**Диоксид кремния и угольная пыль.** Различные виды микрочастиц являются компонентами загрязнения воздуха, попадание которых в дыхательные пути способно усиливать окислительный стресс в лёгочной ткани [Donaldson, K. et al., 2002]. Модели, основанные на использовании микрочастиц, в основном требуют применения ультрадисперсных частиц диоксида кремния и угольной пыли [Albrecht, C., et al., 2001]. Эти модели характеризуются очаговой эмфиземой и имеют схожие механизмы развития с эмфиземой, индуцированной сигаретным дымом [Churg, A., et al., 1997].

**Генетические модели.** Как упоминалось выше, важной частью развития различных заболеваний является генетическая предрасположенность организма к развитию патологии и генетические детерминированные особенности реакций на различные патогенные факторы окружающей среды. Некоторые инбредные линии мышей имеют предрасположенность к спонтанному развитию эмфиземы из-за генетических аномалий. Ряд мутаций, не имеющих прямой связи с лёгочными функциями, за счёт проявления мультисистемных эффектов приводят к патологическому увеличению воздушного пространства лёгких [Mahadeva, R., Shapiro, S.D., 2005]. Так, у мышей линии Tightskin дупликация в гене, кодирующем гликопротеин фибрилин-1, вызывает развитие панлобулярной эмфиземы к 4 дню жизни, вследствие нарушения эластогенеза в лёгких [Churg, A., et al., 1997]. Отмечаются линии мышей, у которых развитие эмфиземы, вероятнее всего, связано с врождённым нарушением баланса между протеазами и антипротеазами. К примеру, у мышей линии Pallid (Pa) наблюдается снижение  $\alpha$ 1-антитрипсина и эмфизема развивается начиная с 1 месяца жизни [Martorana, P.A., et al., 1993], а линия мышей Osteopetrotic (Op/Op) демонстрирует увеличенное высвобождение металлопротеиназ макрофагами, это также вызывает эмфизему [Wendel, D.P., et al., 2000].

Использование в качестве моделей трансгенных и нокаутных мышей позволяет определить участие различных молекул и сигнальных путей *in vivo* в процессах патогенеза ХОБЛ, а также восстановлении функций и регенерации лёгочной ткани. Получение необходимых моделей достигается за счёт использования технологий увеличения экспрессии определённых генов либо выключения их функции. При изучении симптомов ХОБЛ на моделях, основанных на использовании генетически модифицированных линий животных, основное внимание уделяется генам, связанным с межклеточным матриксом [Groneberg, D.A., Chung, K.F. 200494]. Один из механизмов развития эмфиземы связан с деградацией волокон альвеолярного эластина, являющегося основным компонентом внеклеточного матрикса. На генмодифицированных мышах, не имеющих эластина, было показано развитие эмфизематозных нарушений, включающих в себя расширение воздушных пространств, истончение межальвеолярных перегородок и образование воздушных полостей. Помимо своих функций во взрослом ор-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ганизме эластин имеет важное значение в развитии лёгких в эмбриогенезе [Wendel, D.P., et al., 2000]. Дефицит микрофибрилярного компонента фибулина-5 и фактора роста тромбоцитов А приводит к увеличению объёмов воздушных пространств, уменьшению количества клеток гладкой мускулатуры лёгких, эластиновых волокон, что приводит к нарушению альвеологенеза [Lindahl, P., et al., 1997].

На трансгенных мышах с недостатком эпителиальных интегринов  $\alpha$  и  $\beta$  было показано развитие возрастной эмфиземы, развитие которой было связано с недостаточной активностью TGF- $\beta$ , что приводило к гиперэкспрессии MMP-12 макрофагами [Lindahl, P., et al., 1997]. Кроме этого, на мышах, у которых воспроизвели дефицит MMP-12, показано, что эти мыши после экспозиции в сигаретном дыме, в отличие от дикого типа, не склонны к развитию эмфиземы даже после длительного воздействия [Hautamaki, R.D., et al., 1997]. У данных животных, после воздействия сигаретным дымом, не наблюдается накопление макрофагов в лёгочной ткани, что, вероятнее всего, связано с отсутствием фрагментов эластина, разрушенного под действием MMP-12, которые являются хемотоксическим сигналом для макрофагов [Hunninghake, G.W., et al., 1981].

***Recombinant Murine JE/MCP-1.*** Необратимое прогрессирующее нарушение воздушного потока в дыхательных путях при эмфиземе связывают не только с патологической реакцией лёгких на вредоносные частицы и газы, но и с воспалением. После повреждения лёгочной ткани эпителиальные и эндотелиальные клетки выделяют медиаторы воспаления, и, таким образом, инициируют антифибринолитический-коагуляционный каскад, вызывающий миграцию, агрегацию и активацию тромбоцитов. В свою очередь, агрегация тромбоцитов и их последующая дегрануляция способствует расширению и повышению проницаемости кровеносных сосудов, и это обеспечивает эффективное привлечение клеток воспаления (нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и эозинофилов) к месту травмы. Инфильтрирующие лёгкие клетки воспаления проявляют высокую эластазную активность. Так, мигрирующие в альвеолярную ткань нейтрофилы и макрофаги продуцируют MMP12 [Pierrou, S. et al., 2007; Chilosì, M., Poletti V., Rossi A., 2012]. Рассматривается несколько механизмов участия MMP12 в развитии эмфиземы: деградация межклеточного матрикса, протеолитическая инактивация антипротеаз, включая альфа1-антитрипсин, протеолитическая активация провоспалительных цитокинов, включая TNF- $\alpha$ . Кроме того, MMP12 играет важную роль в миграции макрофагов [Snehasikta Swarnakar et. al., 2011]. MMP-12 выделяется в межклеточное пространство в неактивной форме. Индуктором активности MMP-12 выступает нейтрофильная эластаза.

Представленные выше данные легли в основу собственных научно-исследовательских работ, направленных на изучение возможности моделирования воспаления и эмфиземы лёгких хемокином для моноцитов

Recombinant Murine JE/MCP-1 (CCL2) [Hautamaki R.D., Kobayashi D.K., Senior R.M., Shapiro S.D. 1997; He Z.H., Chen P., Chen Y. et al. 2015; He Z.H., Chen Y., Chen P. et al. 2016]. Recombinant Murine JE/MCP-1 (CCL2) – рекомбинантный протеин, хемоаттрактант моноцитов 1, полученный из культуры *E. coli* («Recombinant Murine JE/MCP-1 (CCL2)», «Sigma», США). MCP 1 вызывает развитие воспалительной реакции с привлечением в очаг воспаления клеток моноцитарно-макрофагального ряда [Amsellem V., Abid S., Roupel L. et al., 2016]. Для инициации острой фазы воспаления использовали липополисахарид (ЛПС). Липополисахарид – компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий *E. coli* O111: B4 («Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4», «Sigma», США). ЛПС стимулирует клетки врождённой иммунной системы Toll-подобным рецептором 4 (TLR4), являющимся членом семейства Toll-подобных рецепторных белков, который распознает общие связанные с патогенами молекулярные структуры, вызывая тем самым усиление воспалительной реакции [Wu, K.-C., Huang, S.-S., Ku,о Y.-H. et al., 2017].

По методу Guadalupe Ortiz-Muñoz и Mark R. Looney (2015) интратрахеально вводили ЛПС (в дозе 3 мкг/мышь в 50 мкл PBS на 0, 7, 11, 14, 21, 28 сутки эксперимента) и MCP-1 (в дозе 1,3 мкг/мышь в 15 мкл PBS на 7 и 21 сутки эксперимента). В результате курсового введения ЛПС и MCP-1 в лёгких мышей отмечались очаговые воспалительные инфильтраты, которые располагались как перибронхиально, так и в паренхиме лёгких. Клеточный состав инфильтратов был представлен преимущественно макрофагами и единичными плазмócитами. Кроме этого, в лёгких развивались деструктивные изменения, характерные для очаговой эмфиземы. Обнаруживались группы эмфизематозно растянутых альвеол, имели место разрывы альвеолярных перегородок и единичные ателектазы (таблица 10). Наиболее выраженная эмфизема выявлена в среднем (до  $2,638 \pm 0,164\%$  от нормальной ткани) и нижнем (до  $4,380 \pm 0,143\%$  от нормальной ткани) отделах лёгкого. Полученные результаты соответствуют существующим в литературе данным.

**Сигаретный дым.** Считается, что эмфизема лёгких, вызванная ЭСД (экстрактот сигаретного дыма), наиболее релевантна клиническим ситуациям, так как воспроизводит воздействие основного фактора риска развития эмфиземы лёгких и ХОБЛ – сигаретного дыма. Сигаретный дым – это смесь более 8 тысяч химических веществ, часть из которых образуется при горении табака [Takahashi, Y., et al., 2018]. Основными компонентами являются смола, никотин и угарный газ. Табак-специфичные нитрозамины (анг. Tobacco-specific nitrosamines, TSNA), образующиеся в процессе переработки табака, являются канцерогенами [Bekki, K., et al., 2017].

Экспозиция сигаретного дыма способствует активации альвеолярных макрофагов, напрямую индуцируя окислительный стресс через Toll-подобные рецепторы (анг. Toll-like receptor, TLR) 2, 4 и 9 типов или опосредова-

но через DAMPs (*англ.* Damage-associated molecular patterns, молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями) апоптотических или некротизированных клеток [Parras, K., et al., 2013].

V.L. Erpert et al. продемонстрировали увеличение количества Th-1 и Th-17 и экспрессию IFN- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  на мембране CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у лабораторных животных, подвергшихся воздействию сигаретного дыма [Eppert, V.L., et al., 2013]. Сигаретный дым повышает концентрацию IL-1 в бронхоальвеолярной жидкости человека и лабораторных животных. Воздействие сигаретного дыма вызывает вариабельную экспрессию IL-1 в популяции альвеолярных макрофагов и чёткую экспрессию в альвеоцитах I и II типа. Выраженная экспрессия IL-1 $\beta$  наблюдалась в эпителиальных клетках бронхов [Botelho, F.M., et al., 2011]. Использование животных моделей показало, что IL-1 $\beta$  вызывает нейтрофильную и макрофагальную инфильтрацию лёгочной ткани, расширение дистальных отделов дыхательных путей и разрушение эластиновых волокон межальвеолярных перегородок, приводя к развитию фиброзных изменений дыхательных путей и плевры [Rogliani, P., et al., 2015].

Сигаретный дым является источником активных форм азота, который способен вызвать окислительный (нитрозативный) стресс [Fischer, B.M., et al., 2014]. Под влиянием окислительного стресса происходит активация NK-клеток (*англ.* Natural killer T-cell, натуральные киллеры) и усиливается опосредованное ими воспаление тканей [Pichavant, M., et al., 2014], наблюдается рост продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов: NF- $\kappa$ B, IL-1 и IL-8. Избыток ROS замедляет скорость разрешения воспаления и ускоряет процессы разрушения лёгочной ткани [Zuo, L., et al., 2014].

Сигаретный дым вызывает повышение проницаемости альвеолярной стенки [Lu, Q., et al., 2018]. ЭСД нарушает целостность эндотелия и вызывает эндотелиальную дисфункцию. Так, в экспериментах *in vitro* ЭСД увеличивает проницаемость монослоя эндотелиальных клеток бычьей лёгочной артерии и вызывает апоптоз эндотелиальных и эпителиальных клеток лёгких [Lu, Q., et al., 2018]. Lu Q. et al. связывают это с ингибированием клеточных сигналов, опосредованных VEGF и фокальной адгезивной киназой.

Влияние сигаретного дыма на организм исследуется на лабораторных животных уже в течение длительного времени. Так, действию сигаретного дыма подвергали собак, кроликов, морских свинок и различных грызунов [Snider, G.L., et al., 1986]. Морские свинки [Wright, J.L., et al., 2002] наиболее чувствительны к воздействию сигаретного дыма. Расширение воздушного пространства у этих грызунов происходит в течение нескольких месяцев [Wright J.L., Churg A., 1990]. В случае мышей проявляется значительная зависимость резистентности/чувствительности к сигаретному дыму от линии: C57/BL6, BALB, AKR/J [Perez-Rial, S., et al., 2015; Shapiro, S.D., 2000]. Наиболее часто модель эмфиземы лёгких воспроизводят у мышей самок линии C57/BL6. Меньшей чувствительностью к сигаретному дыму

обладают крысы [Perez-Rial, S., et al., 2015]. Сигаретный дым или экстракт сигаретного дыма (ЭСД) может быть введён непосредственно в дыхательные пути мышей или путём их окуривания в специальной камере (путём подведения в неё сигаретного дыма) [Perez-Rial, S., et al., 2015]. ЭСД получают, пропуская дым тлеющих сигарет (без фильтра) через натрий-фосфатный буфер. Полученный раствор пропускают через бактериальный фильтр [Zhang, Y., et al., 2013]. He Z.H. et al. установили отсутствие значимых различий между площадью эмфиземы, вызванной ингаляцией сигаретного дыма, и площадью эмфиземы, обусловленной внутрибрюшинным введением ЭСД [He, Z.H., et al., 2015].

Длительность и кратность введения сигаретного дыма при этом может значительно варьироваться. В краткосрочной модели, предложенной Beckett E.L. et al., мыши подвергались воздействию сигаретного дыма 2 раза в сутки, 5 дней в неделю на протяжении 1-12 нед. [Beckett, E.L., et al., 2015]. McGrath-Morrow S.A. et al. окуривали 3 часа в день 5 дней в неделю на протяжении 6 месяцев [McGovern, N.N. et al., 2011]. Наиболее стойкая эмфизема лёгких формируется при ингаляции сигаретного дыма в течение 6–7 месяцев [Rahman, I. et al., 2017]. Однако с возрастом активность животных постепенно снижается, в этой связи часть из них гибнет [Hautamaki, R.D., et al., 1997].

При 2-х месячном воздействии сигаретного дыма у мышей линии C57BL/6-J наблюдается потеря реснитчатого эпителия, лимфо-макрофагальная инфильтрация, при этом количество клеток Клара не изменяется [Snider, G.L., 2000]. Экспозиция длительностью больше 6 месяцев приводит к обструкции малых дыхательных путей, воспалительной инфильтрации, разрывам альвеолярных перегородок и расширению воздушного пространства лёгочной ткани. Все эти патологические реакции нарушают нормальное функционирование лёгких и газообмен [Hautamaki, R.D., et al., 1997].

При окуривании животных наблюдается поражение других органов и систем. Beckett E.L. et al. выявили, что ингаляционное воздействие сигаретного дыма приводило к снижению мышечной массы, увеличению массы сердца и количества окружающей его жировой ткани [Beckett, E.L., et al., 2015].

Известны половые различия в чувствительности к сигаретному дыму. Так, под воздействием сигаретного дыма у самок отмечается усиление ремоделирования дистальных дыхательных путей, снижение экспрессии «антиоксидантных» генов, накопление ROS с развитием окислительного стресса по сравнению с самцами этой же линии [Tam, A., et al., 2015], наблюдается уменьшение числа биения ресничек клеток мерцательного эпителия бронхов [Simet, S.M., et al., 2010].

Модель эмфиземы лёгких, индуцированная сигаретным дымом, не стандартизованная. Для воспроизведения модели различными исследовательскими группами использовались различные марки сигарет, разное время и частота экспозиции, а также плотность дыма [He, Z.-H. et al., 2015]. В

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

этом случае высока вероятность получения нестабильной модели и низкая вероятность повторяемости результатов. Хорошей заменой обкуривания сигаретным дымом может служить применение ЭСД, который содержит практически все компоненты дыма, вдыхаемого при курении, включая свободные радикалы, токсины и электрофилы [Horiyama, S., et al., 2016], при этом возможна стандартизация модели. Приведённые в литературе данные указывают, что внутрибрюшинное и интратрахеальное введение ЭСД вызывает нарушение лёгочных функций, апоптоз клеток, разрушение альвеолярных перегородок и воспалительную инфильтрацию [He, Z.-H. et al., 2015; Qamar, W., Sultana, S., 2008]. Скорость развития воспаления и эмфизематозных повреждений выше, чем при экспозиции в сигаретном дыму. Так, при внутрибрюшинном введении ЭСД воспаление и эмфизематозные повреждения развиваются к 28 суткам, а при экспозиции в сигаретном дыму эмфизема развивается только на 6 месяц, а воспалительный процесс развивается уже через два месяца экспозиции [Shapiro, S.D., 2000].

В наших экспериментах, направленных на разработку модели эмфиземы лёгких с использованием экстракта сигаретного дыма для повышения качества доклинических исследований новых молекул с потенциальной противовоспалительной активностью, способных препятствовать развитию эмфиземы лёгких и ускорять процессы регенерации повреждённого альвеолярного эпителия и микрососудистого русла лёгких, были получены доказательства возможности стандартизации ЭСД-индуцированной эмфиземы лёгких по таким основным компонентам, повреждающим лёгкие, как смола, никотин и СО, а также по рН, и времени экспозиции повреждающего фактора. Нами проводилась оценка смертности животных, в гистологических исследованиях на препаратах лёгких изучались воспаление, площадь эмфиземы, количество капилляров, повреждённые альвеолярные стенки, размер альвеол. Предложенный нами подход моделирования предполагает предварительное интраназальное (и/н) введение липополисахарида (ЛПС), что вызывает воспаление и способствует повреждению альвеолярного эпителия и капиллярной сети, и развитию эмфиземы в лёгких после введения ЭСД к 45-м суткам наблюдения. В зависимости от задач возможно получение обратимой и необратимой эмфиземы лёгких у мышей-самцов линии C57BL/6 (Приложение, рисунок 1). Выявленные в ходе гистологических исследований препаратов лёгких мышей патологические изменения в целом соответствуют нарушениям в лёгких пациентов с эмфиземой лёгких и ХОБЛ.



## Глава 3

# СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА

### 3.1. Общие сведения

Предположение начала XX века о существовании клеток, выступающих родоначальниками всех клеток, в последующем вылилось в организацию масштабных исследований, направленных на выделение, идентификацию и характеристику стволовых клеток (СК). На настоящий момент можно говорить о сформировавшемся учении о СК. В настоящее время СК разделяют на две большие популяции – эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и стволовые клетки постнатального развития или взрослого организма (ВСК). ВСК обнаружены практически во всех органах взрослого организма, включая лёгкие [Kajstura J., Rota M., Hall S.R. et al., 2011]. По сравнению с другими клеточными популяциями организма постнатального периода ВСК – наименьшая клеточная фракция. По локализации выделяют костно-мозговые, тканеспецифичные (регионарные, соматические) и свободную фракцию (циркулирующие в крови) стволовых клеток. Максимальное количество СК во взрослом организме в костном мозге [Streckfuss-Bomeke K. et al., 2013; Мезен Н.И., Квачева З.Б., Сычик Л.М., 2014]. Костный мозг взрослого человека содержит большое количество незрелых, низко- и недифференцированных СК: ГСК, мезенхимальные СК (МСК), эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), малые эмбрионально-подобные клетки (МЭПК) [Aurrand-Lions M., Mancini S.J.C., 2018; May M., Slaughter A., Lucas D., 2018; Sugiyama T., Omatsu Y., Nagasawa T., 2019].

В тканях ВСК локализуются в специализированных «нишах». Взрослые стволовые клетки митотически активны, но уступают по этому показателю ЭСК [Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al., 1998; Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al., 2002]. Взрослые стволовые клетки – весьма гетерогенная фракция. В её состав входят не только мультипотентные стволовые клетки, но и бипотентные и унипотентные клетки-предшественники. Считается, что мультипотентные ВСК, теряя способность к самообновлению, дифференцируются в унипотентные клетки-предшественники, которые, в свою очередь, дают начало специализированным клеткам того или иного типа ткани [Chao M.P., Seita J., Weissman I.L., 2008]. Таким образом, ВСК участвуют в репаративной регенерации в течение жизненного цикла.

Существует точка зрения о нецелесообразности вовлечения клеток с огромным пролиферативным и дифференцировочным потенциалом в процессы репаративной регенерации. Для этого достаточно митотически активных зрелых клеток и унипотентных клеток-предшественников. Наибо-

лее целесообразно задействовать глубокий резерв тканевой регенерации при массивных повреждениях тканей при травмах и хронических заболеваниях печени, лёгких, поджелудочной железы, сердечно-сосудистой, нервной и других систем. Как правило, патологическая регенерация в корне отлична от репаративной регенерации с точки зрения нарушения течения известных типовых патологических процессов (воспаление и фиброз, и многих других). При патологической регенерации важна слаженная «оркестровка» близлежащих и пространственно удалённых 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; Bjercknes M., Cheng H., 2005; Blanpain C., Fuchs E., 2006; Rennert R.C., Sorkin M., Garg R.K., 2012]. При этом значительной важностью наделяется отрицательная регуляция всех этих процессов. Только при положительном взаимодействии всех этих механизмов реализуется достаточная для восстановления клеток и тканей мобилизация, миграция, рекрутирование, пролиферация и дифференцировка стволовых клеток больного [Rennert R.C., Sorkin M., Garg R.K., 2012].

### **3.2. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА**

*Гемопозитическая стволовая клетка.* Несмотря на огромное представительство в мировой специализированной литературе данных о стволовых клетках костного мозга, мы посчитали необходимым представить краткую характеристику популяций тех клеток, которые, по мнению многих исследователей, участвуют в патогенезе и клеточной регенерации. Костный мозг выступает в качестве резервуара для гемопозитических стволовых клеток (ГСК), эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и малых эмбрионально-подобных клеток (МЭПК). В ответ на высокие концентрации хемокинов или повреждение тканей происходит мобилизация стволовых клеток из костного мозга в циркулирующую кровь [Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D. et al., 2005; Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W. et al., 2008; Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009] с последующей миграцией по кровотоку к участку повреждения в мышцах, сердце, почках, коже, костях, печени, мозге [Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D. et al., 2005; Hamada H., Kim M.K., Iwakura A. et al., 2006; Schenk S., Mal N., Finan A. et al., 2007; Qian H., Yang H., Xu W. et al., 2008; Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Xynos A., Corbella P., Belmonte N. et al., 2010; Deng J., Zou Z.M., Zhou T.L. et al., 2011; Park D., Spencer J.A., Koh B.I. et al., 2012; Zhao W., Li J.J., Cao D.Y. et al., 2012]. Многие авторы полагают участие СК в восстановлении структуры и функций тканей за счёт паракринных эффектов [Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D. et al., 2005;

Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. et al., 2010; Si Y., Tsou C.L., Croft K., Charo I.F., 2010]. Механизм дифференцировки СК в клетки повреждённых органов является основным.

Гемопоэтическая стволовая клетка костного мозга отвечает за пополнение клеточных компонентов крови: лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Содержание ГСК составляет около 0,01-0,15% от всех клеток костного мозга [Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Challen G.A. et al., 2009]. Используемая для идентификации комбинация поверхностных антигенов состоит из клон-специфического маркера (Lin), CD45, c-kit и / или Sca-1 у мышей и CD34, CD133 у человека [Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Shin D.M., Ratajczak J., 2008; Xynos A., Corbella P., Belmonte N., 2010]. ГСК с маркером CD34 играют важную роль в развитии миело- и эритропоэза во время эмбрионального и постнатального развития [Cheng J., Baumhueter S., Sacalano G. et al. 1996].

Кроме упомянутого выше антигенного профиля для изоляции и идентификации ГСК мышей и человека используют комбинацию рецепторов клеточной поверхности семейства SLAM (signaling lymphocyte activation molecule): CD48, CD150 и CD244 [Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al., 2005; Larochelle A., Savona M., Wiggins M. et al., 2011].

Такое понятие как «ниша» позволило во многом объяснить жизнедеятельность ГСК в норме и при патологии [Schofield R., 1978; Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T., 2001; Watt F.M., Hogan B.L.M., 2000]. Термин «ниша» обозначает совокупность факторов, обеспечивающих самовоспроизведение и дифференцировку ГСК и их дочерних клеток-предшественников [Lin H., 2002; Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al., 2003; Zhang J., Niu C., Ye L. et al., 2003; Moore K.A., Lemischka I.R., 2006; Xie Y., Yin T., Wiegraebe W. et al., 2009; Chan C.K., Chen C.C., Luppen C.A. et al., 2008; Kiel M.J., Morrison S.J., 2008; Wagner W., Horn P., Bork S., Ho A.D., 2008]. Среди факторов следует выделить наличие базальной мембраны, молекул внеклеточного матрикса и соседние клетки, продуцирующие факторы роста. Нарушение экспрессии ангиопоэтина, тромбопоэтина, хемокина CXCL12, остеопонтина и др. молекул существенно сказывается на положении ГСК в «нише».

По современным представлениям ГСК локализуются вблизи эндоста – гетерогенный слой клеток, выстилающий костно-мозговую полость. Это «эндостальная ниша». 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., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al., 2003; Wu J.Y., Scadden D.T., Kronenberg H.M., 2009]. Клетки экспрессируют Ang-1, удерживающий ГСК в нише, Bmi-1, отвечающий за пролиферацию, Jagged-1, способствующий самоподдержанию ГСК [Pazianos G.,

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Ugoezwa M., Reya T., 2003; Ohishi K., Katayama N., Shiku H. et al., 2003; Suda T., Suda J., Ogawa M., 1983; Taichman R.S., 2005]. Паратиреоидный гормон (ПТГ) активирует остеобласты и стимулирует их деление. С другой стороны, ПТГ стимулирует экспрессию Jagged-1 на поверхности остеобластов и через взаимодействие Jagged-1 с Notch-1-сигнальным путём регулирует ГСК [Weber J.M., Forsythe S.R., Christianson C.A. et al., 2006]. Расположение ГСК по отношению к эндосту зависит от их функционального состояния и активности клеток микроокружения [Wilson A., Trumpp A., 2006; Lo Celso C., Klein R.J., Scadden D.T. et al., 2009]. Так, длительно репопулирующие и непролиферирующие ГСК располагаются ближе к остеобластам и эндосту, нежели более зрелые мультипотентные или коммитированные клетки-предшественники [Lo Celso C., Klein R.J., Scadden D.T. et al., 2009].

Устойчивые ассоциации CD150<sup>+</sup> ГСК с эндотелиальными клетками сосудов в костном мозге представляют как «сосудистую нишу» для ГСК [Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al., 2005]. Через эндотелиальные клетки циркулирующие гормоны, цитокины и факторы роста опосредованно влияют на ГСК. Рекрутирование ГСК в «сосудистую нишу» происходит под действием фактора роста фибробластов 4 (ФРФ-4), стромального клеточного фактора-1 (SDF-1) и в условия повышения концентрации O<sub>2</sub>. Хоуминг мобилизованной в кровотоке костно-мозговой ГСК в «сосудистую нишу» осуществляется при низком уровне SDF-1 [Tong Y., Linheng L., 2006]. При повышении уровня SDF-1 наблюдается «возвращение» ГСК в костный мозг.

Поскольку компоненты эндостальной и сосудистой «ниши» находятся в тесной функциональной и структурной взаимосвязи, более правильно говорить об «эндостально-сосудистой нише» для ГСК [Kiel M.J., Morrison S.J., 2008; Xie Y., Yin T., Wiegraebe W. et al., 2009; Lo Celso C., Klein R.J., Scadden D.T. et al., 2009].

На сегодняшний момент вклад костно-мозговых ГСК в ремодуляцию и регенерацию тканей остаётся неопределённым. Известны отдельные сообщения о мобилизации ГСК из костного мозга в кровотоке у пациентов при инфаркте миокарда [Massa M., Rosti V., Ferrario M. et al., 2005], инсульте [Paczkowska E., Kucia M., Koziarska D. et al., 2009], поражении печени [Gehling U.M., Willems M., Schlagner K. et al., 2010] и ожогах кожи [Drukala J., Paczkowska E., Kucia M. et al., 2012]. Остаётся открытым вопрос о связи воспаления с ГСК. Озвучена гипотеза о том, что ГСК может дифференцироваться в клетки поражённой ткани и, тем самым, восстанавливать её структуру и функцию [Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al., 2001; Lin F., Cordes K., Li L. et al., 2003]. Однако доказательства пластичности ГСК *in vivo* не представлены. Между тем, нельзя исключить из обсуждения пластичности ГСК того, что системные и местные инъекции ГСК при соответствующем цитокиновом сопровождении улучшают состояние травмированной ткани [Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L. et al., 2004; Si Y., Tsou C.L., Croft K., Charo I.F., 2010].

**Эндотелиальная прогениторная клетка.** Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) участвуют в васкулогенезе постнатального периода онтогенеза. Известны гемопоэтические и негемопоэтические ЭПК. Для каждой из субпопуляций ЭПК характерны специфический поверхностный профиль антигенов и функции [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011].

Гемопоэтические ЭПК – эта васкулогенная субпопуляция клеток. Есть мнение, что эти клетки происходят из костно-мозговых ГСК [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011] и представляют собой альтернативу резидентным предшественникам эндотелиальных клеток [Yoon C.H., Hur J., Park K.W. et al., 2005; Shepherd R.M., Capoccia B.J., Devine S.M. et al., 2006]. У человека гемопоэтические ЭПК экспрессируют маркер CD34, у мыши – c-kit / Sca-1. Кроме этого, описана ко-экспрессия маркеров эндотелиальной клетки (CD31, vWF, VEGFR2), пан-гемопоэтического маркера (CD45) и моноцитарных маркеров (CD14 и CD163) [Yoon C.H., Hur J., Park K.W. et al., 2005; Timmermans F., Van Hauwermeiren F., De Smedt M. et al., 2007; Yoder M.C., Mead L.E., Prater D. et al., 2007; Timmermans F., Plum J., Yoder M.C. et al., 2009]. Клетки секретируют VEGF, IL-8, хемокин CXCL8, фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), ремодулируют и регенерируют сосуды, в основном, через паракринные механизмы [Yoon C.H., Hur J., Park K.W. et al., 2005; Yoder M.C., Mead L.E., Prater D. et al., 2007]. С другой стороны, гемопоэтические ЭПК способны включаться в эндотелий сосудов [Bailey A.S., Willenbring H., Jiang S. et al., 2006; Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011].

Негемопоэтические ЭПК отрицательны по маркеру CD45 и маркерам моноцитов, но при этом экспрессируют антигены зрелых эндотелиальных клеток [Yoon C.H., Hur J., Park K.W. et al., 2005; Yoder M.C., Mead L.E., Prater D. et al., 2007; Timmermans F., Plum J., Yoder M.C. et al., 2009]. Предположительно, клетки происходят из кровеносных сосудов или негемопоэтических клеток костного мозга [Asahara T., Kawamoto A., Masuda H., 2011]. Для них характерна низкая секреторная активность. Полагают, что негемопоэтические ЭПК мигрируют к очагу повреждения, дифференцируются в эндотелиальные клетки и таким образом участвуют в формировании сосудов [Yoder M.C., Mead L.E., Prater D. et al., 2007].

При многих заболеваниях ЭПК важны в регенерации тканей. Так, в ответ на ишемическое повреждение происходит мобилизация костно-мозговых ЭПК [Massa M., Rosti V., Ferrario M. et al., 2005; Sandri M., Beck E.B., Adams V. et al., 2011]. Мобилизованные ЭПК участвуют в неоваскуляризации, дифференцируясь в эндотелиальные клетки и секретируя VEGF, SDF-1, IGF-1 [Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D. et al., 2005; Urbich C., Aicher A., Heeschen C. et al., 2005]. Надо отметить, что секретируемые ЭПК цитокины дополнительно содействуют миграции зрелых эндотелиальных клеток и резидентных клеток-предшественников в область

формирования сосуда. При дефиците и дисфункции ЭПК наблюдается плохое заживление ран и утяжеление течения сахарного диабета [Fadini G.P., Miorin M., Facco M. et al., 2005; Sorrentino S.A., Bahlmann F.H., Besler C. et al., 2007]. Опыты с трансплантацией показывают, что аллогенные костно-мозговые ЭПК препятствуют расширению травмы и улучшают функциональные показатели животных в условиях инсульта [Fan Y., Shen F., Frenzel T. et al., 2010] и инфаркта миокарда [Schuh A., Liehn E.A., Sasse A. et al., 2008], повреждения печени и лёгких [Lam C.F., Roan J.N., Lee C.H. et al., 2011; Nakamura T., Nakagawa M., Ichisaka T. et al., 2011].

**Мезенхимальные стволовые клетки.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга – это клетки негемопоэтического происхождения. МСК выделены не только из костного мозга [Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al., 1999], но и из жировой ткани [Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al., 2001], крови [Chong P.P., Selvaratnam L., Abbas A.A., Kamarul T., 2012], лёгких, мозга [Da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B., 2006], семенников [Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Пахомова А.В., Першина О.В., 2019] и скелетных мышц [Dodson M.V., Hausman G.J., Guan L. et al., 2010]. В естественных условиях МСК находятся в периваскулярной нише [Da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B., 2006; Feng J., Mantesso A., Sharpe P.T., 2010].

На костно-мозговых МСК человека определяются антигены CD105, CD73 и CD90, при этом отсутствуют клон-специфические маркеры lineage-specific и CD34 [Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al., 2006]. МСК костного мозга мышей экспрессируют Sca-1 и/или PDGFR $\alpha$ , при этом поверхностные маркеры гемопоэтических клеток не определяются [Hamou S., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y. et al., 2009]. По функциональным характеристикам МСК костного мозга мышей во многом сопоставимы с человеческими: клеткам присущи самообновление, адгезия к пластику, мультипотентность (дифференцировка в пробирике в остеобласты, адипоциты и хондробласты) [Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al., 1999; Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al., 2005]. Дополнительно МСК мышей способны дифференцироваться *in vitro* в миоциты, кератиноциты и нейроноподобные клетки [Sasaki M., Abe R., Fujita Y. et al., 2008; Bae K.S., Park J.B., Kim H.S. et al., 2011].

В других исследованиях МСК костного мозга определяются по экспрессии на своей поверхности CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, они негативны по CD31, CD34, CD45, HLA-DR [Nejad-Moghaddam A., Panahi Y., Abdollahpour Alitappeh M. et al., 2015]. Эти клетки мультипотентны и способны к самоподдержанию [Foronjy R.F., Majka S.M., 2012; Kruk D.M., Heijink I.H., Slebos D.J. et al., 2018].

По разным источникам МСК костного мозга составляет 0,001% – 0,08% от общего количества миелокариоцитов [Pittenger M.F., Mackay A.M.,

Beck S.C., et al., 1999; Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009]. При экспериментальной травме МСК мобилизуются в кровь [Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. et al., 2010] и мигрируют в повреждённый участок ткани [Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009; Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. et al., 2010], где за счёт паракринного механизма (секреция HGF, EGF, VEGF и sFRP-4) способствуют регенерации клеток [Nguyen B.K., Maltais S., Perrault L.P. et al., 2010; Katsha A.M., Ohkouchi S., Xin H. et al., 2011]. Не исключается участие МСК в регуляции внеклеточного матрикса [Xu X., Xu Z., Xu Y., Cui G., 2005; Nguyen B.K., Maltais S., Perrault L.P. et al., 2010], иммунном ответе (IL-1 антагонизм, секреция IL-10) [Ortiz L.A., DuTreil M., Fattman C. et al., 2007; Dayan V., Yannarelli G., Billia F. et al., 2011], пролиферации и дифференцировке регионарных клеток-предшественников [Hatzistergos K.E., Quevedo H., Oskouei B.N. et al., 2010]. МСК костного мозга вовлекаются в восстановление целостности сосудов и неоваскуляризацию при ишемии кожи у мышей [Kasper G., Dankert N., Tuischer J. et al., 2007; Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H. et al., 2009].

В условиях экспериментальной травмы МСК костного мозга способны дифференцироваться в 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., Spencer J.A., Koh B.I. et al., 2012], клетки скелетных мышц [De La Garza-Rodea A.S., Van Der Velde I., Boersma H. et al., 2011] и нейроноподобные клетки [Deng J., Zou Z.M., Zhou T.L. et al., 2011]. Однако эти события крайне редки.

Озвученные свойства костно-мозговых МСК делают их особенно привлекательными для клеточной терапии. Аутологичные МСК костного мозга, во-первых, 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., Johnsen V.L., Ma L. et al., 2012]. Во-вторых, при экспериментальной травме ускоряют регенерацию мозга [Borlongan C.V., Glover L.E., Tajiri N. et al., 2011], печени [Zhao W., Li J.J., Cao D.Y. et al., 2012], почек [Qian H., Yang H., Xu W. et al., 2008] и лёгких [Pati S., Gerber M.H., Menge T.D. et al., 2011], МСК участвуют в формировании иммунной толерантности [Ge W., Jiang J., Arp J. et al., 2010; Jui H.Y., Lin C.H., Hsu W.T. et al., 2012].

**Малая эмбрионально-подобная клетка.** Из всех стволовых клеток костного мозга малые эмбрионально-подобные клетки (МЭПК) наиболее примитивные [Kucia M., Reza R., Campbell F.R. et al., 2006; Zuba-Surma E.K., Kucia M., Wu W. et al., 2008; Sovalat H., Scrofani M., Eidenschenk A. et al., 2011] и малочисленные: у мышей составляют 0,006% от всех клеток кост-

ного мозга [Zuba-Surma E.K., Kucia M., Wu W. et al., 2008]. МЭПК отличаются малыми размерами, большим ядром и сдвигом ядерно-плазматического отношения в сторону ядра, эухроматин (области ДНК, лишённые нуклеосом и гиперчувствительные к обработке ДНК-азой), высокая теломеразная активность и плюрипотентность: способность дифференцироваться в клетки всех трёх зародышевых листков [Kucia M., Reza R., Campbell F.R. et al., 2006]. Все эти свойства характерны и для эмбриональных стволовых клеток. МЭПК негативны по lineage- и CD45. У мышей наблюдается экспрессия CXCR4 и Sca-1, у человека – CD133 и CD34 [Zuba-Surma E.K., Kucia M., Wu W. et al., 2008; Sovalat H., Scrofani M., Eidenschenk A. et al., 2011]. Кроме этого, на клеточной поверхности МЭПК выявляются антигены плюрипотентности (Oct-4, SSEA-1) [Kucia M., Reza R., Campbell F.R. et al., 2006] и антиген эпибласта / зародышевой линии стволовых клеток [Shin D.M., Liu R., Klich I. et al., 2010].

На ранней стадии гастрюляции МЭПК, возможно, принимают участие в формировании тканей и органов, репопулируют ткани и являются предтечей тканеспецифичных СК постнатального развития [Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Shin D.M. et al., 2008]. Обладая плюрипотентностью на уровне ЭСК и регенеративным потенциалом, МЭПК костного мозга участвуют в посттравматической регенерации ткани. Этот вывод основан на клинических и экспериментальных наблюдениях. Известна мобилизация клеток в кровь у животных в условиях экспериментальной травмы и у пациентов с ишемической болезнью сердца и инсультом [Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W. et al., 2008; Paczkowska E., Kucia M., Koziarska D. et al., 2009; Wojakowski W., Tendera M., Kucia M. et al., 2009]. При индуцированном инфаркте миокарда небольшая часть МЭПК подвергается дифференцировке в кардиомиоциты [Dawn B., Tiwari S., Kucia M.J. et al., 2008].

### **3.3. Рекрутирование**

Рекрутирование СК костного мозга в повреждённую ткань – это одно из необходимых условий для регенерации. В процессе рекрутирования СК проходит многие этапы: мобилизация из костного мозга в кровотока, хоуминг, движение по сосудам, адгезия на эндотелии, миграция через эндотелий (трансэндотелиальный переход) и, наконец, движение в пределах внеклеточного пространства к месту повреждения. Обеспечивает рекрутирование каскад биологически активных молекул. Основной молекулой рекрутирования считается фактор стромальных клеток (stromal cell-derived factor 1, SDF-1), другое название – хемокин подсемейства CXС (chemokine (C-X-C motif) ligand 12, CXCL12). У человека SDF-1 (или CXCL12) кодируется геном CXCL12.

В эмбриогенезе SDF-1 управляет миграцией разных типов стволовых клеток и играет важную роль в формировании органов [Lewellis S.W., Knaut H., 2012].



Во взрослом организме SDF-1 является хемоаттрактантом [Rankin S.M., 2012]. Мишенью для SDF-1 выступают ГСК и В-лимфоциты [Rankin S.M., 2012], ЭПК [Hiasa K., Ishibashi M., Ohtani K. et al., 2004; Tang Y.L., Qian K., Zhang Y.C. et al., 2005], МСК и МЭПК [Kucia M., Reza R., Campbell F.R. et al., 2006; Liu X., Duan B., Cheng Z. et al., 2011]. В основе мобилизации и самонаведения в постнатальный период лежит взаимодействие цитокина SDF-1 с рецептором (CXCR-4) на клетках костного мозга [Abbott J.D., Huang Y., Liu D. et al. et al., 2004; Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J. et al., 2004]. Наиболее полно описана регуляция рекрутирования ГСК [Kavanagh D.P., Kalia N., 2011]. Полагают, что SDF-1 не даёт ГСК раньше времени покинуть «нишу» в костном мозге, а, с другой стороны, обеспечивает мобилизацию и высвобождение после травмы. Многие авторы отмечают схожесть основных узловых моментов взаимодействия SDF-1 с CXCR-4 на ГСК и других субпопуляциях СК [Chavakis E., Urbich C., Dimmeler S., 2008; Chen F.M., Wu L.A., Zhang M. et al., 2011].

До определённого момента считалось, что SDF-1 взаимодействует только с рецептором CXCR4 (CXCL12-CXCR4) [Bleul C.C., Farzan M., Choe H. et al., 1996]. Однако были получены доказательства связывания CXCL12 с CXCR7 [Balabanian K., Lagane B., Infantino S. et al., 2005; Bleul C.C., Farzan M., Choe H. et al., 1996; Burns J.M., Summers B.C., Wang Y. et al., 2006; Cruz-Orengo L., Holman D.W., Dorsey D. et al., 2011]. При этом активность хемокина связана с такими провоспалительными стимулами, как ЛПС, фактор некроза опухоли и ИЛ-1. Кроме этого, SDF-1 стимулирует пролиферацию, защищает злокачественные В-клетки от апоптоза при хроническом лимфоцитарном лейкозе [Burger J.A., Tsukada N., Burger M. et al., 2000].

SDF-1 находится под контролем индуцируемого гипоксией фактора  $1\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  – HIF-1 $\alpha$ ) [Youn S.W., Lee S.W., Lee J. et al., 2011]. Гипоксия в костном мозге активирует SDF-1 и приводит к его связыванию с рецептором CXCR4, к примеру, на ГСК [Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J. et al., 2004]. В результате модулируется экспрессия молекул адгезии, возрастает пролиферация и выживаемость клеток [Lataillade J.J., Clay D., Dupuy C. et al., 2000; Hidalgo A., Sanz-Rodriguez F., Rodriguez-Fernandez J.L. et al., 2001; Liu X., Duan B., Cheng Z. et al., 2011]. В условиях гипоксии, индуцированной инсультом, возникающая гипоксия способствует секреции SDF-1 эндотелиальными клетками и тромбоцитами. Возникающий градиент концентрации хемокина способствует CXCR4-опосредованной мобилизации стволовых клеток костного мозга (в частности, ГСК и ЭПК) в кровь и миграции к очагу поражения [Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J. et al., 2004; Hiasa K., Ishibashi M., Ohtani K. et al., 2004; Tang Y.L., Qian K., Zhang Y.C. et al., 2005; Massberg S., Konrad I., Schurzinger K. et al., 2006; Youn S.W., Lee S.W., Lee J. et al., 2011].

Механизм SDF-1-опосредованной мобилизации стволовых клеток костного мозга до конца не изучен. Многие исследователи утверждают,

что в этот процесс вовлекаются и другие молекулы [Hiasa K., Ishibashi M., Ohtani K. et al., 2004; Kwon S.M., Eguchi M., Wada M. et al., 2008; Belemabedada F., Uchida S., Martire A. et al., 2008; Si Y., Tsou C.L., Croft K., Charo I.F., 2010; Li Y., Hiroi Y., Ngoy S. et al., 2011]. Так, после SDF-1-опосредованной мобилизации стволовые клетки мигрируют и находятся в кровеносных сосудах зоны ишемической травмы, затем преодолевают CXCR4 десенсибилизацию, происходит миграция к очагу поражения и тканеспецифическая адгезия [Peled A., Grabovsky V., Habler L. et al., 1999; Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J. et al., 2004]. Не исключено участие в этом процессе матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) стромальных клеток, которая участвует в ремодуляции внеклеточного матрикса [Heissig B., Hattori K., Dias S. et al., 2002].

Оксид азота (NO) играет важную роль в гомеостазе сосудов. При повреждениях тканей эта сигнальная молекула принимает участие во взаимодействии SDF-1 и CXCR4 стволовых клеток костного мозга. Однако это участие опосредованное. Так, в ишемической ткани мышцы эндотелиальная синтаза оксида азота (endothelial nitric oxidesynthase, eNOS) повышает экспрессию SDF-1, вовлекая в этот процесс цГМФ-зависимый механизм [Li N., Lu X., Zhao X. et al., 2009]. Блокирование eNOS ингибирует SDF-1-опосредованный хоминг эндотелиальных прогениторных клеток [Hiasa K., Ishibashi M., Ohtani K. et al., 2004]. Кроме этого, eNOS через ICAM-1- и CXCR4-зависимые механизмы участвует в адгезии клеток-предшественников эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого эндотелия [Kaminski A., Ma N., Donndorf P. et al., 2008]. ICAM-1 представляет собой молекулу межклеточной адгезии 1 типа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов.

Notch-сигнализация принимает активное участие во многих процессах взрослого организма, в том числе в регуляции самообновления, экспансии, выживания и дифференцировки стволовых клеток [Varnum-Finney B., Xu L., Brashem-Stein C. et al., 2000; Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J. et al., 2005; Mizutani K., Yoon K., Dang L. 2007]. На модели ишемического повреждения у мышей продемонстрирована важность взаимодействия Notch1 с его лигандом Jagged для рекрутирования МСК и ЭПК костного мозга [Kwon S.M., Eguchi M., Wada M. et al., 2008; Li Y., Hiroi Y., Ngoy S. et al., 2011]. По результатам своих исследований Wang Y.C. и соавт. (2009) выдвинули гипотезу о существовании Notch-опосредованной регуляции CXCR4 рецептора на клетках костного мозга [Wang Y.C., Hu X.B., He F. et al., 2009]. Уменьшение экспрессии CXCR4 рецептора на поверхности костно-мозговых МСК у Notch-нокаутных мышей отчасти подтверждают взаимодействие CXCR4 и Notch-сигналинга [Li Y., Hiroi Y., Ngoy S. et al., 2011].

Относящийся к группе СС-хемокинов ( $\beta$ -хемокинов) CCL2 (С-С motifligand 2) или MCP-1 представляет собой мощный фактор хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих. Цитокин контролирует активность клеток костного мозга, в частности, их миграцию к очагу воспаления.

Рецептором для MCP-1 является CCR2 (C-C chemokine receptor type 2 или CD192 (кластер дифференциации 192)). Продемонстрирована важность взаимодействия MCP-1 с рецептором CCR2 для хоминга и приживления в очаге поражения костно-мозговых стволовых клеток у мышей с ишемией миокарда [Belema-Bedada F., Uchida S., Martire A. et al., 2008]. MCP-1-опосредованная миграция и хемотаксис мобильных клеток происходят за счёт формирования ламелиподий от их тела путём сокращения внутренних нитей актина цитоскелета [Belema-Bedada F., Uchida S., Martire A. et al., 2008]. Однако, по мнению ряда авторов, MCP-1 / CCR2 путь сигнализации не столь распространён для стволовых клеток, как, к примеру, SDF-1 / CXCR4 сигнализация. На это указывает незначительное количество CCR2 рецептора на поверхности ЭПК человека [Walenta K.L., Bettink S., Bohm M., Friedrich E.B., 2011].

В качестве молекул мобилизации и рекрутирования стволовых клеток костного мозга рассматриваются VEGF и G-CSF (Г-КСФ). На различных моделях патологии продемонстрировано содействие VEGF и G-CSF мобилизации СК в травмированную ткань и органы, васкулогенезу и регенерации тканей [Hopkins S.P., Bulgrin J.P., Sims R.L. et al., 1998; Hattori K., Dias S., Heissig B. et al., 2001; Wu X., Wang K., Cui L. et al., 2008; Pitchford S.C., Furze R.C., Jones C.P., 2009]. Создавая введением экзогенного G-CSF градиента концентрации хемокина в области травмы, можно снизить концентрацию SDF-1 в костном мозге у мышей, что способствует CXCR4-опосредованной мобилизации ГСК и ЭПК [Levesque J.P., Hendy J., Takamatsu Y. et al., 2003; Pitchford S.C., Furze R.C., Jones C.P., 2009].

Как известно, активность VEGF напрямую связана с экспрессией VEGFR на поверхности клеток костного мозга. Взаимодействие VEGF с VEGF-рецептором-2 (VEGFR-2) стимулирует миграцию и выживание в участке травмы ЭПК [Pitchford S.C., Furze R.C., Jones C.P., 2009]. При этом возможно вовлечение VEGF в HIF-1 $\alpha$ -индуцированную неоваскуляризацию у мышей [Oladipupo S., Hu S., Kovalski J. et al., 2011]. В свою очередь, контакт VEGF с VEGF-рецептором-1 (VEGFR-1) ингибирует мобилизацию ГСК. Между тем, существует опасность использования VEGF и G-CSF для терапии. У человека одновременно с действием на стволовые клетки VEGF и G-CSF способствуют мобилизации и миграции в зону поражения специфических для индукции и поддержания ишемии конечностей и ишемического инсульта клеток [Hasselblatt M., Jeibmann A., Riesmeier B. et al., 2007; Brandao D., Costa C., Canedo A. et al., 2011].

Рекрутирование СК в область травмы сопровождается экспрессией множества молекул, которые участвуют в продвижении клеток по сосудам и адгезии, их трансэндотелиальной миграции и миграции во внеклеточном пространстве. В этой связи важны такие молекулы движения клеток, как селектины (P-селектин, E-селектин) [Ruster B., Gottig S., Ludwig R.J. et al., 2006; Thankamony S.P., Sackstein R., 2011], молекулы адгезии (VCAM-1/

VLA-4, ICAM-1/ $\beta$ 2 интегрин) [Yoon C.H., Hur J., Oh I.Y. et al., 2006; Ruster B., Gottig S., Ludwig R.J. et al., 2006; Thankamony S.P., Sackstein R., 2011], хемокины или молекулы трансэндотелиальной миграции (CXCL9, CXCL16, CCL20, CCL25) [Chamberlain G., Smith H., Rainger G.E., Middleton J., 2011]. Особая роль для успешной клеточной миграции в повреждённой ткани принадлежит разрушающим внеклеточный матрикс ферментам / ингибиторам (MMP-2, MMP-9) [Ries C., Egea V., Karow M. et al., 2007; Tondreau T., Meuleman N., Stamatopoulos B. et al., 2009]. В условиях травмы только согласованная работа всей этой сложной молекулярной сети позволяет собирать в повреждённом участке ткани определённый набор СК, лишь отчасти мобилизованных из костного мозга, и вовлекать их в регенерацию.

### **3.4. Стволовые и прогениторные клетки лёгких**

Лёгкое представляет собой сложный орган, в организации которого принимают участие более 40 различных дифференцированных типов клеток, при этом в разных анатомических областях лёгочной ткани выявлен свой предшественник (стволовая клетка) [Sueblinvong V., Weiss D.J., 2010; Kajstura J., Rota M., Hall S.R. et al., 2011]. Пребывая в малом количестве, СК наиболее часто локализуются в специализированных «нишах» внутри лёгочной ткани и / или сосудах. Считается, что СК способствуют репаративной регенерации лёгочной паренхимы в условиях нормальной жизнедеятельности. При развитии ХОБЛ происходит массивное разрушение микро- и макроструктуры лёгких. Поэтому вполне закономерно привлечение различных стволовых клеток для регенерации повреждённой альвеолярной ткани.

***Базальные клетки эпителия трахеи и бронхов.*** Ещё в 1995 г. было показано, что эпителиальные клетки бронхов человека после трансплантации в оголённую трахею крысы способны дифференцироваться в большое количество клеточных линий с различной способностью дифференцировки, в том числе и в железистые клетки [Engelhardt J.F., Schlossberg H., Yankaskas J.R., Dudus L., 1995]. Эти эксперименты продемонстрировали огромный регенераторный потенциал клеток, который возможен только у СК. Дальнейшие исследования с использованием новых технологий, в том числе иммунофенотипизации, расширили представления о СК трахеи и бронхов. Так, базальные клетки эпителия трахеи и бронхов экспрессируют на своей поверхности CD44, CD49f, CD151, CD166, NGFR и EGFR, а в их цитозоле обнаружены цитокератины CK5, CK14, CK17 и p63 [Nakajima M., Kawana-mi O., Jin E. et al., 1998; Evans M.J., Van Winkle L.S., Fanucchi M.V., Plopper C.G., 2001; Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al., 2009; Ghosh M., Ahmad S., Jian A. et al., 2013]. После трансплантации эти клетки могут полностью восстановить эпителий. Так, в исследованиях

Van de Laar E. и соавт. базальные клетки эпителия трахеи человека с иммунофенотипом CD44<sup>+</sup>CK5<sup>+</sup>p63<sup>+</sup> способны были восстановить поверхностный и слизистый эпителий после 5 недель культивирования на оголённой трахее [Van de Laar E., Clifford M., Hasenoeder S. et al., 2014]. Трансплантация базальных клеток эпителия бронхов человека в повреждённые нафталином лёгкие мышей приводила к восстановлению эпителия [Ghosh M., Ahmad S., White C.W., Reynolds S.D., 2017]. В этой связи базальные клетки эпителия трахеи и бронхов могут считаться стволовыми клетками.

Незрелые клетки трахеи и бронхов фенотипически и функционально многообразны. К примеру, известно, что у человека базальные клетки эпителия трахеи (CD44<sup>+</sup>CD166<sup>+</sup>NGFR<sup>+</sup>) и железистые клетки подслизистой основы трахеи (CD166<sup>+</sup>) *in vitro* демонстрируют одинаковую способность к самообновлению и дифференциации в эпителиальные клетки [Hegab A.E., Ha V.L., Darmawan D.O. et al., 2012]. В свою очередь, базальные эпителиальные клетки с фенотипом CD151<sup>-</sup>CK5<sup>+</sup>CK14<sup>+</sup>TF<sup>+</sup> обладают высоким митотическим индексом [Ghosh M., Ahmad S., Jian A. et al., 2013], а базальные эпителиальные клетки бронхов, экспрессирующие CD49f, NGFR, p63 способны как к самообновлению, так и к дифференциации в ресничные и секреторные клетки трахеи [Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al., 2009].

Исследования Shaykhiev R. и соавт. показали, что эпидермальный фактор роста (EGF), действуя *in vitro* на рецепторы EGFR базальных клеток бронхов третьего и четвертого порядка, влияет на их дифференциацию, при этом наблюдается экспрессия плоскоклеточных (СК14, СК6) и мезенхимальных маркеров (виментин). С другой стороны, ухудшается их способность генерировать соединительный апикальный комплекс, необходимый для проницаемости эпителия [Shaykhiev R., Zuo W.L., Chao I.W. et al., 2013].

Интересно, что курение табака увеличивает экспрессию EGF в ресниччатых клетках эпителия бронхов [Shaykhiev R., Zuo W.L., Chao I.W. et al., 2013]. Базальные клетки человека (СК5<sup>+</sup>), выделенные из бронхов третьего и четвёртого порядка у некурящих, после воздействия экстракта сигаретного дыма в экспериментах *in vitro* показали повышенную экспрессию амфирегулина (AREG, EGF-подобный фактор роста), увеличение пролиферации с экспрессией маркера пролиферирующих клеток Ki-67 и секрецию муцинов MUC5AC и MUC5B. У тех же базальных клеток после обработки амфирегулином снижается активность дифференцировки, что выражается в уменьшении образования новых ресничек на своей поверхности и, следовательно, приводит к нарушению образования плотных контактов с соседними клетками [Zuo W.L., Yang J., Gomi K. et al., 2017]. Между тем, полученные из бронхов третьего и четвертого порядка некурящих добровольцев и пациентов с ХОБЛ базальные клетки человека с фенотипом СК5<sup>+</sup>p63<sup>+</sup> показали сверхэкспрессию TROP-2 и увеличение митотической активности в условиях *in vitro* [Liu Q., Li H., Wang Q. et al., 2016]. Как известно, TROP-2 является трансмембранным гликопротеином и обеспечивает функциони-

рование сигналинга клеточного выживания и пролиферации, и указывает на приобретение клетками стволовости [Shvartsur A., Bonavida B., 2015]. TROP-2 появляется при многих опухолях.

У курильщиков с нормальной функцией лёгких и пациентов с ХОБЛ уровень экспрессии амфирегулина в базальных СК6<sup>+</sup> клетках лёгких также оказался выше, чем у здоровых некурящих добровольцев [Zuo W.L., Yang J., Gomi K. et al., 2017]. Базальные СК6<sup>+</sup> клетки выделены из бронхо-альвеолярного лаважа. В базальных клетках (СК5<sup>+</sup>р63<sup>+</sup>) дыхательных путей, полученных при проведении лобэктомии у пациентов с ХОБЛ, обнаружено увеличение экспрессии TROP-2 по сравнению с некурящими добровольцами. Экспрессия TROP-2 коррелировала с экспрессией Ki-67 в эпителиальных клетках больных ХОБЛ [Liu Q., Li H., Wang Q. et al., 2016]. У больных ХОБЛ количество базальных клеток бронхов с фенотипом СК5<sup>+</sup>СК14<sup>+</sup>р63<sup>+</sup>, полученных посредством эндобронхиальной биопсии из вторичных бронхов, оказалось значительно меньше по сравнению с группой здоровых добровольцев.

Таким образом, у курильщиков и пациентов с ХОБЛ было обнаружено меньшее количество базальных стволовых клеток. Это обстоятельство воспринимается в качестве признака ранней стадии ХОБЛ и указывает на вовлечение базальных стволовых клеток в патогенез заболевания [Ghosh M., Miller Y.E., Nakachi I. et al., 2018].

**Стволовые клетки подслизистой основы трахеи.** Клетки подслизистой основы трахеи человека экспрессируют на своей поверхности антигены СК5, СК14, р63 и  $\alpha$ -SMA [Wansleben C., Barkauskas C.E., Rock J.R., Hogan B.L., 2013]. Из трахеи были выделены так называемые протоковые железистые стволовые клетки, положительные по маркеру CD166 и негативные по антигенам CD44 и NGFR [Hegab A.E., Ha V.L., Darmawan D.O. et al., 2012]. Интересно, что CD166<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>NGFR<sup>-</sup> определялись у пациентов с облитерирующим бронхиолитом после трансплантации лёгких [Swatek A.M., Lynch T.J., Crooke A.K. et al., 2018]. Этот факт немаловажен и может выступать в качестве маркера приживления лёгких и положительного прогностического маркера. К сожалению, данные о протоковых железистых стволовых клетках единичны, что не позволяет сформировать представления об участии этих клеток в патогенезе многих заболеваний лёгких, в том числе ХОБЛ.

**Бронхоальвеолярные стволовые клетки.** Мышечные бронхоальвеолярные стволовые клетки (БАСК) экспрессируют на своей поверхности белок сурфактанта С (*анг.* Surfactant-associated polypeptide C, SP-C), маркер клеточного секретоглобина семейства 1а члена 1 (SCGB1A1), антигены стволовых клеток 1 (Sca-1) и CD34 [Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al., 2005]. Другие авторы идентифицировали бронхоальвеолярные ство-

ловые клетки как Sca-1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup> [Driscoll B., Kikuchi A., Lau A.N. et al., 2012]. Мышиные БАСК в условиях *in vitro* способны к самообновлению и дифференцировке в несколько клеточных линий [Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al., 2005]. В лёгких мышей эти клетки обнаруживаются исключительно в участках перехода бронхов в альвеолы, находятся в покое в лёгких здоровых животных и размножаются в ответ на лёгочную травму [Kim C.F., 2007].

БАСК человека экспрессируют кадгерин-1, SP-C и виментин. При культивировании на подложке из фибробластов лёгких человека бронхоальвеолярные стволовые клетки способны создавать бронхоальвеолярные конструкции [Kato T., Oka K., Nakamura T., Ito A., 2015]. После трансплантации в повреждённое лёгкое мыши БАСК человека способны размножаться и дифференцироваться в эпителиальные и эндотелиальные предшественники, которые, в свою очередь, частично восстанавливают повреждённые участки эпителия и эндотелия. Содержание БАСК у пациентов с ХОБЛ, курильщиков и здоровых добровольцев существенно не различается [Lopez-Giraldo A., Cruz T., Molins L. et al., 2018].

**Альвеолярные стволовые клетки.** Среди клеток альвеолярного эпителия альвеоциты 2 типа демонстрируют характеристики стволовых клеток, включающие самообновление и способность дифференцироваться в альвеоциты 1 типа [Hogan B., 2018; Nabhan A.N., Brownfield D.G., Harbury P.B. et al., 2018]. Локализацию этих клеток в альвеолах показал Chen R. et al. (2015) [Chen R., Zhang K., Chen H. et al., 2015]. Альвеолярные стволовые клетки экспрессируют на своей поверхности молекулу адгезии EpCAM и SP-C. После травмы мышечных лёгких вирусом гриппа H1N1 наблюдалось значительное увеличение числа альвеоцитов 1 и 2 типов и регенерация повреждённых альвеол [Zacharias W.J., Frank D.B., Zepp J.A. et al., 2018].

В лёгких человека присутствуют резидентные альвеолярные стволовые клетки, которые экспрессируют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стволовых клеток (CD73, CD90, CD105, виментин), поверхностно-активные белки клеток альвеоцитов 2 типа (SP-A, SP-C, SP-D), но при этом негативны по CD117 и по маркерам гемопоэтических или эндотелиальных стволовых клеток (CD31, CD34, CD45, VEGFR-2). SP-C<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> клетки располагаются исключительно в альвеолярных стенках здорового человека [Fujino N., Kubo H., Suzuki T. et al., 2011]. В условиях *in vitro* у альвеолярных стволовых клеток (CD90<sup>+</sup>SP-C<sup>+</sup>) выявлен клоногенный потенциал и способность дифференцироваться в альвеоциты 1 и 2 типов под влиянием трансретиноевой кислоты [Horiguchi M., Kojima H., Sakai H. et al., 2014]. Тот же результат был получен в случае внесения в культуру альвеолярных стволовых клеток человека (CD90<sup>+</sup>SP-C<sup>+</sup>) синтетического ретиноида Am80 [Sakai H., Horiguchi M., Ozawa S. et al., 2014]. Внутриклеточный сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR, центральными компонентами которого явля-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ются ферменты фосфоинозитид-3-киназа, киназы АКТ и mTOR, участвует в механизме дифференцировки альвеолярных стволовых клеток человека [Horiguchi M., Kojima H., Sakai H. et al., 2014; Horiguchi M., Oiso Y., Sakai H. et al., 2015]. Так, ингибиторы PI3K (такие, как вортманнин), которые блокируют фосфорилирование АКТ, индуцируют дифференциацию этих альвеолярных эпителиальных стволовых клеток в альвеоциты 1 и 2 типов.

**Мезенхимальные стволовые клетки.** Мезенхимальные стволовые клетки должны обладать определённым набором признаков: самоподдержанием при стандартных условиях культивирования, быть позитивными по CD73, CD90, CD105 и негативными по CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR, а также дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, адипоциты и фиброциты [Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al., 2006]. Подробная характеристика МСК костного мозга представлена нами выше. Лёгочные МСК (лМСК) экспрессируют CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 и не экспрессируют маркеры эндотелия и моноцитов (CD45, CD34, CD14) [Ricciardi M., Malpeli G., Bifari F. et al., 2012].

МСК выделены из бронхоальвеолярной жидкости (так называемые балМСК) у реципиентов в течение 1 года после трансплантации лёгких, при этом в бронхоальвеолярной жидкости здоровых добровольцев они не обнаруживаются. Иммунофенотип балМСК очень похож на лМСК (CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>), при этом балМСК имеют высокую экспрессию α-SMA и не могут дифференцироваться в адипогенном направлении [Sinclair K.A., Yerkovich S.T., Chen T. et al., 2016]. TGF-β1 усиливает дифференцировку балМСК в фибробласты *in vitro*. Эти результаты показывают, что балМСК могут приобрести профибротический фенотип при поражении лёгочной ткани [Walker N., Badri L., Wettlaufer S. et al., 2011].

МСК лёгких человека считают важным регулятором регенерации травмированной лёгочной ткани [Foronjy R.F., Majka S.M., 2012]. Эта функция реализуется паракринно: путём производства фактора роста фибробластов 10 и фактора роста гепатоцитов (HGF) [Kato T., Oka K., Nakamura T., Ito A., 2015]. В мышинных моделях эмфиземы лёгких, вызванных введением эластазы, наблюдается значительное увеличение количества лМСК (CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) [Skurikhin E.G., Pakhomova A.V., Krupin V.A., et al., 2016]. На эластазной модели эмфиземы показано, что внутривенное и интратрахеальное введение лМСК и кМСК способствует восстановлению лёгочной паренхимы, повышает выработку эпидермального фактора роста (EGF), HGF, VEGF и уменьшает воспалительную реакцию в дыхательных путях посредством подавления циклооксигеназы-2, ингибирует высвобождение протеаз клетками воспаления, вызывает пролиферацию альвеоцитов 1 и 2 типов и улучшает дыхательную функцию лёгких [Cappetta D., De Angelis A., Spaziano G., et al., 2018; Katsha A.M., Ohkouchi S., Xin H. et al., 2011; Liu X., Fang Q., Kim H., 2016].



**Стромальные стволовые клетки жирового происхождения.** Стромальные стволовые клетки жирового происхождения (ССКЖП) подобно МСК костного мозга экспрессируют на своей поверхности CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и мультипотентны [Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al., 2001; Watanabe H., Tsuchiya T., Shimoyama K. et al., 2018]. ССКЖП обладают более высокой пролиферативной способностью [Kern S., Eichler H., Stoeve J. et al., 2006] и иммуномодулирующей активностью, чем кмМСК [Melief S.M., Zwaginga J.J., Fibbe W.E., Roelofs H., 2013; Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A. et al., 2012]. В жировой ткани эти клетки содержатся в гораздо большем количестве, чем в костном мозге.

После трансплантации ССКЖП мышам с эмфиземой, индуцированной эластазой, клетки накапливаются в лёгких и в течение длительного времени секретируют FGF-2 и HGF, при этом имеет место снижение продукции матриксных металлопротеаз и сокращение площади эмфиземы [Cho R.J., Kim Y.S., Kim J.Y. et al., 2017; Kim Y.S., Kim J.Y., Shin D.M. et al., 2014; Shigemura N., Okumura M., Mizuno S. et al., 2006]. Трансплантация ССКЖП человека, предварительно обработанных *in vitro* пиоглитазоном (агонист PPAR- $\alpha$ ), мышам в условиях введения эластазы или экстракта табачного дыма улучшает альвеолярную регенерацию и увеличивает уровни FGF2, HGF и VEGF в лёгочной ткани по сравнению с необработанными пиоглитазоном ССКЖП [Hong Y., Kim Y.S., Hong S.H., Oh Y.M., 2016].

**Циркулирующие эндотелиальные стволовые клетки (ЭндСК).** Эндотелиальные стволовые клетки крови экспрессируют на своей поверхности эндотелиальные маркеры CD31 и CD34, но отрицательны по CD14, CD41a, CD45, CD133 и CD235a [Mund J.A., Case J., 2011; Mund J.A., Estes M.L., Yoder M.C. et al., 2012]. Клетки с иммунофенотипом CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>CD133<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD41a<sup>-</sup>CD235a<sup>-</sup> демонстрируют ангиогенные свойства *in vitro* [Estes M.L., Mund J.A., Ingram D.A. et al., 2010]. В других исследованиях у циркулирующих ЭндСК были обнаружены маркеры CD34, CD45<sup>dim</sup> и VEGFR-2 [Schmidt-Lucke C., Fichtlscherer S., Aicher A. et al., 2010]. Считается, что циркулирующие эндотелиальные стволовые клетки (ЭндСК) служат резервным пулом клеток для замены повреждённого эндотелия кровеносных сосудов в зрелом возрасте [Khakoo A.Y., Finkel T., 2005]. Снижение количества ЭндСК повышает риск смерти у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца [Werner N., Kosiol S., Schiegl T. et al., 2005].

В настоящее время вклад ЭндСК в патогенез ХОБЛ неясен. Так, во многих исследованиях не использовали полную линейку антигенов ЭндСК [Mund J.A., Case J., 2011]. С другой стороны, при исследовании СК человека невозможно исключить необходимую для поддержания больного лекарственную терапию. В этой связи многие препараты, такие, как статины [Dimmeler S., Aicher A., Vasa M. et al., 2001] и глюкокортикоиды [Chen C.,

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Yang S., Feng Y. et al., 2013] вносят свои неизбежные коррективы в результат. Кроме этого, гипоксия [Peplow P.V., 2014] и сопутствующие заболевания (системная артериальная гипертензия, сахарный диабет, возраст, курение и триглицериды плазмы) также могут влиять на количество и функцию циркулирующих ЭндСК [Maltais S., Perrault L.P., Ly H.Q., 2011].

Kasahara Y. и его коллеги (2000, 2001) выдвинули гипотезу о том, что увеличение апоптоза эндотелиальных клеток в лёгочных капиллярах альвеолярных перегородок может играть негативную роль в патогенезе ХОБЛ [Kasahara Y., Tudor R.M., Taraserviciene-Stewart L. et al., 2000; Kasahara Y., Tudor R.M., Cool C.D. et al., 2001]. Подтверждает эту гипотезу гибель эндотелиальных клеток вследствие аутоиммунных процессов, зарегистрированная Caramori G. et al. (2011) в лёгочной ткани больных ХОБЛ и утяжеления этого процесса вследствие этого [Caramori G., Casolari P., Giuffrè S. et al., 2011].

На лабораторных животных Yamada M. и соавт. (2004) показали, что циркулирующие ЭндСК, характеризующиеся экспрессией CD34, CD133 и VEGFR-2, могут способствовать устранению повреждения лёгких [Yamada M., Kubo H., Kobayashi S. et al., 2004]. Можно предположить, что снижение уровня ЭндСК в крови может способствовать развитию ХОБЛ. Действительно, в некоторых клинических исследованиях было обнаружено значительное снижение количества циркулирующих ЭндСК у пациентов с ХОБЛ [Fadini G.P., Schiavon M., Cantini M. et al., 2006; Palange P., Testa U., Huertas A. et al., 2006]. Таким образом, ЭндСК в крови можно использовать как маркеры состояния эндотелия в лёгких больных ХОБЛ, не исключено, что, повышая уровень циркулирующих ЭндСК, можно предотвратить или снизить темпы развития эмфиземы.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что количество и пролиферативная активность циркулирующих CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> клеток были значительно снижены у пациентов со стабильной ХОБЛ и высокой степенью лёгочной артериальной гипертензии (> 25 мм рт. ст.) по сравнению с больными ХОБЛ без гипертензии и со здоровыми добровольцами. Количество этих клеток у пациентов со стабильной ХОБЛ и высокой степенью лёгочной артериальной гипертензии оказалось обратно пропорционально лёгочному артериальному давлению. Предполагается, что изменение числа ЭндСК может быть связано с вовлечением в ХОБЛ лёгочных артерий [Liu P., Zhang H., Liu J. et al., 2016]. В другом исследовании Peinado V.I. и коллеги (2006), используя методы иммуногистохимии, продемонстрировали увеличение количества CD133<sup>+</sup> клеток в лёгочной артерии у пациентов с лёгкой и умеренной ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами. CD133<sup>+</sup> клетки были локализованы на эндотелиальной поверхности и в стенке сосудов, и указывали на их высокий потенциал в ремоделировании сосудов [Peinado V.I., Ramirez J., Roca J. et al., 2006].

В клиническое исследование Brittan M. и соавт. (2013) вошли пациенты с ХОБЛ и здоровые добровольцы без сопутствующих сердечно-сосудистых

заболеваний. Авторы не выявили достоверных групповых различий в количестве клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup>. Между тем, *in vitro* колониеобразующая способность эндотелиальных клеток больных ХОБЛ была выше по сравнению с контрольной группой [Brittan M., Hoogenboom M.M., Padfield G.J. et al., 2013]. При изучении циркулирующих в крови ЭндСК других фенотипов было выявлено, что содержание CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> -клеток и CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> -клеток у пациентов со стабильной ХОБЛ не отличается от такового у добровольцев [Janssen W.J., Yunt Z.X., Muldrow A. et al., 2014]. При этом число CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> оказалось значительно снижено у пациентов с ХОБЛ по сравнению с контролем. Эти изменения коррелировали с ОФВ<sub>1</sub> и с площадью эмфиземы. Особенностью данного исследования было то, что пациенты с ХОБЛ и здоровые добровольцы получали статины.

Интересны результаты сравнения динамики содержания CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> -клеток в крови больных ХОБЛ и больных раком лёгких. При раке лёгкого наблюдалось увеличение числа CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> -клеток через 2 часа после начала операции и возвращение их количества до предоперационного уровня спустя 24 часа. Изменений пула циркулирующих клеток больных ХОБЛ не были выявлены. Кроме этого, в условиях *in vitro* CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> -клетки крови больных раком лёгких формировали эндотелиальные колонии, тогда как клетки пациентов с ХОБЛ характеризовались низкой колониеобразующей активностью [Takahashi T., Suzuki S., Kubo H. et al., 2011].

Результаты более поздних клинических исследований дополнили характеристики CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup>-клетки крови. В частности, в сообщении Liu X. и Xie C. (2012) указывается, что *in vitro* CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup>-клетки, полученные из крови пациентов со стабильной ХОБЛ, продемонстрировали низкую пролиферативную активность и значительное нарушение миграции в ответ на стимуляцию CXCR-12 [Liu X., Xie C., 2012]. Другие исследователи показали уменьшение количества ЭндСК с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>CD133<sup>+</sup> в крови пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами, с другой стороны, число этих клеток в мокроте увеличивалось. Не исключено, что при ХОБЛ CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>CD133<sup>+</sup>ЭндСК из крови мигрируют в лёгкие, возможно, для регенерации эндотелия [Salter V.M., Manzoor F., Beaudin S. et al., 2016]. Тем не менее, в данном исследовании у 25% больных ХОБЛ были обнаружены артериальная гипертензия, гиперлипидемия и в 17% случаев использовали статины. Это не исключает влияние этих факторов на клеточную миграцию.

Ещё в одном исследовании авторами было показано, что у пациентов с ХОБЛ и эмфиземой лёгких CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD144<sup>-</sup> ЭндСК формируют значительно меньшее количество эндотелиальных колоний *in vitro* по сравнению с больными ХОБЛ без эмфиземы, курильщиками с нормальной функцией лёгких и здоровыми добровольцами. Однако достоверной корре-

лянии между числом ЭндСК, КОЕ и лёгочной эмфиземой не наблюдалось. Кроме этого, ЭндСК больных ХОБЛ с эмфиземой и без эмфиземы продемонстрировали более низкую степень миграции после стимуляции VEGF по сравнению со здоровыми добровольцами [Kim E.K., Lee J.H., Jeong H.C. et al., 2012].

**Циркулирующие фиброциты.** Фиброциты – это стволовые клетки костного мозга, которые экспрессируют на своей поверхности CD11, CD13, CD14, CD34, CD45, CXCR4, и молекулы основного комплекса гистосовместимости II класса, но отрицательны по антигенам, идентифицирующим лимфоциты (CD3, CD4, CD8, CD19, CD25). Фиброциты способны вырабатывать коллагены 1 и 3 типов, фибронектин и виментин [Herzog E.L., Bucala R., 2010]. Большая популяция фиброцитов может экспрессировать CCR2, CCR3 и CCR7 [Dupin I., Allard B., Ozier A. et al., 2016].

У здоровых людей количество фиброцитов составляют примерно 0,5% от общей фракции циркулирующих в крови лейкоцитов [Herzog E.L., Bucala R., 2010]. У лабораторных животных в условиях фиброзных поражений лёгких и у пациентов с лёгочным фиброзом фиброциты способны дифференцироваться *in vitro* в лёгочные фибробласты [Keeley E.C., Mehrad B., Strieter R.M., 2010]. Фиброциты распознаются и как мезенхимальные клетки, образующиеся из циркулирующих предшественников моноцитов, и участвуют в ответе на травму: презентуют антиген и ремоделируют повреждённые ткани [Bucala R., 2015].

В повреждённой ткани фиброциты могут дифференцироваться в миофибробласты, теряя при этом на своей поверхности CD34 и экспрессируя  $\alpha$ -SMA [Herzog E.L., Bucala R., 2010]. В этих условиях фиброциты могут начать вырабатывать провоспалительные цитокины (IL-6, IL-8), стимулировать ангиогенез с продукцией матриксных металлопротеиназ и проангиогенных факторов (VEGF, PDGF) [Peng H., Herzog E., 2012; Florez-Sampedro L., Song S., Melgert B.N., 2018]. Дифференцировка фиброцитов снижается в присутствии TNF- $\alpha$ , IL-12 и сывороточного амилоида P и увеличивается при достаточных концентрациях ИК-4, IL-13, TGF- $\beta$ 1 и эндотелина-1 [Bucala R., 2012].

Выделяют две основные популяции циркулирующих фиброцитов. Фиброциты классического типа CD34<sup>+</sup>CD45<sup>med</sup>CD14<sup>+</sup>COL-1<sup>+</sup>, и фиброциты миелоидного происхождения супрессорного типа CD34-CD45<sup>dim</sup>CD14-COL-1<sup>+</sup> [Wright A.K., Newby C., Hartley R.A. et al., 2017]. В настоящее время немного исследований, посвященных изучению фиброцитов больных ХОБЛ. В частности, есть результаты, которые указывают на увеличение числа фиброцитов миелоидного происхождения супрессорного типа в крови больных ХОБЛ по сравнению с группой здоровых добровольцев, тогда как количество циркулирующих фиброцитов классического типа было неизменным [Wright A.K., Newby C., Hartley R.A. et al., 2017].

### 3.5. Воспаление и стволовые клетки

**Гемопоэтические стволовые клетки.** Клетки системы крови участвуют в инициации и разрешении воспалительных реакций. Являясь центральным звеном системы крови, ГСК вовлекается в эти процессы. Понимание того, как воспаление взаимодействует с ГСК, имеет решающее значение для разработки новых эффективных подходов терапии многих хронических заболеваний [Pietras E.M., 2017; Yamashita M., Passequé E., 2019].

В оптимальных условиях жизнедеятельности (состояние здоровья) ГСК находятся в состоянии покоя, что определяется соответствующей комбинацией клеточных транскрипционных и эпигенетических регуляторов и сигналами внеклеточных молекул и клеток «ниши» [Yu V.W.C., Scadden D.T., 2016; Ratajczak M.Z. et al., 2018]. Воспаление имеет решающее значение для высвобождения ГСК из «ниши», проницаемости эндотелиального барьера и мобилизации в кровь. Такой воспалительный сигнал, как интерферон, подавляя усиливающий транскрипцию фактор FOXO3a, индуцирует пролиферацию ГСК [Pietras E.M., 2017]. Впоследствии ГСК возвращается в состояние покоя, даже если воспалительный сигнал всё ещё присутствует [Pietras E.M. et al., 2016]. Это подразумевает существование «тормозящего» механизма в условиях длительного влияния интерферона, предотвращающего истощение пула ГСК [Pietras E.M., 2017]. Кроме интерферона, пролиферацию ГСК способны усиливать  $\gamma$ -КДФ и IL-1 [Weisser M. et al., 2016; Ratajczak M.Z. et al., 2018; Hoggatt J. et al., 2017].

IFN- $\gamma$  посредством активации факторов транскрипции Batf2 и C/EBP $\beta$  индуцирует миелоидную дифференцировку ГСК [Matatal K.A. et al., 2016]. C/EBP $\beta$  также связан с «экстренной» гранулоцитопозстимулирующей реакцией ГСК в ответ на IL-3 и GM-CSF. Поскольку IFN- $\gamma$ , IL-3 и GM-CSF используют Jak/STAT сигнальный путь, активация C/EBP $\beta$  может быть общим для этих цитокинов нисходящим механизмом передачи сигналов.

IL-1 инициирует миелоидную дифференцировку посредством NF- $\kappa$ B-зависимой активации PU.1 [Pietras E.M., 2017]. В связи с тем, что IL-1 рецептор, TNF рецептор и некоторые Toll-подобные рецепторы активируют NF- $\kappa$ B, вероятно, это представляет общий нисходящий механизм влияния указанных рецепторов на ГСК. Не исключено ухудшение самообновления ГСК под влиянием воспалительных сигналов через Toll-подобные рецепторы, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-1 и p38 MAPK [Herman A.C. et al., 2016; Pietras E.M., 2017; Takizawa H. et al., 2017].

IFN $\gamma$  и TNF- $\alpha$  активируют мегакариопоэтическую программу дифференцировки ГСК с высоким уровнем экспрессии маркера мегакариоцитов CD41. Реализация этой программы CD41<sup>hi</sup> клетками происходит в условиях длительного воздействия IL-1 [Pietras E.M., 2017].

Мобилизацию ГСК из костного мозга связывают с повышением градиента биоактивных фосфосфинголипидов (сфингозин-1-фосфат, S1P и церамид-1-фосфат, C1P). Выход ГСК через эндотелиальный барьер в лимфатиче-

скую систему также регулируется S1P и C1P [Ratajczak M.Z. et al., 2018]. Рециркутирование CD34<sup>+</sup> ГСК в участок воспаления связывают с теми же рецепторами адгезии и хемокинами, которые возвращают стволовые клетки в костный мозг (PSGL-1, CXCL12, интегрин  $\alpha 4\beta 1$ , CD44) [Michael S. et al., 2016].

Yamashita M. и Passequé E. (2019) обратили своё внимание на то, что TNF- $\alpha$  по-разному действует на ГСК и гемопоэтические прогениторные клетки. TNF- $\alpha$  индуцирует апоптоз гемопоэтических прогениторных клеток, с другой стороны, активируя р65-ядерный фактор  $\kappa B$  ((NF- $\kappa B$ )-зависимую генную программу, предотвращающую некроз, а не апоптоз), способствует выживанию и дифференцировке в миелоидном направлении ГСК.

Иммунорегуляторные свойства ГСК связывают с экспрессией иммунной контрольной точки PD-L1, известной так же, как CD274. PD-L1 является лигандом для рецептора апоптоза 1 (PD-1). PD-L1 экспрессируется антигенпрезентирующими клетками, в частности, Т-лимфоцитами. Взаимодействие PD-L1 с PD-1 рецептором Т-лимфоцитов ослабляет иммунный ингибирующий ответ, подавляя самообновление Т-клеток за счёт ингибции TCR-опосредованной продукции цитокина IL-2 и активации апоптоза [Tober J. et al., 2018]. Nasr M.B. с коллегами (2017) считает, что экспрессия PD-L1 в ГСК может быть использована в качестве инструмента для направленной иммунотерапии при заболеваниях и, в частности, в терапии СД1.

**Мезенхимальные стволовые клетки.** В ответ на сигналы о повреждении МСК мобилизуются из своей «ниши» в кровь, мигрируют в места активного воспаления или повреждения ткани [Funari A. et al., 2019]. На процесс миграции МСК влияют химические (хемокины, цитокины, факторы роста) и механические факторы (гемодинамические силы, приложенные к стенкам сосуда в виде напряжения сдвига, циклического растяжения сосудов и жёсткости внеклеточного матрикса) [Fu X. et al., 2019].

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что SDF-1/CXCR4 играет важную роль в миграции костно-мозговых МСК в повреждённую ткань [Kuai X.L. et al., 2016]. В условиях действия повреждающих факторов уровень экспрессии SDF-1 значительно повышается. С увеличением концентрации SDF-1 постепенно повышается экспрессия мРНК и белка CXCR4 [Deng Q.J., Xu X.F., Ren J., 2017].

Факторы, регулирующие миграцию МСК, не ограничиваются изложенными выше. Синтезируемый в различных тканях остеопонтин является цитокином. В ответ на повреждение и воспаление в сердце, почке, лёгком, кости и других тканях экспрессия остеопонтина повышается, что способствует миграции МСК [Fu X. et al., 2019]. Также остеопонтин увеличивает экспрессию интегрина  $\beta 1$  в МСК, что усиливает миграцию и в основе которой лежит снижение ядерной жёсткости и экспрессии ламина А/С [Liu L. et al., 2017].

Исследования показали, что основным фактор роста фибробластов (bFGF), VEGF, HGF, IGF-1, PDGF и TGF- $\beta 1$  индуцируют миграцию МСК к месту повреждения для участия в регенерации ткани [Zhang S.J. et al., 2016;

Fu X. et al., 2019]. При этом в ответ на TGF- $\beta$ 1 у мигрирующих МСК костного мозга человека наблюдается активация сигнальных путей N-кадгерина, PI3K/Akt, ERK1/2, FAK и p38 [Fu X. et al., 2019].

МСК, как полагают, уменьшают активность воспаления в силу своих иммуномодулирующих свойств [Funagi A. et al., 2019]. Иммуномодулирующие свойства МСК проявляются секрецией противовоспалительных молекул, таких, как IL-10, HGF, TGF- $\beta$ 1, IDO и паракринной передачей сигналов соседним клеткам для поддержания местной противовоспалительной среды [Gnecchi M. et al., 2016; Zhang S.J. et al., 2016; Folestad E., Kunath A., Wagsäter D., 2018; Carvello M. et al., 2019].

В условиях воспаления МСК, воздействуя на профили секреции цитокинов, могут модулировать функцию различных типов иммунных клеток, включая лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги. МСК не экспрессируют костимулирующие молекулы и способны сделать клетки Th1, Th2 и Th17 анергичными (полное отсутствие реакций на любые раздражители). Таким образом, МСК уменьшают общее количество эффекторных Т-клеток в повреждённых тканях и ослабляют воспаление, вызванное Th1, Th2 или Th17 [Gazdic M. et al., 2015]. МСК могут подавлять продолжающееся Т-клеточное воспаление за счёт секреции растворимых иммунодепрессивных факторов (PGE2, TGF- $\beta$ , IDO и NO) [Volarevic V. et al., 2017]. Благодаря продуцированию PGE2, МСК ослабляют экспрессию рецептора IL-2 и, соответственно, ингибируют экспансию клонов активированных Т-клеток. TGF- $\beta$  также является мощным ингибитором сигнального пути IL-2 и участвует в МСК-опосредованном торможении клеточного цикла G1 активированных Т-клеток. Аналогичным образом NO, секретируемый МСК, ингибирует фосфорилирование сигнального преобразователя и активатора транскрипции (STAT-) 5 в Т-клетках, останавливая клеточный цикл, в то время как IDO МСК способствует деградации триптофана в кинуренин, подавляющего пролиферацию или индуцирующего апоптоз активированных Т-клеток [Volarevic V. et al., 2017].

В дополнение к прямому подавлению эффекторных Т-клеток, МСК способны подавлять генерацию клеток Th1, Th2 и Th17 путём модулирования антиген-презентирующей функции дендритных клеток PGE2, IL-10 и IL-6 зависимым способом. После взаимодействия с МСК у дендритных клеток уменьшается способность к презентации антигена из-за сниженной экспрессии основного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул [Gazdic M. et al., 2015]. МСК уменьшают продукцию воспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-12) в дендритных клетках и макрофагах и способствуют выработке противовоспалительных IL-10 и TGF- $\beta$ , что положительно сказывается на регенерации тканей [Gazdic M. et al., 2015; Haggell C.R. et al., 2019].

Важным и специфичным является способность МСК активировать подгруппу CD4<sup>+</sup> Т-клеток [Carvello M. et al., 2019].

## Глава 4

# NOTCH СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

### 4.1. Общее представление

Notch является одним из наиболее широко используемых природой сигнальным путём, контролирующим процессы развития у животных. Notch-сигналинг определяет клеточную судьбу в эмбриогенезе и постнатальном развитии. Трансмембранный белок Notch был открыт в лаборатории Томаса Ханта Моргана в марте 1913 г. при изучении *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Непосредственное участие сигнального пути Notch в онтогенезе показал Дональд Полсон в 30-е годы XX века. У гемизиготных по Notch эмбрионов *D. melanogaster* не развивались мезодерма и энтодерма, в то время как из большей части эктодермы формировались нервные клетки в ущерб гиподермальным клеткам [Kidd S., Kelley M. R., Young M. W. et al., 1986]. Для Notch сигналинга характерна «латеральная ингибиция», т.е. состояние, когда каждая коммитированная клетка-предшественник в ходе дифференцировки передаёт контактирующим с ней клеткам сигналы, ингибирующие повторение её судьбы, тормозя таким образом специализацию соседних клеток в характерном для неё направлении [Попов Б.В., 2010].

У млекопитающих продуцируется четыре различных рецептора Notch (Notch 1-4) и 5 лигандов семейств Delta (Dll 1, 3, 4) и Serrate (Jagged 1, 2) [Попов Б.В., 2010]. И рецепторы и лиганды являются крупными трансмембранными белками, поэтому передача сигнала от клетки к клетке может выполняться только при физическом контакте двух клеток, одна из которых несёт лиганд, вторая – рецептор. Рецептор Notch синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и подвергается посттрансляционной модификации в аппарате Гольджи с вовлечением в процесс протеазы Furin. Далее рецептор переносится на поверхность клетки. После связывания рецептора с лигандом одного из семейств Delta / Serrate происходят конформационные изменения и внеклеточный домен Notch при помощи протеазы ADAM высвобождается от цитоплазматической мембраны. Образовавшийся комплекс лиганд-рецептор посредством эндоцитоза переносится в иницирующую клетку с последующей деградацией. В клетке, получившей сигнал, образовавшаяся после протеолиза часть рецептора NEXT (Notch extracellular truncated form) подвергается протеолизу  $\gamma$ -секретазой с образованием NICD (Notch intracellular domain), который транспортируется в ядро. В ядре NICD взаимодействует со связывающими ДНК транскрипционным фактором CSL (suppressor of hairless) и кофактором Mam / MAML1–3 (mastermind-like) [Borggreffe T., Liefke R., 2012].



В отсутствие NICD фактор CSL в комплексе с различными кофакторами связывается с ДНК и подавляет транскрипцию целевых генов сигнального пути Notch [Nagel A. C., Krejci A., Tenin G. et al., 2005]. При связывании NICD с CSL и Mам корепрессорный комплекс распадается, что приводит к снятию репрессии с генов Notch и активации транскрипции [Oswald F., Winkler M., Cao Y. et al., 2005]. Далее NICD подвергается фосфорилированию, что приводит к протеасомной деградации и терминации сигнала [Hubbard E. J., Wu G., Kitajewski J. et al., 1997].

Целевыми генами сигнального пути Notch являются ген HES (Hairy / Enhancer of Split) и родственные ему гены (HEY, CHF, HRT, HERP). Главной функцией данных генов является ингибирование транскрипции нижележащих генов. В основном данные транскрипционные факторы поддерживают клетки в недифференцированном состоянии, однако в кератиноцитах активация Notch способствует активации пролиферации клеток [Caracciоне K.M., Pine S.R., 2013].

По современным представлениям сигнальный путь Notch участвует в регуляции эмбриогенеза и поддержании постоянства всех органов и тканей взрослого организма. Однако его действие зависит от условий, в которых клетка находится в настоящий момент. В одной ситуации Notch может стимулировать пролиферацию стволовых клеток, в другой – их апоптоз или дифференцировку [Попов Б.В., 2010]. Например, в эмбриогенезе *D. melanogaster* сигнальный путь Notch способствует разделению специфических клеток в рамках одного зародышевого листка, а также формированию границ между разными типами тканей [Bray S. J., 2006]. При участии Notch происходит образование кровеносных сосудов в генетически детерминированных участках [Quaegebeur A., Lange C., Carmeliet P., 2011]. При созревании наблюдается снижение уровня экспрессии Notch в кроветворных клетках-предшественниках [Ohishi K., Katayama N., Shiku H. et al., 2003]. Индукция эпителиально-мезенхимального перехода, в процессе которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип и возможность к миграции, отчасти находится под контролем Notch [Mani S.A., Guo W., Liao M. J. et al., 2008].

Кроме представленного выше канонического пути активации Notch известен неканонический путь активации сигнала Notch. Неканоническая активация наиболее часто встречается при патологических состояниях, в то время как каноническая – в норме [Minter L. M., Osborne B. A., 2012]. В неканоническом пути происходит образование NICD после связывания Notch с растворимым лигандом, либо без участия лиганда. В последнем случае NICD может образоваться в результате активации Т-клеточного рецептора при дифференцировке Т-лимфоцитов в Т-хелперы [Gentle M. E., Rose A., Vugeon L. et al., 2012]. Однако наиболее часто встречается неканоническая активация Notch при канцерогенезе [Vacca A., Felli M. P., Palermo R. et al., 2006; Lu J., Ye X., Fan F. et al., 2013].

## 4.2. Заболевания лёгких

Существенную роль Notch-сигналинг играет в развитии и гомеостазе лёгких [Radtke F., Fasnacht N., Macdonald H.R., 2010; Xu K., Moghal N., Egan S.E., 2012]. Многочисленные исследования показывают, что активация этого сигнального пути и увеличение экспрессии Notch1 ингибирует дифференцировку и созревание клеток, а в процессе созревания клетки уменьшают экспрессию Notch [Walker L., Carlson A., Tan-Pertel H.T., 2001; Zanotti S., Canalis E., 2013; Suresh S., Irvine A.E., 2015]. В экспериментах на эмбриональных лёгких показано, что добавление Notch-лиганда увеличивало содержание секреторных клеток в культуре клеток, в то время как ингибитор  $\gamma$ -секретазы GSI значительно снижал их количество [Guseh J., Bores S., Stanger B. et al., 2009]. Эти исследования показывают, что в эмбриогенезе высокая активность сигнального пути Notch1 выступает маркером дифференцировки стволовых клеток в секретирующие линии клеток, но не в реснитчатые клетки [Shi Y., Shi G., Wan H. et al., 2013].

Согласно данным Rock J. и соавт. (2011), сигнальный путь Notch играет важную роль в различных лёгочных патологиях [Rock J. R., Gao X., Xue Y. et al., 2011]. Симметричное деление базальных стволовых клеток не зависит от Notch-сигналинга. Ранние клетки предшественники способны только к ограниченной пролиферации для поддержания популяции. Notch запускает дифференциацию базальных стволовых клеток в ранние клетки-предшественники: эти клетки теряют поверхностные маркеры, характерные для базальных стволовых клеток, но при этом не экспрессируют маркеры, характерные для дифференцированных клеток [Rock J. R., Gao X., Xue Y. et al., 2011]. Повторная активация сигнального пути Notch у клеток-предшественников, с большей вероятностью, направляет дифференциацию клеток предшественников в сторону секреторной популяции клеток, но не в направлении реснитчатых клеток.

Tilley A.E. и соавт. (2009) выявили низкую экспрессию различных компонентов пути Notch у больных ХОБЛ [Tilley A.E., Harvey B.G., Heguy A. et al., 2009]. Последующие исследования показали не столь однозначное состояние Notch у больных ХОБЛ. Так, у пациентов с ХОБЛ выявлено увеличение числа секреторных клеток в лёгочной ткани [Cugran D., Cohn L., 2010], что закономерно приводит к увеличению слизи в дыхательных путях [Wang G., Xu Z., Wang R. et al., 2012]. Boucherat O. с коллегами (2012) сообщил, что уровни экспрессии Notch1 и эффекторных генов Hey2 значительно увеличиваются у пациентов с ХОБЛ [Boucherat O., Chakir J., Jeannotte, L., 2012]. Вероятно, сигнальный путь Notch1 является главным регулятором деления бокаловидных клеток-предшественников [Guseh J., Bores S., Stanger B. et al., 2009; Boucherat O., Chakir J., Jeannotte, L., 2012] и их дифференцировки в сторону реснитчатых или секреторных клеток.

Апоптоз эндотелиальных клеток тесно связан с Notch1-сигналингом [Peng H., Yang M., Chen, Z. et al., 2013; Yang M., Chen P., Peng H. et al., 2015;

Kang N., Chen P., Chen Y. et al., 2015; Chen Y., Luo H., Kang N. et al., 2012]. У нокаутных по Notch1-сигналингу лабораторных животных выявлена массовая апоптотическая гибель клеток [Limbourg F., Takeshita K., Radtke F. et al., 2005], тогда как избыточная экспрессия Notch1 защищает клетки от апоптоза [Qin X., Zhang Z., Xu H., Wu, Y., 2011].

Исследования Sinha K. и др. показали, что окислительный стресс может вызвать клеточный апоптоз [Sinha K., Das, J., Pal, P., Sil, P., 2013]. Производство активных форм кислорода также находится под контролем сигнального пути Notch [Small C., Ramroop J., Otazo, M. et al., 2014; Cai W., Liang L., Wang L. et al., 2014]. Сигнал Notch1 поддерживает низкий уровень окислительного стресса в клетках, а ингибирование Notch1 с использованием GSI приводит к увеличению генерации активных форм кислорода.

Бронхиальная астма характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей с участием большого количества воспалительных клеток (эозинофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы), клеток лёгочной ткани (гладкомышечные клетки дыхательных путей, эпителиальные клетки) и множества медиаторов [Xu C., LE, J., Duan, X. et al., 2011]. Дисбаланс в содержании клеток Т-хелперного типа в сторону Th2 клеток играет ведущую роль в развитии и прогрессировании некоторых форм астмы [Kallinich T., Beier K., Wahn U., Stock P., Hamelmann, E., 2007]. Многие авторы указывают на то, что сигнальная система Notch1 активно участвует в дифференцировке, созревании и активации Т-клеток [Zhou M., Cui Z., Guo X. et al., 2015; Zhang W., Nie Y., Chong L. et al., 2013]. Введение активированной аллели Notch1 CD4<sup>+</sup> клеткам активирует экспрессию IL-4 и других цитокинов Th2 профиля [Fang T., Yashiro-Ohtani Y., Del Bianco C. et al., 2007]. В свою очередь, назначение GSI приводило к уменьшению цитокинов Th2 клеток с одновременным увеличением секреции цитокинов Th1 профиля [Kang J., Kim B., Uhm T. et al., 2009]. Эти исследования показывают, что блокировка сигнала Notch1 может положительно влиять на течение заболеваний, связанных с чрезмерной продукцией Th2 цитокинов.

Эозинофилы являются ключевыми эффекторными клетками в патогенезе аллергических заболеваний [Zhang H., Fu J., Fan T. et al., 2015]. У пациентов с астмой значительно увеличено число эозинофилов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости, мокроте и эндобронхиальном биоптате [Gaurav R., Bewtra A., Agrawal, D., 2014]. Radke A. и соавт. (2009) получили доказательства активации Notch-рецептора и последующей транскрипции Notch-чувствительного гена Hes1 в эозинофилах, стимулированных GM-CSF [Radke A., Reynolds L., Melo R. et al., 2009]. Сигнал Notch регулирует терминальную дифференцировку и последующие эффекторные фенотипы эозинофилов [Kang J., Lee D., Lee J. et al., 2005, Kang J., Lee da H., Seo H. et al., 2007]. Системное введение GSI препятствует накоплению эозинофилов в дыхательных путях [Liu L., Wang H., Xenakis J., Spencer, L., 2015].

Интересные данные были получены при изучении Notch-сигналинга при пневмофиброзе. Как известно, фиброз лёгких характеризуется дисфункцией эпителиальных клеток, накоплением фибробластов и миофибробластов и формированием внеклеточной матрицы [Loomis-King H., Flaherty K., Moore, B., 2013]. Дифференциация фибробластов в  $\alpha$ -гладкомышечный актин-продуцирующие клетки ( $\alpha$ -SMA) представляет собой основную проблему в патогенезе идиопатического лёгочного фиброза [Garrison G., Huang S., Okunishi K. et al., 2013]. Этот процесс, а также эпителиально-мезенхимальный переход сопровождается высоким уровнем экспрессии Notch1 [Liu T., Hu B., Choi Y. et al., 2009, Chapman H., 2011]. В ряде сообщений указывается, что ингибирование Notch1 сигнального пути предотвращает эпителиально-мезенхимальный переход *in vitro* и *in vivo* [Namba T., Tanaka K., Ito Y. et al., 2010; Shao S., Zhao X., Zhang X. et al., 2015].

Рак лёгких занимает 3 место в мире среди причин смертности. Это гетерогенная группа заболеваний представлена в клинике преимущественно немелкоклеточной карциномой лёгких (НМРЛ) и мелкоклеточной карциномой лёгких (МРЛ) [Agalioti T., Giannou A., Stathopoulos G., 2014]. НМРЛ составляет около 85% от всех случаев рака лёгкого [Zhou C., 2014]. Существует значительный массив исследований, указывающий на связь Notch-сигналинга с раком лёгких. Прежде всего, необходимо отметить, что содержание белков Notch1 в аденокарциноме лёгкого значительно выше по сравнению со здоровыми лёгкими [Zhou M., Jin W., Fan Z., Han, R., 2013]. Высокий уровень Notch1 у пациентов с НМРЛ объясняется дефицитом NUMB (ингибитор Notch). В 30% случаях НМРЛ не выявлен NUMB, что приводит к увеличению Notch-активности [Westhoff B., Colaluca I., D'Ario G. et al., 2009]. В том же исследовании было показано, что примерно в 10% случаев клинически подтверждённого НМРЛ обнаруживается мутация Notch1, вызывающая активацию Notch. По мнению Zhou M. и коллег (2013) эта мутация Notch сигнального пути играет значительную роль в развитии карциномы лёгких. Кроме этого, сигнальный путь Notch является ценным биомаркером для прогнозирования прогрессирования НМРЛ и что более высокая экспрессия сигналов Notch (в основном Notch1 и Notch3) связана с большей вероятностью метастазов и плохой выживаемостью пациентов с НМРЛ [Yuan X., Wu H., Xu H. et al., 2015].

При МРЛ наблюдается подавление сигнализации Notch1. Инактивирующие мутации в генах семейства Notch наблюдались в 25% случаев МРЛ [George J., Lim J., Jang S. et al., 2015]. Моделирование сверхэкспрессии Notch1 – это возможный подход к ингибированию роста опухоли у человека и нарушению формирования нейроэндокринного фенотипа опухоли [Sriuranpong V., Borges M., Ravi R. et al., 2001]. Подтверждение этому мы нашли в экспериментах на лабораторных животных. Так, активация Notch-сигналинга у мышей с МРЛ существенно уменьшила количество опухолевых клеток, блокировала экспрессию нейроэндокринных генов и

увеличивала выживаемость животных [George J., Lim J., Jang S. et al., 2015]. Notch1 может сдерживать инвазию и метастазирование МРЛ. Так, в культуре индукция Notch1 в клетках МРЛ приводит к ингибированию экспрессии гамма-ламинина, который способствует подвижности клеток [Hassan W., Yoshida R., Kudoh S. et al., 2014]. Как видно из приведённых выше данных, при немелкоклеточной карциноме лёгких Notch1-сигналинг выступает как промотор опухоли, а при мелкоклеточной карциноме лёгких может ингибировать опухолевый рост [Elias S., Liang S., Chen Y. et al., 2010; Sriuranpong V., Borges M., Ravi R. et al., 2001].

Влияние Notch1 на рак лёгкого зависит от концентрации кислорода. В исследованиях Chen Y. и соавт. сообщается, что активация Notch1 заметно усилена при гипоксических условиях [Chen Y., De Marco M., Graziani I. et al., 2007]. Ингибирование передачи сигналов Notch1 введением GSI ( $\gamma$ -secretase inhibitor) при гипоксии приводило к гибели клеток НМРЛ. Непосредственное введение активного лиганда Notch1 предотвращало проапоптотический эффект GSI. С другой стороны, ингибирование Notch в нормоксическом лёгком не влияло на выживание клеток аденокарциномы. Результаты исследований Donnem T. и его коллег показали, что у прооперированных пациентов с диагнозом НМРЛ сосудистый эндотелиальный фактор роста коррелирует с Notch1, а их совместная экспрессия отражает гипоксию в лёгочной ткани [Donnem T., Andersen S., Al-Shibli K. et al., 2010]. У больных НМРЛ без мутации TP53 высокий уровень Notch1 указывает на высокий риск осложнений [Westhoff B., Colaluca I., D'Ario G. et al., 2009]. Ингибирование Notch1, возможно, будет способствовать p53-зависимому апоптозу клеток НМРЛ [Licciulli S., Avila J., Hanlon L. et al., 2013].

## Глава 5

# ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЁГКИХ

Современная лекарственная терапия ХОБЛ основана на назначении  $\beta_2$ -агонистов короткого и длительного действия, М-холиноблокаторов короткого и длительного действия, а также их комбинаций, метилксантинов, комбинации  $\beta_2$ -агонистов и препаратов глюкокортикостероидов, комбинации  $\beta_2$ -агонистов с глюкокортикостероидами и М-холиноблокаторами, ингибиторов фосфодиэстеразы, муколитиков, а также антибиотиков, глюкокортикоидов и некоторых других групп препаратов [Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2022]. Однако эффективность медикаментозного лечения не оправдывает ожиданий, поскольку назначаемые лекарственные средства поддерживают пациентов, замедляют прогрессирование хронического воспаления, патологического ремоделирования тканей лёгких и развитие эмфиземы, при этом не решают вопрос восстановления структуры и функции лёгких. Применение для лечения ХОБЛ хирургических подходов (операция по уменьшению объёма лёгких, булэктомия, односторонняя или двусторонняя трансплантация лёгких) ограничивается дефицитом органов для трансплантации и типичными осложнениями: инфекции, реакцией «трансплантат против хозяина», побочные эффекты, в том числе, при приёме иммуносупрессоров. Следует отметить, что ни один из перечисленных подходов лечения ХОБЛ не приводит к регенерации повреждённых и утраченных клеток лёгких.

На сегодняшний день активно обсуждается вопрос возможного лечения заболеваний лёгких трансплантацией СК и прогениторными клетками. Однако многие опубликованные клинические наблюдения и данные доклинических исследований указывают на негативные эффекты клеточной терапии СК и прогениторными клетками. Различные независимые группы исследователей подчеркивают нестабильность эффектов клеточной терапии СК *in vivo*, отсутствие стандартизированных и эффективных методов получения необходимого количества клеточного материала с заданными свойствами для введения выступают серьёзным препятствием для широкого применения клеточной терапии СК в лечении различных заболеваний лёгких, в том числе ХОБЛ [Garcia-Castro J. et al., 2008]. В США, странах Европы и Азии разработчики столкнулись с отсутствием единых требований к доклинической оценке эффективности и безопасности клеточной терапии СК. В Российской Федерации с 1 января 2017 года вступил в силу Федеральный закон № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», запрещающий использование препаратов на основе клеток человека.

В настоящее время в регенеративной медицине выделяют такой раздел, как фармакологическая регуляция эндогенных СК и прогениторных клеток взрослого организма для стимуляции и/или ускорения регенерации травмированной или поражённой болезнью ткани. Данный подход предполагает нарушение последовательности событий патогенеза заболевания и нацелен на ускорение или стимуляцию регенерации тканей, избирательно воздействуя на эндогенные СК и прогениторные клетки различных классов и локализации [Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др., 2007; Дыгай А.М., Жданов В.В., 2010; Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., 2011]. Известным примером успешного применения подхода является фармакологическая стимуляция бипотентных и унипотентных гемопоэтических прогениторных клеток при гипопластических заболеваниях системы крови [Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., 2012]. Основным сдерживающим фактором разработки нового медикаментозного лечения ХОБЛ и эмфиземы лёгких выступает отсутствие понимания роли отдельных клонов СК и прогениторных клеток взрослого организма при заболеваниях лёгких, а также потенциальных соединений, терапевтический эффект которых был бы связан с СК.

С учётом изложенного выше, изучение реакций и механизмов регуляции СК и прогениторных клеток на различных моделях эмфиземы лёгких и ХОБЛ в высшей степени своевременно. Исследование актуально и с той точки зрения, что его результаты позволят предложить новые патогенетически обоснованные подходы диагностики, прогноза и лечения эмфиземы лёгких и ХОБЛ. Как известно, идиопатический фиброз легких (ИФЛ) и ХОБЛ относят к хроническим воспалительным заболеваниям, при этом по многим клеточным и молекулярным механизмам, симптоматике и клиническому течению эти два заболевания – антиподы. В этой связи для понимания тонких механизмов развития ХОБЛ и эмфиземы легких, регенерации повреждённых тканей мы посчитали целесообразным изучить СК и прогениторные клетки в условиях эмфиземы лёгких, индуцированной различными повреждающими агентами.

По современным представлениям популяции мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных СК и прогениторных клеток гетерогенные представлены отличающимися между собой по иммунофенотипу и функциональной активности субпопуляциями. При проведении настоящего исследования мы попытались учесть это обстоятельство. Иммунофенотипы изученных нами СК и прогениторных клеток представлены в таблице 2. Дополнительно проточной цитометрией изучались вспомогательные клетки ангиогенеза (клетки просвета зарождающегося сосуда, перициты и сосудистые гладкомышечные клетки), зрелые эндотелиальные и эпителиальные клетки, а также фиброциты, моноциты-макрофаги и пан-гемопоэтические клетки.

В зависимости от задачи для индукции эмфиземы лёгких у лабораторных животных используют широкий набор агентов и генмодифицированные животные с возникающей спонтанно эмфиземой легких. Различные примеры моделей эмфиземы лёгких продемонстрированы в главе 2. В нашем ис-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

следовании для моделирования эмфиземы легких у мышей линии C57BL/6 были использованы свиная панкреатическая эластаза, экстракт сигаретного дыма (ЭСД) и D-галактозамин гидрохлорид.

**Табл. 2.** Стволовые и прогениторные клетки, зрелые клетки костного мозга, крови и легких у мышей линии C57BL/6

Клетки	Имунофенотип
Смешанная популяция незитроидных и нелейкоцитарных зрелых клеток, незрелых эпителиальных клеток	CD45-TER119-CD49 <sup>f</sup> CD326 <sup>+</sup>
Зрелые эпителиальные клетки	CD326 <sup>+</sup>
	CD45-CD326 <sup>+</sup>
	CD45-CD49 <sup>f</sup> CD326 <sup>+</sup>
Смешанная популяция зрелых и незрелых эпителиальных клеток	CD326 <sup>+</sup> CD45-CD49 <sup>f</sup>
Эпителиальные прогениторные клетки	CD45-TER119-CD49 <sup>f</sup>
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки	CD326 <sup>hi</sup>
	CD326 <sup>hi</sup> CD49 <sup>f</sup> CD45 <sup>-</sup>
Стволовые клетки легких	CD45-CD117 <sup>+</sup>
Эндотелиальные клетки	CD31 <sup>+</sup>
VEGF2+ эндотелиальные клетки	CD45-CD309 <sup>+</sup>
Предшественники ангиогенеза	CD45-CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла	CD45-CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>
Эндотелиальные прогениторные клетки	CD45-CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD73-CD90 <sup>+</sup>
Клетки просвета зарождающегося сосуда	CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup>
Перициты	CD31-CD34-CD146 <sup>+</sup>
Сосудистые гладкомышечные клетки	CD31-CD34 <sup>+</sup> CD146 <sup>+</sup>
МСК	CD45-CD31-CD34-CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
	CD45-CD106 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
Фибробластные прогениторные клетки	CD45-CD31-CD34 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
Фibroциты миелоидного происхождения	CD31-CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>
Фibroциты немиелоидного происхождения	CD31-CD34-CD45 <sup>+</sup>
Пан-гемопоэтические клетки	CD45 <sup>+</sup>
Моноциты-макрофаги	CD45 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>



Механизм действия представленных агентов значительно различается. Так, свиная панкреатическая эластаза – фермент (сериновая протеаза), полученный из поджелудочной железы свиней («Elastase from porcine pancreas», «Sigma», США). Её введение вызывает сдвиг баланса между протеазами и антипротеазами в сторону протеаз. При интратрахеальном введении фермент гидролизует эластин, гемоглобин, казеин и фибрин, что приводит к эмфиземе лёгких [Hayesa J.A. et al., 1975; Suki B. et al., 2017].

Экстракт сигаретного дыма представляет собой водный экстракт дыма сигарет. ЭСД получали из сигарет марки L&M RED LABEL в количестве 2-х сигарет на 1 мл воды (состав 1 сигареты: смола 10 мг/сиг, никотин 0,8 мг/сиг, СО 10 мг/сиг). Перед получением экстракта убрали сигаретный фильтр (длина сигареты сокращалась с 80 мм до 55 мм). Экстракцию проводили путем протягивания дыма зажжённой сигареты через фосфатный буфер с постоянной скоростью, при помощи вакуумного насоса. За 140 секунд сигарета сжигалась до длины 5 мм. Для удаления загрязнений полученный экстракт фильтровали через бактериальный фильтр с величиной пор 45 нм. После получения экстракта проводили измерение рН и оптической плотности на длинах волн 405 и 540 нм. [He Z.H. et al., 2015; 2016]. При моделировании эмфиземы лёгких ЭСД для усиления воспалительной реакции нами использовался ЛПС.

D-галактозамина гидрохлорид по химическому строению - это 2-амино-2-дезоксид-D-гидрохлорид галактопиранозы, D-хондросамин гидрохлорид («D-(+)-Galactosamine hydrochloride», «Sigma», США). Его применение приводит к поражению гепатоцитов и, как следствие, снижению уровня альфа1-антитрипсина в сыворотке крови и ткани лёгких [Bolmer S.D., Kleinerman J., 1987].

На первом этапе исследования в сравнительном аспекте были изучены особенности повреждений лёгких и формирования эмфиземы у мышей линии C57BL/6 при действии эластазы, экстракта сигаретного дыма и D-галактозамина гидрохлорида.

Закономерным следствием однократного интратрахеального введения эластазы явилось разрушение эластинового и коллагенового каркаса в лёгких мышей патологического контроля, что приводило к уменьшению площади соединительной ткани более чем в 3 раза по сравнению с интактным контролем.

Второй неизбежной реакцией на увеличение концентрации сериновой протеиназы в легких явилось увеличение объёма экссудата и количества CD16<sup>+</sup> клеток в лёгочной ткани. В ряду клеток воспаления выделялись нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты (3, 7, 14 сутки). Одновременно с воспалительной инфильтрацией паренхимы и альвеолярных перегородок у мышей, получавших эластазу, изменялся цитокиновый баланс. Если первоначально (3 сутки) увеличивалась концентрация IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$  в сыворотке крови, продуцентами которых являются фагоцитирующие макрофаги и мо-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ноциты различной локализации (кровь, лёгкие), то позднее (7 и 14 сутки) в сыворотке крови и гомогенате лёгких повышался уровень IL-2 и IL-5. Как известно, IL-2 и IL-5 секретируют CD4 Т-хелперы [Yokoyama A., Evavold B., Dunn D.E., 1989]. При этом IL-2 индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, стимулирует естественные киллеры [Smith K.A., 1980], синтез и секрецию IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , колониестимулирующих факторов и TNF- $\alpha$  [Hamblin A. S., 1988]. В свою очередь, IL-5 индуцирует секрецию IgE и IgA В-клетками, а в присутствии IL-2 вызывает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов и стимулирует эозинофилы [Moore M.L., Peebles R.S., 2006].

По данным Barnes P.J. (2004), IL-13 участвует в развитии эмфиземы в лёгких, механизм его действия связывают с повышением экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММР) и катепсинов. В свою очередь Xu S. и Cao X. (2010) указывают, что IL-17 может инициировать тканевое воспаление индукцией экспрессии IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF. Мишенями IL-17 выступают эпителиальные и эндотелиальные клетки, фибробласты. Другой важной группой мишеней IL-17 называют хемокины группы СХС. CXCL1 и CXCL5 отвечают за привлечение в лёгкие нейтрофилов, которые, в свою очередь, продуцируют эластазу. Кроме этого, ИЛ-17 может стимулировать экспрессию хемокина CCL2 (моноцит хемотаксический протеин 1) и CCL20 (макрофагальный воспалительный белок 3 $\alpha$ ) [Xu S., Cao X., 2010].

Из представленных выше соображений обнаруженная после введения эластазы гиперэкспрессия сывороточного и тканевого IL-13, тканевой ММР9 и ММР12 объясняется нами индукцией IL-13 опосредованного механизма формирования эмфиземы лёгких, центральным звеном которого выступают ММР (7, 14 сутки). В свою очередь, миграция клеток воспаления (нейтрофилы, моноциты) в повреждённые лёгкие во многом связана с CCL2 и CCL20 опосредованной хемокиновой активностью IL-17 (7, 14 сутки).

Патологические изменения соединительнотканного матрикса и воспалительная реакция в ответ на введение эластазы оказали влияние на систему эпителия и эндотелия лёгких. Так, на препаратах лёгких мышей в условиях введения эластазы наблюдалось фестончатое очертание слизистой оболочки бронхов и бронхиол с умеренными десквамативными изменениями респираторного эпителия. Эмфизематозно расширенные альвеолы вызывали сдавление неизменённых альвеол, что приводило к очаговым ателектазам. При этом регистрировалась гиперемия капилляров межальвеолярных перегородок и нарушение микроциркуляции, выражавшееся полнокровием сосудов микроциркулярного русла и капилляров межальвеолярных перегородок. Дополнительно в иммуногистохимических исследованиях выявлено уменьшение экспрессии эндотелиального маркера CD31, эпителиальных маркеров пан-цитокератина и Е-кадхерина, а также ингибитора протеаз альфа1-антитрипсина в легких мышей в условиях введения эластазы по сравнению с мышами интактного контроля.

Обращает на себя внимание, что одновременно с разрушением гистоархитектоники лёгких после введения эластазы имело место гиперэкспрессия IL-10 в сыворотке крови и лёгких мышей патологического контроля относительно интактного контроля (7 сутки). IL-10 обладает различными противовоспалительными эффектами, которые опосредованы ингибированием провоспалительного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, с другой стороны, стимуляцией высвобождения тканевого ингибитора MMP-1 [Barnes P.J., 2004]. Вероятно, IL-10 выступает в качестве протекторного фактора в ответ на действие эластазы. Однако уже к 14 суткам уровень тканевого IL-10 в группе патологического контроля снижался до интактного контроля и в лёгких определялись только медиаторы воспаления.

Интересные результаты мы получили при моделировании эмфиземы лёгких курсовым интраназальным введением ЛПС и ЭСД. Длительное действие на лёгкие ЛПС и ЭСД вызывало инфильтрацию лимфоцитами и макрофагами паренхимы лёгких мышей патологического контроля. Кроме этого, клетки воспаления обнаруживались перибронхиально и периваскулярно, в альвеолах. Иммуногистохимическое исследование позволило обнаружить увеличение экспрессии CD16 и MMP9 в лёгких. Кроме воспаления у мышей патологического контроля выявлены очаговые эмфизематозные повреждения лёгких, умеренное полнокровие сосудов и разрушение межальвеолярных перегородок, а также повреждение клеток эндотелия и альвеолярного эпителия, о чем свидетельствовало, в частности, снижение экспрессии специфических поверхностных маркеров эндотелиальных CD31 и эпителиальных клеток пан-цитокератина (AE1/AE3) в лёгких мышей патологического контроля относительно мышей интактного контроля.

Следует отметить, что относительно эластазы воспалительная реакция, эмфизема, повреждение эпителия воздухоносных путей и альвеол, микроциркуляторного русла в условиях введения ЛПС и ЭСД менее выражены, локализованы преимущественно в нижнем отделе лёгких.

Использование в качестве патологического агента D-галактозамина гидрохлорид вызывало изменения, характерные для токсического гепатита. Так, на препаратах печени мышей патологического контроля обнаружена белковая дистрофия гепатоцитов, моноцеллюлярные некрозы, единичные митозы гепатоцитов. Результатом разрушения гепатоцитов после введения D-галактозамин гидрохлорида выступило снижение концентрации  $\alpha_1$ -антитрипсина в печени. Между тем, синтез и депонирование  $\alpha_1$ -антитрипсина возможен альвеолярными клетками [Song S., 2018]. Подобно печеночному лёгочной  $\alpha_1$ -антитрипсин ингибирует тканевые протеазы, в том числе, трипсин, химотрипсин, эластазу, калликреин, катепсин. Нарушением обмена  $\alpha_1$ -антитрипсина и повышением в этой связи концентрации протеаз в лёгких мы объясняем появление эмфизематозно расширенных альвеол, разрушение межальвеолярных перегородок (3 сутки): площадь эмфиземы в

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

нижнем отделе лёгкого достигала 22,15%, в среднем отделе лёгкого – 4,2%, в верхнем отделе лёгкого – 2,46%.

Как и в случае введения эластазы и ЭСД, D-галактозамина гидрохлорид вызывал застойные явления в микрососудистом русле, повреждал эндотелиальные клетки и альвеолярный эпителий, на что указывало, в том числе, снижение экспрессии периваскулярного и альвеолярного CD31 и пан-цитокератина (A1/AЕ3) в альвеолах. Дополнительным негативным проявлением моделируемого системного дефицита альфа1-антитрипсина выступала гиперэкспрессия CD16, значительная лимфомакрофагальная инфильтрация паренхимы лёгких и перибронхиальный отёк. При этом небольшие скопления лимфоцитов обнаруживались в альвеолах. Различные независимые группы исследователей указывают, что рекрутирование клеток воспаления в лёгкие связано с хемокиновой активностью молекул, выделяемых эндотелиальными и эпителиальными клетками при апоптозе [Imai K., Mercer B.A., Schulman L.L. et al., 2005; Sakhatskyu P., Gabino Miranda G.A., Newton J. et al., 2017]

Итак, результатом действия эластазы, ЛПС и ЭСД, D-галактозамин гидрохлорида явились воспаление и диффузная эмфизема лёгких. На всех моделях эмфиземы лёгких выявлены нарушения структуры микрососудистого русла и альвеолярного эпителия. Наиболее выраженные изменения гистоархитектоники легких мы наблюдали у мышей в условиях введения эластазы, менее значительные – при использовании D-галактозамин гидрохлорида, ЛПС и ЭСД.

В следующем разделе настоящей главы представлены результаты собственных исследований роли стволовых и прогениторных клеток в патогенезе и регенерации эмфиземы лёгких. Акцент в исследовании был сделан на моделировании эмфиземы различными по механизму действия повреждающими факторами, оценке резидентных СК и СК, относящихся к «глубокому резерву регенерации».

В ходе проведённых экспериментов нами выявлен ряд закономерностей. Так, ответной реакцией на моделирование эмфиземы лёгких эластазой явилась мобилизация предшественников ангиогенеза в кровь. Однако ожидаемой миграции их в лёгкие мы не обнаружили (таблица 3). Одновременно выявлено уменьшение числа VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в лёгких мышей патологического контроля по сравнению с интактным контролем. Как правило, VEGF2<sup>+</sup> клетки циркулируют в крови. Это нарушение миграции эндотелиальных клеток из крови в лёгкие у мышей с эмфиземой согласуется с результатами Y. Kasahara и соавторов, которые ранее сообщили об уменьшении числа экспрессирующих VEGFR2 клеток в лёгких пациентов с ХОБЛ [Kasahara Y., Tudor R.M., Cool C.D. et al., 2001].

**Табл. 3.** Сводная таблица результатов исследования реакции предшественников эндотелиальных клеток крови и лёгких на моделирование фиброза и эмфиземы лёгких у мышей линии C57BL/6

Клетки / иммунофенотип	Блеомицин	Эластаза	ЛПС и ЭТД	D-галактозамин гидрохлорид
Эндотелиальные клетки / CD31 <sup>+</sup>		0 /	+ /	
VEGF эндотелиальные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup>		- / 0	0 / 0	+ / -
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	+ /	0 / 0	0 / -	+ / 0
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	+ / -	+ / -	0 / 0	+ / +
Эндотелиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	+ /	/ -	/ -	

**Примечание:** символ + обозначает увеличение содержания стволовых и прогениторных клеток в крови и легких, – значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений. Изменения в легких представлены в числителе, в крови – в знаменателе. Пустые ячейки обозначают отсутствие исследований

Популяция CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток представляет собой резидентную (лёгкие) фракцию клеток. После введения эластазы отмечалось увеличение количества CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток в лёгких и падение их числа в крови (таблица 3). По данным S.Z. Mao et al. (2015) такой агент, как липополисахарид, может вызвать пролиферацию экспрессирующих CD31 клеток лёгких лабораторных животных: иммунофенотип CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup>rtTA<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>eNOS<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> [Mao S.Z., Ye X., Liu G. et al., 2015]. В этой связи выявленное нами увеличение содержания резидентных CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток обусловлено их пролиферативной активностью.

Ответом на введение D-галактозамин гидрохлорида явилось значительное увеличение числа VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>) в легких (3 сутки) (таблица 3). Такая реакция незрелых эндотелиальных клеток сформировалась как результат, во-первых, мобилизации предшественников ангиогенеза из костного мозга в кровь и их миграции в эмфизематозно расширенные лёгкие, во-вторых, миграции VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в лёгкие, в-третьих, деления резидентных эндотелиальных прогениторных клеток.

При воспроизведении хронического повреждения альвеолярной ткани курящих пациентов с ХОБЛ или эмфиземой лёгких введением ЛПС и

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ЭСД изменений в содержании VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>-</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>) в лёгких мышей не наблюдалось (таблица 3). При этом число эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>-</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>) в крови мышей патологического было значительно меньше, чем в интактном контроле, а их количество в костном мозге, напротив, возрастало. Выявленная картина распределения эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>-</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>), вероятно, обусловлена обратным их депонированием в костно-мозговую «нишу».

Таким образом, при моделировании эмфиземы лёгких различными по механизму действия повреждающими факторами (эластаза, D-галактозамин гидрохлорид, ЛПС и ЭСД) наблюдается изменение содержания предшественников эндотелиальных клеток в костном мозге, крови и лёгких, что соответствует активации мобилизации и миграции в целях регенерации повреждённой микроциркуляторной сети лёгких. В этой связи циркулирующие в крови эндотелиальные прогениторные клетки, VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальные клетки и предшественники ангиогенеза могут выступить в качестве потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров, а также мишенями для лекарственного воздействия при эмфиземе лёгких и ХОБЛ.

Дополнительно в каждой модели эмфиземы нами выявлено специфичное распределение предшественников эндотелиальных клеток в костном мозге, крови и лёгких. Процессы мобилизации и миграции во многом зависят от состояния микроциркуляторной сети лёгких. Например, при значительном разрушении микроциркуляторной сети эластазой привлечение незрелых эндотелиальных клеток в повреждённый участок ткани затруднено, при этом регенерация клеток эндотелия осуществляется с преимущественным участием резидентных предшественников эндотелиальных клеток. В случае нарушения гемодинамики и сохранения большей части микроциркуляторной сети после введения D-галактозамин гидрохлорида или сочетания ЛПС и ЭСД регенерация осуществляется с привлечением костно-мозговых и циркулирующих в крови предшественников эндотелиальных клеток.

Ещё одно важное положение, выдвигаемое нами в настоящем разделе, заключается в том, что факторы воспаления могут оказывать ингибирующее действие на предшественников эндотелиальных клеток. Подтверждением этому выступает ингибирующее действие *in vitro* таких медиаторов воспаления, как TNF- $\alpha$  ( $10^{-7}$ М) и IL-1 $\beta$  ( $10^{-7}$ М) на самоподдержание эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>), полученных из лёгких мышей в условиях введения ЛПС и ЭСД. В этой связи отрицательная регуляция сигнальных путей TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  может положительно сказаться на реализации регенеративного потенциала эндотелиальных прогениторных клеток.

ХОБЛ возникает из-за воздействия вдыхаемых вредных веществ и табачный дым является основным фактором риска и индуктором развития этого заболевания и эмфиземы лёгких [Eisner M.D., Anthonisen N., Coultas D. et al., 2010; Lamprecht B., McBurnie M.A., Vollmer W.M., et al, 2011; Grahn K, Gustavsson P, Andersson T, et al., 2021; Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). World Health Organization; 2022]. Это обстоятельство подтолкнуло нас расширить для исследования спектр клеток, участвующих в восстановлении эндотелия, в условиях действия ЛПС и ЭСД. Прежде всего, была проведена оценка активно пролиферирующих Nectin2<sup>+</sup> клеток в популяциях эндотелиальных прогениторных клеток (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>) и предшественников ангиогенеза. Несмотря на равенство числа незрелых эндотелиальных клеток в лёгких мышей патологического контроля и интактного контроля, содержание Nectin2<sup>+</sup> клеток в этих популяциях после действия ЛПС и ЭСД возрастало. Это результаты указывают на мобилизации из костного мозга в кровь и миграцию в повреждённые ЛПС и ЭСД лёгкие пролиферирующих Nectin2<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>) и предшественников ангиогенеза. Сохранение в этих условиях повреждения микроциркуляторной сети мы связываем с ингибирующим действием гуморальных факторов воспаления (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) на дифференцировку Nectin2<sup>+</sup> клеток в зрелые эндотелиальные клетки.

Дополнительно мы обратили своё внимание на так называемые вспомогательные клетки ангиогенеза: клетки просвета зарождающегося сосуда, перициты и сосудистые гладкомышечные клетки (см. таблицу 2). Межклеточные контакты этих клеток, в частности, с эндотелиальными прогениторными клетками, во многом определяют высокие темпы восстановления структуры и функции повреждённых сосудов лёгких [Campbell H.K., Maiers J.L., DeMali K.A., 2017]. В наших исследованиях мы обнаружили уменьшение содержания перицитов в легких мышей в условиях введения ЛПС и ЭСД по сравнению с интактным контролем. При этом значительно сокращались популяции циркулирующих в крови перицитов, сосудистых гладкомышечных клеток и клеток просвета зарождающегося сосуда. Таким образом, ещё одним механизмом нарушения регенерации эндотелиальных клеток лёгких в результате действия ЛПС и ЭСД выступает низкая активность вспомогательных клеток ангиогенеза.

Следующий раздел исследования посвящён реакциям предшественников эпителиальных клеток на моделирование эмфиземы лёгких.

После введения эластазы содержание зрелых эпителиальных клеток (CD326<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup>CD326<sup>+</sup>), зрелых и незрелых эпителиальных клеток общей фракции CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup> клеток, мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток (CD326<sup>hi</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) в лёгких мышей патологического контроля было значительно меньше, чем в интактном контроле (14 сутки) (таблица 4). При этом популяция CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup> эпителиальных прогениторных клеток оставалась неизменной, а количество CD45<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup> стволовых клеток легких увеличивалось.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Реакция эпителиальных клеток на ЛПС и ЭСД была отличной от таковой в условиях введения эластазы. Так, содержание зрелых эпителиальных клеток (CD326<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup>CD326<sup>+</sup>) и их различных предшественников (CD326<sup>hi</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>CD326<sup>+</sup>, CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>) в лёгких мышей патологического контроля превосходило таковое у мышей интактного контроля (16 суток) (таблица 4). В тоже время число резидентных стволовых клеток лёгких и эпителиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>) уменьшалось.

**Табл. 4.** Сводная таблица результатов исследования реакции предшественников эпителиальных клеток и зрелых эпителиальных клеток крови и легких на моделирование фиброза и эмфиземы легких у мышей линии C57BL/6

Клетки / иммунофенотип	Блеомицин	Эластаза	ЛПС и ЭТД	D-галактозамин гидрохлорид
Смешанная популяция незрелых и незрелых эпителиальных клеток / CD45 <sup>-</sup> TER119 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup> CD326 <sup>+</sup>		- /	- /	+ / 0
Зрелые эпителиальные клетки / CD326 <sup>+</sup>	- / -	- / +	+ / +	+ / -
Зрелые эпителиальные клетки / CD45 <sup>-</sup> CD326 <sup>+</sup>	0 / 0	- / 0	+ / +	+ / 0
Зрелые эпителиальные клетки / CD45 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup> CD326 <sup>+</sup>	- / -	/ 0	+ / +	
Смешанная популяция зрелых и незрелых эпителиальных клеток / CD326 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>		- / -	+ / +	0 / +
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> TER119 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>	+ /	0 /	- /	+ /
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>hi</sup>	- / -			+ / -
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>hi</sup> CD49f <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	- / 0	- / +	+ / 0	0 / 0
Стволовые клетки легких / CD45 <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup>	+ /	+ / 0	0 / -	+ / +

**Примечание:** символ + обозначает увеличение содержания стволовых и прогениторных клеток в крови и легких, - значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений. Изменения в легких представлены в числителе, в крови - в знаменателе. Пустые ячейки обозначают отсутствие исследований

Моделирование эмфиземы лёгких D-галактозамин гидрохлоридом приводило к увеличению числа резидентных зрелых и незрелых клеток эпителия, экспрессирующих эпителиальный маркер CD326 по отношению к



интактному контролю (3 сутки) (таблица 4). Кроме этого, в эмфизематозно расширенных лёгких выявлен значительный прирост ряда клеток, не экспрессирующих CD326: эпителиальные прогениторные клетки (CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>), мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки, стволовые клетки лёгких.

Из представленных выше результатов следует, что механизм действия повреждающего фактора во многом определяет реакцию незрелых эпителиальных клеток и механизм регенерации эпителия лёгких. Например, экспрессирующие CD326 зрелые эпителиальные клетки и предшественники эпителиальных клеток бронхоальвеолярного дерева продемонстрировали высокую чувствительность к протеазам, о чем свидетельствовало уменьшение их числа после однократного интратрахеального введения эластазы. Исключение составили стволовые клетки лёгких, содержание которых в этих условиях возрастает. С этими клетками, по всей видимости, связано восстановление эпителиальных клеток лёгких. В противоположность этому, ответом на интраназальное курсовое введение ЛПС и ЭСД, выступает накопление резидентных зрелых эпителиальных клеток и их предшественников, экспрессирующих CD326. Чувствительность стволовых клеток лёгких и эпителиальных прогениторных клеток (CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>) к повреждающему действию ЭСД выступает причиной значительного их сокращения в лёгких. Индукция эмфиземы лёгких D-галактозамин гидрохлоридом не связана с прямым повреждающим действием на лёгкие. Значимым для лёгких результатом разрушения гепатоцитов D-галактозамин гидрохлоридом является дефицит антипротеаз и повышение уровня эндогенных лёгочных протеаз. В такой ситуации регистрируется накопление предшественников, не экспрессирующих CD326 (стволовые клетки лёгких, эпителиальные прогениторные клетки (CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>)) и CD326 положительных клеток (смешанная популяция неэритроидных и нелейкоцитарных зрелых и незрелых эпителиальных клеток (CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>CD326<sup>+</sup>), мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток (CD326<sup>hi</sup>)) (таблица 4).

По современным представлениям зрелые эпителиальные клетки (CD326<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>CD326<sup>+</sup>), зрелые и незрелые эпителиальные клетки общей CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup> популяции, эпителиальные прогениторные клетки (CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>), мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки (CD326<sup>hi</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) и стволовые клетки лёгких (CD45<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>) локализуются в эпителии бронхов и бронхиол. Однако нами выявлены субпопуляции предшественников эпителиальных клеток в крови. При моделировании эмфиземы обнаружены значительные изменения в их содержании. Так, в крови мышей, получавших эластазу, наблюдалось уменьшение количества циркулирующих в крови CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup> эпителиальных прогениторных клеток, при этом число мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток и зрелых эпителиальных клеток, напротив, повышалось (таблица 4).

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

В крови мышей, получавших ЛПС и ЭСД, отмечалось увеличение содержания зрелых ( $CD326^+$ ,  $CD45^-CD326^+$ ) и смешанной популяции зрелых и незрелых эпителиальных клеток ( $CD45^-CD49f^+CD326^+$ ), эпителиальных прогениторных клеток ( $CD326^+CD45^-CD49f^+$ ), при этом мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки ( $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$ ) в крови не были обнаружены, представительство стволовых клеток лёгких сокращалось (таблица 4).

Изучение эпителиальных клеток в крови мышей в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида позволило обнаружить большее число зрелых и незрелых эпителиальных клеток с фенотипом  $CD326^+CD45^-CD49f^+$  и стволовых клеток лёгких, чем в интактном контроле (таблица 4). В тоже время содержание клеток других популяций уменьшалось (мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки,  $CD326^+$  зрелые эпителиальные клетки) или оставалось без изменения (смешанная популяция незритроидных и нелейкоцитарных эпителиальных клеток ( $CD45^-TER119^-CD49f^+CD326^+$ ), зрелые эпителиальные клетки ( $CD45^-CD326^+$ )).

Представленные выше данные значительно расширяют представление о предшественниках эпителиальных клеток лёгких и позволяют сделать предположение о сложной системы «ниш» для этих клеток, включающих легкие и сосуды. Нами не исключается существование костно-мозговой «ниши» для предшественников эпителиальных клеток, поскольку цитометрическая оценка маркеров эпителия и стволовости позволила выявить в костном мозге эпителиальные прогениторные клетки ( $CD326^+CD45^-CD49f^+$ ), мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки ( $CD326^{hi}CD49f^+CD45^-$ ), стволовые клетки лёгких ( $CD45^-CD117^+$ ).

Постнатальные МСК лёгких считают важными регуляторами восстановления травмированной лёгочной ткани [Foronjy R.F., Majka S.M., 2012]. В общей популяции МСК выделяют клоны с различным фенотипом [Phinney D.G., 2007]. Не зависимо от фенотипа МСК демонстрируют такие общие характеристики, как пролиферативная активность и дифференцировка в клетки стромальных линий, секретируют иммуномодулирующие факторы [Summer R., Fitzsimmons K., Dwyer D. et al., 2007]. Под воздействием растворимых факторов клеток альвеолярного эпителия возможна дифференцировка МСК лёгких в альвеолоциты [Weiss D.J., Bertoncetto I., Borok Z. et al., 2011]. С мезенхимально-эпителиальным переходом МСК связывают регенерацию эпителиальных клеток. Однако на сегодняшний день закономерности проявления тех или иных качеств МСК при эмфиземе лёгких изучены недостаточно. В связи с этим следующий этап исследования был посвящен изучению реакций мезенхимальных предшественников на различающихся по этиологии и патогенезу моделях эмфиземы лёгких.

В ходе проведённых экспериментов нами была выявлена неоднозначная реакция популяций мезенхимальных предшественников в ответ на введение различных повреждающих факторов. Так, эластаза увеличивала число

МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) и фибробластных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>) в лёгких мышей патологического контроля по сравнению с интактным контролем (14 сутки). Представленные результаты позволяют сделать вывод, что в условиях значительного повреждения внеклеточного матрикса лёгких резидентные мезенхимальные предшественники участвуют в восстановлении эластинового и коллагенового каркаса, механизмом которого является их дифференцировка в фибробласты. Следует отметить возросшую при этом концентрацию коллагена и гидроксипролина в гомогенатах лёгких мышей патологического контроля по сравнению с интактным контролем. Объяснение этому нам видится в повышении синтетической активности фибробластов, которые получены *de novo* в результате дифференцировки мезенхимальных предшественников. Как было раньше показано, эластаза значительно повреждает микроциркуляторную сеть легких. Это стало причиной нарушения миграции из крови в легкие МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>), фиброцитов немиелоидного и миелоидного происхождения (таблица 5) и, как следствие, низкой скорости регенерации эластинового и коллагенового матрикса лёгких.

**Табл. 5.** Сводная таблица результатов исследования реакции предшественников мезенхимальных клеток крови и легких на моделирование фиброза и эмфиземы легких у мышей линии C57BL/6

Клетки / иммунофенотип	Блеомицин	Эластаза	ЛПС и ЭТД	D-галактозамин гидрохлорид
Мезенхимальные стволовые клетки / CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	+ / +	+ / +	- / +	+ / +
Мезенхимальные стволовые клетки / CD45 <sup>-</sup> D106 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>		0 /	- /	
Фибробластные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> D34 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	+ /	+ /	0 /	
Фиброциты миелоидного происхождения / CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	- / 0	- / 0	+ / -	0 / -
Фиброциты немиелоидного происхождения / CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	0 / 0	/ +	- / +	- / +

**Примечание:** символ + обозначает увеличение содержания стволовых и прогениторных клеток в крови и легких, - значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений. Изменения в легких представлены в числителе, в крови - в знаменателе. Пустые ячейки обозначают отсутствие исследований

Дегградация внеклеточного матрикса при курсовом введении ЛПС и ЭСД значительно уступала таковой при нарушении протеазного/ антипротеазного баланса эластазой. Этим обусловлено отсутствие генерализованного ответа клеток «глубокого резерва» регенерации в этих условиях: количество резидентных МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>;

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

CD45<sup>-</sup>CD106<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>), фибробластных прогениторных клеток уменьшалось (16 сутки). Для восстановления коллагенового и эластинового матрикса, по всей видимости, достаточно фиброцитов. Как видно из представленных данных в таблице 5, ЛПС и ЭСД рекрутируют фиброциты немиелоидного и миелоидного происхождения из костного мозга и крови в лёгкие мышей патологического контроля. При этом число активно пролиферирующих Nectin2<sup>+</sup> клеток в общей популяции фиброцитов легких мышей патологического контроля превосходит таковое в интактном контроле. Таким образом, в условиях введения ЛПС и ЭСД фиброциты немиелоидного и миелоидного происхождения вовлекаются в регенерацию внеклеточного матрикса лёгких.

Мишенью для D-галактозамин гидрохлорида выступают клетки печени. Оправданной реакцией на массивированное повреждение выступает мобилизация в кровь и накопление в печени различных популяций мезенхимальных предшественников на ранние сроки: МСК, фибробластных прогениторных клеток, фиброцитов (3 сутки). Эмфизема лёгких в этих условиях вторична и, по всей видимости, этим объясняется первоначальное уменьшение числа фиброцитов немиелоидного происхождения в лёгких. Накопление МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) в лёгких мы наблюдали позднее (7 сутки).

Представленные данные указывают, что, независимо от факторов, индуцирующих эмфизему, во всех моделях реализуется программа регенерации коллагенового и эластинового матрикса лёгких с участием мезенхимальных предшественников: МСК, фибробластные прогениторные клетки и фиброциты. При значительной эмфиземе (эластаза) в программу регенерации вовлекаются мезенхимальные предшественники «глубокого резерва регенерации» и резидентные клетки, в случае сохранения большей части внеклеточного матрикса (ЛПС и ЭСД, D-галактозамин гидрохлорид) регенерация осуществляется с участием резидентных и циркулирующих в крови мезенхимальных предшественников.

Подводя итог исследованию СК и прогениторных клеток на различных моделях эмфиземы, следует отметить, что в восстановление утраченных клеток и тканей лёгких задействован широкий спектр клеток «локального и глубокого резерва» регенерации. При этом микроциркуляторная сеть и внеклеточный матрикс лёгких являются определяющими результат регенерации факторами, так как обеспечивают мобилизацию из «ниши», миграцию к повреждённому участку ткани, пролиферацию и дифференцировку СК и прогениторных клеток. В этой связи становится важным оценка состояния микроциркуляторной сети и внеклеточного матрикса для диагностики и прогноза ХОБЛ и эмфиземы, а их избирательная фармакологическая регуляция может положительно сказаться на регенерации лёгких. Следует заметить, что положительный эффект может быть достигнут (или усилен) опосредованно: без прямого медикаментозного влияния на СК и прогениторные клетки. В предлагаемом подходе ускорения восстановления структур

лёгких при ХОБЛ и эмфиземе важна «негативная» регуляция воспаления. Например, снижение уровня гуморальных факторов воспаления, оказывающих ингибирующее влияние на «ниши» и СК, позволит снизить медикаментозную нагрузку на пациента за счёт отказа от использования препаратов на основе хемокинов и цитокинов с целью стимуляции СК и прогениторных клеток. С другой стороны, такое действие снижает риск трансформации здоровых клеток в опухолевые и развитие рака, что при ХОБЛ и эмфиземе лёгких актуально.

ХОБЛ противопоставляют другому многофакторному и смертельному заболеванию лёгких – идиопатическому фиброзу легких (ИФЛ). Различия в их клиническом течении и патогенезе очевидные. Если ХОБЛ характеризуется плохо обратимым и прогрессирующим ограничением воздушного потока, сочетающимся с воспалением дыхательных путей и эмфиземой [Pauwels R.A. et al., 2001; Hogg J.C., Timens W., 2009], то при ИФЛ нарушается диффузионная способность легких [American Thoracic Society, 2000]. При ХОБЛ поражаются верхние доли лёгких и в паренхиме наблюдаются такие изменения, как альвеолярная эмфизематозная дилатация и воспаление бронхов, при ИФЛ преимущественно в нижних долях легких развивается интерстициальный фиброз и формируется картина «медовых сот» [Pauwels R.A. et al., 2001; Hogg J.C., Timens W., 2009; American Thoracic Society, 2000]. Наконец, заболеваемость и распространённость этих двух заболеваний совершенно различны. Если ИФЛ считается редким заболеванием (хотя заболеваемость и распространённость растут благодаря усовершенствованной диагностике), то распространённость ХОБЛ очень высокая, хотя и варьирует в разных группах риска [Rabe K.F. et al., 2007; Mannino D.M., Buist A.S., 2007]. Было бы некорректно, если при сравнении ХОБЛ и ИФЛ не были бы представлены общие черты этих заболеваний. Так, ХОБЛ и ИФЛ являются хроническими и прогрессирующими заболеваниями пожилых людей (с преобладанием мужчин), которые серьёзно влияют на функцию легких, связаны с длительным вдыханием внешних вредных агентов (в основном курение табака) [American Thoracic Society, 2000; Rabe K.F. et al., 2007; Baumgartner K.V. et al., 1997; Rennard S.I., Togo S., Holz O., 2006]. При этих заболеваниях происходит прогрессирующая потеря альвеолярной паренхимы, что является причиной серьёзного нарушения дыхательной функции. Кроме ХОБЛ эмфизема описана при лёгочном фиброзе. Эти случаи были сгруппированы в синдром комбинированного лёгочного фиброза и эмфиземы (combined pulmonary fibrosis and emphysema, CPFE) [Cottin V. et al., 2005]. Наконец, ИФЛ и ХОБЛ связаны с повышенным риском развития рака [Koshiol J. et al., 2009; Hubbard R., Venn A., Lewis S., Britton J., 2000].

Несмотря на то, что произошёл переход от «воспалительных» теорий развития ХОБЛ и ИФЛ к сценариям, основанным на окислительном стрессе, дисбалансе протеаз/антипротеаз, нарушенном ремоделировании и усиленном апоптозе [MacNee W., Tuder R.M., 2009; Strieter R.M., Mehrad B.,

2009; Ceylan E., Kocyigit A., Gencer M., Aksoy N., Selek S., 2006; Chilosi M., Murer B., Poletti V., 2008; Selman M., Pardo A., Kaminski N., 2008; King T.E.Jr., Pardo A., Selman M., 2011; Pierrou S. et al., 2007], понимания основ общих черт и различий этих заболеваний до сих нет. Поскольку сравнение ХОБЛ и ИФЛ с позиции СК и прогениторных клеток не проводилось, нами проведён анализ поведения различных популяций предшественников мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных клеток при эмфиземе лёгких и фиброзе лёгких.

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

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

Отвечая на вопрос о роли МСК в патогенезе фиброза лёгких, первоначально мы оценили содержание МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) в лёгких мышей в условиях введения блеомицина. Цитометрический анализ показал увеличение количества МСК в лёгких мышей патологического контроля относительно интактного контроля в сроки наиболее интенсивного отложения коллагеновых масс (21 сутки) (таблица 5).

Выделенные из лёгких мышей патологического контроля МСК характеризовались высоким потенциалом к самоподдержанию и продукцией IFN- $\gamma$ , снижением интенсивности остеогенной дифференцировки и увеличением дифференцировки в фибробласты, при этом активность адипогенной и хондрогенной дифференцировки не изменялась (21 сутки). Позднее дополнительно к выявленным свойствам МСК мышей с фиброзом легких демонстрировали повышенную секрецию TGF- $\beta$ 1 и TNF- $\alpha$  (40 сутки).

Таким образом, при фиброзе лёгких резидентные МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>), дифференцируясь в направлении фибробластов и хондроцитов, увеличивают число фибробластов (продуценты коллагена) в лёгких. Паракринный механизм поддержания МСК фиброза и воспаления связан с продукцией TGF- $\beta$ 1 и TNF- $\alpha$ .

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

В качестве потенциального источника фибробластов в лёгких могут выступать фибробластные прогениторные клетки костного мозга. При изучении клональной активности этих предшественников мы обнаружили, что в условиях введения блеомицина интенсивному отложению коллагеновых волокон в лёгочной ткани мышей (21 сутки) предшествовало увеличение клональной активности фибробластных прогениторных клеток костного мозга (3, 7 сутки) с последующей их мобилизацией в кровь (7, 21 сутки) и рекрутированием в лёгкие (7, 14, 21 сутки).

Итак, в условиях введения блеомицина резидентные МСК (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>), фибробластные прогениторные клетки костного мозга и циркулирующие в крови фиброциты участвуют в фиброзе лёгкого.

В ходе проведения гистологических исследований мы показали, что моделирование фиброза лёгких приводило к разрушению альвеолярного эпителия и микрососудистой сети. По современным представлениям в регенерации утраченных и повреждённых клеток участвуют СК. Однако при фиброзе лёгких механизмы регенерации с участием СК изучены недостаточно. Исследования, проведённые в рамках этой темы, позволили выявить причины задержки восстановления эпителия и эндотелия при фиброзе лёгких. По нашим данным блеомицин увеличивал число резидентных стволовых клеток лёгких (CD45<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>) и эпителиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>) в патологическом контроле по отношению к интактному контролю (21 сутки) (таблица 4). При этом *in vitro* резидентные предшественники эпителиальных клеток патологического контроля демонстрировали более высокую секрецию профибротического TGF-1 $\beta$  и противовоспалительного IL-10, а также низкую экспрессию провоспалительных IL-12 и IL-23, чем в интактном контроле.

Таким образом, при моделировании фиброза лёгких стволовые клетки лёгких и эпителиальные прогениторные клетки участвуют в регенерации эпителия лёгких, с другой стороны, секретировав TGF-1 $\beta$ , вовлекаются в патогенез фиброза.

При изучении предшественников эндотелиальных клеток в условиях введения блеомицина нами было выявлено большее число эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>), эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>-</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>) в легких мышей патологического контроля, чем в интактном контроле (таблица 3). Представленные предшественники эндотелиальных клеток преимущественно костно-мозгового происхождения.

Исследование первичных культур предшественников эндотелиальных клеток лёгких позволило выявить снижение потенциала к самоподдержанию эндотелиальных прогениторных клеток и увеличение его у эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла в патологическом контроле по сравнению с интактным контролем. Изменений активности самоподдержания предшественников ангиогенеза нами не выявлено.

Представленные выше результаты указывают на рекрутирование из костного мозга в лёгкие различных предшественников эндотелиальных клеток в условиях введения блеомицина. При этом только эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла в тестах *in vitro* демонстрируют высокую активность. Это позволяет предположить их участие в восстановлении микрососудистой сети лёгких при фиброзе.

На гистологических препаратах лёгких мышей в условиях введения блеомицина участки фиброзированной ткани имели малое количество кровеносных сосудов, в то время как области здоровой ткани были избыточно насыщены капиллярами. Ранее M. Ebina и соавт. показали, что в области между фиброзированными участками ткани рекрутируются большое количество эндотелиальных прогениторных клеток [Ebina M., 2004]. При этом рекрутированные эндотелиальные прогениторные клетки дифференцировались не в эндотелиальные клетки, а в гладкомышечные клетки. Такое проявление плейотропной активности эндотелиальных прогениторных клеток приводит к утолщению интимы, сужению сосудов и повышению сосудистого сопротивления [Zhu P. et al., 2006; Arciniegas E., 2007; Barbera J.A., 2011], а также к прогрессии фиброза лёгких. Этот механизм во многом объясняет низкую активность ангиогенеза и малое количество капилляров в лёгких мышей в условиях введения блеомицина на фоне значительного рекрутирования в лёгкие эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>), эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>) и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>-</sup>CD309<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>).

Сопоставление результатов исследования СК и прогениторных клеток на моделях эмфиземы лёгких и фиброза лёгких позволило обнаружить некоторые общие закономерности (таблицы 3, 4, 5). Так, при очевидно разном течении и исходе фиброза лёгких, вызванном блеомицином, и эмфиземе лёгких, вызванной эластазой, у мышей в обеих моделях наблюдалось по-



вреждение резидентных CD326<sup>+</sup> эпителиальных клеток и мультипотентных эпителиальных прогениторных клеток (CD326<sup>hi</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>). С другой стороны, блеомицин и эластаза вызывали увеличение количества стволовых клеток лёгких (CD45<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>), эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>), мезенхимальных стволовых клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) и фибробластных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>D34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) в лёгких. В этой связи можно предположить, что при значительном повреждении эпителия, эндотелия и внеклеточного матрикса легких реализация программы регенерации реализуется с участием указанного стандарта СК и прогениторных клеток «локального и глубокого резерва» регенерации. В отличие от эластазы и блеомицина при введении D-галактозамин гидрохлорида, ЛПС и ЭСД изменения выявлены со стороны СК и прогениторных клеток «локального резерва» регенерации.

Известными рутинными лабораторными и клиническими исследованиями невозможно диагностировать на ранней стадии ИФЛ, ХОБЛ и эмфизему легких, контролировать эффективность лечебных мероприятий и дать прогноз осложнениям. Эти подходы не предназначены для оценки регенераторного потенциала. Полученные нами данные значительно приблизили к решению вопроса разработки персонализированной терапии заболеваний лёгких. В частности, при ХОБЛ и ИФЛ в качестве маркеров нарушений эндотелия предлагаются сосудистые клетки просвета зарождающегося сосуда, перициты и гладкомышечные клетки, маркерами эффективности проводимой терапии и регенерации эндотелия – циркулирующие в крови VEGF<sup>+</sup> клетки, предшественники ангиогенеза и эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла.

До настоящего момента Notch1 сигнальный путь изучался на зрелых клетках [Mack J.J. et al., 2017; Yin Q. et al., 2017; Zong D. et al., 2018]. На результатах изучения Notch1 пути зрелых клеток базируется парадигма различий патогенеза ХОБЛ и ИФЛ [Chilosi M. et al., 2012]. Между тем, представления о Notch1 сигнальном пути СК и прогениторных клеток при ХОБЛ и ИФЛ весьма ограничены. С нашей точки зрения, Notch1 сигнальный путь СК и прогениторных клеток, возможно, является «водоразделом» между этими заболеваниями лёгких. В целях подтверждения этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов, направленная на изучение фенотипически разных популяций Notch1<sup>+</sup> предшественников мезенхимальных, эпителиальных и эндотелиальных клеток при эмфиземе легких в сравнении с фиброзом легких.

Первоначально нами были изучены Notch1<sup>+</sup> незрелые эндотелиальные клетки в лёгких. Так, моделирование эмфиземы эластазой и D-галактозамин гидрохлоридом увеличивало содержание Notch1<sup>+</sup> предшественников ангиогенеза в патологическом контроле относительно интактного контроля (таблица 6). Дополнительной характеристикой D-галактозамин гидрохлорида явилось уменьшение содержание резидентных Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогенитор-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ных клеток. Результатом введения ЛПС и ЭСД явилось уменьшение содержания Notch1<sup>+</sup> клеток в популяции эндотелиальных прогениторных клеток. При индуцированном блеомицином фиброзе лёгких представительство Notch1<sup>+</sup> клеток в популяции эндотелиальных прогениторных клеток возросло, в популяции предшественников ангиогенеза, напротив, уменьшалось.

Представленные результаты указывают на то, что при эмфиземе лёгких и фиброзе лёгких Notch1 сигнальный путь вовлекается в регуляцию различных популяций незрелых эндотелиальных клеток. При этом реакция Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза при фиброзе лёгких была противоположной при эмфиземе лёгких. Таким образом, известная парадигма различий патогенеза ИФЛ и ХОБЛ на уровне Notch-сигналинга зрелых клеток распространяется и на предшественников эндотелиальных клеток.

**Табл. 6.** Сводная таблица результатов исследования реакции легочных предшественников ангиогенеза, VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток и эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого русла, экспрессирующих Notch1, мышей линии C57BL/6 при фиброзе легких и эмфиземе легких

Клетки / иммунофенотип	Фиброз легких, вызванный блеомицином	Эмфизема легких, вызванная эластазой	Эмфизема легких, вызванная ЛПС и ЭСД	Эмфизема легких, вызванная D-галактозамин гидрохлоридом
Эндотелиальные про- гениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	+	0	-	-
VEGF <sup>+</sup> эндотелиальные клетки	-	+	0	+
Предшественников ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	-	+	0	+

**Примечание:** символ + обозначает увеличение содержания стволовых клеток, - значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений

Активация Notch1-рецепторов тормозит дифференцировку СК и прогениторных клеток, в частности клеток гемопоэтического ряда [Stier S. et al., 2002]. Ингибирование Notch1 сигнального пути, напротив, приводит к снижению пролиферации клеток [Patel J. et al., 2016]. Как известно, эндотелиальные и гемопоэтические клетки происходят от общего предшественника. В этой связи объяснение полученным результатам мы видим в том, что в условиях экспериментального фиброза Notch1-сигналинг участвует в дифференцировке предшественников ангиогенеза и способствует пролиферации эндотелиальных прогениторных клеток микрососудистого

русла. При моделировании эмфиземы лёгких имеет место обратная закономерность.

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

Представленные данные литературы указывают на важность взаимодействия Notch и VEGF сигнальных систем для ангиогенеза. С позиции поиска и разработки новых подходов регуляции VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток для ускорения ангиогенеза при заболеваниях лёгких нами проведена серия экспериментов, посвящённая изучению эндотелиальных клеток с высокой активностью сигнальных систем Notch1 на VEGF при фиброзе и эмфиземе лёгких. Так, нами было обнаружено существенное увеличение количества Notch1<sup>+</sup>VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в лёгких мышей при введении эластазы и D-галактозамин гидрохлорида по сравнению с интактным контролем (таблица 6). Мы полагаем, что при значительном и среднем разрушении микрососудистой сети лёгких в регенерацию вовлекается Notch1-механизм стимуляции VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток, реализующийся через рост и ветвление сосудов. Между тем, при сохранении значительной части микрососудистой сети в лёгких (введение ЛПС и ЭСД) этот механизм неоангиогенеза избыточен (таблица 6).

По реакции VEGF<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных клеток модель фиброза лёгкого стоит отдельно в общем ряду изучаемых нами экспериментальных патологий. Как видно из таблицы 6, блеомицин уменьшал содержание VEGF<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в легких. Эти данные дают основание утверждать, что у мышей с фиброзом лёгких механизм регенерации эндотелия, опосредованный взаимодействием VEGF и Notch1-сигналинга, ингибируется.

В период эмбрионального развития Notch1 сигнальный путь предопределяет, станет ли стволовая клетка секреторной или реснитчатой клеткой [Guseh J. et al., 2009; Shi Y. et al., 2013]. В постнатальный период развития

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

организма Notch1-сигналинг также регулирует деление предшественников бокаловидных клеток и выбор ими дифференцировки в сторону реснитчатых или секреторных клеток [Guseh J. et al., 2009; Boucherat O. et al., 2012]. Нами не исключается участие Notch1-сигналинга в эпителиогенезе при заболеваниях лёгких. В этой связи мы оценили Notch1<sup>+</sup> эпителиальные клетки при эмфиземе лёгких. Так, в ходе проведённых экспериментов было показано, что у мышей в условиях введения эластазы, ЛПС и ЭСД, D-галактозамин гидрохлорида содержание резидентных CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup> эпителиальных прогениторных клеток превышало таковое в интактном контроле. Таким образом, Notch1 сигнальный путь вовлечён в дифференцировку эпителиальных прогениторных клеток в секреторные клетки при эмфиземе лёгких (таблица 7). В противоположность этому, блеомицин уменьшал количество CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup> эпителиальных прогениторных клеток в лёгких мышей (таблица 7). Как известно, блеомицин избирательно разрушает эпителиальные клетки и унипотентные предшественники эпителиальных клеток, в число которых входят эпителиальные прогениторные клетки (CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>). Вероятно, в условиях экспериментального фиброза легких в первую очередь необходимо восполнение повреждённых унипотентных предшественников эпителиальных клеток.

**Табл. 7.** Сводная таблица результатов исследования реакции легочных МСК и предшественников эпителиальных клеток, экспрессирующих Notch1, мышей линии C57BL/6 при фиброзе легких и эмфиземе легких

Клетки / иммунофенотип	Фиброз легких, вызванный блеомицином	Эмфизема легких, вызванная эластазой	Эмфизема легких, вызванная ЭТД	Эмфизема легких, вызванная D-галактозамин гидрохлоридом
Мезенхимальные стволовые клетки / CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	–	+	–	+
Стволовые клетки легких / CD45 <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup>	–	0	–	–
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> TER119 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>	–	+	0	+

**Примечание:** символ + обозначает увеличение содержания стволовых клеток, – значение показателя уменьшается, 0 указывает на отсутствие достоверных изменений

По нашим данным стволовые клетки лёгких более резистентны к действию токсических агентов, чем унипотентные предшественники эпителиальных клеток. При действии повреждающих факторов, индуцирующих эмфизему и фиброз, число Notch1<sup>+</sup> клеток в общей популяции стволовых

клеток лёгких увеличивается, что отражает активацию Notch1 опосредованного механизма дифференцировки стволовых клеток лёгких (таблица 7).

При рассмотрении предшественников мезенхимальных клеток оказалось, что при моделировании фиброза блеомицин уменьшал количество Notch1<sup>+</sup> МСК и Notch1<sup>+</sup> фиброцитов немиелоидного происхождения в легких мышей патологического контроля по отношению к интактному контролю. Это, с нашей точки зрения, указывает на вовлечение Notch1-сигналинга в дифференцировку предшественников мезенхимальных клеток в синтезирующие коллаген клетки (таблица 7). При эмфиземе, в первую очередь, необходимо восстановление обширных повреждений коллагеновых и эластиновых волокон лёгких. Для этого требуется значительная популяция фибробластов. В этой связи увеличение Notch1<sup>+</sup> клеток в популяции резидентных МСК, фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов, например, при введении эластазы и D-галактозамин гидрохлорида, закономерно и указывает на активацию Notch1-опосредованной пролиферации всех мезенхимальных предшественников (таблица 7). Как уже выше отмечалось, повреждения внеклеточного матрикса ЭСД менее выражены, чем при использовании эластазы или D-галактозамин гидрохлорида. В этой связи закономерно, что в условиях действия никотина и смол из всех предшественников мезенхимальных клеток Notch1-сигналинг поддерживал дифференцировку только резидентных МСК.

Итак, нами обнаружены различия в реакции Notch1<sup>+</sup> МСК и Notch1<sup>+</sup> эпителиальных прогениторных клеток при эмфиземе и фиброзе лёгких, и эти данные поддерживают парадигму различий патогенеза ИЛФ и ХОБЛ на уровне Notch сигнального пути СК и прогениторных клеток (таблица 7). Однако, в ответ на повреждение и патологическое ремоделирование при введении блеомицина, ЭСД или D-галактозамин гидрохлорида существует общий запрос на клетки эпителия воздухоносных путей, что объясняет вовлечение в регенерацию Notch1<sup>+</sup> стволовых клеток лёгких. В силу особенности механизма действия эластазы и меньшего повреждения эпителия воздухоносных путей Notch1 положительные стволовые клетки лёгких в регенерации не задействованы.

Представленные выше результаты оценки Notch1<sup>+</sup> стволовых / прогениторных клеток при эмфиземе лёгких в сравнении с фиброзом лёгких кроме патофизиологической значимости имеют клиническую ценность, так как позволяют предложить в качестве мишени для таргетного лекарственного воздействия Notch1 сигнальный путь МСК, эпителиальных прогениторных клеток и стволовых клеток лёгких.

При ХОБЛ и эмфиземе наблюдается уменьшение васкуляризации альвеол [Wedzicha J.A., Calverley P.M., Rabe K.F., 2016] и возникает системная дисфункция эндотелия [Green C.E., Turner A.M., 2017]. В ходе анализа результатов экспериментов, проведённых в рамках настоящего исследования, мы обратили внимание на сокращение количества капилляров в лёгких мы-

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

шей в условиях действия эластазы, D-галактозамин гидрохлорида и ЭСД. С нашей точки зрения, нарушение гомеостаза эндотелия усугубляет течение ХОБЛ и эмфиземы лёгких, и, по-видимому, является важным фактором их прогрессии. В этой связи, кроме снижения или отмены действия индуцирующих ХОБЛ и эмфиземы факторов (в частности, отказа от курения), при лечении заболеваний важно препятствовать прогрессированию эндотелиальной дисфункции и масштабному апоптозу эндотелиальных клеток. С другой стороны, актуален поиск соединений, способных регенерировать уже поврежденный эндотелий. В этой связи целесообразно делать упор на разработку препаратов, мишенью для которых могут выступить регенеративно активные предшественники эндотелиальных клеток.

## **Глава 6**

# **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭМФИЗЕМЕ ЛЁГКИХ**

### **6.1. Современные подходы использования стволовых клеток в лечении хронических заболеваний**

Практически при всех хронических заболеваниях нарушается репаративная регенерация, при этом патологическая регенерация несостоятельна в восстановлении структуры и функций утраченных и/ или повреждённых клеток и тканей в силу гипертрофированности или нарушения отдельных механизмов. Для ускорения регенерации предлагается увеличить количество стволовых клеток с регенераторным потенциалом. Подходы решения этой задачи разнятся. Так, в клеточной терапии предлагается использовать эмбриональные стволовые клетки и постнатальные стволовые клетки. Однако использование стволовых клеток с плюрипотентным потенциалом сдерживается различными этическими нормами и нормами безопасности. С другой стороны, до сих пор не созданы надёжные и воспроизводимые протоколы выделения, идентификации и культивирования, а также не предложены критерии оценки эффективности проводимой клеточной терапии.

Активно развивается клеточная терапия тканевыми (соматическими), циркулирующими в крови и костно-мозговыми мультипотентными, бипотентными и унипотентными СК. Различают аллогенную и аутологичную трансплантацию этих СК. При отдельных нозологиях, в частности, при сахарном диабете типа 1, предлагается ксенотрансплантация. Наиболее распространена аллогенная клеточная терапия с использованием ГСК и МСК. Например, аллогенная трансплантация ГСК используется для лечения заболеваний системы крови. Клеточная терапия МСК оказывает противовоспалительное действие и подавляет иммунные конфликты, поддерживает кроветворение при ко-трансплантации с ГСК, восстанавливает структуру и функции повреждённых негемопоэтических тканей. МСК-терапию предлагают для лечения заболеваний лёгких, сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративных, эндокринных и костных заболеваний, лейкозов и лимфом, заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Согласно ClinicalTrials на период 2012–2017 гг. прирост клинических испытаний для терапии на основе аллогенных СК значителен, но число исследований, дошедших до 4 фазы, крайне мало. Это объясняется осложнениями и высоким риском возникновения реакции «трансплантат

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

против хозяина» (РТПХ). При ксенотрансплантации весь негатив от клеточной терапии возрастает многократно. За последние 5 лет ситуация не улучшилась.

Аутологичная трансплантация более безопасна, чем аллогенная, в силу сниженного риска возникновения РТПХ. Но для достижения терапевтического эффекта требуется значительное количество аутологичных СК. Необходимое для получения терапевтического эффекта количество СК можно получить при культивировании *in vitro*. Между тем, манипуляции с клетками в культуре вызывают существенные изменения не только в иммунофенотипических характеристиках и внутриклеточного метаболизма, но и в геноме и функциональной активности клеток, что повышает риск возникновения побочных эффектов и злокачественной трансформации.

Есть мнение, что такой продукт СК, как внеклеточные везикулы, могут выступить в качестве терапевтического агента. Использование внеклеточных везикул в практику сдерживает, в том числе, отсутствие стандарта получения продукта и трудности с масштабированием.

Безусловно, все озвученные подходы лечения имеют право на жизнь и развитие. Однако без решения вопросов безопасности разрешительные организации выступают против клеточной терапии и использования продуктов СК.

Альтернативой для терапии СК и продуктами жизнедеятельности клеток может явиться фармакологическая регуляция стволовых клеток пациента. Подход основан на подражании деятельности естественных регуляторных систем. В данном случае РТПХ и злокачественная трансформация клеток отсутствует априори, при этом существенно снижаются финансовые затраты и техническое обеспечение фармакологической регуляции СК менее сложное. С другой стороны, уровень персонализации такого лечения и контроль несопоставимо выше, чем при клеточной терапии.

В 1978 году R. Schofield представил гипотезу о «нише» в костном мозге для гемопоэтических стволовых клеток. Позднее «ниши» СК были показаны практически во всех тканях и органах. На настоящий момент позиционируется, что специализированная (тканевая) «ниша» представляет собой гетерогенную и динамическую структуру, включающую клеточные компоненты, секретируемые факторы, внеклеточный матрикс, и зависящую от различных физических параметров, находящуюся под метаболическим и иммунологическим контролем.

Понимание структуры и функций «ниши» во многом продвинуло исследователей в разработке подходов фармакологической регуляции СК. Например, чувствительность СК к цитокинам и хемокинам позволила предложить в клиническую практику цитокиновую терапию. Однако накопленный в течение десятилетий опыт указывает, что зачастую терапия лекарственными препаратами на основе цитокинов и хемокинов не приводит к положительному исходу, при этом увеличение дозы препаратов цитокинов и хемокинов



может вызвать различные побочные эффекты. Такое положение подвигло нас на проведения НИР в целях поиска и разработки новых подходов лечения заболеваний на основе фармакологической регуляции СК.

## **6.2. Блокада дофаминовых D<sub>2</sub> -рецепторов как новый подход в ускорении регенерации повреждённых тканей при эмфиземе лёгких**

### **6.2.1. Сосудистый гомеостаз и лёгочные эффекты дофамина**

Основной функцией эндотелиального барьера является поддержание гомеостаза. Барьерная функция эндотелия во многом базируется на межклеточных контактах и регулируется рядом молекул межклеточных контактов (катенины, кадгеринины) и других биологически активных молекул (гистамин, брадикинин, VEGF) [Alves N.G., Motawe Z.Y., Yuan S.Y., Breslin J.W., 2018].

Соединения между эндотелиальными клетками представлены адгезивными контактами (*анг.* Adherens junctions) и плотными контактами (*анг.* Tight junctions) [Campbell H.K., Maiers J.L., DeMali K.A., 2017]. В формировании адгезивных контактов участвуют молекулы межклеточной адгезии: VE-кадгерин и катенины. VE-кадгерин состоит из внеклеточного, трансмембранного домена и цитоплазматической части. Внеклеточный домен обеспечивает гомофильную адгезию (взаимодействие с идентичным доменом).  $\alpha$ - и  $\beta$ -катенины опосредуют связь VE-кадгерина с цитоплазматическим скелетом.

Плотные контакты регулируют прохождение ионов и воды, белков и липидов. Они представлены трансмембранными белками окклюдином, клаудинами и молекулами адгезии плотных контактов (*анг.* Junctional adhesion molecule). Окклюдин представляет собой белок с молекулярной массой 65 кДа. В структуре выделяют С-концевой домен (необходим для правильной сборки и функционирования молекулы), N-концевой домен (принимает участие в формировании барьерных свойств плотных контактов), четыре трансмембранных и два внеклеточных домена. Молекула окклюдина четыре раза пронизывает цитоплазматическую мембрану, внеклеточные домены образуют две экстрацеллюлярные петли [Feldman G.J., Mullin J.M., Ryan M.P., 2005].

Молекула клаудина – это белок с молекулярной массой 20–27 кДа, имеющий схожую с окклюдином структуру, но обладает более коротким N-концом. Внеклеточные домены образуют две петли, одна из которых больше второй. Клаудины регулируют параклеточную проницаемость альвеолярного эпителия для ионов, поддерживают гомеостаз альвеолярной жидкости [Wittekindt O.H., 2017].

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Молекула адгезии плотных контактов представляет собой гликозилированный белок с молекулярной массой 43 кДа и состоит из внеклеточно-го, трансмембранного домена и короткого С-конца [González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo B.E., 2003]. Внеклеточные домены молекул взаимодействуют между собой, образуя контакты, при этом внутриклеточные домены связаны с цитоскелетом и регулируют функционирование и сборку молекул [Campbell H.K., Maiers J.L., DeMali K.A., 2017].

Белки zonula occludens регулируют формирование адгезивных и плотных контактов. Структура белков zonula occludens представлена тремя PSD-95 / discs-large / Zonula occludens доменами, одним SH3-доменом и переменными U-доменами (*анг.* Unique) [Hardaker E.L., Freeman M.S., Dale N. et al., 2010].

Проницаемость эндотелиального барьера повышают VEGF, TNF- $\alpha$ , брадикинин и гистамин. Механическое воздействие изменяет состояние эндотелиального барьера путём активации ионных каналов, Rho-киназы [Mehta D., Ravindran K., Kuebler W.M., 2014]. Фосфорилирование тирозина в составе VE-кадгерина, опосредованное VEGF, сопровождается эндоцитозом комплекса  $\beta$ -катенин / VE-кадгерин и повышением сосудистой проницаемости [Gavard J., Gutkind J.S., 2006].

Помимо представленных выше механизмов регуляции сосудистого гомеостаза, в контроле его активности предполагают участие дофамина [Bhattacharya R., Sinha S., Yang S.P. et al., 2008]. Дофамин – это нейромедиатор, продукт метаболизма L-тирозина, принимает участие в регуляции когнитивных функций, формировании мотивационного поведения [Pinoli M., Marino F., Cosentino M., 2017].

В периферических тканях дофамин регулирует секрецию инсулина, снижает артериальное давление, ингибирует синтез фактора Виллебранда эндотелиальными клетками [Rubí B., Maechler P., 2010]. В лёгких дофамин секретируется нейроэндокринными клетками лёгких (*анг.* Pulmonary neuroendocrine cells, PNECs) [Gandhi S.G., Law C., Duan W. et al., 2009]. PNECs обнаруживаются с 10 недели внутриутробного развития. PNECs регулируют ветвление бронхиол [Linnoila R.I., 2006].

Функции дофамина опосредуются пятью типами рецепторов ( $D_{1-5}$ ).  $D_2$ -рецепторы обнаруживаются в лёгочной артерии кролика (автордиография) [Kobayashi Y., Cavallotti D., Ricci A., Amenta F., 1994], адвентиции лёгочной и долевой артериях человека (иммуногистохимия [Ricci A., Mignini F., Tomassoni D., Amenta F., 2006; Wakai J., Takayama A., Yokoyama T. et al., 2015] и иммуноблотинг [Ricci A., Mignini F., Tomassoni D., Amenta F., 2006]), гломерулярных клетках каротидного синуса крыс линии Wistar (цитоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи) [Wakai J., Takayama A., Yokoyama T. et al., 2015].

Проведение ПЦР в реальном времени позволило обнаружить в клетках гладкой мускулатуры дыхательных путей человека (*анг.* Human airway

smooth muscle, HASM) мРНК, кодирующую дофаминовые  $D_2$ -рецепторы. Вестер-блот анализ лизатов культуры HASM и гладкомышечных клеток трахеи человека и морской свинки и иммуногистохимическое исследование подтвердили наличие рецепторов к дофамину [Mizuta K., Zhang Y., Xu D. et al., 2012]. В исследованиях *in vitro* Helms M.N. и коллеги (2006) обнаружили рецепторы дофамина 2 типа в культуре альвеоцитов II типа, полученной из лёгких взрослых крыс [Helms M.N., Chen X.J., Ramosevac S. et al., 2006].

В лёгких дофамин повышает частоту открытия натриевых каналов альвеолярного эпителия за счёт активации  $D_1$ -рецепторов [Helms M.N., Chen X.J., Ramosevac S. et al., 2006], увеличивает активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [Lu L., Zhou J., Zhang J. et al., 2016].

Дофамин является эндогенным ингибитором ангиогенеза. Путём ингибирования VEGF-зависимого фосфорилирования VE-кадгерина и нарушения образования связи между окклюдином и белком zonula occludens в эндотелиальных клетках дофамин может уменьшать сосудистую проницаемость [Bhattacharya R., Sinha S., Yang S.P. et al., 2008]. На модели карциномы лёгкого Льюис у мышей дофамин и агонисты  $D_2$ -рецепторов (квинпирол, каберголин) тормозят опухолевую прогрессию, снижают количество  $\text{CD31}^+$  клеток в опухолевой ткани и увеличивают число эндотелиальных клеток в состоянии апоптоза [Hoeppner L.H., Wang Y., Sharma A. et al., 2015]. На модели рака толстого кишечника HT29 введение дофамина также уменьшает количество  $\text{CD31}^+$  клеток [Sarkar C., Chakroborty D., Dasgupta P.S., Basu S., 2015].

В эксперименте дофамин ингибирует VEGF-зависимую мобилизацию ЭПК ( $\text{CD45}^+\text{VEGFR2}^+$ ) из костного мозга. Аналогичные результаты получены в экспериментах *in vivo*. Chakroborty D. с соавт. (2011) полагают, что эффект дофамина связан с уменьшением экспрессии MMP-9 в костном мозге [Shome S., Rana T., Ganguly S. et al., 2011].

Обработка культуры HUVECs дофамином (10 мкМ) или агонистом  $D_2$ -рецепторов квинпиролом (10 мкМ) приводит к снижению VEGF-индуцированного фосфорилирования Y1175, Y996, Y951 и Y1059 остатков тирозина VEGFR2 [Vohra P.K., Hoeppner L.H., Sagar G. et al., 2011].

Добавление дофамина (10 мкМ) в культуру МСК ( $\text{CD45}^+\text{CD34}^+\text{CD105}^+$ ) тормозит их VEGF-опосредованную миграцию [Shome S., Dasgupta P.S., Basu S., 2012]. В противоположность этому, антагонист  $D_2$ -рецепторов этиклопид значительно повышает количество циркулирующих МСК ( $\text{CD45}^+\text{CD34}^+\text{CD105}^+$ ) и стимулирует их миграцию. В дозе 10 мг/кг этиклопид повышал скорость заживления ран за счёт усиления процесса ангиогенеза [Shome S., Rana T., Ganguly S. et al., 2012]. В своих экспериментах *in vivo* и *in vitro* I. Mirones с коллегами (2014) продемонстрировали влияние дофамина на мобилизацию мезенхимальных предшественников с фенотипом  $\text{CD45}^+\text{CD31}^+\text{CD34}^+\text{CD105}^+$ . Они были получены из периферической крови здоровых доноров. Добавление дофамина (50 ммоль) к культуре человеческих предшественников мезенхимальных клеток *in vitro* усиливало их миграцию

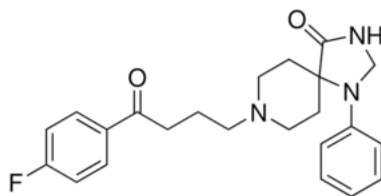
## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

через мембрану с порами диаметром 8 мкм. Чтобы определить, какой тип дофаминовых рецепторов опосредует данный феномен, предшественники мезенхимальных клеток в течение часа инкубировали с антагонистами  $D_2$ -рецепторов бромокриптином и этиклопидом в сравнении с антагонистом  $D_1$ -рецепторов SCH-23390. По результатам исследования блокада  $D_1$ -рецепторов не влияет на миграцию мезенхимальных предшественников. Бромокриптин повышает дофамин-индуцированную миграцию, в то время как добавление в культуру предшественников мезенхимальных клеток этиклопида тормозит её [Mirones I., Angel Rodríguez-Milla M., Cubillo I. et al., 2014; Shome S., Rana T., Ganguly S. et al., 2012].

Дофамин *in vitro* повышает трансэндотелиальную миграцию  $CD14^+CD16^+$  моноцитов, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов, через гематоэнцефалический барьер. Эффект реализуется через  $D_1$ -рецепторы и опосредован молекулой клеточной адгезии ICAM-1 (анг. Inter-cellular adhesion molecule-1/CD54, ICAM-1) и, по мнению Calderon T.M. и соавт., не связан с изменением сосудистой проницаемости [Calderon T.M., Williams D.W., Lopez L. et al., 2017].

В дозе 10 мг/кг дофамин уменьшает содержание жидкости и миелопероксидазы в лёгких, повышает выживаемость мышей линии Balb/C с отёком лёгких, индуцированным внутрибрюшинным введением липополисахарида. Аналогичный эффект был продемонстрирован Vohra P.K. с коллегами при введении квинпирола (10 мг/кг). У мышей линии C57BL/6, нокаутных по  $D_2$ -рецептору, квинпирол и дофамин не улучшали гистологическую картину при отёке лёгких [Vohra P.K., Hoerpner L.H., Sagar G. et al., 2011]. Это указывает на избирательное влияние дофамина на сосудистую проницаемость через  $D_2$ -рецепторы. Однако данные о способности дофамина уменьшать лёгочную гипертензию, расширять бронхи и уменьшать количество альвеолярной жидкости противоречивы и не имеют достаточных клинических доказательств [Ciarka A., Vincent J.L., Van de Borne P., 2007].

### 6.2.2. Спиперон



Спиперон (син. Спироперидол, Спиропитан) является бутирофеноновым антипсихотическим средством со свойствами антагониста дофаминовых ( $D_1$ ,  $D_2$  и  $D_3$ ) и серотониновых ( $5\text{-HT}_{1,2}$ ) рецепторов [Leysen J.E., Gommegen W., Laduron P. M., 1978; Gundlach A.L., Largent B.L., Snyder S.H., 1984; Lu D., Carson D.A., 2009].

Спиперон проявляет свойства антагониста в отношении  $\alpha$ -адренорецепторов, является высокоаффинным лигандом сигма-рецепторов [Snyder S.H., Largent V.L., 1989]. Было продемонстрировано, что спиперон является регулятором кальция и что он специфически блокирует каноническую передачу сигналов Wnt до активации  $\beta$ -катенина путём повышения уровня внутриклеточного кальция [Lu D., Carson D.A., 2009].

Наибольшую селективность спиперон проявляет в отношении  $D_2$ -рецепторов, что обусловлено наименьшей константой диссоциации ( $K_i$ ). В зависимости от локализации рецепторов и pH среды,  $K_i$  спиперона составляет от 0,01 нмоль [Neve K.A., 1991] до 6,6 нмоль [Levant B., Grigoriadis D.E., DeSouza E.B., 1992] (таблица 8). Для антипсихотического средства галоперидола, производного бутирофенона,  $K_i$  составляет от 0,12 [Hirose T., Kikuchi T., 2005] до 6 400,00 нмоль [Colabufo N.A., Berardi F., Perrone R. et al., 2008].

**Табл. 8.** Значение константы диссоциации ( $K_i$ , нМ) для спиперона (по данным Ki Database)

Рецептор	Константа диссоциации, $K_i$ (нМ)	Тип рецептора	Упоминание в литературе
5-HT <sub>1</sub>	322.5800	Человеческий	Richelson E., 1988
5-HT <sub>1A</sub>	425.8400	Крысиный	Gozla N. et al., 1988
5-HT <sub>1A</sub>	130.7600	Человеческий	Hoyer et al., 1986
5-HT <sub>2</sub>	0.430000	Крысиный	Millan M.J. et al., 1994
5-HT <sub>2</sub>	0.380000	Человеческий	Richelson E., 1988
5-HT <sub>2A</sub>	15.488166	Человеческий	Knight A.R. et al., 2004
$\alpha 1$	39.810000	Человеческий	Schwinn D.A. et al., 1995
D <sub>1</sub>	577.000000	Человеческий	Toll L. et al., 1998
D <sub>1</sub>	8,400.000000	Крысиный	Billard W. et al., 1984
D <sub>2</sub>	0.050000	Человеческий	Joyce J.N. et al., 1991
D <sub>2</sub>	0.050000	Крысиный	Kessler R.M. et al., 1993

Высокая селективность стала причиной использования спиперона для идентификации  $D_2$  рецепторов дофамина [Gundlach A.L., Largent V.L., Snyder S.H., 1984; Quelch D.R. et al, 2014]. 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., Galli S.J., Meltzer P.C. et al., 1993; Finnema S.J., Bang-Andersen B., Wikström H.V., Halldin C., 2010].

Sharpe R.J. с коллегами на модели контактной гиперчувствительности, вызванной аппликацией 4% раствора оксазолон, показали местное иммуносупрессивное действие спиперона. Подкожное введение препарата (доза 150, 30 мг/кг) мышам линии C57/BL6J сопровождалось уменьшением отёка и инфильтрации тканей лимфоцитами. В дозе 150 мг/кг спиперон проявлял нейролептический эффект. При этом в дозе 30 мг/кг препарат в меньшей степени угнетал ЦНС. При местном применении спиперон уменьшал отёк и степень лейкоцитарной инфильтрации тканей, но не проявлял системных эффектов [Sharpe R.J., Chandrasekar A., Arndt K.A. et al., 1992].

На модели острого панкреатита, индуцированного внутрибрюшинным введением церулеина в дозе 50 мкг/кг, спиперон снижал уровень амилазы и липазы в крови [Hamada K., Yoshida M., Isayama H. et al., 2007].

На культуре клеток мышинной микроглии BV-2 Zheng L.T. с коллегами продемонстрировал противовоспалительный эффект спиперона. В концентрации 15 и 30 мкмоль препарат достоверно снижал продукцию оксида азота клетками микроглии в ответ на введение липополисахарида, АТФ и β-амилоида, снижал продукцию TNF-α. Отмечалось уменьшение количества мРНК индуцируемой синтазы оксида азота (*анг.* inducible nitric oxide synthase, iNOS), ИЛ-1 и TNF-α. Кроме того, отмечалось уменьшение активации сигнальных путей NF-κB и p38 MARK (*анг.* mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа). При совместном культивировании клеток микроглии BV-2 и нейробластомы крыс B35 спиперон оказывал нейропротективный эффект [Zheng L.T., Hwang J., Ock J. et al., 2008].

В экспериментах *in vitro* в культуре клеток IB3-1 (культура эпителиальных клеток бронхов, полученных от пациента с муковисцидозом с мутантным фенотипом трансмембранного регулятора муковисцидоза (*анг.* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)) спиперон стимулировал экскрецию Cl<sup>-</sup> и повышал уровень цитоплазматического Ca<sup>2+</sup>. Высвобождение Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума было опосредовано сигнальным путём PLC и не связано с блокадой D<sub>2</sub>-рецепторов или 5HT-рецепторов. После предварительной инкубации клеток с U-73122 (ингибитор PLC), добавление спиперона не приводило к повышению концентрации цитоплазматического Ca<sup>2+</sup> [Liang L., MacDonald K., Schwiebert E.M. et al., 2009].

### **6.2.3. Фармакологические эффекты спиперона при эмфиземе лёгких**

Из представленных выше данных следует, что антагонисты дофаминовых рецепторов оказывают противовоспалительное действие и имеют потенциал для стимуляции ангиогенеза. В этой связи использование антагонистов дофаминовых рецепторов может представлять собой новый подход не только в лечении ХОБЛ и эмфиземы, но и в ускорении регенерации микроциркуляторной сети. Для подтверждения этой гипотезы на мышах самках

линии C57BL/6 нами было проведено исследование противовоспалительных и регенеративных эффектов спиперона на модели эмфиземы лёгких, индуцированной ЛПС и ЭСД.

В этом исследовании интратрахеальное введение ЛПС и ЭСД вызывало гибель 20% мышей группы патологического контроля. При введении спиперона смертность отсутствовала. Блокада  $D_2$ -рецепторов снижала активность воспаления, предотвращала разрушение межальвеолярных перегородок и уменьшила площадь эмфиземы в лёгких животных опытной группы по сравнению с патологическим контролем (приложение, рисунок 2), с другой стороны, увеличивала количество капилляров и экспрессию CD31 (приложение, рисунок 3, 4). Как известно, курение сигарет вызывает функциональную инактивацию  $\alpha 1$ -антитрипсина. Это делает уязвимой лёгочную ткань курильщиков к разрушительному действию эластаз нейтрофилов [Gadek J., Fells G., Crystal R., 1979; Kapellos T.S., Bassler K., Aschenbrenner A.C., et al., 2018]. В настоящем исследовании было показано, что спиперон повышал концентрацию  $\alpha 1$ -антитрипсина в лёгких мышей опытной группы по отношению к патологическому контролю (приложение, рисунок 4).

На основании этих данных мы сделали вывод, что спиперон стимулирует регенерацию повреждённой ЛПС и ЭСД лёгочной ткани. Объяснение этому мы видим в сосудистом эффекте спиперона: в ответ на введение препарата миграция и трансэндотелиальный переход СК улучшается. Этот вывод подтверждается увеличением числа эндотелиальных прогениторных клеток, VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза в лёгких мышей опытной группы по сравнению с нелечеными мышами с эмфиземой лёгких (приложение, рисунок 5A, B и D). Вместе с тем, мы не исключаем положительный эффект спиперона на мобилизацию клеток из костного мозга. В пользу этого предположения выступает увеличение числа предшественников ангиогенеза в крови мышей, получавших спиперон (приложение, рисунок 5B, D и F).

Передача сигналов Notch играет важную роль в развитии и гомеостазе лёгочной ткани [Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR., 2010; Xu K., Moghal N., Egan S.E., 2012]. Активация пути передачи сигналов Notch ингибирует дифференцировку и созревание клеток, и его экспрессия подавляется во время дифференцировки клеток [Zong D., Li J., Cai S. et al., 2017; Walker L., Carlson A., Tan-pertel H.T. et al., 2001; Sainson R.C., Aoto J., Nakatsu M.N. et al., 2005; Zanotti S., Canalis E., 2013]. В этом контексте следует отметить, что уровни экспрессии Notch1 в зрелых эндотелиальных клетках снижаются у пациентов с ХОБЛ [Zong D., Li J., Cai S. et al., 2018]. Однако мало что известно о влиянии эмфиземы на незрелые Notch1<sup>+</sup> эндотелиальные клетки. Как показано на рисунке 9, индуцированная ЛПС и ЭСД эмфизема лёгких сопровождалась уменьшением числа Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток и Notch1<sup>+</sup> предшественников ангиогенеза. С нашей точки зрения, это связано с индукцией Notch1 опо-

средованной дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза.

Во множестве публикаций было высказано предположение о перекрестных помехах между передачей сигналов Notch и VEGF [Blanco R., Gerhardt H., 2013; Fish J.E., Cantu Gutierrez M., Dang L.T. et al., 2017; Kühn C., Chesa S., 2019]. Более того, указывается, что индуцированное дофамином прямое взаимодействие между VEGF2 рецептором и  $D_2$  рецептором может нарушать индуцированный VEGF ангиогенез [Sinha S., Vohra P.K., Bhattacharya R. et al. 2009]. Таким образом, предположительно, регенеративный эффект спиперона может быть опосредован блокадой индуцированного дофамином прямым взаимодействием между Notch и VEGF. В нашем исследовании мы провели цитометрическую оценку количества лёгочных VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток, ко-экспрессирующих Notch1. По нашим данным, спиперон снижал содержание VEGF2<sup>+</sup> / Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в легких мышей опытной группы более чем в два раза по сравнению с патологическим контролем (приложение, рисунок 6), что можно объяснить диссоциацией рецептора  $D_2$  и VEGFR2 за счёт блокирования дофаминовых рецепторов на клеточной мембране. Предположительно, так в условиях введения ЛПС и ЭСД спиперон устраняет ингибирующее действие дофамина на ангиогенез.

Есть публикации, в которых сообщается, что эндотелиальными прогениторными клетками экспрессируют  $D_2$  -рецепторы [Helms M.N., Chen X.J., Ramosevac S. et al., 2006]. Присутствие  $D_2$  -рецепторов на мембране свидетельствует о прямом регулирующем эффекте дофамина на эндотелиальные прогениторные клетки лёгких при эмфиземе и ХОБЛ. Результаты наших экспериментов *in vitro* показали, что дофамин оказывает прямое стимулирующее действие на эндотелиальные прогениторные клетки (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> Nectin2<sup>+</sup>) лёгких мышей в условиях введения ЛПС и ЭСД (приложение, рисунок 7Е). Nectin2 является маркером активно пролиферирующих клеток. Предварительная обработка спипероном отменяла индуцированную дофамином пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> Nectin2<sup>+</sup>). С другой стороны, в экспериментах *in vivo* спиперон снижал количество Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток в лёгких мышей в условиях введения ЛПС и ЭСД по сравнению с нелеченными мышами патологического контроля (приложение, рисунок 6). С нашей точки зрения, блокада  $D_2$  -рецепторов спипероном ингибирует опосредованную дофамином пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток и способствует их дифференцировке, пренебрегая эффектами дофамина на Notch1.

Таким образом, на модели эмфиземы лёгких продемонстрированы многочисленные положительные эффекты спиперона. В частности, проявляя свои сосудистые эффекты, спиперон способствует мобилизации и миграции эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>), VEGF2<sup>+</sup> эндо-



телиальных клеток и предшественников ангиогенеза (CD45<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>) в повреждённые ЛПС и ЭСД лёгкие. Индуцированная спипероном регенерация микрососудистой сети лёгких объясняется блокадой D2 -рецепторов, в частности, устранением негативных эффектов дофамина на опосредованную передачей сигналов Notch дифференцировку эндотелиальных прогениторных клеток и VEGF-опосредованный ангиогенез.

В некоторых публикациях отмечено влияние спиперона на каноническую передачу сигналов Wnt [Lu D., Carson D.A., 2009]. При это ингибция спипероном Wnt сигнального пути не связана с его антагонистическими свойствами в отношении дофаминовых и серотониновых рецепторов. Спиперон повышает уровень внутриклеточного кальция [Lu D., Carson D.A., 2009]. Это может быть ещё одним механизмом действия спиперона при ХОБЛ и эмфиземе. Кроме того, спиперон может препятствовать ключевым изменениям в экспрессии генов, связанных с регуляцией активности гидролазы в эпителиальных клетках и моноцитах, подвергнутых воздействию сигаретного дыма [Zhua D., Maa N., Chen L. et al. 2021].

При эмфиземе лёгких, вызванной эластазой или D-галактозамин гидрохлоридом, спиперон оказывал действие подобному тому, что наблюдалось в условиях введения ЛПС и ЭСД: препятствовал деструкции паренхимы легких и сокращал площадь эмфиземы, выявлена тенденция к увеличению площади микроциркуляторного русла (таблица 9, 10). При этом блокада D<sub>2</sub>-рецепторов уменьшала воспалительную инфильтрацию паренхимы лёгких. Противовоспалительный эффект спиперона в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида превосходил таковой при использовании эластазы.

**Табл. 9.** Влияние спиперона на площадь эмфиземы легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы на 21 сутки эксперимента (% от нормальной ткани) (M.±m)

Группы	Верхнее легочное поле	Среднее легочное поле	Нижнее легочное поле
Интактный контроль	0	0	0
Эмфизема легких	42,60 ± 6,68 p <sub>1</sub> < 0,001	61,72 ± 3,09 p <sub>1</sub> < 0,001	81,05 ± 5,21 p <sub>1</sub> < 0,001
Эмфизема легких в условиях введения спиперона	22,21 ± 4,61 p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,001	36,78 ± 4,12 p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,001	46,99 ± 9,95 p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,011

**Примечание:** p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля; p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

Противовоспалительный и регенеративный эффекты спиперона в условиях введения эластазы и D-галактозамин гидрохлорида подтвердились данными иммуногистохимических исследований и ИФА. Так, не зависимо

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

от модели блокада  $D_2$  рецепторов, во-первых, уменьшала экспрессию маркера воспаления CD16 в лёгких животных опытной группы по сравнению с патологическим контролем. Во-вторых, повышала экспрессию пан-цитокератина и CD31 в альвеолярных отделах, сосудах лёгких и воздухоносных путях. Дополнительно в модели эмфиземы легких, индуцированной D-галактозамин гидрохлоридом, мы обнаружили, что спиперон повышал концентрацию  $\alpha_1$ -антитрипсина в сыворотке крови.

**Табл. 10.** Влияние спиперона на площадь эмфиземы легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения D-галактозамин гидрохлоридом на 3 сутки эксперимента (% от нормальной ткани) (M. $\pm$ m)

Группы	Верхнее легочное поле	Среднее легочное поле	Нижнее легочное поле
Интактный контроль	0	0	0
Эмфизема легких	2,46 $\pm$ 0,81 $p_1 < 0,001$	4,2 $\pm$ 1,33 $p_1 < 0,001$	22,15 $\pm$ 2,12 $p_1 < 0,001$
Эмфизема легких в условиях введения спиперона	0,78 $\pm$ 0,30 $p_2 < 0,001$	2,42 $\pm$ 1,26 $p_2 < 0,023$	6,89 $\pm$ 1,29 $p_2 < 0,001$

**Примечание:**  $p_1$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

Таким образом, в условиях моделирования эмфиземы лёгких D-галактозамин гидрохлоридом и эластазой спиперон оказывает противовоспалительное действие, сокращает площадь эмфиземы, стимулирует регенерацию клеток лёгких, преимущественно эндотелиальных клеток.

Регенеративный эффект в отношении эндотелия при нарушении баланса протеаз и антипротеаз и индукции системного дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина может быть связан с влиянием спиперона на различные предшественники эндотелиальных клеток. Для получения ответа на этот вопрос мы оценили влияние спиперона на резидентные и циркулирующие в крови эндотелиальные прогениторные клетки, предшественники ангиогенеза, и VEGF<sup>+</sup> эндотелиальные клетки в условиях введения эластазы и D-галактозамин гидрохлорида. Так, по нашим данным спиперон уменьшал содержание резидентных VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток и клеток-предшественников ангиогенеза у мышей в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида по сравнению с патологическим контролем (таблица 11).

**Табл. 11.** Влияние спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида на 3 сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения спиперона
VEGF2 <sup>+</sup> эндотелиальные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup>	0,906 ± 0,088	2,182 ± 0,188 $p_1 < 0,001$	1,319 ± 0,142 $p_1 = 0,027$ $p_2 < 0,001$
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	1,913 ± 0,165	5,730 ± 0,445 $p_1 < 0,001$	3,703 ± 0,225 $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,017$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	1,884 ± 0,112	3,133 ± 0,289 $p_1 = 0,01$	2,741 ± 0,312 $p_1 = 0,018$

**Примечание:**  $p_1$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

В тоже время количество этих клеток в крови, напротив, увеличивалось (таблица 12). При введении эластазы блокада дофаминовых  $D_2$ -рецепторов увеличивала число предшественников эндотелиальных клеток в крови и не оказывала влияние на резидентную фракцию.

**Табл. 12.** Влияние спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников в крови мышей линии C57BL/6 в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида на 3 сутки эксперимента (% от всех окрашенных мононуклеаров) ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения спиперона
VEGF2 <sup>+</sup> эндотелиальные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup>	0,093 ± 0,008	0,135 ± 0,022 $p_1 = 0,037$	0,173 ± 0,008 $p_1 = 0,011$
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	0,081 ± 0,005	0,093 ± 0,007	0,142 ± 0,011 $p_1 = 0,013$ $p_2 = 0,023$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	0,145 ± 0,011	0,319 ± 0,024 $p_1 = 0,011$	0,288 ± 0,013 $p_1 = 0,025$

**Примечание:**  $p_1$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Итак, в условиях введения эластазы или D-галактозамин гидрохлорида спиперон вызывает мобилизации предшественников эндотелиальных клеток в кровь. В случае D-галактозамин гидрохлорида миграции клеток в легкие находит своё объяснение в незначительном повреждении эндотелия. Эластаза значительно сокращает площадь микрососудистой сети и это препятствует индуцированной спипероном миграции клеток в лёгкие.

Ранее нами были представлены доказательства зависимости процессов регенерации эндотелия от ассоциации дофаминовой системы с Notch1-сигналингом при эмфиземе лёгких, индуцированной ЛПС и ЭСД. Аналогичная закономерность была выявлена нами при моделировании локального нарушения баланса между протеазами и антипротеазами, а также системного дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина. Результаты проведённых экспериментов свидетельствуют, что в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида спиперон увеличивал количество Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток и уменьшал число Notch1<sup>+</sup>/ VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток и Notch1<sup>+</sup> предшественников ангиогенеза в лёгких мышей опытной группы по сравнению с патологическим контролем ПК (таблица 13).

**Табл. 13.** Влияние спиперона на содержание Notch1<sup>+</sup> предшественников эндотелиальных клеток в легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения D-галактозамин гидрохлорида на 3 сутки эксперимента (% от общей популяции) (M ± m)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения спиперона
VEGF2 <sup>+</sup> эндотелиальные клетки / CD45-CD309 <sup>+</sup>	1,467 ± 0,078	1,916 ± 0,156	1,991 ± 0,077
Предшественники ангиогенеза / CD45-CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	1,620 ± 0,131	3,967 ± 0,278 $p_1 < 0,001$	4,427 ± 0,395 $p_1 < 0,001$
Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45-CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	2,442 ± 0,117	0,695 ± 0,045 $p_1 < 0,001$	2,453 ± 0,189 $p_2 < 0,001$

**Примечание:**  $p_1$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

При введении эластазы блокада  $D_2$  -рецепторов сокращала популяцию резидентных Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток и Notch1<sup>+</sup>/ VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток (таблица 14). С нашей точки зрения, при введении D-галактозамин гидрохлорида или эластазы спиперон облегчает диссоциацию  $D_2$  -рецепторов и VEGF2 рецепторов, а также фосфорилирование последнего. Этим механизмом спиперон устраняет ингибирующее действие дофамина на ангиогенез. Предположительно, в указанных моделях эмфиземы восстановление микрососудистой сети лёгких осуществля-

ется за счёт активного ветвления сосудов с преимущественным участием VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток. Между тем, при введении D-галактозамин гидрохлорида спиперон, по всей видимости, дополнительно способствует реализации сценария формирования «кончиковых» клеток с участием Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток.

**Табл. 14.** Влияние спиперона на содержание Notch1<sup>+</sup> предшественников эндотелиальных клеток в легких мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы на 14 сутки эксперимента (% Notch1<sup>+</sup>-клеток от общей популяции) (M ± m)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения спиперона
VEGF <sup>+</sup> эндотелиальные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup>	0,361 ± 0,022	2,149 ± 0,129 p <sub>1</sub> < 0,001	1,049±0,087 p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,001
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	3,502 ± 0,313	5,464 ± 0,448 p <sub>1</sub> = 0,01	4,213± 0,245
Эндотелиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	7,346 ± 0,448	7,704 ± 0,665	4,762±0,348 p <sub>1</sub> = 0,01 p <sub>1</sub> < 0,001

**Примечание:** p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий относительно показателя интактного контроля; p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий относительно показателя патологического контроля

Подводя итог исследованию эффектов и механизма действия блокатора D<sub>2</sub>-рецепторов спиперона, можно сказать, что при эмфиземе лёгких различной этиологии положительные эндотелиальные эффекты введения спиперона реализовываются с помощью нескольких механизмов. Блокада D<sub>2</sub>-рецепторов, во-первых, уменьшает активность пролиферации и стимулирует дифференцировку предшественников эндотелиальных клеток. Во-вторых, отменяет ингибирующее действие дофамина на сигнальные системы VEGF и Notch. В-третьих, вызывает вазодилатацию, что облегчает мобилизацию из костного мозга и миграцию в травмированный участок лёгкого предшественников эндотелиальных клеток. Следует отметить, что реализация механизмов действия спиперона во многом зависит от состояния микроциркуляторной сети. При незначительных повреждениях эндотелия в условиях введения ЛПС и ЭСД с большей долей вероятности можно предположить, что спиперон облегчает мобилизацию и миграцию предшественников эндотелиальных клеток, ускоряет ангиогенез через VEGF и Notch- сигналинг в их взаимодействии. Разрушение микрососудистой сети при введении эластазы или D-галактозамин гидрохлорида затрудняет или делает невозможным миграцию эндотелиальных прогениторных клеток при введении спиперона. В этих моделях эмфиземы ускорение ангиогенеза опосредовано сигнальными путями VEGF и Notch резидентных предшественников эндотелиальных клеток (рисунок 8).

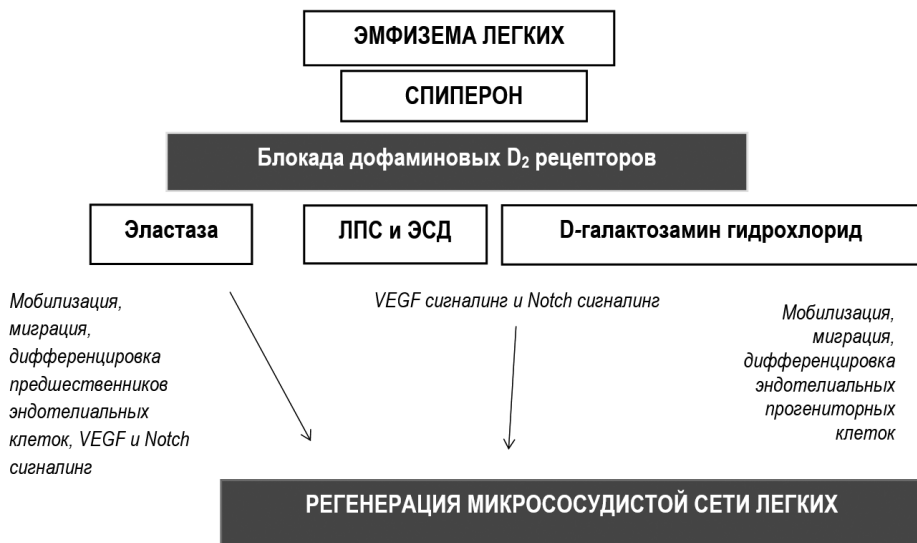


Рис. 8. Механизмы регенераторного эффекта спиперона при моделировании эмфиземы лёгких ЛПС и ЭСД, эластазой и D-галактозамин гидрохлоридом

В заключение необходимо отметить, что на всех моделях эмфиземы спиперон не оказывал существенного влияния на предшественники мезенхимальных и эпителиальных клеток. Обнаруженное нами в иммуногистохимических исследованиях частичное восстановление клеток альвеолярного эпителия и снижение активности такого процесса ремодуляции, как перибронхиальный и периваскулярный фиброз при блокаде дофаминовых D<sub>2</sub>-рецепторов, опосредован положительным эффектом регенерации клеток эндотелия крупных сосудов и микрососудистой сети лёгких.

### 6.3. Пегилированный аналог глюкагоноподобного пептида 1 как средство гендерного выбора лечения сочетанной патологии МС и ХОБЛ и стимуляции регенерации микрососудистой сети

#### 6.3.1. Гендерные различия в реакциях стволовых клеток эндотелия при сочетании метаболических нарушений и эмфиземы лёгких

Метаболический синдром (МС) является сложным заболеванием. В клинической практике МС определяется по наличию по меньшей мере трёх из следующих пяти состояний: абдоминальное ожирение, повышенный

уровень триглицеридов, низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови, высокое кровяное давление (гипертония) и повышенный уровень глюкозы в крови [Lusis A.J., Attie A.D., Reue K., 2008; Matsushita K., Dzau V.J., 2017].

Особенности гормонального обмена определяют специфику гомеостаза и многих заболеваний у мужчин и женщин. Традиционно действием половых гормонов объясняются гендерные различия в механизмах накопления жировой ткани и мобилизации жировых запасов, гомеостазе глюкозы, секреции и эффектах инсулина и связанные с ними абдоминальное ожирение и МС [Mauvais-Jarvis F., 2017; Link, J.C.; Reue K., 2017]. Так, женщины подвергаются большему риску метаболических нарушений из-за более высокого соотношения жировой / мышечной массы и большего количества подкожной жировой ткани. Резистентность к инсулину у женщин выше, чем у мужчин. Это связано с гормональными различиями и диетой [Karastergiou K., Smith S.R., Greenberg A.S., Fried S.K., 2012; Mundi M.S., Koutsari C., Jensen M.D., 2014; Karpe F., Pinnick K.E., 2015; Karastergiou K., Fried S.K., 2017]. Хорошо известны гендерные различия в профиле липопротеинов [Link J.C., Reue K., 2017]. Гендерно-специфические механизмы способствуют более высокому накоплению жировой ткани у женщин, в то время как мобилизация жировых запасов, как правило, более эффективна у мужчин.

В дополнение к представленным характеристикам МС следует отметить, что гендерные различия в основных метаболических путях отражаются на патогенезе заболеваний лёгких у мужчин и женщин [Agarwal A.R., Yin F., Cadenas E., 2014; Titz B. et al., 2016]. Абдоминальное ожирение способствует повышению реактивности дыхания и может привести к таким респираторным патологиям, как ХОБЛ и астме [Hanson C., Rutten E.P., Wouters E.F., Rennard S., 2014; Lamonaca P. et al., 2017]. Более того, ожирение часто встречается у пациентов с диагнозом ХОБЛ и способствует развитию респираторных симптомов [García-Río F. et al., 2014]. Клинические наблюдения указывают, что пациенты с сочетанием МС и ХОБЛ имеют более высокий индекс массы тела по сравнению с пациентами с ХОБЛ без МС [Sebron Lipovec N. et al., 2016]. Сочетание ХОБЛ с МС чаще встречается у пациенток женского пола: распространённость сочетанной патологии у мужчин составляет 18,5%, у женщин – 38,5% [Kim J.H., Yoo J.Y., Kim H.S., 2019]. Отмечают различия клинической картины и течение ХОБЛ у женщин и мужчин с ожирением и МЕТС [Åberg J. et al., 2019].

Жирные кислоты являются важным источником энергии. В этом контексте катаболизм жирных кислот даёт больше аденозинтрифосфата (АТФ), чем окисление глюкозы [Walther T.C., Farese R.V., 2012; Shimano H., Sato R., 2017; Peiris-Pages M., Pestell R.G., Sotgia F., 2017]. В некоторых публикациях указывается на то, что преимущественно липидный обмен позволяет лёгочной ткани удовлетворять энергетические потребности пациентов с ХОБЛ [Chen H. et al., 2019]. С другой стороны, изменения в липидном обмене

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

не (катаболизм, анаболизм) способствуют патогенезу ХОБЛ. В частности, ожирение инициирует анаболические пути, участвующие в синтезе провоспалительных молекул [Chen H. et al., 2019]. Этот механизм снижает функцию лёгких и усугубляет течение ХОБЛ [Hanson C., Rutten E.P., Wouters E.F., Rennard S., 2014; Lambert A.A. et al., 2017].

В негативном действии на лёгкие выделяют эстрогены. Стероидные женские половые гормоны снижают функцию лёгких. В своём обзоре J.H. Kim с коллегами (2019) указали на гендерные различия в гистологии и функциональной активности лёгких у пациентов с МС и ХОБЛ [Kim J.H., Yoo J.Y., Kim H.S., 2019]. Авторы подчеркнули, что, по сравнению с мужчинами, у женщин меньше альвеол. Относительно мужчин диаметр дыхательных путей у женщин невелик по сравнению с размером лёгких. Таким образом, в ходе прогрессирования ожирения функция лёгких женщин имеет тенденцию к существенному снижению. В 2018 году T. Zore и коллеги обратили внимание на предшественников адипоцитов как на потенциальный фактор, влияющий на половые различия жировой ткани [Zore T., Palafox M., Reue K., 2018]. В тоже время, гемопоэтические стволовые клетки являются фактором, способствующим гендерным различиям в воспалительной реакции. Важно отметить, что эндотелиальная дисфункция и эндотелиальные нарушения являются важными факторами риска многих осложнений ХОБЛ. Однако гендерные различия в эндотелиальной дисфункции и эндотелиальных нарушениях при сочетании МС и ХОБЛ малоизучены. Понимание специфических для пола механизмов сочетанного заболевания МС и ХОБЛ важно для поиска индивидуальных и персонализированных стратегий лечения пациентов с сочетанием.

На первом этапе работы у мышей линии C57BL/6 были изучены гендерные различия экспериментального метаболического синдрома и ХОБЛ.

Есть сведения, что введение глутамата натрия (ГН) новорожденным мышам повреждает дугообразное ядро гипоталамуса и снижает уровень нейропептида Y, регулирующего передачу сигналов лептина и инсулина [Matysková R. et al., 2008]. У таких животных развивается тяжёлое ожирение, гипергликемия и гиперинсулинемия [Sasaki Y. et al., 2009]. Отмечается схожесть эффектов ГН у грызунов с клиническим течением МС у человека [Sasaki Y. et al., 2009; Salisu N. et al., 2018].

В ходе проведённых экспериментов нами показано, что введение ГН увеличивало уровень общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов очень низкой плотности в сыворотке крови мышей линии C57BL/6 общей группы по сравнению с интактным контролем. Обращал на себя внимание тот факт, что индуцированные ГН нарушения в липидном обмене в большей степени были выражены у самцов, чем у самок. Представленные в настоящей главе сведения в целом соответствуют ранее опубликованным результатам [Sasaki Y. et al., 2009].



Как и в нашем более раннем исследовании [Skurikhin E.G. et al., 2019], эта работа выявила инфильтрацию клетками воспаления (преимущественно макрофагами и одиночными нейтрофилами) паренхимы лёгких у мышей обоих полов, получавших ГН. С другой стороны, в лёгких самок и самцов были обнаружены нарушения гемодинамики и снижение экспрессии маркера эндотелиальных клеток CD31. Детальный анализ результатов гистологических и иммуногистохимических исследований в сопоставлении с данными цитометрических исследований позволил выявить половые различия в реакции клеток ангиогенеза на моделирование метаболических нарушений. Так, у самок наблюдалось рекрутирование в лёгкие костно-мозговых эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза, а также циркулирующих в крови пероцитов и клеток гладкой мускулатуры сосудов. Как известно, пероциты клетки просвета зарождающегося сосуда, сосудистые гладкомышечные клетки участвуют в восстановлении нормальной структуры и функции повреждённого эндотелия через межклеточные контакты [Birbrair A. et al., 2015]. В соответствии с этой публикацией рекрутирование указанных клеток ангиогенеза в лёгкие может быть объяснено регенерацией повреждённого эндотелия в легких самок, получавших ГН.

Удивительно, но моделирование метаболических нарушений у самцов не приводило к рекрутированию в лёгочную ткань эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза костного мозга. При этом дополнительно с дислипидемией у животных этой группы наблюдались признаки гипергликемии и повышенное соотношение ТГ/ЛПВП по сравнению с интактным контролем. У самок эти параметры были в пределах значений нормы. Считается, что высокие значения соотношения ТГ/ЛПВП и толерантности к глюкозе указывают на высокий риск сосудистых осложнений [Vogtano G. et al., 2018].

Как было показано выше, реакцией на введение ЛПС и ЭСД лабораторным животным является воспаление, повреждение тканей лёгких и эмфизема. При сочетании глутамата натрия с ЛПС и ЭСД воспалительная реакция, повреждения альвеол и эндотелия, и площадь эмфизематозно-расширенных лёгких превосходили таковые в группе мышей, получавших только ЛПС и ЭСД. Несмотря на то, что этот комплекс феноменов был характерен как для самок, так и самцов, нами были выявлены половые различия в реакции лёгких в условиях сочетанной патологии. Так, повреждение альвеолярного эпителия и микрососудистой сети лёгких было более значительным у самцов (высокие значения ТГ/ЛПВП и гипергликемия до моделирования эмфиземы), чем у самцов (низкие значения ТГ/ЛПВП и нормальный уровень глюкозы до моделирования эмфиземы).

Таким образом, высокие значения соотношения ТГ/ЛПВП и гипергликемия могут иметь потенциальное прогностическое значение для заболеваний лёгких (ХОБЛ и эмфизема) в группе пациентов с абдоминальным ожирением и в совокупности с реакцией клеток ангиогенеза крови указывать на повреждения эндотелия лёгких.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

На втором этапе настоящего исследования мы изучили стволовые клетки эндотелия и «вспомогательные» клетки ангиогенеза мышей самок и самцов линии C57BL/6 при сочетании МС и эмфиземы лёгких. Введение ЛПС и ЭСД приводило к уменьшению количества эндотелиальных прогениторных клеток ( $CD45-CD31^+CD34^+$ ;  $CD31^+CD34^+CD146^+$ ), предшественников ангиогенеза, клеток гладкой мускулатуры сосудов, клеток просвета зарождающихся сосудов и перицитов в лёгких самцов с МС. Эти данные проточной цитометрии объясняются нарушением мобилизации и миграции клеток в лёгкие. Как и у самцов, мобилизация и миграция костно-мозговых предшественников ангиогенеза в лёгкие самок с сочетанной патологией ингибируется. В тоже время  $CD45-CD31^+CD34^+$  эндотелиальные прогениторные клетки, клетки гладкой мускулатуры сосудов и перициты активно рекрутировались в лёгкие. Дополнительно *in vitro* мы проанализировали  $CD31^+$  клетки, выделенные из лёгких самок и самцов при моделировании сочетанной патологии. Нами не выявлено гендерных различий в скорости апоптоза, экспрессии  $CD34$  и активности эстераз в культуре  $CD31^+$  клеток.

Итак, в условиях сочетанной патологии метаболического синдрома и эмфиземы лёгких гендерные различия заключаются в нарушении процессов мобилизации и миграции стволовых клеток эндотелия и «вспомогательных» клеток ангиогенеза у самцов, у самок сохраняется способность  $CD45-CD31^+CD34^+$  эндотелиальных прогениторных клеток, клеток гладкой мускулатуры сосудов и перицитов к рекрутированию в лёгкие.

Основная роль взрослых стволовых клеток заключается в образовании новых клеток после травмы [He S., Nakada D., Morrison S.J., 2009]. В тканях взрослого организма СК содержатся в костном мозге и тканеспецифических нишах [Pinho S., Frenette P.S., 2019]. Считается, что активность СК регулируется внутренними механизмами и внешними сигналами; последние могут исходить из «ниши», окружающего «ниши» внеклеточного матрикса и различных дистантных факторов. Например, воспаление изменяет многие гомеостатические параметры и таким механизмом оказывает существенное влияние на различные клетки, включая СК [Kizil C., Kyritsis N., Brand M., 2015]. Ранее сообщалось о негативном влиянии воспаления на «нишу» для стволовых клеток кишечника, клеток-сателлитов или миогенных клеток-предшественников, клеток-предшественников печени, эпидермальных стволовых клеток и нервных стволовых клеток [Kizil C., Kyritsis N., Brand M., 2015]. Кроме того, была продемонстрирована мобилизация МСК факторами воспаления [Keshav S., 2006; Koning J.J. et al., 2013; Mourkioti F., Rosenthal N., 2005]. С другой стороны, нами известно ингибирующее действие гуморальных факторов воспаления на эндотелиальные прогениторные клетки и предшественники ангиогенеза (таблица 15). В настоящем исследовании были обнаружены высокие уровни воспалительных цитокинов в гомогенатах лёгких самцов с сочетанной патологией, значительно превосходящие таковые у самок.

**Табл. 15.** Влияние TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  на содержание эндотелиальных прогениторных клеток и предшественников ангиогенеза в культуре мононуклеаров, выделенных из легочной ткани мышей линии C57BL/6 в условиях введения ЛПС и ЭСД (45 сутки) или блеомицина (21 сутки) (% от общего числа мононуклеаров) ( $M \pm m$ )

Группы	ЛПС и ЭСД	Блеомицин	
	Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	Эндотелиальные прогениторные клетки микрососудистого русла / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
До культивирования	2,682 $\pm$ 0,372	1,186 $\pm$ 0,095	1,588 $\pm$ 0,087
После культивирования с физ. р-ром	5,247 $\pm$ 0,475 $p_3 < 0,001$	3,068 $\pm$ 0,311 $p_3 < 0,001$	7,062 $\pm$ 0,552 $p_3 < 0,001$
После культивирования с TNF- $\alpha$ ( $10^{-7}$ М)	2,624 $\pm$ 0,184 $p_4 < 0,001$	1,523 $\pm$ 0,162 $p_4 < 0,001$	3,637 $\pm$ 0,298 $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,001$
После культивирования с IL-1 $\beta$ ( $10^{-7}$ М)	1,754 $\pm$ 0,092 $p_4 < 0,001$	1,329 $\pm$ 0,135 $p_4 < 0,001$	3,371 $\pm$ 0,612 $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,001$

**Примечание:**  $p_3$  – уровень статистической значимости различий относительно результатов до культивирования;  $p_4$  – уровень статистической значимости различий относительно результатов после культивирования

Таким образом, выявленное на модели сочетания метаболических нарушений и эмфиземы лёгких различие в активности процессов мобилизации и миграции у самцов и самок мышей линии C57BL/6 во многом объясняется гендерными различиями воспалительной реакции, жирового обмена и обмена глюкозы. Не исключается, что в формировании стволового ответа могут быть вовлечены гормональные механизмы. Причём мужские гормоны, вероятно, оказывают ингибирующее влияние на ангиогенез.

### 6.3.2. Общие сведения о фармакологических эффектах глюкагоноподобного пептида 1

Инкретины представляют большой интерес как для исследователей биомедицинской науки, так и для практической медицины. Среди многих представителей этой группы гормонов, участвующих в регуляции гомеостаза глюкозы в организме человека [Sundström L. et al., 2017] наиболее исследован глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1, англ. Glucagon-like peptide-1, GLP-1) [Никонова Л.В. и др., 2013]. В ответ на приём пищи ГПП-1 секретируется энтероэндокринными L-клетками слизистой оболочки подвздош-

ной кишки, так называемый «инкретиновый эффект» [Caporarello N, 2017; Sundström L, 2017], поступает в кровеносное русло [Мэдсбэд С., 2010; Корпачев В.В. и др., 2011; Панькив В.И., 2011], под влиянием инкретина наблюдается секреция инсулина, вызывает пролиферацию бета-клеток и ингибирует апоптоз [Brubaker P.L. et al., 2004]. Функциональный каскад в рамках гормональной регуляции «кишечник-поджелудочная железа», в формировании которой участвует ГПП-1, носит название энтероинсулярной оси.

Известны две биологически активные изоформы ГПП-1 с одинаковой выраженностью биологической активности, одинаковым периодом полужизни и идентичной гомологичностью в отношении рецепторов: 80% циркулирующего инкретина - это изоформа ГПП-1 (7-36), 20% – изоформа ГПП-1 (7-37) [Спасов А.А. и др., 2015]. После взаимодействия с ГПП-1 рецепторами реализуются физиологические эффекты ГПП-1. Разлагается инкретин ферментом дипептидилпептидаза IV (DPP-IV).

Рецепторы ГПП-1 (GLP-1R) выявлены в островках-клетках поджелудочной железы, а также в почках, сердце, периферической и центральной нервной системы. Преимущественная экспрессия GLP-1R обнаружена в бета-клетках поджелудочной железы. С действиями на эти клетки связывают инсулинотропные эффекты ГПП-1 [Галастьян Г.Р. и др., 2010; Корпачев В.В. и др., 2011; Никонова Л.В. и др., 2013]. ГПП-1 стимулирует выработку инсулина островковыми β-клетками, противодействует инсулинорезистентности, улучшает толерантность к периферической глюкозе, обладает противовоспалительными свойствами [Lee Y-S., Jun H-S. 2016; Huang J, Yi H 2018]. Помимо эндокринной активности ГПП-1 может играть решающую роль в гомеостазе лёгких. GLP-1R в избытке присутствуют в альвеолах, перегородках, дыхательных путях и гладких мышцах сосудов лёгких [Korner et al., 2007; Rogliani et al., 2016; Nguyen D.V. et al., 2017], их уровни относительно выше, чем в кишечнике и мозге [Viby N.E. et al., 2013].

Глюкагоноподобный пептид-1-(7-36) представляет собой весьма желательное противодиабетическое средство главным образом благодаря своей уникальной глюкозозависимой стимуляции профилей секреции инсулина [Lee S.H. et al., 2005]. Между тем, относительно недавно была показана индукция ГПП-1 (7-36) дифференцировки предшественников бета-клетки поджелудочной железы в секретирующие инсулин бета-клеток у мышей со стрептозотоцин-индуцированным диабетом [Скурихин Е.Г. и др., 2013]. При этом активность секреции полученных в результате неогенеза бета-клеток зависела от дозы глюкозы.

Аналоги ГПП-1 используются для лечения сахарного диабета 2 типа [Ушакова О.В. и др., 2016]. ГПП-1 проявляет противовоспалительное действие и положительно действует на сурфактант [Viby N.E. et al., 2013]. Также ГПП-1 приводит к нормогликемии и способствует нормализации эндотелиальной функции у больных с сахарным диабетом типа 1 [Dupre J., 2005; Ceriello A. et al., 2016]. В одном из недавних исследований были

представлены доказательства эффективности лечения инкретином ГПП-1 симптомов ожирения и диабета, воспаления и эмфиземы лёгких, а также стимуляции регенерации повреждённого эндотелия лёгких у мышей в условиях моделирования сочетанной патологии метаболических нарушений и эмфиземы лёгких [Skurikhin E. et al., 2019]. Авторами предложена новая мишень ГПП-1 – это экспрессирующие CD31 и CD34 эндотелиальные прогениторные клетки.

Тем не менее, разработка препарата на основе ГПП-1 фармацевтического агента для коррекции воспаления, обмена глюкозы, эндотелия, наблюдающиеся при многих заболеваниях, в том числе при метаболических нарушениях, диабете и эмфиземе лёгких, ХОБЛ, а также при сочетанной патологии (МС и ХОБЛ), имеет серьёзное ограничение из-за очень короткого периода полураспада в плазме [Спасов А.А. и др., 2015]. Период полужизни инкретина составляет 1-2 минуты [Мэдсбэд С. И., 2010; Корпачев В.В. и др., 2011; Панькив В.И., 2011].

### **6.3.3. Влияние пегилированного глюкагоноподобного пептида 1 на сочетанную патологию метаболических нарушений и эмфиземы лёгких**

В более ранних публикациях нами была показана принципиальная возможность стимулировать регенерацию микрососудистой сети легких мышей с ожирением в условиях введения ЛПС и ЭСД глюкагоноподобным пептидом-1 (ГПП-1) [Skurikhin E.G. et al., 2019]. Регенеративный эффект инкретина частично был опосредован стимулирующим действием на предшественники эндотелиальных клеток. Однако *in vivo* ГПП-1 быстро метаболлизировался дипептидилпептидазой-4, что негативно сказывалось на продолжительности регенеративной активности инкретина. Для сохранения глюкагоноподобного пептида 1 от разрушения дипептидилпептидазой-4 нами использовался такой подход, как пегилирование. Успешное использование пегилирования для улучшения фармакокинетических свойств и повышения стабильности в агрессивной среде было продемонстрировано различными коллективами авторов [Lee S.H. et al., 2005; Gao H. et al., 2018]. Известные пегилированные аналоги инкретина характеризуются улучшенными фармакокинетическими характеристиками без снижения эффективности лечения и безопасности по сравнению с нативным ГПП-1 [Viby N.E., 2013]. По примеру этих образцов нами был создан пегилированный аналог инкретина ГПП-1 (пегГПП-1). ПегГПП-1 демонстрировал значительную стабильность в условиях целостного организма по сравнению с нативной формой инкретина и антидиабетическое действие на модели сахарного диабета 1 типа, индуцированного курсовым внутрибрюшинным введением стрептозотоцина [Skurikhin E.G. et al., 2017; Skurikhin E.G. et al., 2018]. В силу нового положительного свойства ГПП-1, обретённого после пегили-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

рования – стабильность в организме лабораторных животных, при способности отрицательно регулировать гипергликемию и оказывать положительное влияние на гомеостаз лёгких, нами было выдвинуто предположение о потенциальной высокой активности пегГПП-1 на модели сочетания симптоматики метаболического синдрома и ХОБЛ. При проведении доклинических исследований пегГПП-1, в рамках этой тематики акцент был сделан на существование возможных гендерных различий в фармакологических эффектах: изучалась возможность лечения гипергликемии, дислипидемии и ожирения, эмфиземы лёгких, а также ускорения регенерации повреждённого эндотелия лёгких мышей линии C57BL/6.

В ходе проведения экспериментов нами был выявлен ряд закономерностей. Так, в условиях сочетания метаболических нарушений и эмфиземы лёгких пегГПП-1 значительно снижал уровень триглицеридов в сыворотке крови, соотношение ТГ/ЛПВП, индекс масс тела (ИМТ) у самок по сравнению с самками патологического контроля (189 сутки) (приложение, рисунок 9, 10). При этом введение пегГПП-1 вызывало повышение концентрации общего холестерина в сыворотке крови самцов опытной группы по отношению к самцам патологического контроля.

При проведении ГТТ было выявлено, что под влиянием пегГПП-1 концентрация глюкозы в сыворотке крови самок было ниже, чем в патологическом контроле (188 сутки) (приложение, рисунок 11). У самцов с сочетанной патологией мы не выявили изменений концентрации глюкозы при введении пегГПП-1.

Результаты гистологических исследований позволили говорить о снижении воспаления в легких и поджелудочной железе у самцов и самок в условиях сочетанной патологии под влиянием пегГПП-1 (189 сутки). А также, о меньшей площади эмфиземы в лёгких мышей опытных групп обоего пола, чем в соответствующих патологических контролях (приложение, рисунок 12). Гендерных различий в действии пегГПП-1 на гистопатологические параметры лёгких и поджелудочной железы не выявлены.

При проведении иммуногистохимических исследований нами обнаружено, что пегГПП-1 вызывал повышение экспрессии CD31 в лёгких мышей опытных групп обоего пола по сравнению с соответствующими патологическими контролями, при этом стимулирующий эффект у самок превосходил таковой у самцов (приложение, рисунок 13). Во многом повышение содержания CD31 клеток в лёгких мышей опытных групп было обусловлено соответствующей реакцией клеток ангиогенеза. Так, у самок и самцов с сочетанной патологией пегГПП-1 вызывал повышение числа эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> в костном мозге, мобилизацию из костного мозга в кровь эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипами CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> и CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>, увеличение количества перicyтов и сосудистых гладкомышечных клеток в крови

(приложение, рисунок 14). Дополнительно у самок пегГПП-1 рекрутировал в лёгкие клетки просвета зарождающегося сосуда и эндотелиальных прогениторных клеток  $CD45^+CD31^+CD34^+$ . Таким образом, экспрессия CD31 в лёгких в ответ на введение пегГПП-1 мы объясняем стимуляцией ангиогенеза, в котором у самок принимает участие больший спектр предшественников и «вспомогательных» клеток ангиогенеза.

В экспериментах *in vitro* мы не обнаружили различий в действии пегГПП-1 на культивируемые  $CD31^+$  клетки, выделенные из лёгких самок и самцов в условиях сочетанной патологии метаболических нарушений и эмфиземы легких. По нашим данным внесение в культуру эндотелиальных клеток легких пегГПП-1 приводило к уменьшению апоптоза  $CD31^+$  клеток и увеличению числа  $CD34^+$  клеток с активными эстеразами (приложение, рисунок 13). Таким образом, возможно, что, подобно нативному ГПП-1 [Skurikhin E.G. et al., 2019], позитивные по CD31 и CD34 предшественники эндотелиальных клеток являются мишенью для пегГПП-1.

В настоящем исследовании мы также оценили потенциальные гендерные различия в эффектах нативного ГПП-1 и пегГПП-1 на модели сочетанной патологии. Введение обеих субстанций более значительно снижало уровни триглицеридов в сыворотке крови, ИМТ и AUC (Area Under Curve, площадь под кривой) у самцов, чем у самок, при этом концентрация холестерина ЛПВП в сыворотке крови у самцов повышалась (приложение, рисунок 9, 10, 14). Различий в действии ГПП-1 и пегГПП-1 на эмфизему нами не выявлено, в то время как дополнительная экспрессия CD31 отмечалась в случае введения пегилированного инкретина (приложение, рисунок 15). В отличие от пегГПП-1 с помощью ГПП-1 в повреждённую альвеолярную ткань были рекрутированы только перициты (приложение, рисунок 11).

Таким образом, процесс пегилирования позволил повысить противовоспалительную активность, препятствовать развитию эмфиземы, улучшить процессы мобилизации и миграции клеток ангиогенеза у инкретина ГПП-1 на модели сочетания метаболических нарушений и эмфизем лёгких. Нами обнаружены гендерные различия в действии пегГПП-1 на эти процессы. Например, если в основе пегГПП-1-индуцированной регенерации эндотелия у самок лежит рекрутирование в лёгкие клеток просвета зарождающегося сосуда и эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом ЭПК  $CD45^+CD31^+CD34^+$ , то у самцов подобная реакция наблюдается только со стороны сосудистых гладкомышечных клеток (приложение, рисунок 15). Низкую активность мобилизации и миграции клеток ангиогенеза у самцов можно объяснить негативным действием воспаления, гипергликемии и жировой ткани, активность которых после лечения пегГПП-1 остаётся значительной. В этой связи использование пегГПП-1 в качестве корректора симптомов метаболического синдрома и эмфиземы легких, а также стимуляции регенерации эндотелия более приемлемо у женщин, чем у мужчин.

## **6.4. Противовоспалительная активность симпатолитика как основа терапевтических эффектов при эмфиземе лёгких**

### **6.4.1. Роль катехоламинов в развитии ХОБЛ**

Воздушные пути лёгочной ткани имеют автономную иннервацию, представленную в основном адренергическими и холинергическими нервными волокнами [Hamid, Q.A. et al., 1991]. Некоторые исследования показали, что катехоламины способны оказывать положительное и отрицательное влияние на процесс воспаления, в зависимости от патологии [Bellinger, D.L. et al., 2008]. Так, при ХОБЛ адренергическая активность в лёгочной ткани определяется с бронхоспазмом и активностью воспаления в дыхательных путях [Broadley, K.J., 2006]. Эффекты катехоламинов опосредованы семью трансмембранными рецепторами, связанными с G-белком. Адренорецепторы классифицированы по трём основным типам:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\beta$ . Для  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  адренорецепторов большим аффинитетом обладает норадреналин, а для  $\beta$  рецепторов – адреналин [Scanzano A., Cosentino M., 2015].

При ХОБЛ основным ответом лёгких на стимуляцию адренорецепторов является расслабление гладкой мускулатуры дыхательных путей. Вследствие расслабления гладкой мускулатуры у здоровых людей наблюдается увеличение проводимости дыхательных путей и небольшое увеличение ОФВ<sub>1</sub> [Jamison, J.P. et al., 1987]. У больных ХОБЛ ответная реакция на стимуляцию  $\beta$ -адренорецепторов намного выше за счёт бронхоспазма [Borrill, Z.L. et al., 2005].

Несмотря на то, что наиболее заметным эффектом активации лёгочных адренорецепторов является расслабление гладкой мускулатуры, при ХОБЛ значимым является влияние адренергической системы на воспалительные процессы. Эффекты адренергической нервной системы на воспаление опосредуются прямым влиянием на клетки воспаления и косвенным воздействием: регуляция тока крови и лимфы, распределения и продукции лимфоцитов и высвобождения провоспалительных пептидов [Pongratz G., Straub R.H., 2014].

Клетки иммунной системы экспрессируют,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы. Взаимодействуя с  $\beta$ -рецепторами, адреналин и норадреналин подавляют миграцию нейтрофилов и ингибируют экспрессию мембранного белка Мас-1, участвующего в распознавании бактериальных антигенов. Кроме этого, активация  $\beta$ -адренорецепторов ингибирует активность естественных киллеров, моноцитов [Jamison, J.P. et al., 1987]. В противоположность этому, активация  $\beta$ -адренорецепторов в костном мозге увеличивает популяцию провоспалительных лейкоцитов [Powell, N.D. et al., 2013].



Одновременная экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов на иммунных клетках даёт возможность этим клеткам пассивно определять расстояние до источников катехоламинов за счёт разного аффинитета  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторов к адреналину и норадреналину. Так, при большой концентрации катехоламинов активируются  $\beta$ -рецепторы, а при меньшей будет происходить активация только  $\alpha$ -рецепторов. В зависимости от того, какой тип адренорецепторов активирован, будет проявлена про-или противовоспалительная активность. Так, например, активация  $\beta$ -адренорецепторов увеличивает противовоспалительную активность, а активация  $\alpha$ -адренорецепторов усиливает экспрессию TNF- $\alpha$ , обладающего сильной провоспалительной активностью [Pongratz G., Straub R.H., 2014].

К сожалению, эффект стимулирования адренорецепторов иммунных клеток не является однозначным и сильно зависит от дополнительных факторов, как, например, исходная активность клеток [Straub, R.H., 2008], близость клетки к источнику катехоламинов, цитокинов и хемокинов [Li, W., et al., 2003], плотность экспрессии адренорецепторов на поверхности клетки [Lorton, D., et al., 2003]. Таким образом, нельзя однозначно утверждать о возможном про- или противовоспалительном эффекте адреналина или норадреналина. Эффект сильно зависит от влияния других медиаторов, таких, как нейропептид Y, АТФ и цАМФ, оксид азота, которые сами по себе обладают сильным иммуномодулирующим действием [Todorov, L.D., 1999]. Следует учитывать и тот факт, что адренергическая система, кроме расслабления гладкомышечной мускулатуры и различного влияния на иммунокомпетентные клетки, взаимодействует с другими типами клеток, например, с клетками эндотелия [Stohl, L.L., et al., 2013].

Данные клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что разрушение лёгочной паренхимы запускает воспалительную реакцию с нарушением функций альвеолярного эпителия, микрососудистой сети и барьерных функций эндотелиальных клеток сосудов лёгких, что позволяет клеткам воспаления легче проникать из сосудов в легочную ткань [Petrache I., Serban K., 2014]. Таким образом, восстановление эндотелия – необходимое условие выздоровления больных ХОБЛ.

В последнее время эндотелиальные клетки-предшественники широко изучаются как важные участники ангиогенеза, способствующие восстановлению повреждённых кровеносных сосудов. Эти клетки экспрессируют такие маркеры, как CD34, CD133 и VEGF [Asahara, T., et al., 1997]. Эндотелиальные предшественники обычно классифицируют на 2 типа, ранние предшественники и поздние предшественники. Ранние предшественники получены из CD45<sup>+</sup> клеток костного мозга и не имеют типичного для эндотелия фенотипа [Yoder, M.C. et al., 2007]. Но они участвуют в процессе ангиогенеза за счёт рекрутирования и включения в повреждённый участок [Werner, N., et al., 2005]. Привлечение этих клеток к повреждённому участку лёгких требует активации многоступенчатого каскада сигнальных путей и адгезионных

молекул, запускающих хемоаттракцию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток [Werner, N., et al., 2005]. За инициирование данного процесса отвечает симпатическая нервная система и цитокины [Katayama, Y., et al., 2006]. Предполагается, что  $\beta_2$ -адренорецепторы могут модулировать процесс ремоделирования сосудов. Активация  $\beta_2$ -адренорецепторов важна для миграции клеток и их пролиферации [Spiegel, A., et al., 2007]. Так  $\beta_2$ -адренорецепторы выборочно ингибируют миграцию клеток, однако длительное лечение салбутеролом имеет противоположное действие и способствует миграции клеток гладких мышц человека [Goncharova, E.A., et al., 2012].

Представляет интерес контроль адренергической системой альвеолярного эпителия при ХОБЛ. Эпителиальные клетки экспрессируют  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы. При активации этих адренорецепторов увеличивается внутриклеточная концентрация цАМФ. Адреналин, а также селективные  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -агонисты в значительной мере снижают миграцию эпителиальных клеток и сдерживают восстановление повреждений альвеолярного эпителия [Peitzman, E.R., et al., 2015]. При высоких концентрациях  $\beta_2$ -агонистов снижение скорости восстановления повреждений не связано с цАМФ и может быть опосредовано другими сигнальными путями [Kim, I.-M., et al., 2008]. Некоторые физиологические эффекты катехоламинов не зависят от G-белков. Так, например, возможным путём ингибирования восстановления лёгочного эпителия может являться активация связанного с  $\beta_2$ -адренорецепторами регулятора  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера (NHE) [Hall, R.A., et al., 1998].

#### **6.4.2. Фармакологические эффекты и механизм действия резерпина**

Растения рода *Rauwolfia* в основном встречаются в тропических регионах, таких, как Южная Америка, Индия и Малайском полуострове. Существует около 135 видов раувольфии, которые традиционно использовались как рвотное, слабительное, отхаркивающее, гипотензивное, снотворное средство и для лечения водянки. Экстракт листьев используется для лечения холеры, кишечных расстройств, дизентерии, заболеваний глаз, лихорадки. Корень применяют при сердечно-сосудистых заболеваниях, гипертонии и различных психических заболеваниях [Венгеровский А.И., 2020].

В химических профилях раувольфии идентифицированы акридоны, кумарины, лигнаны, флавоноиды, фитостерины, сапонины, дубильные вещества, фенольные соединения и индольные алкалоиды [Rohela G. K. et al., 2016; Sagi S. et al., 2016; Vođa M. et al., 2019; Mukherjee E. et al., 2019; Zafar N. et al., 2019; Венгеровский А.И., 2020; Rohela G. K. et al., 2021]. Алкалоиды широко распространены в природе, являются вторичными соединениями и совокупностью различных элементов и биомолекул, полученных из аминокислот или в результате трансаминирования [Dey P. et al., 2020].

Резерпин – это индольный алкалоид, выделен из Раувольфии змеиной (*лат. Rauwolfia serpentina*). Среди всех индольных алкалоидов из *Rauwolfia serpentina* резерпин является наиболее значимым в медицине [Sagi S. et al., 2016; Dey P. et al., 2020]. Первое сообщение об эффектах экстрактов раувольфии змеиной появилось в 1931 г. В чистом виде резерпин был выделен в 1950 году, а в 1952 году лаборатория CIBA Labs в Швейцарии опубликовала отчёт о фармакологическом действии резерпина. В этом же году резерпин был введён в применение в качестве препарата для лечения гипертонии, тахикардии и тиреотоксикоза под названием Серпасил [Jerie, P., 2007].

После перорального введения абсорбция резерпина происходит в течение 1-2 часов, однако имеются данные о более медленном его всасывании от 2 до 4 часов, в большинстве исследований указывается, что биодоступность резерпина составляет 50% [Lobay, D., 2015]. Алкалоид широко распространяется по всему телу, обнаруживается в печени, головном мозге, селезенке, почках и жировой ткани, в эритроцитах и периферических нейронах. Большая часть резерпина утилизируется печенью: на печеночный метаболизм приходится до 62% его деградации, почками утилизируется 8% алкалоида [Lobay, D., 2015].

Основным фармакологическим эффектом резерпина является его симпатолитическое действие. Резерпин проявляет двухфазный эффект на тоническую и рефлекторную активность симпатической нервной системы и вазомоторные рефлексы. Первая фаза действия алкалоида связана с быстрым высвобождением и ингибированием секреции катехоламинов, результатом этого выступает истощение запасов катехоламинов в пресинаптическом окончании [Jayanthi, L.D., et al., 2004]. Вторая фаза действия резерпина развивается через 2–4 часа 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 запасов моноаминов в синапсе [Jayanthi, L.D., et al., 2004].

В основе действия резерпина лежит необратимое связывание с белками, называемыми везикулярным переносчиком моноаминов (VMAT) и расположенными на мембранах секреторных везикул в пресинаптических нейронах [Schuldiner, S., 1993]. Связываясь с VMAT, алкалоид изменяет его конформацию и, таким образом, приводит к невозможности обратного захвата катехоламинов. Это приводит к разрушению катехоламинов моноаминоксидазой [Gopalakrishnan, A., et al., 2007].

Существует 2 изоформы везикулярных транспортных белков VMAT1 и VMAT2. VMAT1 в основном экспрессируется в нейроэндокринных клетках периферической нервной системы, особенно в мозговом веществе надпочечников, симпатических нейронах и тромбоцитах. Экспрессия VMAT2 наиболее выражена в головном мозге, симпатической нервной системе, тучных клетках, кишечнике и поджелудочной железе. Аффинитет резерпина к VMAT2 в 3 раза больше, чем к VMAT1 [Wimalasena, K., 2011].

До появления современных нейролептических средств резерпин применяли для лечения психических заболеваний, в настоящее время резерпин как антипсихотическое средство практически не применяют. В основном алкалоид использовали как антигипертензивное средство для лечения артериальной гипертензии. Депрессорный антигипертензивный эффект резерпина зависит от исходного уровня давления: при повышенном давлении гипотензия выражена сильнее, чем при нормальном давлении [Slotkin, T.A., 1975]. У спонтанно гипертензивных крыс эффект от введения симпатолитика, оцениваемый по уровню биогенных аминов, развивается раньше и выражен в большей степени, чем у нормотензивных крыс. Предполагается, что данный эффект связан с особенностями реактивности симпатoadреналовой системы у гипертензивных животных [Slotkin, T.A., 1975].

Антигипертензивный эффект резерпина начинает проявляться в малых дозах (0,1-1 мг/кг в сутки), без проявления его центрального депрессивного действия [Parker J.M., Murphy C.W., 1961]. Способность алкалоида 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.

Из-за множества побочных эффектов со стороны центральной нервной системы и желудочно-кишечного тракта использование резерпина в качестве основного гипотензивного и антипсихотического средства значительно сократилось [Nur S., Adams C.E., 2016; Yaffe D., Forrest L. R., Schuldiner S., 2018]. Тем не менее, его назначение в качестве вспомогательного средства второй линии в сочетании с другими гипотензивными препаратами для лечения тяжёлых форм гипертензии и с другими антипсихотическими препаратами для лечения психозов становится всё более актуальным [Peri R., Mangipudy R.S., 2014; Венгеровский А.И., 2020]. В редких случаях внутривенное введение резерпина используют для купирования психомоторного возбуждения у пациентов с сосудистыми поражениями головного мозга [Венгеровский А.И., 2020]. Ранее резерпин использовался для лечения признаков дискинезии у пациентов, страдающих болезнью Хантингтона. Резерпин также используется при различных психических заболеваниях, действуя как успокаивающее средство. [Shen H., 2008; Singh M., 2017; Dey P. et al., 2020]. Доза резерпина 0,5 мг/день или выше позволяла достичь необходимых значений систолического артериального давления и именно поэтому резерпин входит в состав комбинированных антигипертензивных средств – дельфан, бринердин, кристепин, тринттон, трирезид [Shamon S.D., Perez M.I., 2016; Венгеровский А.И., 2020; Dey P. et al., 2020].

Резерпин показал потенциальную антимикобактериальную активность против *Mycobacterium tuberculosis*, штамма H37Rv и антиоксидантную активность, ингибируя рост бактерий на 55% при концентрации 6,25 мкг / мл [Begum et al., 2012; Dey P. et al., 2020].

Резерпин может быть использован в терапии рака. Продукция ангиопоэтина связана с клинической рефрактерностью к антиангиогенной терапии. Резерпин может быть использован с целью специфического подавления межклеточного переноса биомолекул-стимулированного ангиопоэтин-2-зависимого внутриопухолевого ангиогенеза и агентов комплемента, нацеленных на путь VEGF. По данным Ortiz A. и коллег (2019) резерпин увеличивает экспрессию холестерин-25-гидроксилазы в клетках, обработанных опухолевыми внеклеточными везикулами. Соединение ограничивало межклеточный перенос между злокачественными и доброкачественными клетками *in vivo*, вероятно, с помощью подавления поглощения опухолевых внеклеточных везикул и снижения их циркуляции. Молекулярные механизмы, лежащие в основе опосредованного резерпином ингибирования межклеточного переноса, по всей видимости, включают влияние на экспрессию генов, участвующих в производстве внеклеточных везикул, а также на текучесть плазматической мембраны и ее способность сливаться с везикулами липидной мембраны [Lu Z. et al., 2021].

Острова нейроэндокринных клеток в ткани лёгких способны секретировать биоактивные вещества (биогенные амины и пептиды), регулирующие рост эпителиоцитов в норме и при патологии [Reynolds, S.D. et al, 2000]. Показана зависимость синтеза коллагеновых волокон в лёгких от адренергических рецепторов: стимуляция человеческих фибробластов  $\beta$ -агонистами приводила к снижению продукции коллагена на 30% [Berg, R.A., et al., 1981]. При фиброзе лёгких, индуцированном блеомицином, воспалительная реакция в альвеолах и интерстициальной ткани коррелирует с повышением экспрессии адренорецепторов в лёгких [Kim, D.S., et al., 2006]. Вероятно, вещества, снижающие активность адренергической системы, такие, как симпатолитик резерпин, могут выступать в качестве эффективных противовоспалительных средств. Это гипотеза подтверждается тем, что резерпин вызывает снижение концентрации сывороточных провоспалительных цитокинов IL-1, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  [Zhao, N., et al., 2011].

Относительно низкая стоимость и высокая эффективность являются преимуществом терапии резерпином над другими подходами. Кроме того, резерпин относительно хорошо переносится и уже одобрен для использования у людей. Эта совокупность обстоятельств, а также длительная положительная история клинического применения дают толчок исследователям для поиска новых точек терапевтического использования резерпина, при обнаружении которых препарат может быть немедленно протестирован в дополнительных клинических испытаниях и включён в стандартные схемы для повышения эффективности лечения. В таблице 16 представлены некоторые недавние клинические исследования, посвященные симпатолитику резерпину, по данным [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov). Эти данные подтверждают высокую востребованность симпатолитика резерпина для клинической практики.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Табл. 16. Результаты поискового запроса на клинические испытания резерпина (<https://Clinicaltrials.gov>), зарегистрированные на 2021 год

Номер испытания	Место проведения испытания	Испытание	Фаза испытания	Способ введения и дозы резерпина
NCT03223272	Университет Алабамы в Бирмингеме	Механизмы рефрактерной гипертензии (резерпин)	Фаза 2	Перорально 0,1 мг ежедневно в течение 4 недель
NCT00267657	Национальный институт злоупотребления наркотиками (NIDA)	Параллельное групповое, двойное слепое, плацебо-контролируемое сердечно-сосудистое и поведенческое исследование, оценивающее взаимодействие между однократными дозами резерпина для перорального приема и внутривенным метамфетамин – 1	Фаза 1	Перорально 0,5 и 1,0 мг однократно
NCT00033033	Национальный институт злоупотребления наркотиками (NIDA)	Резерпин для лечения кокаиновой зависимости – 1	Фаза 2	Перорально 0,25 мг ежедневно
NCT02684786	Клиника Майо	Исследование блокады звездчатого ганглия и / или резерпина у пациентов с легочной гипертензией 2-й степени	Фаза 1	Перорально по 0,05 мг ежедневно в течение 2 недель, затем 0,10 мг перорально ежедневно в течение 2 недель
NCT00000514	Национальный институт старения (NIA)	Систолическая гипертензия у пожилых людей	Фаза 3	Перорально 0,05 или 0,10 мг / день

### 6.4.3. Фармакологические эффекты и механизм действия резерпина в условиях экспериментальной эмфиземы лёгких

ХОБЛ относят к хроническим воспалительным заболеваниям лёгких. Эмфизематозные повреждения лёгочной ткани при ХОБЛ, в большинстве

случаев, индуцируются воспалительным процессом в малых бронхах и разрушением структурной целостности альвеолярных перегородок и мелких сосудов. Предполагается, что деструкция альвеолярных перегородок происходит с участием нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, инфильтрующей лёгочную ткань и высвобождающих нейтрофильную эластазу и MMP-12, которые вызывают разрушение эластинового каркаса альвеол [Schuldiner, S., et al., 1993]. В свою очередь, фрагменты эластина являются хемоаттрактантами для клеток воспаления и, накапливаясь, способны усиливать патологический процесс в повреждённом участке лёгких [Houghton, A.M. et al., 20006].

Известна симпатическая составляющая воспаления и негативное влияние катехоламинов на СК [Дыгай А.М., и др., 2017]. На различных моделях заболеваний (сахарный диабет, фиброз лёгкого) показано снижение резерпином воспаления в тканях (поджелудочная железа, лёгкие) [Spiegel, A., et al., 2007, Skurikhin, E.G., et al., 2018]. Противовоспалительная активность резерпина объясняется ингибирующим действием на гемопоэтические стволовые клетки и бипотентные кроветворные предшественники. При этом отрицательной регуляцией катехоламинов можно усилить регенеративные возможности стволовых клеток. В частности, эффективность стимуляции регенерации лёгких введением алкалоида резерпина была продемонстрирована ранее у мышей на модели блеомицин-индуцированного пневмофиброза [Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, 2012.] и стрептозотоцин-индуцированной модели сахарного диабета 1 типа [Skurikhin, E.G., et al., 2018].

Исходя из изложенного выше, нами было выдвинуто предположение, что, купируя резерпином воспаление, можно повлиять на развитие эмфиземы лёгких. В этих условиях не исключено ускорение регенерации повреждённых тканей.

При изучении фармакологических эффектов резерпина мы отдали предпочтение модели эмфиземы лёгких, индуцированной однократным интратрахеальным введением эластазы и последовательным введением ЛПС и ЭСД. В целях снижения побочных эффектов и достижения преимущественно эффектов периферической нервной системы резерпин вводился в дозе 0,1 мг/кг.

В ходе гистологических исследований препаратов лёгких нами было выявлено, что резерпин уменьшает выраженность повреждений коллагенового и эластинового матрикса лёгких мышей в обеих моделях эмфиземы лёгких по сравнению с соответствующим патологическим контролем. При этом, независимо от повреждающего лёгкие фактора алкалоид в большей мере сокращал площадь эмфиземы в верхнем и нижнем лёгочных полях, чем в среднем лёгочном поле (таблица 17, 18).

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

**Табл. 17.** Влияние резерпина на площадь эмфиземы легких (% от нормальной) мышей-самок линии С57Bl/6 в условиях интратрахеального введения эластазы на 21 сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Группы	Верхнее легочное поле	Среднее легочное поле	Нижнее легочное поле
Интактный контроль	0	0	0
Эмфизема легких	42,60 ± 6,68 *	61,72 ± 3,09 *	81,05 ± 5,21 *
Эмфизема легких в условиях введения резерпина	16,71 ± 3,94 * ●	54,29 ± 5,28 *	66,14 ± 6,37 * ●

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

**Табл. 18.** Влияние резерпина на площадь эмфиземы легких (% от нормальной) мышей-самок линии С57Bl/6 в условиях интраназального введения ЛПС и ЭСД на 16 и 45-е сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Группы	Верхнее легочное поле	Среднее легочное поле	Нижнее легочное поле
Интактный контроль	0	0	0
16 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	0,93 ± 0,15 *	1,31 ± 0,17 *	1,84 ± 0,19 *
Эмфизема легких в условиях введения резерпина	0,24 ± 0,06 * ●	0,31 ± 0,04 * ●	0,42 ± 0,08 * ●
45 сутки эксперимента			
Эмфизема легких	14,36 ± 2,21 *	10,04 ± 1,09 *	13,29 ± 1,38 *
Эмфизема легких в условиях введения резерпина	6,29 ± 1,17 * ●	9,64 ± 2,52 * ●	11,66 ± 1,89 * ●

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

Иммуногистохимическое окрашивание клеточных маркеров в лёгких, характерных для клеток воспаления, показало, что резерпин в обеих экспериментальных моделях эмфиземы приводит к снижению экспрессии маркера воспаления CD16 по сравнению с соответствующими патологическими контролями (таблица 19). Оценка поверхностных антигенов воспаления методом проточной цитометрии позволила выявить межмодельные различия в действии симпатолитика. Так, в условиях введения эластазы резерпин уменьшает количество пан-гемопоэтических клеток ( $CD45^+$ ) в крови и лёгких мышей по сравнению с патологическим контролем. При действии на



легкие ЛПС и ЭСД симпатолитик сокращает число пан-гемопозитических клеток в легочной ткани и увеличивает их содержание в крови. В обеих моделях эмфиземы мы не обнаружили существенных изменений содержания моноцитов/ макрофагов при истощении депо катехоламинов.

**Табл. 19.** Влияние резерпина на относительное содержание (% от общего количества клеток) специфических маркеров (УЕ) в легких мышей-самок линии С57В1/6 в условиях интра-трахеального введения эластазы или интраназального введения ЛПС и ЭСД (М ± m)

Маркер	Эластаза 21 сутки эксперимента	ЛПС и ЭСД 16 сутки эксперимента
Интактный контроль		
CD16	5 ± 0,41	17,00 ± 0,58
CD31	27,5 ± 2,5	17,66 ± 0,88
АЕ1/АЕ3 (пан-цитокератин)	83,67 ± 1,453	81,33 ± 1,37
Эмфизема легких		
CD16	36,0 ± 0,577 *	28,33 ± 1,45 *
CD31	6,67 ± 0,667 *	12,33 ± 1,33 *
АЕ1/АЕ3 (пан-цитокератин)	42,67 ± 2,186 *	55,00 ± 1,34 *
Эмфизема легких в условиях введения резерпина		
CD16	5,0 ± 1,44 ●	18,00 ± 0,58 ●
CD31	25,4 ± 1,33 ●	21,00 ± 1,15 ●
АЕ1/АЕ3 (пан-цитокератин)	65,4 ± 1,41 * ●	75,67 ± 0,93 ●

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

Объяснение выявленным феноменам мы видим в нарушении резерпिन-ном симпатического звена регуляции, прежде всего, миграции CD45<sup>+</sup> клеток костно-мозгового происхождения в повреждённые лёгкие. Однако популяция CD45<sup>+</sup> клеток весьма гетерогенная популяция клеток, включающая лимфоциты, нейтрофилы и клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Как видно из результатов цитометрических исследований, симпатолитик не оказывает ингибирующего действия на моноциты-макрофаги. По всей видимости, противовоспалительный эффект препарата связан с лимфоидными клетками и нейтрофилами.

Участие макрофагов в патогенезе ХОБЛ показано во множестве исследований, так, согласно литературным данным, при эмфиземе лёгких наблюдается 25-кратное увеличение количества макрофагов в лёгочной паренхиме, мокроте и бронхоальвеолярном лаваже [Retamales, I., et al., 2001].

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

Макрофаги лёгких в ответ на различные стимулы могут экспрессировать эластолитические ферменты, ответственные за разрушение лёгочной паренхимы, как, например, металлопротеиназы (ММП-2, ММП-9, ММП-12) и катепсины [Barnes, P.J., et al., 2003]. Более того, показано, что уменьшение количества альвеолярных макрофагов предохраняет лёгкие от развития эмфизематозных повреждений при экспозиции экспериментальных животных в сигаретном дыму [Beckett, E.L., et al., 2013]. Отсутствие влияния резерпина на клетки СМФ, обнаруженное нами, можно объяснить незначительной экспрессией рецепторов к катехоламинам или отсутствием таковых на этапе развития эмфиземы. Однако в своих исследованиях мы обнаружили снижение экспрессии ММП-9 и ММП-12 в легких леченых резерпином мышей в условиях моделирования эмфиземы эластазой или ЛПС и ЭСД, по отношению к нелеченым мышам. Таким образом, вторым механизмом противовоспалительной активности резерпина может выступать снижение секреции клетками СМФ металлопротеиназ.

Другим не менее важным феноменом при назначении резерпина является увеличение экспрессии клеточных маркеров эндотелиальных клеток (CD31) и эпителиальных клеток (AE1/AE3) в травмированных эластазой или ЛПС и ЭСД лёгких (таблица 19). Важность полученных нами результатов в том, что восстановить повреждённую альвеолярную ткань и утраченные лёгочные функции при существующих подходах не представляется возможным. На сегодняшний день лекарственная терапия ХОБЛ является симптоматической, противовоспалительной и направлена на замедление прогрессирования заболевания. Поэтому появление в ряду уже известных препаратов с противовоспалительной активностью для терапии ХОБЛ и эмфиземы препаратов, обладающих дополнительным регенеративным действием, нам представляется важным. Предположительно, регенеративный эффект резерпина опосредован действием алкалоида на СК и прогениторные клетки. Для подтверждения этой гипотезы мы оценили реакцию эндогенных стволовых клеток на введение резерпина на модели эмфиземы лёгких, индуцированной эластазой или ЛПС и ЭСД.

Исследование методом проточной цитометрии маркеров эпителиальных, эндотелиальных и мезенхимальных стволовых клеток позволило выявить следующие закономерности. Так, в условиях введения эластазы резерпин увеличивает число зрелых эпителиальных клеток и их предшественников в лёгочной ткани мышей опытной группы по сравнению с патологическим контролем: эпителиальные прогениторные клетки (CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>), мультипотентные предшественники эпителиальных клеток (CD326<sup>hi</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>), стволовые клетки лёгких (CD45<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>) (таблица 20). В тоже время, лечение снижает их количество в крови. Представленные данные указывают на усиление миграции циркулирующих в крови предшественников эпителиальных клеток в случае снижения активности СНС, при этом нами не исключается их дифференцировка в эпителиальные клетки.

**Табл. 20.** Влияние резерпина на содержание незрелых эпителиальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57Bl/6 в условиях интратрахеального введения эластазы на 14 сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> TER119-CD49f <sup>+</sup>	9,281 ± 0,881	8,109 ± 0,753	7,895 ± 0,654
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> TER119-CD49f <sup>+</sup> CD326 <sup>+</sup>	2,667 ± 0,064	0,987 ± 0,10*	1,754 ± 0,125 ●
Эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>	5,782 ± 0,673	1,433 ± 0,09*	3,206 ± 0,267 * ●
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>hi</sup> CD49f <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	3,210 ± 0,233	0,817 ± 0,05 *	1,492 ± 0,116 * ●
Стволовые клетки легких / CD45-CD117 <sup>+</sup>	17,074 ± 1,944	24,414 ± 2,986 *	31,317 ± 2,997 * ●

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни)

Как и при нарушении протеазного/ антипротеазного обмена резерпин увеличивает число зрелых эпителиальных клеток и их предшественников в лёгких в условиях введения ЛПС и ЭСД по сравнению с соответствующим патологическим контролем (таблица 21). Различие заключается в том, что в данной модели симпатолитик повышает только количество клеток смешанной популяции зрелых и незрелых эпителиальных клеток (CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>) в крови. Снижение числа других незрелых эпителиальных клеток в циркуляции не носит достоверный характер.

**Табл. 21.** Влияние резерпина на содержание незрелых эпителиальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57Bl/6 в условиях энтраназального введения ЛПС и ЭСД на 16-е сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
Эпителиальные прогениторные клетки / CD45-TER119-CD49f <sup>+</sup>	17,281 ± 1,223	12,534 ± 1,034 *	18,862 ± 1,634 ●

**Хроническая обструктивная болезнь лёгких:  
перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

Окончание таблицы 21

Эпителиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> TER119 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup> CD326 <sup>+</sup>	1,156 ± 0,102	3,534 ± 0,255 *	4,537 ± 0,376 * ●
Эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> CD49f <sup>+</sup>	1,402 ± 0,121	4,320 ± 0,511 *	6,619 ± 0,566 * ●
Мультипотентные эпителиальные прогениторные клетки / CD326 <sup>hi</sup> CD49f <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	0,462 ± 0,023	2,084 ± 0,117 *	3,279 ± 0,267 * ●
Стволовые клетки легких / CD45 <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup>	19,781 ± 1,763	20,077 ± 1,897	24,107 ± 2,150

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни)

Итак, повреждения альвеолярного эпителия определяют выраженность эффекта алкалоида. При эмфиземе лёгких, вызванной протеолитическим действием эластазы, гибель клеток альвеолярного эпителия значительная и регенеративных возможностей резидентных (лёгкие) СК недостаточно. В этих условиях истощение депо катехоламинов положительно сказывается на два пула стволовых клеток: мобильный (циркулирующие в крови) и резидентный. При эмфиземе, вызванной ЛПС и ЭСД, гибель лёгочного эпителия значительно меньше. Этим объясняется достаточная для регенерации эпителия стимуляция резерпином только части резидентных СК.

Исследование влияния симпатолитика на содержание эндотелиальных прогениторных клеток в крови и лёгочной ткани показало, что в условиях введения эластазы истощение депо катехоламинов уменьшает содержание CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> эндотелиальных прогениторных клеток в лёгочной ткани относительно патологического контроля (таблица 22). В крови наблюдается противоположная картина: количество эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипами CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup> возрастает.

Эффекты резерпина на модели эмфиземы, вызванной введением ЛПС и ЭСД, отличаются от таковых в условиях назначения эластазы. Истощение депо катехоламинов увеличивает число предшественников ангиогенеза и эндотелиальных прогениторных клеток в крови и лёгких по отношению к патологическому контролю, при этом повышается количество клеток, экспрессирующих рецептор к VEGF2 (таблица 23).

Итак, повреждающие лёгкие факторы определяют реакцию незрелых эндотелиальных клеток на введение резерпина. Так, при назначении эластазы симпатолитик оказывает ингибирующее действие на миграцию ЭПК

**Табл. 22.** Влияние резерпина на содержание незрелых эндотелиальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57Bl/6 в условиях интратрахеального введения эластазы на 14 сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	8,024 ± 0,668	7,943 ± 0,672	7,313 ± 0,698
VEGF2 <sup>+</sup> эндотелиальные клетки	4,204 ± 0,276	2,546 ± 0,224 *	2,618 ± 0,119 *
Эндотелиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	18,665 ± 1,783	26,839 ± 2,672 *	16,066 ± 1,599 ●

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни)

**Табл. 23.** Влияние резерпина на содержание незрелых эндотелиальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57Bl/6 в условиях интраназального введения ЛПС и ЭСД на 16 сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
Предшественники ангиогенеза / CD45 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	1,296 ± 0,114	1,101 ± 0,096	2,138 ± 0,166 * ●
VEGF2 <sup>+</sup> эндотелиальные клетки	0,847 ± 0,067	0,918 ± 0,055	1,238 ± 0,098 * ●
Эндотелиальные прогениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>	16,255 ± 1,388	19,491 ± 1,739	25,234 ± 2,089 *

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни)

в лёгкие. С нашей точки зрения, это связано со значительным повреждением микрососудистого русла. Результатом этого выступает накопление костно-мозговых эндотелиальных прогениторных клеток с регенеративным потенциалом в крови. В условиях назначения ЛПС и ЭСД нарушение целостности эндотелия незначительны, и мы наблюдаем ожидаемую картину при истощении депо катехоламинов: активация мобилизации и миграции незрелых и зрелых эндотелиальных клеток, в том числе эндотелиальных клеток, регулируемых VEGF сигнальным путём.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

В заключительной части работы мы оценили реакцию зрелых и незрелых мезенхимальных клеток на введение резерпина. После введения алкалоида наблюдается уменьшение содержания МСК с фенотипом CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> в лёгких мышей в условиях введения эластазы по сравнению с патологическим контролем (таблица 24). При этом количество фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов миелоидного происхождения, напротив, увеличивается. В крови обнаруживается дефицит МСК, но происходит накопление фиброцитов немиелоидного происхождения.

**Табл. 24.** Влияние резерпина на содержание мезенхимальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии C57Bl/6 в условиях интратрахеального введения эластазы на 14 сутки эксперимента (M ± m)

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
МСК / CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	0,105 ± 0,018	0,163 ± 0,022 *	0,113 ± 0,011 ●
МСК / CD45 <sup>-</sup> CD106 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	2,682 ± 0,199	2,513 ± 0,136	2,694 ± 0,187
Фибробластные прогениторные клетки / CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD90 <sup>+</sup>	0,527 ± 0,049	1,445 ± 0,098 *	0,667 ± 0,059 ●
Фиброциты миелоидного происхождения / CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup>	1,699 ± 0,117	0,401 ± 0,027 *	0,199 ± 0,009 * ●

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем (p<0,05; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких (p<0,05; U-критерий Манна-Уитни)

У мышей с эмфиземой, вызванной ЛПС и ЭСД, резерпин увеличивает количество МСК с фенотипом CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> в лёгких (таблица 25), при этом в крови число клеток данной популяции уменьшается. Подобная закономерность была характерна для фиброцитов миелоидного и немиелоидного происхождения.

Таким образом, в условиях эластаза-индуцированной эмфиземы лёгких истощение депо катехоламинов снижает активность миграции костно-мозговых МСК из крови в легкие. Выше было показано, что такая реакция характерна и для других клеток мезодермального происхождения: СК эндотелия. Восстановление внеклеточного матрикса в условиях проводимой терапии осуществляется за счёт увеличения популяций резидентных фибробластных прогениторных клеток и фиброцитов миелоидного происхождения. Что касается эмфиземы лёгких, индуцированной ЛПС и ЭСД, то в данном случае

**Табл. 25.** Влияние резерпина на содержание мезенхимальных клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей линии С57В1/6 в условиях интраназального введения ЛПС и ЭСД на 16 сутки эксперимента ( $M \pm m$ ).

Клетки / иммунофенотип	Интактный контроль	Эмфизема легких	Эмфизема легких в условиях введения резерпина
МСК / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	0,648 ± 0,059	0,398 ± 0,043 *	0,555 ± 0,047 ●
МСК / CD45 <sup>+</sup> CD106 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	5,585 ± 0,489	3,685 ± 0,287 *	4,216 ± 0,378
Фибробластные прогениторные клетки / CD45 <sup>+</sup> CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	2,947 ± 0,208	3,331 ± 0,259	3,714 ± 0,289
Фibroциты миелоидного происхождения / CD31 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	0,429 ± 0,036	0,877 ± 0,075 *	1,065 ± 0,122 *

**Примечание:** результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни); ● – достоверность различия с группой животных с эмфиземой легких ( $p < 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни).

резерпин ожидаемо положительно влияет на процессы мобилизации МСК и фиброцитов из костного мозга с последующей их миграцией в лёгкие.

Подводя итог разделу работ, посвящённому изучению стволовых и прогениторных клеток, необходимо отметить, что в условиях эмфиземы лёгких различного генеза механизм действия резерпина связан с мобилизацией и миграцией в лёгочную ткань стволовых клеток. Реализация этого механизма напрямую зависит от состояния микрососудистой сети лёгких. Так, ЛПС и ЭСД менее повреждают микрососудистую сеть лёгких, чем эластаза. Это выступает положительным моментом для процесса регенерации, так как резерпин не только мобилизует СК в циркуляцию, но и, снижая тонус сохранившихся сосудов, облегчает трансэндотелиальный переход преимущественно клеток мезодермального происхождения и способствует их миграции к участку повреждения. За счёт МСК, по всей видимости, происходит восстановление внеклеточного матрикса сосудов и, возможно, эпителия в силу реализации такого механизма, как мезенхимально-эпителиальный переход. Предшественники эндотелия вовлекаются в ангиогенез, эпителиальные прогениторные клетки – в эпителиогенез. Следует отметить, что для регенерации эндотелия и эпителия, эластинового матрикса важно уменьшение повреждающего действия катехоламинов на СК, что также обеспечивает симпатолитик.

По современным представлениям в основе симпатолитического действия резерпина лежит необратимое связывание с белками, расположенными на мембране секреторных везикул в пресинаптических мембранах, называемы-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

ми везикулярными переносчиками моноаминов (*англ.*, vesicular monoamine transporter, VMAT) [Schuldiner, S., et al., 1993]. Отмечается высокая концентрация VMAT в адренергических синапсах, где переносчик отвечает за депонирование катехоламинов: адреналин и норадреналин, дофамин [Eiden, L.E., et al., 2004]. Резерпин, связываясь с VMAT, изменяет его конформацию, что нарушает обратный захват катехоламинов, и это приводит к разрушению их моноаминоксидазой [Gopalakrishnan, A., et al., 2007]. Существует 2 изоформы везикулярных транспортных белков VMAT1 и VMAT2. В нейроэндокринных клетках периферической нервной системы (в том числе в мозговом веществе надпочечников), симпатических нейронах и тромбоцитах экспрессируется в основном VMAT1. В головном мозге, симпатической нервной системе, тучных клетках, кишечнике и поджелудочной железе наиболее выражена экспрессия VMAT2. При этом к VMAT2 отмечается больший аффинитет резерпина по сравнению с VMAT1 [Wimalasena, K., 2011].

Волокна симпатической нервной системы иннервируют костно-мозговую ткань [Phinney, D.G., 2007]. В костном мозге механизм действия норадреналина и адреналина сопряжён с G-CSF (фактор дифференцировки кровяных клеток-предшественников в клетки воспаления, хемокин), и такими клетками «ниши», как остеобласты. В одиночку катехоламины не способны повышать уровень циркулирующих в крови предшественников клеток воспаления (ГСК), но в сочетании с G-CSF активность их мобилизации повышается кратно [Spiegel, A., et al., 2007]. Механизм действия G-CSF связывают с увеличением доступности норадреналина и адреналина, поскольку стимуляция *ex vivo* периферических симпатических нейронов с помощью ростового фактора приводит к значительному снижению повторного захвата норадреналина [Lucas, D., et al., 2012]. Фармакологическое или генетическое подавление влияния катехоламинов на костно-мозговую ткань у мышей приводит к ингибированию выхода ГСК из костного мозга в циркуляцию, а введение  $\beta$ 2-агониста кленбутерола усиливает мобилизацию ГСК [Méndez-Ferrer, S., et al., 2010, Skurikhin, E.G., et al., 2014]. Дофамин также увеличивает мобилизацию ГСК на фоне введения G-CSF, при этом на мобилизованных клетках увеличивается экспрессия дофаминовых рецепторов  $D_3$  и  $D_5$ . С другой стороны, дофамин увеличивает пролиферацию и колониюобразующую активность клеток-предшественников через механизм, включающий металопротеиназы и активацию канонического Wnt сигнального пути [Spiegel, A., et al., 2007]. Таким образом, одним из механизмов противовоспалительного действия резерпина выступает угнетение активности ГСК.

Кроме ингибирующего действия на дифференцировку ГСК и мобилизацию не исключаются эффекты резерпина на секреторную активность клеток воспаления. Так, ранее было показано, что длительные курсы  $\beta$ 2-агонистов усиливают воспаление в дыхательных путях, а введение  $\beta$ -адреноблокаторов может снизить не только количество эозинофилов, но секрецию ими IL-13, IL-10, IL-5 и TGF $\beta$ 1 [Nguyen, L.P., et al., 2008]. Следует отметить, что нейтрофилы не только имеют дофаминовые рецепторы, но и способны к синтезу и



депонированию дофамина, адреналина и норадреналина, и некоторых их метаболитов. В экспериментах *in vitro* показано, что введение резерпина снижает внутриклеточные концентрации дофамина, норадреналина и адреналина в нейтрофилах, за счёт ингибирования VMAT, что говорит о наличии механизмов обратного захвата в этих клетках и ингибирующей регуляции симпатолитиком клеточной активности [Cosentino, M., et al., 1999].

Отмечается негативное адренергическое влияние на регенерацию и миграцию эпителиальных клеток после повреждений [Peitzman, E.R., et al., 2015]. Возможное положительное влияние резерпина на регенерацию в условиях эмфиземы лёгких мы видим в следующих молекулярных механизмах. Имеются данные о том, что некоторые физиологические эффекты катехоламинов не зависят от G-белков, а сопряжены с регулятором активности вакуолярных  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортеров. Исходя из этого, восстановление резерпином лёгочного эпителия может быть связано с отменой ингибирующего адренергического влияния на регулятор активности вакуолярных  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортеров [Hall R.A., et al., 1998].

Фосфорилирование Akt и eNOS в эндотелиальных прогениторных клетках [Jiang, Q., et al., 2014] находится под контролем  $\beta_2$ -адренорецепторов [Galasso, G., et al., 2013]. В этой связи эндотелиальные эффекты резерпина могут быть объяснены изменением активности фосфорилирования Akt и eNOS. С другой стороны, активация дофаминовых  $D_2$ -рецепторов может ингибировать мобилизацию эндотелиальных клеток [Spiegel, A., et al., 2007]. Механизм дофаминовой ингибиции мобилизации опосредован подавлением фосфорилирования VEGF A-ERK1/ERK2 и синтеза MMP-9 [Chakroborty, D., et al., 2008]. В наших экспериментах резерпин положительно влияет на миграцию эндотелиальных прогениторных клеток, в том числе на VEGF2<sup>+</sup> клетки. В этой связи нами не исключается, что при моделировании эмфиземы лёгких дофаминовая ингибиция эндотелиальных прогениторных клеток выходит на первый план, а симпатолитик купирует этот механизм.

Из всех катехоламинов дофамин оказывает наибольшее влияние на мобилизацию МСК [Shome, S., et al., 2012]. Механизм ингибирующего действия дофамина на мобилизацию МСК реализуется за счёт ингибирования фосфорилирования VEGFR2 [Sarkar, C., et al., 2004]. Адреналин также способен ингибировать миграцию МСК, действуя через  $\beta_2$ -адренорецепторы он повышает экспрессию ИЛ-6, усиливая при этом нейтрофильное воспаление [Kim, M.-H., et al., 2014]. В этой связи, при моделировании эмфиземы лёгких, активацию мобилизации МСК резерпином можно связать с блокадой негативного влияния адреналина на фосфорилирование VEGFR2 и купирование дофаминовой стимуляции продукции ИЛ-6.

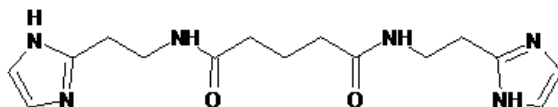
Помимо VMAT, возможной мишенью для резерпина могут явиться белки ABC семейства АТФ-связывающих кассетных транспортеров ABCB1 и ABCG2 [Zhou, S., et al., 2001]. АТФ-связывающие кассетные транспортеры представляют собой семейство трансмембранных белков, способных к энергозависимому транспорту широкого спектра субстратов через мембраны

клетки [Scheffer, G.L., et al., 2002]. ABCB1 играет важную роль в защите клеток от воздействия окружающей среды и экспрессируется клетками органов, участвующих в экскреции, например, в печени и кишечнике. В лёгочной ткани ABCB1 экспрессируется на апикальной стороне реснитчатых эпителиальных клеток и серозных клеток бронхиальных желез [Lechart-Zalman, E., et al., 1997]. ABCG2 участвует в формировании устойчивости к токсинам и некоторым химиотерапевтическим агентам [Doyle, L.A., et al., 1998]. Уровень экспрессии белка ABCG2 в лёгочной ткани ниже, чем ABCB1, он обнаруживается в слое эпителиальных клеток и в серомуциновых железах. Небольшие капилляры также экспрессируют этот белок [A.E. van Herwaarden, Schinkel A.H., 2005]. Экспрессия ABCG2 обнаруживается во многих тканеспецифичных стволовых клетках [A.E. van Herwaarden, Schinkel A.H., 2005]. Предполагается, что ABCG2 выполняет защитную функцию СК и прогениторных клеток от повреждающего воздействия эндогенных и экзогенных веществ [Panwala, S.M., et al., 1998], а также выступает в роли регулятора дифференцировки, поскольку трансплантация клеток костного мозга гиперэкспрессирующих ABCG2 летально облучённым мышам приводила к уменьшению количества зрелых гемопоэтических клеток [Zhou, S., et al., 2001].

Таким образом, результаты исследования фармакологических эффектов алкалоида резерпина на модели эмфиземы лёгких, индуцированной различными по механизму действия факторами, позволяют предложить его по новому назначению для противовоспалительной терапии и стимуляции регенерации тканей лёгких при ХОБЛ и эмфиземе, в основе которой лежит мобилизация и миграция СК. Действие резерпина на процессы воспаления и СК может реализовываться за счёт ряда молекулярных механизмов: VMAT, АТФ-связывающие кассетные транспортеры, фосфорилирование Akt и eNOS, VEGF сигналинг.

## **6.5. Противовоспалительные и регенеративные эффекты Триамида при экспериментальной эмфиземе лёгких**

Как было продемонстрировано выше на различных моделях эмфиземы лёгких, ускорение регенерации во многом зависит от эффективности противовоспалительной терапии. Продолжая поиск соединений, способных оказывать положительные эффекты в условиях экспериментальной эмфиземы лёгких, мы обратили свое внимание на новый препарат Триамид (*англ.*, Treamid; bisamide derivative of dicarboxylic acid, BDDA) (рисунок 16). Для проведения доклинических исследований Триамид был предоставлен компанией “PHARMENTERPRISES” Ltd. [Nebolsin V.E. et al., 2016; Nebolsin V.E. et al., 2018].



**Рис. 16.** Структурная формула фармакологического соединения Триамид, синоним бисамидная производная дикарбоновой кислоты, химическая формула N1, N5-bis [2-(1H-imidazole-2-yl)ethyl] glutaramide

На животной модели фиброза лёгких были показаны противовоспалительная и антифибротическая активности, и регенераторные свойства Триамида [Skurikhin Evgenii et al., 2020]. При экспериментальных метаболических нарушениях Триамид демонстрировал антидиабетические и регенераторные эффекты [Pakhomova A. et al., 2020 (A); Pakhomova A. V. et al., 2020 (B)]. Эти ранее опубликованные результаты позволили сформировать гипотезу о возможной неспецифической противовоспалительной активности Триамида, которая во многом способствует процессу регенерации. В настоящей главе нами представлены результаты доклинических исследований, посвященные изучению действия Триамида на воспаление и эмфизему лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы. В дополнительном разделе исследования мы оценили влияние Триамида на регенерацию лёгких и предшественников эндотелиальных и эпителиальных клеток как его потенциальные мишени.

На первом этапе исследования известные параметры эмфиземы лёгких, индуцированной эластазой (площадь эмфиземы и инфильтрация ткани лёгких клетками воспаления), мы дополнили такими параметрами, как Lm (mean linear intercept, MLI или Lm; средний линейный перехват) и DI (destructive index; деструктивный индекс), количеством капилляров в лёгких, уровнями провоспалительных цитокинов и хемокинов, иммунофенотипом клеток воспаления, например, макрофагов. Это позволило выявить тонкие механизмы повреждающего действия эластазы и провести глубокую дифференциальную оценку фармакологических эффектов Триамида.

В ходе проведённых экспериментов было выявлено, что у мышей, получивших эластазу, повреждались альвеолярные перегородки и формировалась диффузная эмфизема во всех отделах лёгких уже на 3 сутки опыта. Последующие наблюдения показали прогрессирование эмфиземы (14, 21 сутки) (приложение, рисунок 17). В этот период разрушение альвеол (увеличение Lm и DI) (приложение, рисунок 18а, б) и эндотелия (уменьшалась плотность капилляров и экспрессия CD31) (приложение, рисунок 18с, 19е) мы связываем не столько с действием экзогенной эластазы, сколько с деструктивным действием воспаления. Так, в сыворотке крови мышей опытной группы нами обнаружено повышенная концентрация IL-2, IL-5, IL-13 по сравнению с мышами интактного контроля 1 (14, 21 сутки) (таблица 26).

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

**Табл. 26.** Влияние Триамида на уровень интерлейкинов в сыворотке крови мышей линии C57BL/6 в условиях введения эластазы на 14, 21 сутки эксперимента ( $M \pm m$ )

Группы	IL-2, pg/mL	IL-5, pg/ mL	IL-13, pg/mL
Интактный контроль (Intact control)	21,9 ± 0,2	160,8 ± 2,4	26,4 ± 0,9
14 сутки эксперимента			
Эмфизема легких (Lung emphysema)	94,1 ± 19,9 *	1270,6 ± 121,6 *	1769,5 ± 468,8 *
Эмфизема легких в условиях введения Триамида (Lung emphysema+Treamid)	11,8 ± 0,1 * ●	287,9 ± 19,85 * ●	14,6 ± 0,19 * ●
21 сутки эксперимента			
Эмфизема легких (Lung emphysema)	85,5 ± 10,8 *	852,4 ± 64,9 *	478,9 ± 35,7 *
Эмфизема легких в условиях введения Триамида (Lung emphysema+Treamid)	20,6 ± 0,8 ●	115,6 ± 4,5 * ●	363,2 ± 21,5 * ●

**Примечание.** \* – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ );  
● – различия достоверны по сравнению с группой «Lung emphysema» ( $p < 0,05$ )

Эти молекулы выступают в качестве провоспалительных факторов и хемокинов для клеток воспаления. Наблюдения независимых авторов указывают на то, что такие клетки воспаления, как макрофаги, инициируют развитие ХОБЛ и сопутствуют прогрессированию заболевания, в том числе эмфиземы [Belchamber K.B.R., Donnelly L.E., 2017]. Во время эпизодов острого и хронического воспаления пул резидентных макрофагов может дополняться за счёт рекрутирования моноцитов [Murray P.J. et al., 2014; Mantovani A. et al., 2013]. Макрофаги способны рекрутировать нейтрофилы в лёгкие через высвобождение LTB4 и CXCL-8 [Belchamber K.B.R., Walker E.M., Stockley R.A., Sapey E., 2020]. В свою очередь, нейтрофилы, секретировав катепсин G и азуроцидин, рекрутируют моноциты в паренхиму [Chertov O. et al., 1997; Soehnlein O, Lindborn L., 2008]. Это взаимовлияние приводит к увеличению количества нейтрофилов и макрофагов в лёгких во время воспаления. В своих гистологических исследованиях мы выявили значительное накопление мононуклеаров в альвеолах и альвеолярных перегородках, а также в периваскулярных и перибронхиальных областях у мышей патологического контроля по сравнению с интактным контролем (приложение, рисунок 20а, b, d, e). Мононуклеары на препаратах лёгких нами идентифицировались как нейтрофилы, лимфоциты и макрофаги. Используя иммуногистохимический анализ, обнаружилось, что часть мононуклеаров экспрессирует CD16: маркер специфичен для макрофагов, натуральных киллеров

и Т-клеток (14, 21 сутки) (приложение, рисунок 19e). Цитометрическая оценка маркеров подтвердила увеличение количества зрелых макрофагов (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) и незрелых макрофагов (F4/80<sup>low</sup>CD11b<sup>low</sup>) в повреждённых эластазой лёгких (14, 21 сутки) (приложение, рисунок 21c, d). Общая популяция мононуклеаров лёгких также была обогащена CD45<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> клетками (фракция содержит макрофаги, натуральные киллеры, дендритные клетки) и CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> клетками (фракция не содержит дендритные клетки и В-лимфоциты [Crapster-Pregont, M., Yeo, J., Sanchez, R. L., & Kuperman, D. A., 2012; Rouze, A. et al., 2018] (рисунок 21a, b). Выявленная нами картина активности эластазы и клеток воспаления дополняет описанную выше и сопоставима с той, которая описана John M. с соавторами [John M. Craig, Alan L. Scott, and Wayne Mitzner, 2017].

По сложившейся точке зрения  $\alpha$ 1-антитрипсин поддерживает физиологический баланс протеиназ и антипротеиназ, и целостность лёгких [Nagase H., 1997]. Хотя  $\alpha$ 1-антитрипсин продуцируется главным образом гепатоцитами [Cataldo D. et al., 2000], он также продуцируется эпителиальными клетками лёгких [Vignola A.M. et al., 1998].  $\alpha$ 1-антитрипсин был обнаружен в лёгких [Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J., 1979], вокруг капилляров и в эпителиальных клетках [Betsuyaku T., Shipley J.M., Liu Z., Senior R.M., 1999]. При дефиците  $\alpha$ 1-антитрипсина нарушается контроль протеиназ в лёгких. Со временем это приводит к деструкции паренхимы лёгких вследствие усиленного распада соединительной ткани и к развитию панлобулярной эмфиземы, особенно при наличии курения [Mackarel A.J. et al., 1999]. MMP-9 играет ключевую роль в воспалении через деградацию коллагена IV типа, основного компонента базальной мембраны клеток [Delclaux C. et al., 1996; Ivanoff A., Ivanoff J., Hultenby K., Sundqvist K.G., 1999], и в патогенезе эмфиземы лёгких [Yamasaki, K., & Eeden, S., 2018]. Другой представитель семейства матриксных металлопротеиназ MMP-12 проявляет эластолитическую активность (гидролизует растворимый и нерастворимый эластин) [Snehasikta Swarnakar, Sumit Paul et al., 2011]. MMP-12 участвует в развитии эмфиземы лёгких через несколько независимых механизмов, включающих деградацию межклеточного матрикса, протеолитическую инактивацию антипротеаз, включая  $\alpha$ 1-антитрипсин, а также протеолитическую активацию провоспалительных цитокинов, включая TNF $\alpha$  [Shibata, S. et al., 2018]. Кроме этого, MMP-12 играет важную роль в миграции макрофагов. MMP-12 выделяется в межклеточное пространство в неактивной форме. Индуктором активности MMP-12 выступает нейтрофильная эластаза [Robert M. Senior, Gail L. Griffin., 1980], гидролизующая растворимый и нерастворимый эластин [Chua Felix and Laurent Geoffrey J., 2006]. Перечисленные протеазы продуцируются многими клетками воспаления (лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги) [Kjeldsen L. et al., 1994; Legrand C. et al., 1999; Mautino G. et al., 1997; Ohno I. et al., 1997]. В настоящем исследовании нами обнаружена повышенная экспрессия MMP-9, MMP-12 и нейтрофильной эластазы моно-

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

нуклеарами альвеол и альвеолярных перегородках мышей патологического контроля по сравнению с мышами интактного контроля (приложение, рисунок 22). С другой стороны, нами обнаружено, что экспрессия  $\alpha 1$ -антитрипсина в повреждённых эластазой альвеолах и в просвете кровеносных сосудов в 3 раза ( $P < 0,05$ ) была меньше, чем в интактном контроле (приложение, рисунок 19а). Мы связываем развитие дефицита  $\alpha 1$ -антитрипсина в лёгких с разрушением эпителиальных клеток, и эта наша гипотеза нашла подтверждение в результатах иммуногистохимических исследований, которые указывают на гораздо меньшую экспрессию эпителиальных маркеров E-cadherin (на 40%;  $P < 0,05$ ) и пан-цтокератина (на 49%;  $P < 0,05$ ) в альвеолах мышей в условиях введения эластазы, чем у мышей в условиях оптимальной жизнедеятельности (приложение, рисунок 19с, d).

В конечной своей стадии эмфизема может вызывать репаративную реакцию. На 14, 21 сутки опыта в повреждённых эластазой лёгких нами выявлено увеличение числа клеток, способных регенерировать эпителий (клетки Клара (приложение, рисунок 23а)) и эндотелий (VEGF2<sup>+</sup> клетки, предшественники ангиогенеза) (приложение, рисунок 24b, c). Белок клеток Клара (CC16) секретируется клетками реснитчатого эпителия и клетками Клара бронхиол, играет важную защитную роль в окислительном стрессе и воспалении дыхательных путей [Nagase H, 1997] и ассоциируется с развитием и прогрессированием некоторых заболеваний лёгких, включая идиопатический лёгочный фиброз, саркоидоз, ХОБЛ, астму, профессиональное или экологическое повреждение лёгких и облитерирующий бронхиолит [Kjeldsen L. et al., 1994]. По нашим данным концентрация CC16 в гомогенате лёгких от мышей патологического контроля повышалась относительно мышей интактного контроля (14 сутки) (приложение, рисунок 25). Между тем, при стимуляции молекулярных и клеточных факторов регенерации структура лёгких оставалась нарушенной. Объяснение этому мы видим в ингибирующем и дезорганизирующем действии воспаления на процессы репаративной регенерации.

Использование Триамида в качестве терапевтического агента позволило положительно повлиять на лёгкие мышей в условиях введения эластазы. После лечения активность воспаления в повреждённых эластазой лёгких снижалась. Этот вывод мы сделали на основании, во-первых, падения концентрации воспалительных ИЛ-2, ИЛ-5 и ИЛ-13 в сыворотке крови у мышей с эмфиземой лёгких в условиях введения Триамида по сравнению с нелеченными мышами с эмфиземой легких (14, 21 сутки). Во-вторых, Триамид уменьшал плотность инфильтрации клетками воспаления альвеол, альвеолярных перегородок, а также перибронхиального и периваскулярного пространства (приложение, рисунок 20). Иммуногистохимический анализ определил эти клетки как CD16<sup>+</sup> клетки (приложение, рисунок 19е). Цитометрическая оценка маркеров позволила обнаружить сокращение числа зрелых (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) и незрелых (F4/80<sup>low</sup>CD11b<sup>low</sup>) макрофагов в повреждённых эластазой лёгких животных, пролеченных Триамидом (14 сутки) (приложение, рисунок 21). При этом сокращались субпопуляции клеток с

фенотипами CD45<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>. В-третьих, при лечении отмечалось уменьшение экспрессии нейтрофильной эластазы, MMP9 и MMP12 на мононуклеарах, расположенных преимущественно в альвеолах (21 сутки) (приложение, рисунок 22).

Купирование Триамидом воспаления обусловило закономерное уменьшение площади эмфиземы во всех лёгочных полях и улучшение такого параметра альвеол, как Lm, у мышей опытной группы по сравнению с патологическим контролем (приложение, рисунок 18).

Важным является положительное действие Триамида на эндотелий. При лечении у мышей опытной группы не выявлено полнокровие кровеносных сосудов, подобного у мышей патологического контроля. При этом обнаруживалось увеличение плотности капилляров во всех лёгочных полях (в верхнем – в 9 раз, в среднем – в 4 раза, в нижнем – в 5,4 раза) (приложение, рисунок 18a) и дополнительная экспрессия эндотелиального маркера CD31 в просвете кровеносных сосудов (более чем в 3 раза;  $P < 0,05$ ) (приложение, рисунок 19b). Этот регенераторный эффект Триамида предположительно можно связать с клетками-предшественниками. Как видно из рисунка 24, субстанция увеличивала (в 2,8 раза;  $P < 0,05$ ) количество эндотелиальных прогениторных клеток (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) в лёгких мышей опытной группы по сравнению с не пролеченными мышами с эмфиземой (14 сутки). Эти данные повторяют результаты исследования Триамида на модели фиброза легких [Skurikhin Evgenii et al., 2020]. В нашей ранее опубликованной работе показано, что *in vivo* субстанция увеличивала количество эндотелиальных прогениторных клеток лёгких мышей с фиброзом лёгких по отношению к не пролеченным мышам с фиброзом лёгких. В культуре CD31<sup>+</sup> клеток, выделенных из фиброзированных лёгких, субстанция уменьшала количество клеток в апоптозе и увеличивала число клеток с активными эстеразами [Skurikhin Evgenii et al., 2020]. Таким образом, потенциальной мишенью для Триамида, возможно, выступают резидентные клетки, экспрессирующие CD31.

Триамид увеличивал экспрессию Е-кадгерина и пан-цитокератина в альвеолах мышей опытной группы по сравнению с мышами патологического контроля (приложение, рисунок 19c, d), при этом содержание резидентных стволовых клеток легких повышалось (приложение, рисунок 23b). К положительному действию субстанции мы относим повышение до уровня интактного контроля экспрессии  $\alpha$ 1-антитрипсина на альвеолярных клетках (приложение, рисунок 19a). Структура альвеол определяет интенсивный газообмен: капиллярная сеть обволакивает альвеолы, базальная мембрана для эпителия альвеол и эндотелия капилляра общая. Мы не исключаем, что положительные эффекты Триамида в отношении альвеолярного эпителия, возможно, опосредованы паракринной активностью регенерирующего эндотелия. С другой стороны, мы не выявили изменений со стороны бронхиального эпителия и клеток Клара (секреция белка клеток Клара не изменялась) у пролеченных мышей с эмфиземой. Значения этих параметров в

опытной группе, как и в патологическом контроле, были достаточно высокие по сравнению с интактным контролем (приложение, рисунок 23а, 25). Объяснение этому мы видим в ограниченном взаимодействии эндотелия и эпителия воздухоносных путей.

В заключении мы остановились на таком важном аспекте воспаления, как взаимодействие структурных клеток лёгких с клетками иммунной системы, которые проникают в лёгочную ткань при эмфиземе и ХОБЛ. Оба типа клеток экспрессируют хемокины и хемокиновые рецепторы, что делает их чувствительными к изменениям градиентов концентрации. В публикации за 2019 год Pauline Henrot и соавторы привели доказательства участия хемокинов в развитии эмфиземы и ХОБЛ, и выдвинули гипотезу о том, что нарушение регуляции этой жестко регулируемой системы имеет решающее значение в развитии легочных заболеваний [Henrot Pauline, Prevel Renaud, Berger Patrick and Dupin Isabelle, 2019]. Особый акцент авторы сделали на *sxc18-CXCR1 / 2*, *CXCL9/10/11-оси CXCR3*, *CCL2-CCR2* и *CXCL12-CXCR4*, которые, по-видимому, в большей степени вовлечены в патогенез эмфиземы и ХОБЛ. В других публикациях другие независимые авторы указывают на роль многих хемокинов (в том числе семейства *CXC*) в мобилизации, миграции и хоминге костно-мозговых незрелых эндотелиальных клеток в норме и при патологии [George, A.L. et al., 2011; Li, D.W. et al., 2012; Ishizawa, K. et al., 2004; Zheng, Q. et al., 2017; Kanzler, I. et al., 2013; Sozzani S, Del Prete A, Bonecchi R, Locati M., 2015; Henrot, P., Prevel, R., Berger, P., & Dupin, I., 2019; Sozzani S. et al., 2015; Kanzler, I. et al., 2013]. Миграция проангиогенных клеток из костного мозга находится в зависимости от *SDF-1* и его рецептора *CXCR4* [Yang, J. et al., 2016; Henrot, P., Prevel, R., Berger, P., & Dupin, I., 2019; Shen, L. et al., 2011]. Изменение градиента концентрации *SDF-1* в костном мозге и повышенная экспрессия *CXCR4* на клетках-предшественниках [Kollet O. et al., 2006] усиливает их рекрутирование из костного мозга в повреждённые ткани [Guo Y. et al., 2005]. Есть мнение, что фактор роста эндотелия сосудов *VEGF* мобилизует незрелые эндотелиальные клетки из костного мозга [Li D.W. et al., 2012], и возможно, действует через хемокин *SDF-1* [George A. L. et al., 2011; DeLeve, L.D., Wang, X., & Wang, L., 2016]. Таким образом, путь *VEGF-SDF-1* может рекрутировать клетки костного мозга в сосудистую сеть [Grunewald, M. et al., 2006; Jin, Y.L. et al., 2006]. В этой связи уменьшение числа клеток воспаления, предшественников ангиогенеза и *VEGF2<sup>+</sup>* клеток в повреждённых эластазой лёгких могут быть связаны с отрицательной регуляцией Триамидом хемокинов и хемокиновых рецепторов.

Итак, представленные результаты позволяют предположить, что Триамид может представлять собой перспективное соединение для разработки на его основе новых лекарственных средств, сочетающих в себе противовоспалительное действие и регенераторную активность, для пациентов с эмфиземой и ХОБЛ.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) является распространённым во всём мире хроническим заболеванием дыхательных путей, связанным с воздействием вредных частиц или газов, особенно сигаретного дыма, которые приводят к стойкому воспалению дыхательных путей и разрушению лёгких (эмфизема) [Vogelmeier C., Agustí A., Anzueto A., Barnes P., Bourbeau J., Criner G., et al., 2019]. Анализ значительного количества результатов опубликованных доклинических и клинических исследований привёл нас к выводу, что многолетние исследования ХОБЛ не привели научное сообщество к единому пониманию патогенеза заболевания. До сих пор проводится поиск эффективных диагностических и прогностических биомаркеров ХОБЛ, мишеней и, собственно, сама терапия заболевания. Лечение пациентов даже при видимом многообразии лекарственных препаратов и хирургического вмешательства, во многом, это предмет дискуссии, и, прежде всего, в силу неэффективности известных подходов. Остаётся нерешённый вопрос о восстановлении повреждённых и утраченных клеток и тканей лёгких при ХОБЛ. Развивающаяся быстрыми темпами регенеративная медицина не может предложить в клиническую практику тактических ходов стимуляции или ускорения регенерации повреждённых и утраченных клеток и тканей лёгких.

Известны многие модели *in vivo*, используемые в целях вскрытия новых клеточных и молекулярных механизмов, лежащие в основе патогенеза ХОБЛ. Мышь представляет собой наиболее предпочтительный выбор животного в этих исследованиях из-за её генетического и физиологического сходства с человеком, наличия большой вариабельности инбредных штаммов и нескольких генетических нарушений, аналогичных таковым у человека. И, наконец, возможности создания моделей путём генетических манипуляций. С нашей точки зрения, при решении фундаментальных и прикладных задач целесообразно использовать различные повреждающие факторы, моделирующие отдельные симптомы или целый симптомокомплекс ХОБЛ. К таким факторам относят эластазу, D-галактозамин гидрохлорид, SU5416, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, диоксид кремния и угольную пыль, *JE/MCP-1* и другие. При этом особое внимание уделяется действию на лёгкие сигаретного дыма, так как многочисленные внешние раздражители, присутствующие в листьях табака и сигаретном дыме, способствуют хемотаксису, адгезии, фагоцитозу, высвобождению супероксидных анионов и содержанию ферментных гранул, и эти реакции сродни реакциям у пациентов с ХОБЛ.

Многообразие животных моделей эмфиземы лёгких и ХОБЛ нами использовалось с целью изучения механизмов регуляции стволовых и прогениторных клеток различных классов, поиска новых диагностических и прогностических биомаркеров, а также подходов фармакологической регуляции СК для коррекции нарушений и ускорения регенерации утраченных и повреждённых клеток лёгких.

Представленные в монографии данные указывают на новые факты жизнедеятельности СК при эмфиземе лёгких. Прежде всего следует указать на то, что нами продемонстрирована общая реакция предшественников мезенхимальных клеток на моделирование эмфиземы лёгких. Выявленная нами активация предшественников мезенхимальных клеток, прежде всего, меняет существующее представление о «фундаментальных» различиях в развитии ХОБЛ и ИФЛ [Chilosi M. et al., 2012], по крайней мере, на уровне МСК, фибробластных прогениторных клеток, фиброцитов. Если в условиях индуцированного блеомицином фиброзе лёгких эти клетки выступают как патогенетический фактор (способствуют фиброзу), то при моделировании эмфиземы лёгких (эластаза, D-галактозамин гидрохлорид, ЛПС и ЭСД) участвуют в восстановлении эластинового и коллагенового матрикса.

Важны результаты, касающиеся механизмов, препятствующих регенерации лёгких при эмфиземе лёгких. Достаточно низкие темпы регенерации или её отсутствие объясняются нами ингибирующим действием гуморальных факторов воспаления на резидентные (лёгкие) эпителиальные и эндотелиальные СК и прогениторные клетки. С другой стороны, состояние микрососудистой сети лёгких во многом определяет миграцию в повреждённую ткань костно-мозговых и циркулирующих в крови СК и прогениторных клеток. Например, в случае значительного повреждения эндотелия (эластаза) наблюдается снижение активности процесса, что негативно сказывается на рекрутировании регенераторно компетентных эндотелиальных прогениторных клеток в эмфизематозно расширенные лёгкие.

Notch сигнальный путь – один из важных путей, определяющих патогенез ХОБЛ [Chilosi M. et al., 2012]. Нами получены результаты, указывающие на целесообразность использования Notch1-сигнального пути и СК, экспрессирующих на своей мембране молекулы Notch, в качестве диагностических и прогностических маркеров эмфиземы лёгких и ХОБЛ. Перспективным, с нашей точки зрения, выступает использование мембранных рецепторов Notch1 в качестве мишеней для фармакологической регуляции регенераторно компетентных клеток для регенерации эпителия и эндотелия лёгких.

Выводы, которые были сделаны нами по окончании фундаментальных исследований, позволили предложить новые подходы ускорения восстановления структуры лёгких при эмфиземе. В основе первого подхода лежит снижение активности периферического звена СНС. Использование препаратов с симпатолитической активностью, например, резерпина, приводит к снижению негативного влияния воспаления на резидентные прогениторные клетки. С другой стороны, симпатолитик способствует рекрутированию в лёгкие клеток «глубокого» резерва регенерации: костно-мозговых СК и прогениторных клеток.

Возможной альтернативой известной противовоспалительной терапии ХОБЛ может стать Триамид (бисамидная производная дикарбоновой кислоты). Доклиническая оценка этого нового соединения на различных моделях

патологии поджелудочной железы, тестикулярной ткани и лёгких показала его значительную противовоспалительную активность. При этом механизм действия соединения, по всей видимости, связан с «регуляцией» моноцитарно-макрофагального звена воспаления. Важным является то обстоятельство, что дополнительно Триамид ускоряет регенерацию повреждённых специализированных клеток. Противовоспалительный и регенераторный эффект Триамид демонстрирует и на модели эмфиземы легких, вызванной нарушением баланса протеаз / антипротеаз эластазой.

Повреждение микрососудистой сети лёгких представляют одним из факторов прогрессии ХОБЛ. В монографии нами представлено патогенетическое обоснование необходимости купирования негативного влияния дофамина на систему эндотелия сосудов легких и его противовоспалительной активности при эмфиземе легких. Результатом блокады дофаминовых  $D_2$ -рецепторов спипероном выступает регенерация клеток эндотелия крупных сосудов и микрососудистой сети лёгких за счёт рекрутирования в лёгкие костно-мозговых и циркулирующих в крови эндотелиальных прогениторных клеток. Это закономерно влечёт за собой восстановление клеток альвеолярного эпителия. Обнаруженное снижением спипероном интенсивности перибронхиального и периваскулярного фиброза при эмфиземе различной этиологии может выступить положительным моментом при выборе стратегии лекарственной терапии для пациентов с ХОБЛ.

В настоящее время ХОБЛ рассматривается как системное заболевание с внелёгочными сопутствующими заболеваниями, такими, как сердечно-сосудистые заболевания, дисфункция скелетных мышц/саркопения и остеопороз и др. [Hillas G, Perlikos F, Tsiligianni I, Tzanakis N., 2015]. Особое внимание в этом ряду сопутствующих заболеваний обращено на метаболический синдром, который оказывает значительное влияние на заболеваемость и смертность от ХОБЛ. При поиске возможного подхода для лечения сочетанного заболевания метаболического синдрома и ХОБЛ мы обратили своё внимание на глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1).

Глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1) – инкретин, секретируемый L клетками желудочно-кишечного тракта в ответ на приём пищи (Tian and Jin, 2016). Вследствие своих привлекательных биологических функций, таких, как стимуляция секреции инсулина глюкоза зависимым способом, подавление аппетита и замедление работы желудка, ГПП-1 в настоящее время используют как главный тип инкретиновой терапии для сахарного диабета 2 типа [Brubaker, 2010; Rajeev and Wilding, 2016]. Есть интерес к использованию ГПП-1 в качестве препарата в противовоспалительной терапии при метаболическом синдроме [Skurikhin E., Pershina O., Pakhomova A. et al., 2019]. Однако эндогенный ГПП-1 чувствителен к протеолитическому расщеплению и быстро деградирует главным образом дипептидилпептидазой-IV (DPP-IV) (Glaesner и соавт., 2010; Wan et al., 2017). В последние два десятилетия различными независимыми коллективами исследователей

## **Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

были предприняты большие усилия, направленные на увеличение продолжительности действия инкретина *in vivo*. Недавно нами разработан аналог ГПП-1 с использованием технологии химического пегилирования. Пегилированный ГПП-1 (пегГПП-1) не только сохранил биологические эффекты ГПП-1, но и обладал более продолжительным действием, чем нативный инкретин. В доклинических исследованиях мы получили данные, указывающие на противовоспалительную, противоэмфизематозную и регенеративную активности пегГПП-1 у мышей линии C57BL/6 в условиях сочетания метаболических нарушений и эмфиземы лёгких. В качестве потенциальной мишени для пегГПП-1 выступают эндотелиальные прогениторные клетки, экспрессирующие маркеры CD31 и CD34. Важным является то обстоятельство, что нами выявлены гендерные различия в действии пегГПП-1 при сочетанной патологии: эффективность лечения самок превосходила таковую самцов. Таким образом, впервые представлена возможность гендерного выбора лечения сочетанного заболевания МС и ХОБЛ с одновременной стимуляцией регенерации микрососудистой сети лёгких.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева, О.С. Хроническая обструктивная болезнь лёгких от воздействия производственных аэрозолей / О.С. Васильева, А.А. Гусаков, Е.Е. Гущина, Н.Ю. Кравченко // Пульмонология. – 2013. – № 3. – С. 49–55.
2. Венгеровский, А. И. Фармакология: учебник / А.И. Венгеровский. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 848 с. - ISBN 978-5-9704-5294-3.
3. Галастьян, Г.Р. Клинические аспекты использования первого аналога человеческого ГПП - 1 длительного действия - лираглутида при СД 2 типа / Г.Р. Галастьян // Сахарный диабет. – 2010. – Спецвыпуск. – С. 7-10.
4. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни лёгких (пересмотр 2014 г.) / пер. с англ. под ред. А.С. Белевского. – Москва: Российское респираторное общество. – 2014. – 92 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. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях / пер. М.С. Красильщикова, И.В. Белозерцева. – Rus-LASA, 2012.
7. Дыгай, А.М. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты / А.М. Дыгай, В.В. Жданов. – М.: Изд-во РАМН, 2010. – С.138.
8. 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.
9. 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.
10. Дыгай, А.М. Стволовые клетки при метаболическом синдроме и сахарном диабете: реалии и перспективы использования в клинике / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, А.В. Пахомова, О.В. Першина - Москва: РАН. 2019. – 202 с. ISBN: 978-5-7901-0140-3.
11. Игнатъев, В.А. Хроническая обструктивная болезнь легких: эпидемиология и экономический ущерб / В.А. Игнатъев, О.Н. Титова, О.И. Гуляева // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2007. – Т. 11 – № 4 – С. 1–8.
12. Корпачев, В.В. Механизмы действия, безопасность и переносимость глиптинов - нового класса противодиабетических препаратов с инкретиновым эффектом / В.В.Корпачев, Н.М.Гурина // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 7(39). – С. 17-22.

13. Мезен, Н.И. Стволовые клетки. Учебно-методическое пособие / сост. Н.И. Мезен, З.Б. Квачева, Л.М. Сычик – 2-е изд., доп., – Минск, БГМУ, 2014. – 62 с.

14. Мэдсбэд, С. Исследование эффекта и действия лираглутида при сахарном диабете (LEAD™) / С.Мэдсбэд // Сахарный диабет. – 2010. – Спецвыпуск. – С.11 – 20.

15. Никонова, Л.В. Физиологические эффекты инкретинов при сахарном диабете 2 типа / Л.В. Никонова, И.П. Дорошкевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 1. – С 18-21

16. Никонова, Т.В. Апоптоз в развитии ремиссии сахарного диабета 1 типа / Т.В. Никонова, С.А. Прокофьева, В.А. Горельшева и др. // Сахарный диабет. – 2006. – №4. – С. 47-50.

17. Панькив, В.И. Инкретины: новая веха в лечении сахарного диабета 2-го типа. Возможности ситаглиптина в достижении компенсации сахарного диабета 2-го типа / В.И. Панькив // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – №6(38). – С.6- 12.

18. Попов Б.В. Введение в клеточную биологию стволовых клеток / СПб.: СпецЛит, 2010 – 319 с.: ил.

19. Пульмонология: клинические рекомендации / ред. А.Г. Чучалин. – ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 240 с.

20. Регенеративная биология и медицина. Книга III. Клеточные технологии в клинической медицине / А.М. Дыгай, В.В. Семченко, И.Н. Лебедев, С.И. Ерениев, С.С. Степанов, В.К. Леонтьев, В.В. Жданов, К.Н. Ярыгин, Ф.И. Петровский, В.Н. Байматов, М.С. Назаренко, Н.А. Николаев; под ред. В.П. Пузырёв, А.М. Дыгай, И.Н. Лебедев, В.В. Семченко. – Москва – Омск – Томск – Ханты-Мансийск: Омская областная типография, 2017. – Т. 3 – 774 с.

21. Российское респираторное общество. Хроническая обструктивная болезнь лёгких. Клинические рекомендации, 2016.

22. Скурихин, Е.Г. Дифференцировка стволовых и прогениторных  $\beta$ -клеток поджелудочной железы в инсулинсекретирующие клетки у мышей при сахарном диабете / Е.Г. Скурихин, Н.Н. Ермакова, Е.С. Хмелевская и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2013. – Т. 156(12). – С. 681-686.

23. Спасов, А.А. Потенциал фармакологической модуляции уровня и активности инкретинов при сахарном диабете типа 2 / А.А. Спасов, Н.И. Чепляева // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61(4). – С. 488-496.

24. Ушакова, О.В. Сравнительная характеристика агонистов глюкагоноподобного пептида-1 / О.В. Ушакова, Л.Г. Витько // Здравоохранение Дальнего Востока. – 2016. – № 1. – С. 83–87.

25. Чучалин, А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни лёгких / А.Г. Чучалин, С.Н. Авдеев, З.Р. Айсанов, и др. // Пульмонология. – 2014. – № 3 – С. 15–36.

26. 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
27. Abboud, R.T. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema / R.T. Abboud, S. Vimalanathan // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2008. – Vol. 12.(4). – P. 361 – 367.
28. 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.
29. Åberg, J. Sex-related differences in management of Swedish patients with a clinical diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease / J. Åberg, M. Hasselgren, S. Montgomery et al. // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2019. – Vol. 14. – P. 961–969.
30. Abreu, S.C. Bone marrow, adipose, and lung tissue-derived murine mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma / S.C. Abreu, M.A. Antunes, D.G. Xisto et al. // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 6(6). – P. 1557 – 1567.
31. Adenuga, D. Histone deacetylase 2 is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded by cigarette smoke / D. Adenuga, H. Yao, T.H. Marchet et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 40 – № 4 – P. 464–473.
32. Agalioti, T. Pleural involvement in lung cancer / T. Agalioti, A. Giannou, G. Stathopoulos // *Journal of Thoracic Disease*. – 2015. – Vol. 7. – P. 1021 – 1030.
33. Agarwal, A.R. Short-term cigarette smoke exposure leads to metabolic alterations in lung alveolar cells / A.R. Agarwal, F. Yin, E. Cadenas // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 51. – P. 284–293.
34. Akram, K. Lung Regeneration: Endogenous and Exogenous Stem Cell Mediated Therapeutic Approaches. / K.M. Akram, N. Patel, M.A. Spiteri, N.R. Forsyth // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – Vol. 17(1). P. 128.
35. Albert, R.K. Long-term oxygen treatment trial research group. A randomized trial of long-term oxygen for COPD with moderate desaturation / R.K. Albert, D.H. Au, A.L. Blackford et al. // *NEJM*. – 2016. – Vol. 375. - № 17. – P. 1617.
36. Albrecht, C. Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung / C. Albrecht, B. Adolf, C. Weishaupt, D. Höhr, I. Zeitträger, J. Friemann, P.J. Borm // *Inhalation Toxicology*. – 2001. – Vol. 13(3). – P. 191–205.
37. Allinson, J.P. The presence of chronic mucus hypersecretion across adult life in relation to chronic obstructive pulmonary disease development / J.P. Allinson, R. Hardy, G.C. Donaldson et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2016. – Vol. 193. - № 6. – P. 662 - 672.

38. Alves, N.G. Endothelial Protrusions in Junctional Integrity and Barrier Function / N.G. Alves, Z.Y. Motawe, S.Y. Yuan, J.W. Breslin // *Current topics in membranes*. – 2018. – Vol. 82. – P. 93 – 140.

39. American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. / American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2000. – Vol.161. P. 646-664.

40. Andreeva, E. The Prevalence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease by the Global Lung Initiative Equations in North-Western Russia / E. Andreeva, M. Pokhaznikova, A. Lebedev et al. // *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*. – 2016. – Т. 91 – № 1 – P. 43–55.

41. Anthonisen, N.R. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. / N.R. Anthonisen, J. Manfreda, C.P. Warren et al. // *Annals of internal medicine*. – 1987. – Vol. 106(2). – P. 196–204.

42. Anthonisen, N.R. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV 1 / N.R. Anthonisen, J.E. Connett, J.P. Kiley et al. // *The Lung Health Study. JAMA*. – 1994. – Vol. 272. – P. 1497 – 1505.

43. Antunes, M.A. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema / M.A. Antunes, S.C. Abreu, F.F. Cruz et al. // *Respiratory Research*. – 2014. – Vol. 15(1). – P. 118.

44. Antunes, M.A. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models / M.A. Antunes, P.R. Rocco // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. – 2011. – Vol. 83(4). – P. 1385–1395.

45. 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. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiolog*. – 2007. – Vol. 293. - L1–L8.

46. 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.

47. Asahara, T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan et al. // *Science (New York, N.Y.)*. – 1997. – Vol. 275(5302). – P. 964–967.

48. Atkinson, J.J. The role of matrix metallo-proteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema / J.J. Atkinson, B.A. Lutey, Y. Suzuki et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2011. – Vol. 183(7). – P. 876 – 884.

49. Aurrand-Lions, M. Murine bone marrow niches from hematopoietic stem cells to B cells / M. Aurrand-Lions, S.J.C. Mancini // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – 19(8):2353.



50. Azghani, A.O. Mechanism of fibroblast inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* elastase / A.O. Azghani, K. Neal, S. Idell et al. // *Microbiology*. – 2014. – Vol. 160. – P. 547–555.
51. 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 Medical Journal*. – 2011. – Vol. 52(3). – P. 401–412.
52. Bagdonas, E. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD / E. Bagdonas, J. Raudoniute, I. Bruzauskaite, R. Aldonyte // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 995–1013.
53. Bailey, A.S. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium / A.S. Bailey, H. Willenbring, S. Jiang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2006. – Vol. 103(35). – P. 13156–13161.
54. 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. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280(42). – P. 35760–35766.
55. 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.
56. Baraldo, S. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD / S. Baraldo, G. Turato, C. Badin, et al. // *Thorax*. – 2004. – Vol. 59 – № 4 – P. 308–312.
57. Barbera, J.A. Vascular progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease. / J.A. Barbera, V.I. Peinado // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2011. – Vol. 8. – P. 528–534.
58. Barnes P.J. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons / P.J. Barnes // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2005. – Vol. 2(4). – P. 334 – 339.
59. Barnes, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms / P.J. Barnes, S.D. Shapiro, R.A. Pauwels // *The European Respiratory Journal*. – 2003. – Vol. 22(4). – P. 672–688.
60. Barnes, P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // *Pharmacological Reviews*. – 2004. – Vol. 56(4). – P. 515 – 548.
61. Barth, P.J. Effects of nitrogen dioxide exposure on Clara cell proliferation and morphology / P.J. Barth, B. Müller // *Pathology, Research and Practice*. – 1999. – Vol. 195(7). – P. 487–493.
62. Baumgartner, K.B. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis / K.B. Baumgartner, J.M. Samet, C.A. Stidley et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1997. – Vol. 155. – P. 242–248.
63. Beckett, E.L. A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis / E.L.

Beckett, R.L. Stevens, A.G. Jarnicki et al. // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2013. – Vol. 131(3). – P. 752–762.

64. Begum, S. Antimycobacterial and antioxidant activities of reserpine and its derivatives / S. Begum, S.Q.Z. Naqvi, A. Ahmed et al. // *Natural product research*. – 2012. – V. 26(22). – P. 2084-2088.

65. Bekki, K. Comparison of Chemicals in Mainstream Smoke in Heat-not-burn Tobacco and Combustion Cigarettes / K. Bekki, Y. Inaba, S. Uchiyama, N. Kunugita // *Journal of UOEH*. – 2017. – Vol. 39(3). – P. 201–207.

66. Belchamber, K.B.R. Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease / K.B.R. Belchamber, L.E. Donnelly // *Results and Problems in Cell Differentiation*. – 2017. – Vol. 62. – P. 299-313.

67. 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.

68. Belinsky, S.A. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers / S.A. Belinsky, W.A. Palmisano, F.D. Gilliland et al. // *Cancer Research*. – 2002. – Vol. 62 – № 8 – P. 2370–2377.

69. Bellinger, D.L. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease / D.L. Bellinger, B.A. Millar, S. Perez et al. // *Cellular Immunology*. – 2008. – Vol. 252 – № 1–2 – P. 27–56.

70. 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(5). – P. 1457–1462.

71. Bergin D.A. Alpha-1 Antitrypsin: A Potent Anti-Inflammatory and Potential Novel Therapeutic Agent. / D.A. Bergin, K. Hurley, N.G. McElvaney. // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2012. – Vol.60. P–81-97.

72. Betsuyaku, T. Dendritic cells and alveolar macrophages mediate IL-13-induced airway inflammation and chemokine production / T. Betsuyaku, J.M. Shipley, Z. Liu et al. // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2012. – Vol. 129(6). – P. 1621–1627.e3.

73. Betsuyaku, T. Neutrophil emigration in the lungs, peritoneum, and skin does not require gelatinase B / T. Betsuyaku, J.M. Shipley, Z. Liu, R.M. Senior // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 20. – P. 1303–1309.

74. 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.

75. Biancone, L. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles / L. Biancone, S. Bruno, M.C. Deregibus, et al. // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2012. – Vol. 27. – P. 3037 – 3042.

76. Biaoxue, R. Correlation of serum levels of HIF-1 $\alpha$  and IL-19 with the disease progression of COPD: a retrospective study. // R. Biaoxue. Y. Liu, M. Li

et al. // International journal of chronic obstructive pulmonary disease. – 2018. – Vol. 13. – P. 3791-3803.

77. Biener, A.I. Prevalence and Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in the United States. / A.I. Biener, S. L. Decker, F. Rohde. // *Jama*. – 2019. – Vol. 322(7).

78. Birbrair, A. Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology / A. Birbrair, T. Zhang, Z.M. Wang et al. // *Clinical Science*. – 2015. – Vol. 128. – P. 81–93.

79. Bjerknæs, M. Gastrointestinal stem cells: II. Intestinal stem cells / M. Bjerknæs, H. Cheng // *American journal of physiology – gastrointestinal and liver physiology*. – 2005. – Vol. 289. – P. 381 – 387.

80. Blackwood, R.A. Alpha 1-antitrypsin deficiency and increased susceptibility to elastase-induced experimental emphysema in a rat model / R.A. Blackwood, J.M. Cerreta, I. Mandl, G.M. Turino // *The American review of respiratory disease*. – 1979. – Vol. 120(6). – P. 1375–1379.

81. Blackwood, R.A. Emphysema induced by intravenously administered endotoxin in an alpha 1-antitrypsin-deficient rat model / R.A. Blackwood, J. Moret, I. Mandl, G.M. Turino // *The American review of respiratory disease*. – 1984. – Vol. 130(2) – P. 231–236.

82. Blanco I. Prevalence of  $\alpha$ 1-antitrypsin PiZZ genotypes in patients with COPD in Europe: a systematic review. / I. Blanco, I. Diego, P. Bueno et al. // *European respiratory review*. – 2020. – Vol. 29.

83. Blanco, R. VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection / R. Blanco, H. Gerhardt // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2013. – Vol. 3(1). – P. a006569.

84. 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.

85. 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.

86. Boğa, M. Chapter 7 - Chemical and Biological Perspectives of Monoterpene Indole Alkaloids from *Rauwolfia* species / M. Boğa, M. Bingül, E.E. Özkan, H. Şahin // *Studies in Natural Products Chemistry*. – 2019. – V. 61. – P. 251-299.

87. Bogaert, M.G. Comparative pharmacokinetics: introductory remarks / M.G. Bogaert // *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy: Proceedings of the 3rd Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, August 25–29 1985, Ghent, Belgium Part II, Invited Lectures* / ed. by A.S.J.P.A.M. Van Miert, M.G. Bogaert, M. Debackere. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1986. – P. 155–160.

88. Bolmer, S.D. Galactosamine-induced alpha 1-antitrypsin deficiency in rats. Alterations in plasma glycoproteins and alpha 1-antitrypsin carbohydrate composition / S.D. Bolmer, J. Kleinerman // *American Journal of Pathology*. – 1987. – Vol. 126 (2). – P. 209 – 219.

89. Borggrefe, T. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway / T. Borggrefe, R. Liefke // *Cell Cycle*. – 2012. – Vol. 11(2). – P. 264–276.

90. 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 // *Progress in Neurobiology*. – 2011. – Vol. 95(2). – P. 213–228.

91. Borrayo, G. TG/HDL-C Ratio as Cardio-Metabolic Biomarker Even in Normal Weight Women / G. Borrayo, L. Basurto, E. González-Escudero et al. // *Acta Endocrinology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 261–267.

92. Borrill, Z.L. Measuring bronchodilation in COPD clinical trials / Z.L. Borrill, C.M. Houghton, A.A. Woodcock et al. // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2005. – Vol. 59(4). – P. 379–384.

93. Botelho, F.M. IL-1 $\alpha$ /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. / F.M. Botelho, C.M. Bauer, D. Finch et al. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6(12). – P. e28457.

94. Boucherat, O. The loss of Hoxa5 function promotes Notchdependent goblet cell metaplasia in lung airways / O. Boucherat, J. Chakir, L. Jeannotte // *Biol Open*. – 2012. – Vol. 1. – P. 677–691.

95. Bradford E. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. / E. Bradford, S Jacobson, J Varasteh, et al. // *Respiratory research*. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 180.

96. 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 // *International Angiology*. – 2011. – Vol. 30(1). – P. 25–34.

97. Bray, S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex / S.J. Bray // *Nature Reviews Cancer*. – 2006. – Vol. 7(9). – P. 678–689.

98. Brittan, M. Endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease / M. Brittan, M.M. Hoogenboom, G.J. Padfield et al. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2013. – Vol. 305(12). – P. 964–969.

99. Broadley, K.J. Beta-adrenoceptor responses of the airways: for better or worse? / K.J. Broadley // *European Journal of Pharmacology*. – 2006. – Vol. 533 – № 1–3 – P. 15–27.

100. Broekman, W. Mesenchymal stromal cells: a novel therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease? / W. Broekman, P.P.S.J. Khedoe, K. Schepers et al. // *Thorax*. – 2018. – Vol. 73. – P. 565–574.

101. Brubaker, P.L. Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system / P.L. Brubaker, D.J. Drucker // *Endocrinology*. – 2004; – Vol. 145(6): – P. 2653–2659.

102. Bucala, R. Fibrocytes at 20 years / R. Bucala // *Molecular Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – P. 3–5.

103. Bucala, R. Review Series-Inflammation & fibrosis. Fibrocytes and fibrosis / R. Bucala // QJM. – 2012. – Vol. 105(6). – P. 505 – 508.
104. Buist, A.S. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. / A.S. Buist, M.A. McBurnie, W.M. Vollmer et al. // Lancet. – 2007. Vol. 370(9589). – P. 741–750.
105. 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 at al. // Blood. — 2000. — Vol. 8(96). — P. 2655-2663.
106. 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. // Journal of Experimental Medicine. – 2006. – Vol. 203(9). – P. 2201–2213.
107. Byrne, A.L. Tuberculosis and chronic respiratory disease: a systematic review / A.L. Byrne, B.J. Marais, C.D. Mitnick et al. // International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. – 2015. - Vol. 32. – P. 138 - 146.
108. Cadwallader, K.A. Effect of priming on activation and localization of phospholipase D-1 in human neutrophils / K.A. Cadwallader, M. Uddin, A.M. Condliffe et al. // European journal of biochemistry. – 2004. – Vol. 271(13). – P. 2755–2764.
109. Cai, W. Inhibition of Notch signaling leads to increased intracellular ROS by up-regulating Nox4 expression in primary HUVECs / W. Cai, L. Liang, L. Wang et al. // Cellular Immunology. – 2014. – Vol. 287. – P. 129 – 135.
110. Calderon, T.M. Dopamine Increases CD14+CD16+ Monocyte Transmigration across the Blood Brain Barrier: Implications for Substance Abuse and HIV Neuropathogenesis / T.M. Calderon, D.W. Williams, L. Lopez et al. // Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology. – 2017. – Vol. 12(2). – P. 353 – 370.
111. 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.
112. Campbell, E.J. Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. / E.J. Campbell, M.A. Campbell, S.S. Boukedes, C.A. Owen // The Journal of clinical investigation. – 1999. – Vol. 104. – P. 337 – 344.
113. Campbell, H.K. Interplay between tight junctions & adherens junctions / H.K. Campbell, J.L. Maiers, K.A. DeMali // Experimental cell research. – 2017. – Vol. 358(1). – P. 39–44.
114. Capaccione, K.M. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival / K.M. Capaccione, S.R. Pine // Carcinogenesis. – 2013. – Vol. 34(7). – P. 1420 – 1430.

115. Caporarello, N. Insulin receptor signaling and glucagon-like peptide 1 effects on pancreatic beta cells / N. Caporarello, C. Parrino, V. Trischitta, L. Frittitta // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12(8).

116. Cappetta, D. Lung mesenchymal stem cells ameliorate elastase-induced damage in an animal model of emphysema / D. Cappetta, A. De Angelis, G. Spaziano et al. // *Stem Cells International*. – 2018. – 9492038.

117. 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.

118. Caramori, G. Cytokine inhibition in the treatment of COPD / G. Caramori, I.M. Adcock, A. Di Stefano, K.F. Chung // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 397–412.

119. Carrell, R.W. Alpha 1-antitrypsin deficiency. A conformational disease / R.W. Carrell, D.A. Lomas, S. Sidhar, R. Foreman // *Chest*. - 1996. - Vol. 110. - P. 243 – 247.

120. Carvello, M. Mesenchymal Stem Cells for Perianal Crohn's Disease / M. Carvello, A. Lightner, T. Yamamoto et al. // *Cells*. – 2019. – V. 8(7). – P. 764; doi.org/10.3390/cells8070764.

121. Castaldi, P.J. Genetic control of gene expression at novel and established chronic obstructive pulmonary disease loci / P.J. Castaldi, M.H. Cho, X. Zhou et al. // *Human Molecular Genetics*. – 2015. – Vol. 24. - № 4. – P. 1200 – 1210.

122. Cataldo, D. MMP-2 and MMP-9 derived gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and COPD / D. Cataldo, C. Munaut, A. Noe et al. // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2000. – Vol. 123. – P. 259–267.

123. Cazzola, M. Tremor and b2-adrenergic agents: is it a real clinical problem? / M. Cazzola, M.G. Matera // *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. - 2012. - Vol. 25. - P. 4 – 10.

124. Cebron Lipovec, N. The Prevalence of Metabolic Syndrome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review / N. Cebron Lipovec, R.J. Beijers, B. van den Borst et al. // *COPD Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2016. – Vol. 13. – P. 399–406.

125. 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. // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10. - P. 858 - 864.

126. Ceriello, A. The simultaneous control of hyperglycemia and GLP-1 infusion normalize endothelial function in type 1 diabetes / A. Ceriello, V. De Nigris, G. Pujadas et al. // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2016. – Vol. 114. – P. 64-68.

127. Ceylan, E. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass / E. Ceylan, A. Kocyigit, M. Gencer et al. // *Respiratory Medicine*. – 2006. – Vol. 100. – P. 1270-1276.

128. 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.
129. 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). – P. 14–24.
130. 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.
131. 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.
132. Chandler, M.A. Smoking cessation / M.A. Chandler, S.I. Rennard // *Chest*. – 2010. – Vol. 137. – P. 428 – 435.
133. Chao, M.P. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy / M.P. Chao, J. Seita, I.L. Weissman // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 2008. – Vol. 73. – P. 439 – 449.
134. Chapman, H. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis / H. Chapman // *The Annual Review of Physiology*. – 2011. – Vol. 73. – P. 413 – 435.
135. Chavakis, E. S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy / E. Chavakis, C. Urbich, S. Dimmeler // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2008. – Vol. 45(4). – P. 514–522.
136. Chen, C. Impairment of two types of circulating endothelial progenitor cells in patients with glucocorticoid-induced avascular osteonecrosis of the femoral head / C. Chen, S. Yang, Y. Feng et al. // *Joint Bone Spine*. – 2013. – Vol. 80(1). – P. 70 – 76.
137. 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.
138. Chen, H. Lipid metabolism in chronic obstructive pulmonary disease / H. Chen, Z. Li, L. Dong et al. // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2019. – Vol. 14. – P. 1009–1018.
139. Chen, J.Y. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived microvesicles on pulmonary arterial hypertension in rats / J.Y. Chen, R. An, Z.J. Liu et al. // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2014. – Vol. 35. – P. 1121 – 1128.
140. Chen, R. Telomerase deficiency causes alveolar stem cell senescence-associated low-grade inflammation in lungs / R. Chen, K. Zhang, H. Chen et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290(52). – P. 30813 – 30829.

141. Chen, Y. Beraprost sodium attenuates cigarette smoke extract-induced apoptosis in vascular endothelial cells / Y. Chen, H. Luo, N. Kang, et al. // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39. – P. 10447 – 10457.

142. Chen, Y. Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH signaling in adenocarcinoma of the lung / Y. Chen, M. De Marco, I. Graziani et al. // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – P. 7954 – 7959.

143. Chen, Y. Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver / Y. Chen, L.X. Xiang, J.Z. Shao et al. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2010. – Vol. 14(6B). – P. 1494–1508.

144. Chen, Y.B. Mesenchymal stem cell-based HSP70 promoter-driven VEGFA induction by resveratrol alleviates elastase-induced emphysema in a mouse model / Y.B. Chen, Y.W. Lan, L.G. Chen et al. // *Cell Stress Chaperones*. – 2015. – Vol. 20(6). – P. 979 – 989.

145. 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.

146. Chertov, O. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils / O. Chertov, H. Ueda, L. Xu et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 1997. – Vol. 186(5). – P. 739-747.

147. Chessa, D. Lipopolysaccharides belonging to different salmonella serovars are differentially capable of activating Toll-like receptor 4 / D. Chessa, L. Spiga, N. De Riu et al. // *Infection and immunity*. – 2014. – Vol. 82(11). – P. 4553 – 4562.

148. Chilosi M. Usual interstitial pneumonia / M. Chilosi, B. Murer, V. Poletti // *Molecular pathology of lung diseases*. – Springer. – 2008. – P. 607-615.

149. Chilosi, M. The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil? / M. Chilosi, V. Poletti, A. Rossi // *Respiratory Research*. – BioMed Central Ltd, 2012. – Vol. 13(1) – P. 3.

150. Chirgwin, J.M. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease / J.M. Chirgwin, A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, W.J. Rutter // *Biochemistry*. – 1979. – Vol. 18. – P. 5294–5299.

151. Cho, R.J. Human adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids improve recovery in a mouse model of elastase-induced emphysema / R.J. Cho, Y.S. Kim, J.Y. Kim, Y.M. Oh // *BMB Rep*. – 2017. – Vol. 50(2). – P. 79 – 84.

152. 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 // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2012. – Vol. 30(4). – P. 634–642.

153. Christie, J.D. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012 / J.D. Christie, L.B. Edwards, A.Y. Kucheryavaya et al. // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2012. – Vol. 31(10). – P. 1073 - 1086.



154. Chua, F. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation / F. Chua, G.J. Laurent // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2006. – Vol. 3(5). – P. 424-427.
155. Chuchalin, A.G. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation / A.G. Chuchalin, N. Khaltayev, N.S. Antonov et al. // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2014. – T. 9 – C. 963–974.
156. Chung, K.F. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction / K.F. Chung, I.M. Adcock // *The European Respiratory Journal*. – 2008. – Vol. 31 – № 6 – P. 1334–1356.
157. Churg, A. Mechanisms of mineral dust-induced emphysema. / A. Churg, K. Zay, K. Li // *Environmental Health Perspectives*. – 1997. – Vol. 105. – Suppl 5 – P. 1215–1218.
158. 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. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – Vol. 166. – P. 849–854.
159. Ciarka, A. The effects of dopamine on the respiratory system: Friend or foe? / A. Ciarka, J.L. Vincent, P.van de Borne // *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. – 2007. – Vol. 20(6). – P. 607 – 615.
160. Cichy J. Biosynthesis of alpha 1 proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. / J. Cichy, J. Potempa, J. Travis // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272(13). –P.8250-8255
161. Conboy, I.M. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment /I.M. Conboy, M.J. Conboy, A.J. Wagers at al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 433(7027). – P. 760–764.
162. Cope, S. Comparative efficacy of long-acting bronchodilators for COPD – a network meta-analysis / S. Cope, J.F. Donohue, J.P. Jansen et al. // *Respiratory Research*. – 2013. – Vol. 14. – P. 100.
163. Cosentino, M. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils / M. Cosentino, F. Marino, R. Bombelli et al. // *Life Sciences*. – 1999. – Vol. 64(11). – P. 975–981.
164. Cosio, M.G. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells / M.G. Cosio, J. Majo, M.G. Cosio // *Chest*. – 2002. – Vol. 121. – P. 160 – 165.
165. Cottin, V. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity / V. Cottin, H. Nunes, P.Y. Brillet et al. // *European Respiratory Journal*. – 2005. – Vol. 26. – P. 586-593.
166. Craig, J.M. Immune-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Emphysema: Insights from Mouse Models / J.M. Craig, A.L. Scott, W. Mitzner // *Cell Tissue Research*. – 2017. – Vol. 367(3). – P. 591–605.
167. Cranston, J.M. Domiciliary oxygen for chronic obstructive pulmonary disease / J.M. Cranston, A.J. Crockett, J.R. Moss, J.H. Alpers // *The Cochrane Database Systematic Reviews*. – 2005. – Vol. 4. – P. CD001744.

168. Crapster-Pregont, M. Dendritic cells and alveolar macrophages mediate IL-13-induced airway inflammation and chemokine production / M. Crapster-Pregont, J. Yeo, R. L. Sanchez, D.A. Kuperman // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2012. – Vol. 129(6). – P. 1621–1627.e3.

169. Criner, G. Effect of lung volume reduction surgery on diaphragm strength / G. Criner, F.C. Cordova, V. Leyenson et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1998. – Vol. 157. – P. 1578 - 1585.

170. Cruz, F.F. Systemic administration of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell extracellular vesicles ameliorates aspergillus hyphal extract-induced allergic airway inflammation in immunocompetent mice / F.F. Cruz, Z.D. Borg, M. Goodwin et al. // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1302 – 1316.

171. 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. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208(2). – P. 327–339.

172. Culpitt, S.V. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease / S.V. Culpitt, D.F. Rogers, P. Shah, C. et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2003. – Vol. 167 – № 1 – P. 24–31.

173. 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 // *Journal of Cell Science*. – 2006. – Vol. 119. – P. 2204–2213.

174. 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.

175. 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 Research in Cardiology*. – 2011. – Vol. 106(6). – P. 1299–1310.

176. De Falco G. Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Derived Circulating Cells Release IL-18 and IL-33 under Ultrafine Particulate Matter Exposure in a Caspase-1/8-Independent Manner. / G. De Falco, C. Colarusso, M. Terlizzi et al. // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8(1415).

177. 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.

178. De Marco, R. Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults / R. De Marco, S. Accordini, A. Marcon et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2011. – Vol. 183. – № 7. – P. 891 - 897.

179. Decker, K. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death / K. Decker, D. Keppler // *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. – 1974. – Vol. 71. – P. 77–106.
180. Decramer M.L. Chronic obstructive pulmonary disease. / M. Decramer, W. Janssens, M. Miravittles. // *Lancet*. – 2012. Vol. 379(9823). – P. 1341–1351.
181. Decramer, M.L. The safety of long-acting b2-agonists in the treatment of stable chronic obstructive disease / M.L. Decramer, N.A. Hanania, J.O. Lotvall, B.P. Yawn // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2013. – Vol. 8. – P. 53 – 64.
182. Delclaux, C. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane / C. Delclaux, C. Delacourt, M.P. d'Ortho et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 14. – P. 288–295.
183. Deng, Q.J. Effects of SDF-1/CXCR4 on the repair of traumatic brain injury in rats by mediating bone marrow derived mesenchymal stem cells / Q.J. Deng, X.F. Xu, J. Ren // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2017. – V. 38. – P. 1–11.
184. Deveza, L. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases / L. Deveza, J. Choi, F. Yang // *Theranostics*. – 2012. – Vol. 2(8). – P. 801–814.
185. Dey, P. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids) / P. Dey, A. Kundu, A. Kumar et al. // *Recent Advances in Natural Products Analysis*. – 2020. – P. 505-567.
186. Di Stefano, A. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD / A. Di Stefano, G. Caramori, T. Oates et al. // *The European Respiratory Journal*. – 2002. – Vol. 20 – № 3 – P. 556–563.
187. Di Stefano, A. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers / A. Di Stefano, A. Capelli, M. Lusuardi et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1998. – Vol. 158. - № 4. – P. 1277 – 1285.
188. Dima E. Implication of Interleukin (IL)-18 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). / E. Dima, O. Koltsida, P. Katsaounou et al. // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 74. P. 313-137.
189. Dimmeler, S. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway / S. Dimmeler, A. Aicher, M. Vasa et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – Vol. 108(3). – P. 391 – 397.
190. Dodson, M.V. Skeletal muscle stem cells from animals I. Basic cell biology / M.V. Dodson, G.J. Hausman, L. Guan et al. // *International Journal of Biological Sciences*. – 2010. – Vol. 6(5). – P. 465–474.
191. Domej, W. Oxidative stress and free radicals in COPD—implications and relevance for treatment / W. Domej, K. Oetl, W. Renner // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1207–1224.

192. 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.

193. Donaldson, K. The pulmonary toxicology of ultrafine particles / K. Donaldson, D. Brown, A. Clouter et al. // *Journal of Aerosol Medicine: The Official Journal of the International Society for Aerosols in Medicine*. – 2002. – Vol. 15(2). – P. 213–220.

194. Donath, E. A metaanalysis on the prophylactic use of macrolide antibiotics for the prevention of disease exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease / E. Donath, A. Chaudhry, L.F. Hernandez-Aya, L. Lit // *Respiratory Medicine*. – 2013. – Vol. 107. – P. 1385 – 1392.

195. Donnem, T. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival / T. Donnem, S. Andersen, K. Al-Shibli et al. // *Cancer*. – 2010. – Vol. 116. – P. 5676 – 5685.

196. Doyle, L.A. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95(26). – P. 15665–15670.

197. Driscoll, B. Isolation and characterization of distal lung progenitor cells / B. Driscoll, A. Kikuchi, A.N. Lau et al. // *Methods in Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 879. – P. 109 – 122.

198. 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 et al. // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2012. – Vol. 8(1). – P. 184–194.

199. Drummond, M.B. HIV-associated obstructive lung diseases: insights and implications for the clinician / M.B. Drummond, G.D. Kirk // *The Lancet Respiratory medicine*. – 2014. – Vol. 2. - № 7. – P. 583 – 592.

200. Dupin, I. Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4-dependent pathway / I. Dupin, B. Allard, A. Ozier et al. // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. – Vol.137(4). – P. 1036 – 1042.

201. Dupre, J. Glycaemic effects of incretins in Type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans / J. Dupre // *Regulatory Peptides*. – 2005. – Vol. 128(2). – P.149-57.

202. Ebina, M. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis / M. Ebina, M. Shimizukawa, N. Shibata et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2004. – Vol. 169(11). – P. 1203– 1208.

203. 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.-H. Schäfer, E. Weihe, B. Schütz // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 447(5). – P. 636–640.

204. Eisner, M.D. An official American Thoracic Society public policy statement: novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease / M.D. Eisner, N. Anthonisen, D. Coultas et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2010. – Vol. 182. – P. 693 – 718.

205. Eliazsz, S. Notch stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway / S. Eliazsz, S. Liang, Y. Chen et al. // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – P. 2488 – 2498.

206. Engelhardt, J.F. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development / J.F. Engelhardt, H. Schlossberg, J.R. Yankaskas, L. Dudus // *Development*. – 1995. – Vol. 121(7). – P. 2031 – 2046.

207. Eppert, B.L. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease / B.L. Eppert, B.W. Wortham, J.L. Flury, M.T. Borchers // *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*. – 2013. – Vol. 190(3). – P. 1331–1340.

208. Estes, M.L. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood / M.L. Estes, J.A. Mund, D.A. Ingram, J. Case // *Current Protocols in Cytometry*. – 2010. – Vol. 9. – P. 1 – 11.

209. Evans, M.J. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium / M.J. Evans, L.S. Van Winkle, M.V. Fanucchi, C.G. Plopper // *Experimental Lung Research*. – 2001. – Vol. 27(5). – P. 401 – 415.

210. Ezzie, M.E. Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation / M.E. Ezzie, M. Crawford, J.-H. Cho et al. // *Thorax*. – 2012. – Vol. 67. – P. 122 – 131.

211. 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. // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2005. – Vol. 45(9). – P. 1449–1457.

212. 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.

213. Fahy, J.V. Airway inflammation and remodeling in asthma / J.V. Fahy, D.B. Corry, H.A. Boushey // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2000. – Vol. 6(1) – P. 15–20.

214. Fang, T. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation / T. Fang, Y. Yashiro-Ohtani, C. Del Bianco et al. // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27. – P. 100 – 110.

215. Feldman, G.J. Occludin: structure, function and regulation / G.J. Feldman, J.M. Mullin, M.P. Ryan // *Advanced drug delivery reviews*. – 2005. – Vol. 57(6). – P. 883–917.

216. Feng L. Novel D-galactosamine-induced cynomolgus monkey model of acute liver failure / L. Feng, L. Cai, G.L. He et al. // *World journal of gastroenterology*. – 2017. – Vol. 23(42). – P. 7572–7583.

217. Feng, J. Perivascular cells as mesenchymal stem cells / J. Feng, A. Mantesso, P.T. Sharpe // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2010. – Vol. 10(10). – P. 1441–1451.

218. Fernandez Fernandez E. CFTR dysfunction in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. / E. Fernandez Fernandez, C, De Santi, V, De Rose, C.M. Greene. // *Expert review of respiratory medicine*. – 2018. – Vol.12. – P. 483-492.

219. Finkelstein, R. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers / R. Finkelstein, R.S. Fraser, H. Ghezzi, M.G. Cosio // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1995. – Vol. 152 – № 5 Pt 1 – P. 1666–1672.

220. 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.

221. Fischer, B.M. COPD: balancing oxidants and antioxidants / B.M. Fischer, J.A. Voynow, A.J. Ghio // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. – 2014. – Vol. 10(1). – P. 261–276.

222. Fish, J.E. Dynamic regulation of VEGF-inducible genes by an ERK/ ERG/p300 transcriptional network / J.E. Fish, M. Cantu Gutierrez, L.T. Dang et al. // *Development*. – 2017. – Vol. 144. – P. 2428-2444.

223. Fishman, A. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema / A. Fishman, F. Martinez, K. Naunheim et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 348(21). – P. 2059 - 2073.

224. Floreani, A.A. Smoke and C5a induce airway epithelial intercellular adhesion molecule-1 and cell adhesion / A.A. Floreani, T.A. Wyatt, J. Stoner, et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 29 – № 4 – P. 472–482.

225. Florez-Sampedro, L. The diversity of myeloid immune cells shaping wound repair and fibrosis in the lung / L. Florez-Sampedro, S. Song, B.N. Melgert // *Regeneration (Oxf)*. – 2018. – Vol. 5(1). – P. 3 – 25.

226. Folestad, E. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models / E. Folestad, A. Kunath, D. Wagsäter // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2018. – V.62. – P. 1–11.

227. Foronjy, R.F. The potential for resident lung mesenchymal stem cells to promote functional tissue regeneration: understanding microenvironmental cues / R.F. Foronjy, S.M. Majka // *Cells*. – 2012. – Vol. 1(4). – P. 874.

228. Foronjy, R.F. The potential for resident lung mesenchymal stem cells to promote functional tissue regeneration: understanding microenvironmental cues / R.F. Foronjy, S.M. Majka // *Cells*. – 2012. – Vol. 1(4). – P. 874.

229. Foster, J.R. A comparative study of the pulmonary effects of NO<sub>2</sub> in the rat and hamster. / J.R. Foster, R.C. Cottrell, I.A. Herod et al. // *British journal of experimental pathology*. – 1985. – Vol. 66(2). – P. 193–204.
230. Fu, X. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair / X. Fu, G. Liu, A. Halim et al. // *Cells*. – 2019. – Vol. 8(8). – P. 784
231. 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.
232. Funari, A. Human sinusoidal subendothelial cells regulate homing and invasion of circulating metastatic prostate cancer cells to bone marrow / A. Funari, M. Alimandi, L. Pierelli et al. // *Cancers*. – 2019. – V. 11. – P. 763.
233. Gadek, J. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans / J. Gadek, G. Fells, R. Crystal // *Science*. – 1979. – Vol. 206. – P. 1315–1316.
234. Galasso, G.  $\beta$ 2-Adrenergic receptor stimulation improves endothelial progenitor cell-mediated ischemic neovascularization / G. Galasso, R. De Rosa, M. Ciccarelli et al. // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 112(7). – P. 1026–1034.
235. Ganai, A.A. Genistein attenuates D-GalN induced liver fibrosis/chronic liver damage in rats by blocking the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathways / A.A. Ganai, M. Husain // *Chemico-biological interactions*. – 2017. – Vol. 261. – P. 80–85.
236. Gandhi, S.G. Pulmonary neuroendocrine cell-secreted factors may alter fetal lung liquid clearance / S.G. Gandhi, C. Law, W. Duan et al. // *Pediatric research*. – 2009. – Vol. 65(6). – P. 274 – 278.
237. Gao, H. Pharmacological Effects of EGLP-1, a Novel Analog of Glucagon-Like Peptide-1, on Carbohydrate and Lipid Metabolism / H. Gao, Z. Song, Q. Zhao et al. // *Cell Physiol Biochem*. – 2018. – Vol. 48. – P. 1112–1122.
238. 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.
239. Garcia-Gomez, I. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications / I. Garcia-Gomez, G. Elvira, A.G. Zapata et al. // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2010. – Vol. 10. – P. 1453–1468.
240. García-Río, F. Impact of obesity on the clinical profile of a population-based sample with chronic obstructive pulmonary disease / F. García-Río, J.B. Soriano, M. Miravittles et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – P. e105220.
241. Garrison, G. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2) / G. Garrison, S. Huang, K. Okunishi et al. // *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 48. – P. 550 – 558.
242. Gaurav, R. Novel CLC3 transcript variants in blood eosinophils and increased CLC3 expression in nasal lavage and blood eosinophils of asthmatics / R. Gaurav, A. Bewtra, D. Agrawal // *Immunity, Inflammation and Disease*. – 2014. – Vol. 2. – P. 205 – 213.

243. Gavard, J. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin / J. Gavard, J.S. Gutkind // *Nature cell biology*. – 2006. – Vol. 8(11). – P. 1223 – 1234.

244. Gazdic, M. Mesenchymal stem cells: A friend or foe in immune-mediated diseases / M. Gazdic, V. Volarevic, N. Arsenijevic, M. Stojkovic // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2015. – V. 11. –P. 280–287.

245. 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

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

247. Gentle, M.E. Noncanonical Notch signaling modulates cytokine responses of dendritic cells to inflammatory stimuli / M.E. Gentle, A. Rose, L. Bugeon et al. // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189(3). – P. 1274 – 1284.

248. George, A.L. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration / A.L. George, P. Bangalore-Prakash, S. Rajoria et al. // *Journal of hematology & oncology*. – 2011. – Vol. 4(24). – P. 1-8.

249. George, J. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer / J. George, J. Lim, S. Jang et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 524. – P. 47 – 53.

250. Ghorani, V. Experimental animal models for COPD: a methodological review / V. Ghorani, M.H. Boskabady, M.R. Khazdair, M. Kianmeher // *Tobacco induced diseases*. – 2017. – Vol. 15. – P. 25.

251. Ghosh, M. Exhaustion of airway basal progenitor cells in early and established chronic obstructive pulmonary disease / M. Ghosh, Y.E. Miller, I. Nakachi et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2018. – Vol. 197(7). – P. 885 – 896.

252. Ghosh, M. Human tracheobronchial basal cells. Normal versus remodeling/repairing phenotypes in vivo and in vitro / M. Ghosh, S. Ahmad, A. Jian et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 49(6). – P. 1127 – 1134.

253. Ghosh, M. Transplantation of airway epithelial stem/progenitor cells: a future for cell-based therapy / M. Ghosh, S. Ahmad, C.W. White, S.D. Reynolds // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 56(1). – P. 1 – 10.

254. 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.

255. 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 Research & Therapy*. – 2010. – Vol. 1. – P. 19.



256. Gnecci, M. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair / M. Gnecci, P. Danieli, G. Malpasso, M.C. Ciuffreda, // *Methods in Molecular Biology*. – 2016. – 1416. – P. 123–146.
257. Goncharova, E.A.  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Agonists Modulate Human Airway Smooth Muscle Cell Migration via Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein / E.A. Goncharova, D.A. Goncharov, H. Zhao et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 46(1). – P. 48–54.
258. González-Mariscal, L. Tight junction proteins / L. González-Mariscal, A. Betanzos, P. Nava, B.E. Jaramillo // *Progress in biophysics and molecular biology*. – 2003. – Vol. 81(1). – P. 1 – 44.
259. Gopal, P. Association of plasma sRAGE, but not esRAGE with lung function impairment in COPD / P. Gopal, N.L. Reynaert, J.L. Scheijen et al. // *Respiratory research*. – 2014. – Vol. 15(24).
260. 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 // *Molecular Pharmacology*. – 2007. – Vol. 72(6). – P. 1567–1575.
261. Gosselink, R. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. / R. Gosselink, T. Troosters, M. Decramer. // *Journal of cardiopulmonary rehabilitation*. – 2000. – Vol. 20(6). – P. 353–360.
262. Grahn, K. Occupational exposure to particles and increased risk of developing chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A population-based cohort study in Stockholm, Sweden / K. Grahn, P. Gustavsson, T. Andersson et al. // *Environmental Research*. – 2021. – Vol. 200. – P. 111739.
263. Green, C.E. The role of the endothelium in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) / C.E. Green, A.M. Turner // *Respiratory research*. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 20.
264. Groneberg, D.A. Models of chronic obstructive pulmonary disease / D.A. Groneberg, K.F. Chung // *Respiratory Research*. – 2004. – Vol. 5(1). – P. 18.
265. Gross, P. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats / P. Gross, E.A. Pfitzer, E. Tolker et al. // *Archives of Environmental Health*. – 1965. – Vol. 11 – P. 50–58.
266. Gu, W. Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation and emphysema in COPD through down-regulation of cyclooxygenase-2 via p38 and ERK MAPK pathways / W. Gu, L. Song, X.M. Li et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 4(5). – P. 8733.
267. Guerra, S. Chronic bronchitis before age 50 years predicts incident airflow limitation and mortality risk / S. Guerra, D.L. Sherrill, C. Venker et al. // *Thorax*. – 2009. – Vol. 64. - № 10. – P. 894 - 900.
268. Guillien, A. Prevalence and risk factors for COPD in farmers: a cross-sectional controlled study / A. Guillien, M. Puyraveau, T. Soumagne et al. // *The European respiratory journal*. – 2016. – Vol. 47(1). – P. 95–103.

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

270. Guo, Y. Association of genetic polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in the Chinese Han population: a case-control study / Y. Guo, Y. Gong, C. Pan et al. // *BMC Medical Genomics*. – 2012. – Vol. 5. – P. 64.

271. Guseh, J. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development / J. Guseh, S. Bores, B. Stanger et al. // *Development*. – 2009. – Vol. 136. – P. 1751 – 1759.

272. Gyorgy, B. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles / B. Gyorgy, T.G. Szabo, M. Pasztoi et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2011. – Vol. 68. – P. 2667 – 2688.

273. Hall, R.A. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange / R.A. Hall, R.T. Premont, C.W. Chow et al. // *Nature*. – 1998. – Vol. 392(6676). – P. 626–630.

274. 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.

275. 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. // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2007. – Vol. 105. – P. 240 – 250.

276. Hamblin, A.S. Lymphokines and interleukins / A.S. Hamblin // *Immunology*. - 1988. – S.1. – P. 39 – 41.

277. Hamid, Q.A. Localization of beta 2-adrenoceptor messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography / Q.A. Hamid, J.C. Mak, M.N. Sheppard et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 1991. – Vol. 206(2). – P. 133–138.

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

279. Hanson, C. Influence of diet and obesity on COPD development and outcomes / C. Hanson, E.P. Rutten, E.F. Wouters, S. Rennard // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2014. – Vol. 9. – P. 723–733.

280. Haq I. Deficiency Mutations of Alpha-1 Antitrypsin. Effects on Folding, Function, and Polymerization. / I. Haq, J.A. Irving, A.D. Saleh et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2016. – Vol 54(1). – P. 71–80.

281. Hardaker, E.L. Exposing rodents to a combination of tobacco smoke and lipopolysaccharide results in an exaggerated inflammatory response in the lung / E.L. Hardaker, M.S. Freeman, N. Dale et al. // *British journal of pharmacology*. – 2010. – Vol. 160 (8). – P. 1985 - 1996.

282. 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.
283. Harel, S. Desmosine radioimmunoassay for measuring elastin degradation in vivo / S. Harel, A. Janoff, S.Y. Yu, A. Hurewitz, E.H. Bergofsky // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1980. – Vol. 122(5). – P. 769 – 773.
284. Harrell, C.R. Mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory lung diseases: current understanding and future perspectives / C.R. Harrell, R. Sadikot, J. Pascual et al. // *Stem Cells International*. – 2019. – 4236973. (B).
285. Harrell, C.R. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome / C.R. Harrell, C. Fellabaum, N. Jovicic et al. // *Cells*. – 2019. – 8. – P. 467.
286. Hassan, W. Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines / W. Hassan, R. Yoshida, S. Kudoh et al. // *Lung Cancer*. – 2014. – Vol. 86. – P. 304 – 310.
287. 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 Neuropathologica*. – 2007. – Vol. 113(1). – P. 45–51.
288. Hattab Y. Obstructive Pulmonary Disease. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / Y. Hattab, S. Alhassan, M. Balaan et al. // *Critical care nursing quarterly*. – 2016. Vol. 39(2). – P. 124–130.
289. Hatzistergos, K.E. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation / K.E. Hatzistergos, H. Quevedo, B.N. Oskouei et al. // *Circulation Research*. – 2010. – Vol. 107(7). – P. 913–922.
290. Hautamaki, R.D. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice / R.D. Hautamaki, D.K. Kobayashi, R.M. Senior, S.D. Shapiro // *Science (New York, N.Y.)*. – 1997. – Vol. 277(5334). – P. 2002–2004.
291. Hayesa, J.A. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamsters / J.A. Hayesa, G. Orthy, G. Snider // *Journal of pathology*. – 1975. – Vol. 117 (1). – P. 1 – 20.
292. Hazari, Y.M. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions / Y.M. Hazari, A. Bashir, M. Habib et al. // *Mutation research*. – 2017. – Vol. 773. – P. 14–25.
293. He, J. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model / J. He, Y. Wang, S. Sun et al. // *Nephrology*. – 2012. – Vol. 17. – P. 493 – 500.
294. He, S. Mechanisms of stem cell selfrenewal / S. He, D. Nakada, S.J. Morrison // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2009. –Vol. 25. – P. 377–406.
295. He, Z.H. Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema / Z.-H. He, P. Chen, Y. Chen et al. // *Tobacco Induced Diseases*. – 2015. – Vol. 13(1) – P. 6.

296. He, Z.H. Decitabine enhances stem cell antigen-1 expression in cigarette smoke extract-induced emphysema in animal model / Z.H. He, Y. Chen, P. Chen et al. // *Experimental Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 241 (2). – P. 131 – 139.

297. Hegab, A.E. Isolation and in vitro characterization of basal and submucosal gland duct stem / progenitor cells from human proximal airways / A.E. Hegab, V.L. Ha, D.O. Darmawan et al. // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 1(10). – P. 719 – 724.

298. Heise, R.L. From here to there, progenitor cells and stem cells are everywhere in lung vascular remodeling / R.L. Heise, P.A. Link, L. Farkas // *Frontiers in Pediatrics*. – 2016. – Vol. 4. – P. 8091 – 8094.

299. 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.

300. Helms, M.N. Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells / M.N. Helms, X.J. Chen, S. Ramosevac et al. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2006. – Vol. 290. – P. L710-L722.

301. Henrot, P. Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use / P. Henrot, R. Prevel, P. Berger, I. Dupin // *International journal of molecular sciences*. 2019. – Vol. 20(11). – P. 2785.

302. Herman, A.C. Systemic TLR2 agonist exposure regulates hematopoietic stem cells via cell-autonomous and cell-non-autonomous mechanisms / A.C. Herman, D.A. Monlish, M.P. Romine et al. // *Blood Cancer Journal*. – 2016. – 6(6):e437.

303. Herwaarden, A.E. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins / A.E. van Herwaarden, A.H. Schinkel // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2006. – Vol. 27(1). – P. 10–16.

304. Herzog, E.L. Fibrocytes in health and disease / E.L. Herzog, R. Bucala // *Experimental Hematology*. – 2010. – Vol. 38(7). – P. 548 – 556.

305. 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.

306. 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. // *Experimental Hematology*. – 2001. – Vol. 29(3). – P. 345–355.

307. Hillas, G. Managing comorbidities in COPD / G. Hillas, F. Perlikos, I. Tsiligianni, N. Tzanakis // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2015. – Vol. 10. – P. 95-109.

308. Hirano, T. Salmeterol plus theophylline combination therapy in the treatment of COPD / T. Hirano, T. Yamagata, M. Gohda, et al. // *Chest*. - 2001. - Vol. 119. - P. 1661 – 1670.
309. Hobbs, B.D. Integrative genomics of chronic obstructive pulmonary disease / B.D. Hobbs, C.P. Hersh // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2014. – Vol. 452. - № 2. – P. 276 – 286.
310. Hoepfner, L. Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells / L.H. Hoepfner, Y. Wang, A. Sharma et al. // *Molecular oncology*. – 2015. - Vol. 9(1). – P. 270 – 281.
311. Hogan, B. Stemming lung disease? / B. Hogan // *The New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 378(25). – P. 2439 – 2440.
312. Hogg, J.C. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease / J.C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 350 – № 26 – P. 2645–2653.
313. Hogg, J.C. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease / J.C. Hogg, W. Timens // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2009. – Vol. 4. – P. 435-459.
314. Hoggatt, J. Rapid mobilization reveals a highly engraftable hematopoietic stem cells / J. Hoggatt, P. Singh, T.A. Tate et al. // *Cell*. – 2017. – Vol. 172:191–204.e10.
315. 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 et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 24. – P. 671 – 681.
316. Hong, Y. Therapeutic effects of adipose-derived stem cells pretreated with pioglitazone in an emphysema mouse model / Y. Hong, Y.S. Kim, S.H. Hong, Y.M. Oh // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 48(10). – e266.
317. 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 // *Journal of Vascular Surgery*. – 1998. – Vol. 27(5). – P. 886–894.
318. Horiguchi, M. Pulmonary administration of integrin-nanoparticles regenerates collapsed alveoli / M. Horiguchi, H. Kojima, H. Sakai, H. Kubo, C. Yamashita // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 187. – P. 167 – 174.
319. Horiguchi, M. Pulmonary administration of phosphoinositide 3-kinase inhibitor is a curative treatment for chronic obstructive pulmonary disease by alveolar regeneration / M. Horiguchi, Y. Oiso, H. Sakai et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Vol. 213. – P. 112 – 119.
320. Horiyama, S. Mass Spectrometric Approaches to the Identification of Potential Ingredients in Cigarette Smoke Causing Cytotoxicity / S. Horiyama, M.

Kunitomo, N. Yoshikawa, K. Nakamura // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. – 2016. – Vol. 39(6) – P. 903–908.

321. 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.

322. Hoppers, J.J. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study / J.J. Hoppers, D.S. Postma, B. Rijcken, S.T. Weiss, J.P. Schouten // *Lancet*. – 2000. – Vol. 356. - № 9238. – P. 1313 – 1317.

323. Houghton, A.M. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema / A.M. Houghton, P.A. Quintero, D.L. Perkins et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116(3) – P. 753–759.

324. Huang, J. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) signaling ameliorates dysfunctional immunity in COPD patients / J. Huang, H. Yi, C. Zhao et al. // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2018. – Vol. 13. – P. 3191–3202.

325. Hubbard, E.J. Sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins / E.J. Hubbard, G. Wu, J. Kitajewski et al. // *Genes & Development*. – 1997. – Vol. 11(23). – P. 3182 – 3193.

326. Hubbard, R. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study / R. Hubbard, A. Venn, S. Lewis, J. Britton // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2000. – Vol. 161. – P. 5-8.

327. Huertas, A. COPD: a multifactorial systemic disease. / A. Huertas, P. Palange. // *Therapeutic advances in respiratory disease*. – 2011 – Vol. 5(3). – P. 217–224.

328. 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. // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2012. – Vol. 302(2). – P. 163–172.

329. Huh, J.W. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats / J.W. Huh, S.Y. Kim, J.H. Lee et al. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2011. - Vol. 301(3). – P. 255 - 266.

330. Huleihel, L. The potential of cell-based therapy in lung diseases. / L. Huleihel, M. Levine, M. Rojas. // *Expert opinion on biological therapy*. – 2013. – Vol. 13(10). P. 1429–1440.

331. Hunninghake, G.W. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema / G.W. Hunninghake, J.M. Davidson, S. Rennard et al. // *Science*. – 1981. – Vol. 212(4497). – P. 925 – 927.

332. Imai, K. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema / K. Imai, B.A. Mercer, L.L. Schulman et al. // *European Respiratory Journal*. – 2005. – Vol. 25 (2). – P. 250 – 258.

333. Ingenito, E.P. Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema / E.P. Ingenito, L. Tsai, S. Murthy et al. // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol(1). – P. 175 – 189.
334. Ishii T. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. / T. Ishii, T. Matsuse, S. Teramoto et al. // *Thorax.* – 1999. Vol. 54(8). – P.693-696.
335. Ishizawa, K. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema / K. Ishizawa, H. Kubo, M. Yamada et al. // *FEBS Letters.* – 2004 – Vol. 556. – P. 249 – 252.
336. Ishizawa, K. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells / K. Ishizawa, H. Kubo, M. Yamada et al. // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2004. – Vol. 324(1). – P. 276–280.
337. Ito, K. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages / K. Ito, S. Lim, G. Caramori et al. // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* – 2001. – Vol. 15 – № 6 – P. 1110–1112.
338. Ito, K. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease / K. Ito, M. Ito, W.M. Elliott et al // *The New England Journal of Medicine.* – 2005. – Vol. 352 – № 19 – P. 1967–1976.
339. Ivanoff, A. Infiltrative capacity of T leukemia cell lines: a distinct functional property coupled to expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) / A. Ivanoff, J. Ivanoff, K. Hultenby, K.G Sundqvist // *Clinical & Experimental Metastasis.* – 1999. – Vol. 17. – P. 695–711.
340. Jamison, J.P. Comparison of the effects of inhaled ipratropium bromide and salbutamol on the bronchoconstrictor response to hypocapnic hyperventilation in normal subjects / J.P. Jamison, P.J. Glover, W.F. Wallace // *Thorax.* – 1987. – Vol. 42(10). – P. 809–814.
341. Janssen, W.J. Circulating hematopoietic progenitor cells are decreased in COPD / W.J. Janssen, Z.X. Yunt, A. Muldrow et al. // *COPD.* – 2014. – Vol. 11(3). – P. 277 – 289.
342. Jarvinen, L. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator / L. Jarvinen, L. Badri, S. Wettlaufer et al. // *Journal of Immunology.* – 2008. – Vol. 181. – P. 4389 - 4396.
343. Jayanthi, 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 // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2004. – Vol. 279(18). – P. 19315–19326.
344. Jerie, P. Milestones of cardiovascular therapy. IV. Reserpine / P. Jerie // *Casopis Lekaru Ceskych.* – 2007. – Vol. 146 – P. 573–577.

345. Jiang, Q. Norepinephrine stimulates mobilization of endothelial progenitor cells after limb ischemia / Q. Jiang, S. Ding, J. Wu et al. // *PloS One*. – 2014. – Vol. 9(7). – P. e101774.

346. 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.

347. Johnson, M. Alternative mechanisms for longacting  $\beta_2$ -adrenergic agonists in COPD / M. Johnson, S. Rennard // *Chest*. – 2001. – Vol. 120. – P. 258 – 270.

348. 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.

349. Kallinich, T. T-cell co-stimulatory molecules: their role in allergic immune reactions / T. Kallinich, K. Beier, U. Wahn, P. Stock, E. Hamelmann // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 29. – P. 1246 – 1255.

350. 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. // *Laboratory Investigation*. – 2008. – Vol. 88(1). – P. 58–69.

351. Kanazaw, H. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / H. Kanazaw // *Med Sci Monit*. – 2007. – Vol. 13(11). – P. 189 – 195.

352. Kang, J. Eosinophilic differentiation is promoted by blockage of Notch signaling with a gammasecretase inhibitor / J. Kang, D. Lee, J. Lee et al. // *European Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 35. – P. 2982 – 2990.

353. Kang, J. Gamma-secretase inhibitor reduces allergic pulmonary inflammation by modulating Th1 and Th2 responses / J. Kang, B. Kim, T. Uhm et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2009. – Vol. 179. – P. 875 – 882.

354. Kang, J. Regulation of functional phenotypes of cord blood derived eosinophils by gamma-secretase inhibitor / J. Kang, H. Lee da, H. Seo et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 37. – P. 571 – 577.

355. Kang, N. PRMT6 mediates CSE induced inflammation and apoptosis / N. Kang, P. Chen, Y. Chen et al. // *International Immunopharmacology*. – 2015. – Vol. 24. – P. 95 – 101.

356. Kankaanranta, H. Diagnosis and pharmacotherapy of stable chronic obstructive pulmonary disease: the finnish guidelines / H. Kankaanranta, T. Harju, M. Kilpelainen et al. // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. – 2015. – Vol. 116. – № 4. – P. 291 - 307.

357. Kanzler, I. Differential roles of angiogenic chemokines in endothelial progenitor cell-induced angiogenesis / I. Kanzler, N. Tuchscheerer, G. Steffens et al. // *Basic research in cardiology*. – 2013. – Vol. 108(1). – P. 310.



358. Kapellos, T.S. Dysregulated Functions of Lung Macrophage Populations in COPD / T.S. Kapellos, K. Bassler, A.C. Aschenbrenner et al. // *J Immunol Res.* – 2018. – Vol. 2018:2349045.
359. Karastergiou, K. Cellular mechanisms driving sex differences in adipose tissue biology and body shape in humans and mouse models / K. Karastergiou, S.K. Fried // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2017. – Vol. 1043. – P. 29–51.
360. Karastergiou, K. Sex differences in human adipose tissues e the biology of pear shape / K. Karastergiou, S.R. Smith, A.S. Greenberg, S.K. Fried // *Biology of Sex Differences.* – 2012. – Vol. 3. – P. 13.
361. Karner, C. Tiotropium versus placebo for chronic obstructive pulmonary disease / C. Karner, J. Chong, P. Poole // *The Cochrane Database Systematic Reviews.* – 2012. – Vol. 7. – P. 9285.
362. Karpe, F. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue link to whole-body phenotypes / F. Karpe, K.E. Pinnick // *Nature Reviews Endocrinology.* – 2015. – Vol. 11. – P. 90–100.
363. Kasahara, Y. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema / Y. Kasahara, R.M. Tudor, C.D. Cool et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine.* – 2001. – Vol. 163(3). – P. 737 – 744.
364. Kasahara, Y. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema / Y. Kasahara, R.M. Tudor, L. Taraserviciene-Stewart et al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2000. – Vol. 106(11). – P. 1311 – 1319.
365. 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.
366. 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(2). – P. 407–421.
367. Kato, T. Bronchioalveolar morphogenesis of human bronchial epithelial cells depending upon hepatocyte growth factor / T. Kato, K. Oka, T. Nakamura, A. Ito // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* - 2015. – Vol. 19(12). – P. 2818 – 2826.
368. Katsha, A.M. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model / A.M. Katsha, S. Ohkouchi, H. Xin et al. // *Molecular Therapy.* – 2011. – Vol. 19(1). – P. 196 – 203.
369. Kavanagh, D.P. Hematopoietic stem cell homing to injured tissues / D.P. Kavanagh, N. Kalia // *Stem Cell Reviews and Reports.* – 2011. – Vol. 7(3). – P. 672–682.
370. Keeley, E.C. Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis / E.C. Keeley, B. Mehrad, R.M. Strieter // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2010. – Vol. 42(4). – P. 535 – 542.

371. Kern, S. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, et al. // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24(5). – P. 1294 – 1301.

372. Keshav, S. Paneth cells: Leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine / S. Keshav // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – Vol. 80. – P. 500–508.

373. Kessler, R. Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. / R. Kessler, M.R. Partridge, M. Miravittles et al. // *European Respiratory Journal*. – 2011. – Vol. 37(2). – P. 264–272.

374. Kew, K.M. Long-acting beta2-agonists for chronic obstructive pulmonary disease / K.M. Kew, C. Mavergames, J.A.E. Walters // *The Cochrane Database Systematic Reviews*. – 2013. - № CD010177.

375. Khakoo, A.Y. Endothelial progenitor cells / A.Y. Khakoo, T. Finkel // *Annual Review of Medicine*. – 2005. – Vol. 56. – P. 79 – 101.

376. Kidd, S. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors / S. Kidd, M.R. Kelley, M.W. Young et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1986. – Vol. 6(9). - P. 3094 – 3108.

377. 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.

378. Kiel, M.J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells / M.J. Kiel, S.J. Morrison // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 8(4). – P. 290-301.

379. Kim, C.F. Identification of bronchioalveolar stem cell in normal lung and lung cancer / C.F. Kim, E.L. Jackson, A.E. Woolfenden et al. // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – P. 823 – 835.

380. Kim, C.F. Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells / C.F. Kim // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2007. – Vol. 293(5). – P. 1092 – 1098.

381. Kim, D.S. Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias / D.S. Kim, H.R. Collard, T.E. King // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2006. – Vol. 3(4). – P. 285–292.

382. Kim, E.K. Impaired colony-forming capacity of circulating endothelial progenitor cells in patients with emphysema / E.K. Kim, J.H. Lee, H.C. Jeong et al. // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 227(4). – P. 321 – 331.

383. Kim, I.-M. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation / I.-M. Kim, D.G. Tilley, J. Chen et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105(38). – P. 14555–14560.

384. Kim, J.H. Metabolic Syndrome in South Korean Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Focus on Gender Differences / J.H. Kim, J.Y. Yoo, H.S. Kim // *Asian Nursing Research*. – 2019. – Vol. 13. – P. 137–146.
385. 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.
386. Kim, M.-H. Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by  $\beta$ 2 adrenergic receptor mediated upregulation of IL-6 / M.-H. Kim, F. Gorouhi, S. Ramirez et al. // *The Journal of investigative dermatology*. – 2014. – Vol. 134(3). – P. 809–817.
387. Kim, V. What is a COPD exacerbation? Current definitions, pitfalls, challenges and opportunities for improvement. / V. Kim, S. D. Aaron. // *The European respiratory journal*. – Vol. 52(5). – 2018. – 1801261.
388. Kim, Y.S. Adipose stem cell-derived nanovesicles inhibit emphysema primarily via an FGF2-dependent pathway. / Y.S. Kim, J.Y. Kim, R. Cho et al. // *Experimental & molecular medicine*. 2017. – Vol. 49(1). – e284.
389. Kim, Y.S. Tracking intravenous adipose-derived mesenchymal stem cells in a model of elastase-induced emphysema / Y.S. Kim, J.Y. Kim, D.M. Shin et al. // *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. – 2014. – Vol. 77. – P. 116 – 123.
390. King, T.E. Idiopathic pulmonary fibrosis / T.E. King, A. Pardo, M. Selman // *Lancet*. – 2011. – Vol. 378. – P. 1949-1961.
391. Kirsten, D.K. Effects of theophylline withdrawal in severe chronic obstructive pulmonary disease / D.K. Kirsten, R.E. Wegner, R.A. Jorres, H. Magnussen // *Chest*. - 1993. - Vol. 104. - P. 1101 – 1107.
392. Kistemaker, E.M. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: Perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD / E.M. Kistemaker, T.A. Oenema, M. Herman, R. Gosens // *Life Sciences*. - 2012. - Vol. 91. - P. 1126 – 1133.
393. Kizil, C. Effects of inflammation on stem cells: Together they strive? / C. Kizil, N. Kyritsis, M. Brand // *EMBO Reports*. – 2015. – Vol. 16. – P. 416–426.
394. Kjeldsen, L. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils / L. Kjeldsen, H. Sengelov, K. Lollike et al. // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – P. 1640–1649.
395. Knight, K.R. The proteinase-antiproteinase theory of emphysema: a speculative analysis of recent advances into the pathogenesis of emphysema. / K.R. Knight, J.G. Burdon, L. Cook et al. // *Respirology*. – 1997. – Vol. 2. – P. 91 – 95.
396. Ko, F.W. Acute exacerbation of COPD. / F.W. Ko, K.P. Chan, D.S. Hui et al. // *Respirology*. – Vol. 21(7). – 2016. – P. 1152–1165.
397. Kobayashi, S.D. Neutrophils in the innate immune response / S.D. Kobayashi, J.M. Voyich, C. Burlak, F.R. De Leo // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2005. – Vol. 53. - № 6. – P. 505 – 517.

398. Kobayashi, S.D. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach / S.D. Kobayashi, F.R. De Leo // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 1. - № 3. – P. 309 – 333.
399. Kobayashi, Y. Localisation of dopamine D2-like receptors in pulmonary artery of the human and rabbit but not of the rat / Y. Kobayashi, D. Cavallotti, A. Ricci, F. Amenta // *European journal of pharmacology*. – 1994. – Vol. 261(3). – P. 229 – 236.
400. Koning, J.J. Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation / J.J. Koning, G. Kooij, H.E. de Vries et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 49.
401. Korner, J. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding / J. Korner, M. Bessler, W. Inabnet et al. // *Surgery for Obesity and Related Diseases*. – 2007. – Vol. 3. – P. 597–601.
402. Koshiol, J. Chronic obstructive pulmonary disease and altered risk of lung cancer in a population-based case-control study / J. Koshiol, M. Rotunno, D. Consonni et al. // *PLoS One*. – 2009. – 4:e7380.
403. Kotton, D.N. Lung stem cells / D.N. Kotton, A. Fine // *Cell and Tissue Research*. – 2008. – Vol. 331. – P. 145–156.
404. Kovacs, G. Pulmonary Vascular Involvement in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Is There a Pulmonary Vascular Phenotype? / G. Kovacs, A. Agusti, J.A. Barberà et al. / *American journal of respiratory and critical care medicine*. – Vol. 198(8). – 2018. – P. 1000–1011.
405. Koyama, S. Acetylcholine stimulates bronchial epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity / S. Koyama, S.I. Rennard, R.A. Robbins // *American Journal of Physiology*. - 1992. - Vol. 262. - P. 466 – 471.
406. Kuai, X.L. Stromal derived factor-1/CXCR4 axis involved in bone marrow mesenchymal stem cells recruitment to injured liver / X.L. Kuai, P. Li, J.F. Zhang, et al. // *Stem Cells International*. – 2016. – P. 1–10.
407. Kucia, M.J. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. / M.J. Kucia, M. Wysoczynski, W. Wu // *Stem cells*. – 2008. – Vol. 26(8). – P. 2083–2092.
408. Kühn, C. Computational modeling to quantify the contributions of VEGFR1, VEGFR2, and lateral inhibition in sprouting angiogenesis / C. Kühn, S. Checa // *Front Physiol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 288.
409. Kuhn, C. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue / C. Kuhn, S.Y. Yu, M. Chraplyvy et al. // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. – 1976. – Vol. 34(4) – P. 372–380.
410. 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.

411. Lai, R.C. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease / R.C. Lai, T.S. Chen, SK. Lim // *Regenerative Medicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 481 – 492.
412. 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. // *Anesthesia & Analgesia*. – 2011. – Vol. 112(3). – P. 620–627.
413. Lama, V.N. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts / V.N. Lama, L. Smith, L. Badri et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – Vol. 117. – P. 989 – 996.
414. Lambert, A.A. Obesity is associated with increased morbidity in moderate to severe COPD / A.A. Lambert, N. Putcha, M.B. Drummond et al. // *Chest*. – 2017. – Vol. 151. – P. 68–77.
415. Lamonaca, P. Metabolic Disorder in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients: Towards a Personalized Approach Using Marine Drug Derivatives / P. Lamonaca, G. Prinzi, A. Kisialiou et al. // *Marine Drugs*. – 2017. – Vol. 15. – P. 81.
416. Lamprecht, B. BOLD Collaborative Research Group: COPD in never smokers: results for the population-based burden of obstructive lung disease study / B. Lamprecht, M.A. McBurnie, W.M. Vollmer et al. // *Chest*. – 2011. – Vol. 139. – P. 752 – 763.
417. 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.
418. 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.
419. Laurell, C.B. Hypo-alpha-1-antitrypsinemia / C.B. Laurell, S. Eriksson // *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*. – 1964. – Vol. 70. – P. 537 – 539.
420. Lechapt-Zalcman, E. MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus / E. Lechapt-Zalcman, I. Hurbain, R. Lacave et al. // *The European Respiratory Journal*. – 1997. – Vol. 10(8). – P. 1837–1843.
421. Lee, S.H. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1 / S.H. Lee, S. Lee, Y.S. Youn et al // *Bioconjugate Chemistry*. – 2005. – Vol. 16. – P. 377–383.
422. Lee, Y.S. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control / Y.S. Lee, H.S. Jun // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 3094642.
423. Legrand, C. Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling / C. Legrand, C. Gilles, J.M. Zahm et al. // *Journal of Cell Biology*. – 1999. – Vol. 146. – P. 517–529.

424. Levesque, J.P. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide / J.P. Levesque, J. Hendy, Y. Takamatsu et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Vol. 111(2). – P. 187–196.

425. Lewellis, S.W. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations / S.W. Lewellis, H. Knaut // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2012. – Vol. 3 (23). – P. 333–340.

426. 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 // *Biochemical Pharmacology*. – 1978. – Vol. 27. – P. 307–316.

427. Li, D.W. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review) / D.W. Li, Z.Q. Liu, J. Wei et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2012. – Vol. 30(5). – P. 1000–1006.

428. 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.

429. Li, W. Regulation of noradrenergic function by inflammatory cytokines and depolarization / W. Li, D. Knowlton, W.R. Woodward, B.A. Habecker // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 86(3). – P. 774–783.

430. 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.

431. Li, Y. Therapeutic effects of amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells on lung injury in rats with emphysema / Y. Li, C. Gu, W. Xu et al. // *Respiratory Research*. – 2014. – Vol. 15(120). – P. 1 – 14.

432. Li, Z. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction / Z. Li, J. Guo, Q. Chang, A. Zhang // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2009– Vol. 32(8). – P. 1343–1346

433. Liang, L. Spiperone, identified through compound screening, activates calcium-dependent chloride secretion in the airway / L. Liang, K. MacDonald, E.M. Schwiebert et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2009. – Vol. 296(1). – P. 131 – 141.

434. Licciulli, S. Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53 / S. Licciulli, J. Avila, L. Hanlon et al. // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – P. 5974 – 5984.

435. Limbourg, F. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis / F. Limbourg, K. Takeshita, F. Radtke et al. // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111. – P. 1826 – 1832.

436. 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. // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2003. – Vol. 14(5). – P. 1188–1199.

437. Lin, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies / H. Lin // *Nature Reviews Genetics*. – 2002. – Vol. 3(12). – P. 931–940.
438. Lindahl, P. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development / P. Lindahl, L. Karlsson, M. Hellström et al. // *Development* (Cambridge, England). – 1997. – Vol. 124(20). – P. 3943–3953.
439. Link, J.C. Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism / J.C. Link, K. Reue // *Annual Review of Nutrition*. – 2017. – Vol. 37. – P. 225–245.
440. Linnoila, R.I. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system / R.I. Linnoila // *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. – 2006. – Vol. 86. – P. 425–444.
441. Liu, L. Decreased nuclear stiffness via FAK-ERK1/2 signaling is necessary for osteopontin-promoted migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / L. Liu, Q. Luo, J. Sun, et al. // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 355. – P. 172–181.
442. Liu, L. Notch signaling mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming-induced transendothelial migration of human eosinophils / L. Liu, H. Wang, J. Xenakis, L. Spencer // *Allergy*. – 2015. – Vol. 70. – P. 805 – 812.
443. Liu, P. Changes of number and function of late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients combined with pulmonary hypertension / P. Liu, H. Zhang, J. Liu et al. // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2016. – Vol. 64(4). – P. 323 – 329.
444. Liu, Q. Increased expression of TROP2 in airway basal cells potentially contributes to airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease / Q. Liu, H. Li, Q. Wang et al. // *Respir Res*. – 2016. – Vol. 17. - № 1. – P. 159 – 173.
445. Liu, T. Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation / T. Liu, B. Hu, Y. Choi et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2009. – Vol. 174. – P. 1745 – 1755.
446. Liu, X. Human endothelial progenitor cells isolated from COPD patients are dysfunctional / X. Liu, C. Xie // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2012. – Vol. 363. – P. 53 – 63.
447. Liu, X. Preclinical studies of mesenchymal stem cell (MSC) administration in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review and meta-analysis / X. Liu, Q. Fang, H. Kim // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11(6). – e0157099.
448. 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.
449. Lo Celso, C. Analysis of the hematopoietic stem cell niche / C. Lo Celso, R.J. Klein, D.T. Scadden // *Current Protocols in Stem Cell Biology*. – 2007. – Unit 2A.5.

450. Lobay, D. Rauwolfia in the Treatment of Hypertension / D. Lobay // *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*. – 2015. – Vol. 14(3). – P. 40–46.

451. Long, N.C. Airway hyperresponsiveness in a rat model of chronic bronchitis: role of C fibers / N.C. Long, J.G. Martin, R. Pantano, S.A. Shore // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1997. – Vol. 155(4). – P. 1222–1229.

452. Loomis-King, H. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis / H. Loomis-King, K. Flaherty, B. Moore // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2013. – Vol. 13. – P. 377 – 385.

453. Lopez Varela, M.V. Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study / M.V. Lopez Varela, M. Montes de Oca, R.J. Halbert et al. // *The European respiratory journal*. – 2010. – Vol. 36. - № 5. – P. 1034 - 1041.

454. Lopez-Giraldo, A. Characterization, localization and comparison of c-kit. lung cells in never smokers and smokers with and without COPD / A. Lopez-Giraldo, T. Cruz, L. Molins et al. // *BMC Pulmonary Medicine*. – 2018. – Vol. 18(1). – P. 123.

455. Lorton, D. Potential use of drugs that target neural-immune pathways in the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases / D. Lorton, C. Lubahn, D.L. Bellinger // *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*. – 2003. – Vol. 2(1). – P. 1–30.

456. Lozano, R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman et al. // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380. - № 9859. – P. 2095 - 2128.

457. Lu, D. Spiperone enhances intracellular calcium level and inhibits the Wnt signaling pathway / D. Lu, D.A. Carson // *BMC Pharmacology*. – 2009. – Vol. 9. – P. 13.

458. Lu, J. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1 / J. Lu, X. Ye, F. Fan et al. // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 23(2). – P. 171 – 185.

459. Lu, L. Prevention and Therapeutic Effects and Mechanisms of Tanshinone IIA Sodium Sulfonate on Acute Liver Injury Mice Model / L. Lu, J. Zhou, J. Zhang et al. // *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4097398.

460. Lu, Q. Effects of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells / Q. Lu, E. Gottlieb, S. Rounds // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. – 2018. – Vol. 314(5). – P. L743-L756.

461. Lu, Z. Regulation of intercellular biomolecule transfer-driven tumor angiogenesis and responses to anticancer therapies / Z. Lu, A. Ortiz, I.I. Verginadis et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2021. – Vol. 131(10):e144225.

462. Lucas, D. Norepinephrine reuptake inhibition promotes mobilization in mice: potential impact to rescue low stem cell yields / D. Lucas, I. Bruns, M. Battista et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 119(17). – P. 3962–3965.



463. Lusic, A.J. Metabolic syndrome: From epidemiology to systems biology / A.J. Lusic, A.D. Attie, K. Reue // *Nature Reviews Genetics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 819–830.
464. Mack, J.J. NOTCH1 is a mechanosensor in adult arteries / J.J. Mack, T.S. Mosqueiro, B.J. Archer et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8 (1). – P. 1620.
465. Mackarel, A.J. Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors / A.J. Mackarel, D.C. Cottell, K.J. Russell et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 20. – P. 1209–1219.
466. MacNee W. ABC of chronic obstructive pulmonary disease Pathology, pathogenesis, and pathophysiology / W. MacNee // *BMJ*. – 2006. – Vol. 332. - № 7551. – P. 1202 – 1204.
467. MacNee, W. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / W. MacNee, R.M. Tuder // *Proceedings of the American Thoracic Societ*. – 2009. – Vol. 6. – P. 527-531.
468. MacNee, W. Oxidants/antioxidants and COPD / W. MacNee // *Chest*. – 2000. – Vol. 117 – № 5 Suppl 1 – P. 303S–17S.
469. MacNee, W. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology / W. MacNee // *BMJ*. – 2006. – Vol. 332(7551) – P. 1202–1204.
470. MacNee, W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease / W. MacNee // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2005. – Vol. 2 – № 1 – P. 50–60.
471. Mahadeva, R. Animal models of pulmonary emphysema / R. Mahadeva, S.D. Shapiro // *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*. – 2005. – Vol. 4(6). – P. 665–673.
472. Majo, J. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema / J. Majo, H. Ghezzi, M.G. Cosio // *European Respiratory Journal*. – 2001. – Vol. 17. - № 5. – P. 946 - 953.
473. Maltais, S. The bone marrow-cardiac axis: role of endothelial progenitor cells in heart failure / S. Maltais, L.P. Perrault, H.Q. Ly // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. – 2011. – Vol. 39(3). – P. 368 – 374.
474. Mani, S.A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells / S.A. Mani, W. Guo, M.J. Liao et al. // *Cell*. – 2008. – Vol. 133(4). – P. 704 – 715.
475. Mannino, D.M. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000 / D.M. Mannino, D.M. Homa, L.J. Akinbamiet et al. // *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*. – 2002. – Vol. 51(6). – P. 1–16.
476. Mannino, D.M. Global burden of COPD: risk factors, revalence, and future trends / D.M. Mannino, A.S. Buist // *Lancet*. – 2007. – Vol. 370. – P. 765-773
477. Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling / A. Mantovani, S. Biswal, M.R. Galdiero et al. // *Journal of pathology*. – 2013. – Vol. 229(2). – P. 176-185.

478. Mao, S.Z. Resident Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells Restore Endothelial Barrier Function Following Inflammatory Lung Injury / S.Z. Mao, X. Ye, G. Liu et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2015. – Vol. 35 (7). – P. 1635 – 1644.

479. Marchetti, N. Surgical approaches to treating emphysema: lung volume reduction surgery, bullectomy, and lung transplantation / N. Marchetti, G.J. Criner // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2015. – Vol. 36(4). – P. 592 - 608.

480. Martinez, F.J. Lung-volume reduction improves dyspnea, dynamic hyperinflation, and respiratory muscle function / Martinez FJ, De Oca MM, Whyte RI et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1997. – Vol. 155(6). – P. 1984 – 1990.

481. Martinez-Outschoorn, U.E. Cancer metabolism: A therapeutic perspective / U.E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pages, R.G. Pestell et al. // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 14. – P. 11–31.

482. Martorana, P.A. The pallid mouse. A model of genetic alpha 1-antitrypsin deficiency / P.A. Martorana, T. Brand, C. Gardi et al. // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. – 1993. – Vol. 68(2) – P. 233–241.

483. Marwick, J.A. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs / J.A. Marwick, P.A. Kirkham, C.S. Stevenson et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 31 – № 6 – P. 633–642.

484. 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.

485. 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. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2006. – Vol. 203(5). – P. 1221–1233.

486. Matatall, K.A. Chronic infection depletes hematopoietic stem cells through stress-induced terminal differentiation / K.A. Matatall, M. Jeong, S. Chen et al. // *Cell Reports*. – 2016. – 17(10). – P. 2584–2595.

487. Matsushita, K. Mesenchymal stem cells in obesity: Insights for translational applications / K. Matsushita, V.J. Dzau // *Laboratory Investigation*. – 2017. – Vol. 97. – P. 1158–1166.

488. Mautino, G. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics / G. Mautino, N. Oliver, P. Chanez et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 17. – P. 583–591.

489. Mauvais-Jarvis, F. Epidemiology of Gender Differences in Diabetes and Obesity / F. Mauvais-Jarvis // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 1043. – P. 3–8.

490. May, M. Dynamic regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow niches. / M. May, A. Slaughter, D Lucas. // *Current stem cell reports*. – 2018. – Vol. 4(3). P. 201–208.
491. McEvoy, C. E. Corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. / Corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical benefits and risks. // C.E. McEvoy, D.E. Niewoehner // *Clinics in chest medicine*. – 2000. – Vol. 21(4). – P. 739–752.
492. McGeachie, M.J. Patterns of growth and decline in lung function in persistent childhood asthma / M.J. McGeachie, K.P. Yates, X. Zhou et al. // *The new england journal of medicine*. – 2016. – Vol. 374. - № 19. – P. 1842 - 1852.
493. McGovern, N.N. Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils / N.N. McGovern, A.S. Cowburn, L. Porter et al. // *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*. – 2011. – Vol. 186(1). – P. 453–463.
494. Mehta, A.J. Occupational exposure to dusts, gases, and fumes and incidence of chronic obstructive pulmonary disease in the Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults / A.J. Mehta, D. Miedinger, D. Keidel et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2012. – Vol. 185. – P. 1292 – 1300.
495. Mehta, D. Novel regulators of endothelial barrier function / D. Mehta, K. Ravindran, W.M. Kuebler // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. – 2014. – Vol. 307(12). – P. L924 – L935.
496. Melief, S.M. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts / S.M. Melief, J.J. Zwaginga, W.E. Fibbe, H. Roelofs // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 2(6). – P. 455 – 463.
497. Méndez-Ferrer, S. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization / S. Méndez-Ferrer, M. Battista, P.S. Frenette // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 1192 – P. 139–144.
498. Michael, S. Inflammation Shapes Stem Cells and Stemness during Infection and Beyond / S. Michael, C. Achilleos, T. Panayiotou, K. Strati // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2016. – Vol.4. P. 118.
499. Minter, L.M. Canonical and non-canonical Notch signaling in CD4+ T cells / L.M. Minter, B.A. Osborne // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2012. – Vol. 360. – P. 99 – 114.
500. Mirones, I. Dopamine mobilizes mesenchymal progenitor cells through D2-class receptors and their PI3K/AKT pathway / I. Mirones, M.A. Rodríguez-Milla, I. Cubillo, et al. // *Stem Cells*. – 2014. - Vol. 32(9). – P. 2529 – 2538.
501. Mita, Y. Induction of muscarinic receptor subtypes in monocytic/macrophagic cells differentiated from EoL-1 cells / Y. Mita, K. Dobashi, K. Suzuki, et al. // *European Journal of Pharmacology*. - 1996. - Vol. 297. - P. 121 – 127.

502. Mizuta, K. The dopamine D2 receptor is expressed and sensitizes adenylyl cyclase activity in airway smooth muscle / K. Mizuta, Y. Zhang, D. Xu et al. // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* – 2012. – Vol. 302(3). – P. L316 – L324.

503. 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

504. Molet, S. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease / S. Molet, C. Belleguic, H. Lena et al. // *Inflammation Research.* – 2005. – Vol. 54(1). – P. 31 – 36.

505. Mons U. Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the chances consortium. / U. Mons, A. Muezzinler, C. Gellert et al. // *BMJ (Clinical research ed).* – 2015. – 350 :h1551.

506. Moore, K. A. Stem cells and their niches / K. A. Moore, I. R. Lemischka // *Science.* – 2006(311). – P.1880–1885.

507. Moore, M.L. IL-5. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* / M.L. Moore, R.S. Peebles // *Interleukins.* Oxford. – 2006. – P. 359 – 363.

508. Mourkioti, F. IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration / F. Mourkioti, N. Rosenthal // *Trends in Immunology.* – 2005. – Vol. 26. – P. 535–542.

509. Mukherjee, E. Biotechnological interventions on the genus *Rauvolfia*: recent trends and imminent prospects / E. Mukherjee, S. Gantait, S. Kundu et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2019. – Vol. 103. – P. 7325–7354.

510. Mund, J.A. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells / J.A. Mund, M.L. Estes, M.C. Yoder et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2012. – Vol. 32(4). – P. 1045 – 1053.

511. Mund, J.A. The ontogeny of endothelial progenitor cells through flow cytometry / J.A. Mund, J. Case // *Current Opinion in Hematology.* – 2011. – Vol. 18(3). – P. 166 – 170.

512. Mundi, M.S. Effects of increased free fatty acid availability on adipose tissue fatty acid storage in men / M.S. Mundi, C. Koutsari, M.D. Jensen // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2014. – Vol. 99. – P. E2635–E2642.

513. Murray, P.J. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas et al. // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41(1). – P. 14-20.

514. Murtagh, E. Prevalence of obstructive lung disease in a general population sample: the NICECOPD study. / E. Murtagh, L. Heaney, J. Gingles et al. // *European journal of epidemiology.* – Vol. 20(5). – 2005. – P. 443–453.

515. Nabhan, A.N. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells / A.N. Nabhan, D.G. Brownfield, P.B. Harbury, et al. // *Science.* – 2018. – Vol. 359(6380). – P. 1118 – 1123.

516. Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases / H. Nagase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 378. – P. 151–160.
517. Nagel, A.C. Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors / A.C. Nagel, A. Krejci, G. Tenin et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25(23). – P. 10433 – 10441.
518. Nakajima, M. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways / M. Nakajima, O. Kawanami, E. Jin et al. // *Pathology International*. – 1998. – Vol. 48(12). – P. 944 – 953.
519. Nakamura, T. Essential Roles of ECAT15-2/Dppa2 in Functional Lung Development / T. Nakamura, M. Nakagawa, T. Ichisaka et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2011. – Vol. 21. – P. 4366–4378.
520. Namba, T. Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis / T. Namba, K. Tanaka, Y. Ito et al. // *Cell Death & Differentiation*. – 2010. – Vol. 7. – P. 1882 – 1895.
521. Nebolsin V.E. Patent WO 2016190785 Bisamide Derivative of Dicarboxylic Acid as an Agent for Stimulating Tissue Regeneration and Recovery of Diminished Tissue Function. / V.E. Nebolsin, A.V. Rydlovskaya, A.M. Dygai, T.G. Borovskaya, E.G. Skurikhin / Applicant(s): Obschestvo S Ogranichennoi Otvetstvennostiyu “Pharmenterprises” [RU/RU] - № 2015120055 (RU); Priority date(s): 27.05.2015; Publication date: 01.12.2016.
522. Nebolsin, V.E. Patent No 20180353479 Bisamide Derivative Of Dicarboxylic Acid As An Agent For Stimulating Tissue Regeneration And Recovery Of Diminished Tissue Function / V.E. Nebolsin, A.V. Rydlovskaya, A.M. Dygai, T.G. Borovskaya, E.G. Skurikhin // U.S. TREAMID THERAPEUTICS GmbH (Berlin, DE). – 2018. <http://www.freepatentsonline.com/y2018/0353479.html>
523. Nejad-Moghaddam, A. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of airway remodeling in pulmonary diseases / A. Nejad-Moghaddam, Y. Panahi, M. Abdollahpour Alitappeh et al. // *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. – 2015. – Vol. 14(6). – P. 552 – 568.
524. 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. // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. – 2010. – Vol. 3(5). – P. 547–558.
525. Nguyen, D.V. et al. Glucagon-like peptide 1: A potential anti-inflammatory pathway in obesity-related asthma / D.V. Nguyen, A. Linderholm, A. Haczku, N. Kenyon // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2017. – Vol. 180. – P. 139–143.
526. Nguyen, L.P. Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model / L.P. Nguyen, O. Omoluabi, S. Parra et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 38(3). – P. 256–262.

527. Nomura, J. The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system / J. Nomura, T. Hosoi, Y. Okuma, Y. Nomura // *Life Sciences*. - 2003. - Vol. 72. - P. 2121 – 2126.

528. Nur, S. Chlorpromazine versus reserpine for schizophrenia / S. Nur, C.E. Adams // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2016. – №. 4:CD012122.

529. Oczypok, E.A. All the “RAGE” in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. / E.A. Oczypok, T.N. Perkins, T.D. Oury // *Paediatric respiratory reviews*. – 2017. – Vol 23. – P. 40-49.

530. Ogura Y. A functional variant in MIR4300HG, the host gene of microRNA MIR4300 is associated with progression of adolescent idiopathic scoliosis. / Y. Ogura, I. Kou, Y. Takahashi et al. // *Human molecular genetics*. – 2017. –Vol. 26. P. 4086-4092.

531. Ohishi, K. Notch signaling in hematopoiesis / K. Ohishi, N. Katayama, H. Shiku, et al. // *Cell and Development Biology*. – 2003. – Vol. 14. – P. 143–150.

532. Ohno, I. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation / I. Ohno, H. Ohtani, Y. Nitta et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 16. – P.212–219.

533. Oladipupo, S. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting / S. Oladipupo, S. Hu, J. Kovalski et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2011. – Vol. 108(32). – P. 13264–13269.

534. Orlic, D. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 938. – P. 221–229.

535. Orozco-Levi, M. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease / M. Orozco-Levi, J. Garcia-Aymerich, J. Villar et al. // *The European respiratory journal*. – 2006. – Vol. 27. - № 3. – P. 542 - 546.

536. Ortiz, A. An interferon-driven oxysterol-based defense against tumor-derived extracellular vesicles / A. Ortiz, J. Gui, F. Zahedi et al. // *Cancer cell*. – 2019. – Vol. 35(1). – P. 33-45. e6.

537. 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, M. DuTreil, C. Fattman et al. // *PNAS*. – 2007. – Vol. 104. – P. 11002 – 11007.

538. Ortiz-Muñoz, G. Non-invasive Intratracheal Instillation in Mice / G. Ortiz-Muñoz, M.R. Looney // *Bio Protoc*. – 2015. – Vol. 5(12):e1504.

539. Ostanin, A.A. Multiplex analysis of cytokines, chemokines, growth factors, MMP-9 and TIMP-1 produced by human bone marrow, adipose tissue, and pla-cental mesenchymal stromal cells / A.A. Ostanin, Y.L. Petrovskii, E.Y. Shevela, E.R. Chernykh // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 151(1). – P. 133 – 141.

540. Oswald, F. RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes / F. Oswald, M., Winkler, Y. Cao et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25(23). – P. 10379 – 10390.
541. Overbeek, S.A. Cigarette smoke-induced collagen destruction; key to chronic neutrophilic airway inflammation? / S.A. Overbeek, S. Braber, P.J. Koelink et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. - № 1. – P. e55612.
542. Pace, E. MiR-21 upregulation increases IL-8 expression and tumorigenesis program in airway epithelial cells exposed to cigarette smoke. / E. Pace, S. Di Vincenzo, E. Di Salvo // *Journal of cellular physiology*. – 2019. – Vol. 234. – P. 22183-22194.
543. Pace, E. TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. / E. Pace, A. Giarratano, M. Ferraro et al. // *Human immunology*. – 2011. – Vol. 72. – P. 54-62.
544. 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.
545. Pakhomova, A. Bisamide Derivative of Dicarboxylic Acid Contributes to Restoration of Testicular Tissue Function and Influences Spermatogonial Stem Cells in Metabolic Disorders / A. Pakhomova, O. Pershina, V. Nebolsin et al. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8:562358. (A).
546. Pakhomova, A.V. Antidiabetic Effects of Bisamide Derivative of Dicarboxylic Acid in Metabolic Disorders / A.V. Pakhomova, V.E. Nebolsin, O.V. Pershina et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21(3). – P. 991 (B).
547. Palange, P. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are de-created in COPD / P. Palange, U. Testa, A. Huertas, et al. // *European Respiratory Journal*. – 2006. – Vol. 27(3). – P. 529 – 541.
548. Pałgan, K. Angiogenesis in bronchial asthma / K. Pałgan, Z. Bartuzi // *International journal of immunopathology and pharmacology*. – 2015. – Vol. 28(3). – P. 415–420.
549. Pandey, K.C. Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / K.C. Pandey, S. De, P.K. Mishra // *Frontiers in pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 512.
550. Panwala, C.M. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis / C.M. Panwala, J.C. Jones, J.L. Viney // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1998. – Vol. 161(10). – P. 5733–5744.
551. Pappas, K. The role of macrophages in obstructive airways disease: chronic obstructive pulmonary disease and asthma / K. Pappas, A.I. Papaioannou, K. Kostikas, N. Tzanakis // *Cytokine*. – 2013. – Vol. 64, N 3. – P. 613–625.
552. 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.

553. Parker, J.M. Reserpine—A Comparison of Chronic Toxicity in Animals with Clinical Toxicity / J.M. Parker, C.W. Murphy // *Canadian Medical Association Journal*. – 1961. – Vol. 84(21). – P. 1177–1180.

554. Patel, A.R. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: The Changes Made. / A.R. Patel, A.R. Patel, S. Singh et al. // *Cureus*. – Vol. 11(6).

555. Patel, J. Self-renewal and high proliferative colony forming capacity of late-outgrowth endothelial progenitors is regulated by cyclin-dependent kinase inhibitors driven by notch signaling / J. Patel, H.Y. Wong, W. Wang et al. // *Stem Cells*. – 2016. – Vol. 34. – P. 902–912.

556. 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).

557. Pauwels, R.A. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary / R.A. Pauwels, A.S. Buist, P.M. Calverley et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2001. – Vol. 163. – P. 1256–1276.

558. Pазianos, G. The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective / G. Pазianos, M. Ugoezwa, T. Reya // *Biotechniques*. – 2003. – Vol. 35(6). – P. 1240–1247.

559. 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. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 34. – P. 257–263.

560. Peitzman, E.R. Agonist binding to  $\beta$ -adrenergic receptors on human airway epithelial cells inhibits migration and wound repair / E.R. Peitzman, N.A. Zaidman, P.J. Maniak, S.M. O'Grady // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2015. – Vol. 309(12). – P. 847–855.

561. Peitzman, E.R. Agonist binding to  $\beta$ -adrenergic receptors on human airway epithelial cells inhibits migration and wound repair / E.R. Peitzman, N.A. Zaidman, P.J. Maniak, S.M. O'Grady // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2015. – Vol. 309(12). – P. 847–855.

562. 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. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – Vol. 104(9). – P. 1199–1211.

563. Pelkonen, M. Smoking cessation, decline in pulmonary function and total mortality: a 30-year follow-up study among the Finnish cohorts of the Seven Countries Study / M. Pelkonen, I.L. Notkola, H. Tukiainen et al. // *Thorax*. – 2001. – Vol. 56. – P. 703–707.

564. Peng, H. Expression and methylation of mitochondrial transcription factor A in chronic obstructive pulmonary disease patients with lung cancer / H. Peng, M. Yang, Z. Chen, et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. e82739.



565. Peng, H. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation / H. Peng, E. Herzog // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2012. – Vol. 12(4). – P. 491 – 496.
566. Peplow, P.V. Growth factor- and cytokine-stimulated endothelial progenitor cells in post-ischemic cerebral neovascularization / P.V. Peplow // *Neural Regeneration Research*. – 2014. – Vol. 9(15). – P. 1425 – 1429.
567. Perez-Rial, S. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease / S. Pérez-Rial, Á. Girón-Martínez, G. Peces-Barba // *Archivos de bronconeumología*. – 2015. – Vol. 51(3). – P. 121–127.
568. Peri, R. Reserpine / R. Peri, R.S. Mangipudy // *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. – 2014. – P. 94-96.
569. Peron, J.P. Human tubal-derived mesenchymal stromal cells associated with low level laser therapy significantly reduces cigarette smoke-induced COPD in C57BL/6 mice / J.P. Peron, A.A. De Brito, M. Pelatti et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10(8). – P. e0136942.
570. Petrache, I. Emphysema / I. Petrache, K. Serban // *Pathobiology of Human Disease* / под ред. L.M. McManus, R.N. Mitchell. – San Diego: Academic Press. – 2014. – P. 2609–2624.
571. Philipson, L.H. B-agonists and metabolism / L.H. Philipson // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2002. – Vol. 110. – P. 313 – 317
572. Phinney, D.G. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy / D.G. Phinney // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2007. – Vol. 6(23). – P. 2884 – 2889.
573. Pichavant, M. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis / M. Pichavant, G. Rémy, S. Bekaert et al. // *Mucosal immunology*. – 2014. – Vol. 7(3). – P. 568–578.
574. Pierrou, S. Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. / S. Pierrou, P. Broberg, R. A. O'Donnell et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2007. – Vol. 175 – P. 577-586.
575. Pietras, E.M. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal / E.M. Pietras, C. Mirantes-Barbeito, S. Fong et al. // *Nature Cell Biology*. – 2016. – Vol. 18(6). – P. 607-618.
576. Pietras, E.M. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease / E.M. Pietras // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. P. 1693-1698
577. Pinho, S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche / S. Pinho, P.S. Frenette // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20. – P. 303–320.
578. Pinoli, M. Dopaminergic Regulation of Innate Immunity: a Review / M. Pinoli, F. Marino, M. Cosentino // *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. – 2017. – Vol. 12(4). – P. 602–623.

579. 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.

580. 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.

581. Pongratz, G. The sympathetic nervous response in inflammation / G. Pongratz, R.H. Straub // *Arthritis Research & Therapy*. – 2014. – Vol. 16 – doi:10.1186/s13075-014-0504-2.

582. Poole, P. Mucolytic agents for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease / P. Poole, P.N. Black, C.J. Cates // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2012. – Vol. 8. – №. CD001287.

583. Poole, P.J. Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Poole, E. Chacko, R.W. Wood-Baker, C.J. Cates // *The Cochrane Database Systematic Reviews*. – 2006. – Vol. 1. - № CD002733.

584. 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. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110(41). – P. 16574–16579.

585. Punturieri, A. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages / A. Punturieri, S. Filippov, E. Allen et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2000. – Vol. 192. – № 6. – P. 789 – 799.

586. Qamar, W. Farnesol ameliorates massive inflammation, oxidative stress and lung injury induced by intratracheal instillation of cigarette smoke extract in rats: an initial step in lung chemoprevention / W. Qamar, S. Sultana // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – Vol. 176(2–3) – P. 79–87.

587. 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. // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 22(3). – P. 325–332.

588. Qin, X. Notch signaling protects retina from nuclear factor- $\kappa$ B- and poly-ADP-ribose-polymerase-mediated apoptosis under high-glucose stimulation / X. Qin, Z. Zhang, H. Xu, Y. Wu // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2011. – Vol. 43. – P. 703 – 711.

589. Qiu, W. Variable DNA methylation is associated with chronic obstructive pulmonary disease and lung function / W. Qiu, A. Baccarelli, V.J. Carey et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2012. – Vol. 185(4) – P. 373–381.

590. Quaegebeur, A. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications / A. Quaegebeur, C. Lange, P. Carmeliet // *Neuron*. – 2011. – Vol. 71(3). – P. 406 – 424.

591. 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 et al. // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 85. – P. 305 – 313.
592. Rabe, K.F. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary / K.F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2007. – Vol 176. – P. 532-555.
593. Rabe, K.F. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. / K.F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – Vol. 176(6). – 2007. P. 532–555.
594. Rabe, K.F. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants / K.F. Rabe, H. Magnussen, G. Dent // *European Respiratory Journal*. - 1995. - Vol. 8. - P. 637 – 642.
595. Radke, A. Mature human eosinophils express functional Notch ligands mediating eosinophil autocrine regulation / A. Radke, L. Reynolds, R. Melo et al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – P. 3092 – 3101.
596. Radtke, F. Notch signaling in the immune system / F. Radtke, N. Fasnacht, H.R. Macdonald // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32. – P. 14 – 27.
597. Ragni, E. Differential microRNA signature of human mesenchymal stem cells from different sources reveals an “environmental-niche memory” for bone marrow stem cells / E. Ragni, T. Montemurro, E. Montelatici et al. // *Experimental Cell Research*. – 2013. – Vol. 319(10). – P. 1562 – 1574.
598. Rahman, I. Vulnerability and Genetic Susceptibility to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice / I. Rahman, G. De Cunto, I.K. Sundar, G. Lungarella // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2017. – Vol. 57(3). – P. 270–271.
599. Ramsey, S.D. Cost effectiveness of lung-volume-reduction surgery for patients with severe emphysema / S.D. Ramsey, K. Berry, R. Etzioni et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 348(21). – P. 2092 – 2102.
600. Rankin, S. M. Mesenchymal stem cells / S.M. Rankin // *Thorax*. - 2012. – Vol. 67. – P. 565–566.
601. Ratajczak, M.Z. Mobilization of hematopoietic stem cells as a result of innate immunity-mediated sterile inflammation in the bone marrow microenvironment—the involvement of extracellular nucleotides and purinergic signaling / M.Z. Ratajczak, M. Adamiak, M. Plonka et al. // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32. P. 1116–1123.
602. 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 // *Experimental Gerontology*. – 2008. – Vol. 43(11). – P. 1009–1017.

603. Rawlins, E.L. Epithelial stem/progenitor cells in lung postnatal growth, maintenance, and repair / E.L. Rawlins, T. Okubo, J. Que et al. // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – 2008. – Vol. 73. – P. 291 – 295.

604. Reilly, J.J.J. Cigarette smoking induces an elastolytic cysteine proteinase in macrophages distinct from cathepsin L / J.J.J. Reilly, P. Chen, L.Z. Sailor et al. // American Journal of Physiology. – 1991. – Vol. 261. – P. 41 – 48.

605. Rennard, S.I. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema / S.I. Rennard, S. Togo, O. Holz // Proceedings of the American Thoracic Society. – 2006. – Vol. 3. – P. 703-708.

606. Rennard, S.I. COPD: the dangerous underestimate of 15% / S.I. Rennard, J. Vestbo // Lancet (London, England). – 2006. – Vol. 367 – № 9518 – P. 1216–1219.

607. Rennert, R.C. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative / R.C. Rennert, M. Sorkin, R.K. Garg // Medicine. Regenerative Medicine. – 2012. – Vol. 7(6). – P.833–850.

608. Retamales, I. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection / I. Retamales, W.M. Elliott, B. Meshi et al. // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 164(3). – P. 469–473.

609. 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.R. Stripp // The American Journal of Pathology. – 2000. – Vol. 156(1). – P. 269–278.

610. Ribeiro-Paes, J.T. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema / J.T. Ribeiro-Paes, A. Bilaqui, O.T. Greco et al. // International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. – 2011. – Vol. 6. – P. 63 – 71.

611. Ricci, A. Dopamine receptor subtypes in the human pulmonary arterial tree / A. Ricci, F. Mignini, D. Tomassoni, F. Amenta // Autonomic & autacoid pharmacology. – 2006. - Vol. 26(4). – P. 361 – 369.

612. 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(5). – P. e35639.

613. 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.

614. Roche, N. Modeling future COPD epidemiology / N. Roche, C. Laurendeau, C. Raherison et al. // European Respiratory Journal. – 2016. – Vol. 48 – № suppl 60 – P. PA3115

615. Rock, J.R. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium / J.R. Rock, M.W. Onaitis, E.L. Rawlins et al. // Proceedings

of the National Academy of Sciences USA. – 2009. – Vol. 106(31). – P. 12771 – 12775.

616. Rock, J.R. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells / J.R. Rock, X. Gao, Y. Xue et al. // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8. – P. 639 – 648.

617. Rogliani, P. Airflow obstruction: Is it asthma or is it COPD? / P. Rogliani, J. Ora, E. Puxeddu, M. Cazzola // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2016. – Vol. 11. – P. 3007–3013.

618. Rogliani, P. Canakinumab for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease / P. Rogliani, L. Calzetta, J. Ora, M.G. Matera // *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. – 2015. – Vol. 31. – P. 15–27.

619. Rohela, G.K. High performance liquid chromatography based quantification of reserpine in *Rauwolfia tetraphylla* L. and enhanced production through precursor feeding / G.K. Rohela, P. Bylla, S. Pendli et al. // *Acta Chromatographica*. – 2021. – Vol. 34(2). – P. 120-129.

620. Rohela, G.K. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf, stem, root and their callus extracts in *Rauwolfia tetraphylla* / G.K. Rohela, P. Bylla, R. Korra, C. Reuben // *International Journal of Agriculture And Biology*. – 2016. – Vol.18(3). – P. 521–528.

621. Rombout, P.J. Influence of exposure regimen on nitrogen dioxide-induced morphological changes in the rat lung / P.J. Rombout, J.A. Dormans, M. Marra, G.J. van Esch // *Environmental Research*. – 1986. – Vol. 41(2). – P. 466–480.

622. Rouze, A. Inflammatory Cellular Response to Mechanical Ventilation in Elastase-Induced Experimental Emphysema: Role of Preexisting Alveolar Macrophages Infiltration / A. Rouze, G. Voiriot, E. Guivarch et al. // *BioMed Research International*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 5721293.

623. Russell, R.E.K. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases / R.E.K. Russell, A. Thorley, S.V. Culpitt et al. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2002. – Vol. 283. - № 4. – P. 867 – 873.

624. 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.

625. Sagi, S. Quantification and characterization of alkaloids from roots of *Rauwolfia serpentina* using ultra-high performance liquid chromatography-photo diode array-mass spectrometry / S. Sagi, B. Avula, Y.-H. Wang, I.A. Khan // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2016. – V. 408(1). – P. 177-190.

626. Sainson, R.C. Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis / R.C. Sainson, J. Aoto, M.N. Nakatsu et al. // *FASEB J*. – 2005. – Vol. 19. – P. 1027-1079.

627. Sakhatsky, P. Cigarette smoke-induced lung endothelial apoptosis and emphysema are associated with impairment of FAK and eIF2 $\alpha$  / P Sakhatsky,

G.A. Gabino Miranda, J. Newton et al. // *Microvascular Research*. – 2014. – Vol. 94. – P. 80 – 89.

628. Salter, B.M. Dysregulation of vascular endothelial progenitor cells lung-homing in subjects with COPD / B.M. Salter, F. Manzoor, S. Beaudin et al. // *Canadian Respiratory Journal*. – 2016. – P. 1 – 10.

629. Sandri, M. Maximal exercise, limb ischemia and endothelial progenitor cells / M. Sandri, E.B. Beck, V. Adams et al. // *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. – 2011. – Vol. 18(1). – P. 55–64.

630. Sarkar, C. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells / C. Sarkar, D. Chakroborty, R.B. Mitra et al. // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – Vol. 287(4). – P. H1554-1560.

631. 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 // *International Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 137(3). – P. 744 – 749.

632. 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. // *Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180(4). – P. 2581–2587.

633. Sasaki, Y. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice / Y. Sasaki, W. Suzuki, T. Shimada et al. // *Life Sciences*. – 2009. – Vol. 85. – P. 490–498.

634. Sayan M. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. / M. Sayan, B.T. Mossman // *Particle and fibre toxicology*. – 2016. – Vol. 13.

635. Scanzano, A. Adrenergic regulation of innate immunity: a review / A. Scanzano, M. Cosentino // *Frontiers in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 6 – P. 171.

636. Schamberger, A.C. Epigenetic mechanisms in COPD: implications for pathogenesis and drug discovery / A.C. Schamberger, N. Mise, S. Meiners, O. Eickelberg // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2014. – Vol. 9(6) – P. 609–628.

637. Scheffer, G.L. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung / G.L. Scheffer, A.C.L.M. Pijnenborg, E.F. Smit et al. // *Journal of Clinical Pathology*. – 2002. – Vol. 55(5). – P. 332–339.

638. 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.

639. Schmidt-Lucke, C. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol / C. Schmidt-Lucke, S. Fichtlscherer, A. Aicher et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5(11). - e13790.

640. 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.

641. Schriver, E.E. Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease / E.E. Schriver, J.M. Davidson, M.C. Sutcliffe et al. // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1992. – Vol. 145. – P. 762 – 766.
642. 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 Research in Cardiology*. – 2008. – Vol. 103(1). – P. 69–77.
643. Schuldiner, S. Reserpine binding to a vesicular amine transporter expressed in Chinese hamster ovary fibroblasts / S. Schuldiner, Y. Liu, R.H. Edwards // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268(1). – P. 29–34.
644. Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? / M. Selman, A. Pardo, N. Kaminski // *PLoS Med*. – 2008. – Vol. 5. – e62.
645. Senior, R.M. Chemotactic activity of elastin-derived peptides / R.M. Senior, G.L. Griffin, R.P. Mecham. // *The Journal of clinical investigation*. – 1980. – Vol. 66. – P 859-862.
646. Sestini, P. Short-acting beta2-agonists for stable chronic obstructive pulmonary disease / P. Sestini, E. Renzoni, S. Robinson, et al. // *The Cochrane Database Systematic Reviews*. – 2002. – Vol. 3. - № CD001495.
647. Shamon, S.D. Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension / S.D. Shamon, M.I. Perez // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2016. – Vol. 12(12):CD007655.
648. Shao, S. Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner / S. Shao, X. Zhao, X. Zhang et al. // *Molecular Cancer*. – 2015. – Vol. 14. – P. 28.
649. Shapiro, S.D. Animal models for COPD / S.D. Shapiro // *Chest*. – 2000. – Vol. 117(5) Suppl 1 – P. 223S–7S.
650. Shapiro, S.D. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice / S.D. Shapiro, N.M. Goldstein, A.M. Houghton et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2003. – Vol. 163(6) – P. 2329–2335.
651. Shapiro, S.D. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease / S.D. Shapiro // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1999. – Vol. 160. – P. 29 – 32.
652. Sharafkhaneh, A. Safety and tolerability of inhalational anticholinergics in COPD / A. Sharafkhaneh, H. Majid, N.J. Gross // *Drug, Healthcare and Patient Safety*. – 2013. – Vol. 5. – P. 49 – 55.
653. 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. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1992. – Vol. 99(5). – P. 594-600.

654. Shaykhiev, R. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype / R. Shaykhiev, W.L. Zuo, I.W. Chao et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2013. – Vol. 110(29). – P. 12102 – 12107.

655. Shen, H. Illustrated pharmacology memory cards: pharmnemonics. – Minireview, LLC, 2007. – С. 282.

656. Shen, L. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization / L. Shen, Y. Gao, J. Qian et al. // *Medical hypotheses*. – 2011. – Vol. 76(2). – P. 256–258.

657. 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.

658. Shi, G.P. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastolytic cysteine protease / G.P. Shi, J.S. Munger, J.P. Meara et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267(11). – P. 7258 – 7262.

659. Shi, Y. An increased ratio of Th2/Treg cells in patients with moderate to severe asthma / Y. Shi, G. Shi, H. Wan et al. // *Chinese Medical Journal*. – 2013. – Vol. 126. – P. 2248 – 2253.

660. Shibata, S. Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages / Shibata, S., Miyake, K., Tateishi, T. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – Vol. 115(51). – P. 13057–13062.

661. Shigemura, N. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema / N. Shigemura, M. Okumura, S. Mizuno et al. // *American Journal of Transplantation*. – 2006. - Vol. 6(11). – P. 2592 – 2600.

662. Shimano, H. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology—Divergent pathophysiology / H. Shimano, R. Sato // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2017. – Vol. 13. – P. 710–730.

663. 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.

664. Shinmura, D. Pretreatment of human mesenchymal stem cells with pioglitazone improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and cardiac function / D. Shinmura, I. Togashi, S. Miyoshi et al. // *Stem Cells*. – 2011. – Vol. 29(2). – P. 357 – 366.

665. Shirai, T. Correlation between peripheral blood T-cell profiles and clinical and inflammatory parameters in stable COPD / T. Shirai, T. Suda, N. Inui, K. Chida // *Allergology International*. – 2010. – Vol. 59. – P. 75 – 82.



666. 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.
667. Shvartsur, A. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications / A. Shvartsur, B. Bonavida // *Genes Cancer*. – 2015. – Vol. 6(3). – P. 84 – 105.
668. 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 // *Journal of Clinical Investigation*. – 2010. – Vol. 120(4). – P. 1192–1203.
669. Siganaki M. Deregulation of apoptosis mediators' p53 and bcl2 in lung tissue of COPD patients. / M. Siganaki, A.V. Koutsopoulos, E. Neofytou et al. // *Respiratory research*. – 2010. – Vol. 11(46).
670. Silva, G.E. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study / G.E. Silva, D.L. Sherrill, S. Guerra, R.A. Barbee // *Chest*. – 2004. – Vol. 126. - № 1. – P. 59 - 65.
671. Silverman, E.K. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease / E.K. Silverman, S.T. Weiss, J.M. Drazen et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2000. – Vol. 162. - № 6. – P. 2152 - 2158.
672. Silverman, E.K. Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes / E.K. Silverman, J.D. Mosley, L.J. Palmer et al. // *Human molecular genetics*. – 2002. – Vol. 11. – № 6. – P. 623 – 632.
673. Simet, S.M. Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function / S.M. Simet, J.H. Sisson, J.A. Pavlik et al. // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2010. – Vol. 43(6). – P. 635–640.
674. Simpson, R.J. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives / R.J. Simpson, S.S. Jensen, J.W. Lim // *Proteomics*. – 2008. – Vol. 8. – P. 4083 – 4099.
675. Sinclair, K.A. Mesenchymal stromal cells are readily recoverable from lung tissue, but not the alveolar space, in healthy humans / K.A. Sinclair, S.T. Yerkovich, T. Chen et al. // *Stem Cells*. – 2016. – Vol. 34(10). – P. 2548 – 2558.
676. Singh, D. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. / D. Singh, A. Agusti, A. Anzueto et al. // *The European respiratory journal*. – 2019. – Vol. 53(5). – 1900164.
677. Singh, M. Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina* / M. Singh // *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*. – 2017. – Vol. 11(3). – P. 132-142.
678. Sinha, K. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis / K. Sinha, J. Das, P. Pal, P. Sil // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Vol. 87. – P. 1157 – 1180.

679. Sinha, S. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 / S. Sinha, P.K. Vohra, R. Bhattacharya et al. // *Journal of Cell Science*. – 2009. – Vol. 122. – P. 3385-3392.

680. Skurikhin, E. Antifibrotic and Regenerative Effects of Treamid in Pulmonary Fibrosis / E. Skurikhin, V. Nebolsin, D. Widera et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol.21(21). – P. 8380.

681. Skurikhin, E. Endothelial Progenitor Cells as Pathogenetic and Diagnostic Factors, and Potential Targets for GLP-1 in Combination with Metabolic Syndrome and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Authors / E. Skurikhin, O. Pershina, A. Pakhomova et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20(5). – P. 1105.

682. Skurikhin, E.G. Effects of Pegylated Glucagon-Like Peptide-1 Analogue in C57Bl/6 Mice under Optimal Conditions and During Streptozotocin-Induced Diabetes / E.G. Skurikhin, O.V. Stronin, A.A. Epanchintsev et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicin*. – 2017. – Vol. 163. – P. 635–638.

683. Skurikhin, E.G. Endothelial Progenitor Cells as Pathogenetic and Diagnostic Factors, and Potential Targets for GLP-1 in Combination with Metabolic Syndrome and Chronic Obstructive Pulmonary Disease / E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, A.V. Pakhomova et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1105.

684. 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. // *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. – 2014. – Vol. 4(6).

685. Skurikhin, E.G. Polytherapy with Reserpine and Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Improves the Symptoms in Streptozotocin-Induced Type-1 Diabetic Mice by Reducing Inflammation and Inducing Beta Cell Regeneration / E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, N.N. Ermakova et al. // *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 8(8). – P. 434.

686. Skurikhin, E.G. Response of inflammatory mediators, extracellular matrix proteins and stem and progenitor cells to emphysema / E. G. Skurikhin, A. V. Pakhomova, V. A. Krupin et al. // *Cell Technologies in Biology and Medicine*. – 2016(2). – P. 566 – 570.

687. Skurikhin, E.G. Role of Cell Precursors in the Regeneration of Insulin-Producing Pancreatic Cells under the Influence of Glucagon-Like Peptide 1 / E.G. Skurikhin, A.V. Pakhomova, A.A. Epanchintsev et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicin*. – 2018. – Vol. 165. – P. 644–648.

688. 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(3). – P. 349–356.

689. Small, C. An unexpected link between notch signaling and ROS in restricting the differentiation of hematopoietic progenitors in *Drosophila* / C. Small, J. Ramroop, M. Otazo et al. // *Genetics*. – 2014. – Vol. 197. – P. 471 – 483.

690. Smith, D.J. Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products in COPD. / D.J. Smith, S.T. Yerkovich, M.A. Towers et al. // *European respiratory journal*. – 2011. – Vol. 37. – P. 516-522.
691. Smith, K.A. T-cell growth factor / K.A. Smith // *Immunological Reviews*. – 1980. – P. 337 – 357.
692. Smyllie, H. Incidence of serious complications of corticosteroid therapy in respiratory disease / H. Smyllie, C. Connolly // *Thorax*. – 1968. – Vol. 23. – P. 571 - 581.
693. Snider, G.L. Animal models of emphysema / G.L. Snider, E.C. Lucey, P.J. Stone // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1986. – Vol. 133(1). – P. 149–169.
694. Snyder, S.H. Receptor mechanisms in antipsychotic drug action: focus on sigma receptors / S.H. Snyder, B.L. Largent // *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. – 1989. – Vol. 1. – P. 7-15.
695. Society A.T. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. / A.T. Society, E.R. Society. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2003. Vol. 168(7). P. 818–900.
696. Soehnlein, O. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system / O. Soehnlein, L. Lindborn // *Journal of leukocyte biology*. – 2008. – 85(3).
697. Song, S. Alpha-1 Antitrypsin Therapy for Autoimmune Disorders / S. Song // *Chronic Obstructive Pulmonary Diseases*. – 2018. – Vol. 5(4). – P. 289 – 301.
698. 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.
699. 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. // *Experimental Hematology*. – 2011. – Vol. 39(4). – P. 495–505.
700. Sozzani, S. Chemokines as effector and target molecules in vascular biology / S. Sozzani, A. Del Prete, R. Bonecchi, M. Locati // *Cardiovascular Research*. – 2015. – Vol. 107(3). – P. 364-372.
701. Spiegel, A. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling / A. Spiegel, S. Shvitiel, A. Kalinkovich et al. // *Nature Immunology*. – 2007. – Vol. 8(10). – P. 1123–1131.
702. Sriuranpong, V. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells / V. Sriuranpong, M. Borges, R. Ravi et al. // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61. – P. 3200 – 3205.

703. Stavem, K. Lung transplantation in patients with chronic obstructive pulmonary disease in a national cohort is without obvious survival benefit / K. Stavem, O. Bjortuft, O. Borgan, et al. // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2006. – Vol. 25(1). – P. 75 - 84.

704. Stier, S. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome / S. Stier, T. Cheng, D. Dombkowski et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 2369 – 2378.

705. Stockley R.A. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. / R.A. Stockley // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1999. – Vol.160(5). S. 49-52.

706. Stockley, R.A. Alpha1-antitrypsin Review. / R.A. Stockley. // *Clinics in Chest Medicine*. – 2014. – Vol. 35(1). P. 39-50.

707. Stohl, L.L. Norepinephrine and adenosine-5'-triphosphate synergize in inducing IL-6 production by human dermal microvascular endothelial cells / L.L. Stohl, J.B. Zang, W. Ding et al. // *Cytokine*. – 2013. – Vol. 64(2). – P. 605–612.

708. Stolarczyk M. The EGFR-ADAM17 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Cystic Fibrosis Lung Pathology. Mediators of inflammation. / M. Stolarczyk, B. J. Scholte. // *Mediators of inflammation*. – 2018. – 1067134.

709. Stoll P. Stage-dependent association of BDNF and TGF- $\beta$ 1 with lung function in stable COPD. / P. Stoll, U. Wuertemberger, K. Bratke et al. // *Respiratory research*. – 2012. – Vol. 13(1.). – P. 116

710. Stoller, J.K. Alpha1-antitrypsin deficiency / J.K. Stoller, L.S. Aboussouan // *Lancet*. – 2005. – Vol. 365. - № 9478. – P. 2225 – 2236.

711. Straub, R.H. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon- $\gamma$  secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis / R.H. Straub, L. Rauch, A. Fassold et al. // *Arthritis & Rheumatism*. – 2008. – Vol. 58(11). – P. 3450–3460.

712. Streckfuss-Bomeke, K. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes and skin fibroblasts / K. Streckfuss-Bomeke, F. Wolf, A. Azizian // *European Heart Journal*. – 2013. – V. 34(33). – P. 2618-2629.

713. Strieter, R.M. New mechanisms of pulmonary fibrosis / R.M. Strieter, B. Mehrad // *Chest*. – 2009. – Vol. 136. – P. 1364-1370.

714. 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 // *Journal of Cellular Physiology*. – 1983. – Vol. 117. – P. 308–313.

715. Sueblinvong, V. Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases / V. Sueblinvong, D.J. Weiss // *Translational Research*. – 2010. – Vol. 156(3). – P. 188 – 205.

716. Sugiyama, T. Niches for hematopoietic stem cells and immune cell progenitors / T. Sugiyama, Y. Omatsu, T. Nagasawa // *International Immunology*. – 2019. – V. 31. – I. 1. – P. 5–11.

717. Suki, B. Elastase-Induced Lung Emphysema Models in Mice / B. Suki B, E. Bartolák-Suki, P.R.M. Rocco // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1639. – P. 67 – 75.

718. Summer, R. Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population / R. Summer, K. Fitzsimmons, D. Dwyer et al. // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2007. – Vol. 37. – P. 152 – 159.

719. Sun, Z. Stem cell therapies for chronic obstructive pulmonary disease: current status of pre-clinical studies and clinical trials / Z. Sun, F. Li, X. Zhou et al. // *Journal of Thoracic Disease*. – 2018. – Vol. 10(2). – P. 1084 – 1098.

720. Sundström, L. The acute glucose lowering effect of specific GPR120 activation in mice is mainly driven by glucagon-like peptide 1 / L. Sundström, S. Myhre, M. Sundqvist et al. // Irwin N, ed. *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12(12) –:e0189060.

721. Suresh, S. The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production / S. Suresh, A.E. Irvine // *Journal of Cell Communication and Signaling*. – 2015. – Vol. 9. – P. 5 – 13.

722. Swallow, E. B. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. / E.B. Swallow, D. Reyes, N.S. Hopkinson, W.D. Man, R. Porcher, E.J. Cetti, A.J. Moore, J. Moxham, M.I. Polkey. // *Thorax*. – Vol. 62(2). – 2007. – P. 115–120.

723. Swarnakar, S. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. / S. Swarnakar, S. Paul, L. P. Singh, R. J. Reiter. // *Journal of pineal research*. – 2011. – Vol.8 (50). – P. 8–20.

724. Swatek, A.M. Depletion of airway submucosal glands and TP63.KRT5. basal cells in obliterative bronchiolitis / A.M. Swatek, T.J. Lynch, A.K. Croke et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2018. – Vol. 197(8). – P. 1045 – 1057.

725. Tager, I.B. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life / I.B. Tager, L. Ngo, J.P. Hanrahan // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 1995. – Vol. 152. – P. 977 – 983.

726. Takahashi, T. Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease / T. Takahashi, S. Suzuki, H. Kubo et al. // *Respirology*. – 2011. – Vol. 16(4). – P. 680 – 687.

727. Takahashi, Y. Chemical analysis and in vitro toxicological evaluation of aerosol from a novel tobacco vapor product: A comparison with cigarette smoke / Y. Takahashi, Y. Kanemaru, T. Fukushima et al. // *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*. – 2018. – Vol. 92. – P. 94–103.

728. Takizawa, H. Pathogen-induced TLR4-TRIF innate immune signaling in hematopoietic stem cells promotes proliferation but reduces competitive fitness / H. Takizawa, K. Fritsch, L.V. Kovtonyuk et al. // *Cell Stem Cell*. – 2017. –21(2). – P. 225-240.e5.

729. Tam, A. Sex Differences in Airway Remodeling in a Mouse Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / A. Tam, A. Churg, J.L. Wright et al. //

American journal of respiratory and critical care medicine. – 2015. – Vol. 193(8). – P. 825–834.

730. Tan L. Circulating polymers in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. / L. Tan, J.A. Dickens, D.L. DeMeo et al. // The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. – 2014. – Vol. 43. P.1501-1504.

731. Tan, C.Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models / C.Y. Tan, R.C. Lai, W. Wong et al. // Stem Cell Research & Therapy. – 2014. – Vol. 5. – P. 76.

732. Tanaka, N. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. / N. Tanaka, H. Yonekura, S. Yamagishi et al. // The Journal of biological chemistry. – 2000. – Vol. 275. P. 25781-25790.

733. 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. // Regulatory Peptides. – 2005. – Vol. 125(1–3). – P. 1–8.

734. 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.

735. 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 // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2011. – Vol. 108(6). – P. 2258–2263.

736. Theodore, J. Lung transplantation comes of age / J. Theodore, N. Lewiston // The Journal of Heart and Lung Transplantation. – 1990. – Vol. 322(11). – P. 772 - 724.

737. Thery, C. Membrane vesicles as conveyors of immune responses / C. Thery, M. Ostrowski, E. Segura // Nature Reviews Immunology. – 2009. – Vol. 9(8). – P. 581 - 593.

738. Thomas, M. No room to breathe: the importance of lung hyperinflation in COPD / M. Thomas, M. Decramer, D.E. O'Donnell // Primary Care Respiratory Journal. – 2013. – Vol. 22. – P. 101 – 111.

739. 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.

740. Tibboel, J. Intravenous and intratracheal mesenchymal stromal cell injection in a mouse model of pulmonary emphysema / J. Tibboel, R. Keijzer, I. Reiss, J.C. De Jongste, M. Post // COPD. – 2014. – Vol. 11(3). – P. 310 – 318.

741. Tilley, A.E. Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease

/ A.E. Tilley, B.G. Harvey, A. Heguy et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2009. – Vol. 179(6). – P. 457–466.

742. 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. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2007. – Vol. 27(7). – P. 1572–1579.

743. Timmermans, F. Endothelial progenitor cells: identity defined? / F. Timmermans, J. Plum, M.C. Yoder et al. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 13(1). – P. 87–102.

744. Titz, B. Effects of cigarette smoke, cessation, and switching to two heat-not-burn tobacco products on lung lipid metabolism in C57BL/6 and Apoe-/- mice—An integrative systems toxicology analysis / B. Titz, S. Boue, B. Phillips et al. // *Toxicological Sciences*. – 2016. – Vol. 149. – P. 441–457.

745. Tober, J. Maturation of hematopoietic stem cells from prehematopoietic stem cells is accompanied by up-regulation of PD-L1 / J. Tober, M.M.W. Maijenburg, Y. Li et al. // *JEM Home*. – 2018. – V. 215(2). – P. 645–659.

746. Todorov, L.D. Differential cotransmission in sympathetic nerves: role of frequency of stimulation and prejunctional autoreceptors / L.D. Todorov, S.T. Mihaylova-Todorova, R.A. Bjur, D.P. Westfall // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1999. – Vol. 290(1). – P. 241–246.

747. 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.

748. Tong, Y. The stem cell niches in bone / Y. Tong, L. Linheng // *Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116. – P. 1195–1201.

749. Toru, U. MDR-1 gene C/T polymorphism in COPD: data from Aegean part of Turkey / U. Toru, C. Ayada, O. Genç et al. // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2014. – Vol. 7. - № 10. – P. 3573–3577.

750. Trigueros Carrero J.A. How should we define and classify exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease? / J.A. Trigueros Carrero. // *Expert review of respiratory medicine*. – Vol. 7(2 Suppl.) – 2013. – P. 33–41.

751. Tzouvelekis, A. Stem cell therapy in pulmonary fibrosis. / A. Tzouvelekis, A. Antoniadis, D. Bouros // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2011. – Vol. 17. – P. 368–373.

752. 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. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2005. – Vol. 39(5). – P. 733–742.

753. Vacca, A. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia / A. Vacca, M.P. Felli, R. Palermo et al. // *The EMBO Journal*. – 2006. – Vol. 25(5). – P. 1000–1008.

754. Van de Laar, E. Cell surface marker profiling of human tracheal basal cells reveals distinct subpopulations, identifies MST1/MSP as a mitogenic signal, and identifies new biomarkers for lung squamous cell carcinomas / E. Van de Laar, M. Clifford, S. Hasenoeder et al. // *Respiratory Research*. – 2014. – Vol. 15. – P. 160.

755. Van de Lest, C.H. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats / C.H. van de Lest, E.M. Versteeg, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt // *The European respiratory journal*. – 1995. – Vol. 8(2). – P. 238–245.

756. 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. // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6(11). – P. 1278–1281.

757. Viby, N.E. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) reduces mortality and improves lung function in a model of experimental obstructive lung disease in female mice / N.E. Viby, M.S. Isidor, K.B. Buggeskov et al. // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154. – P. 4503–4511.

758. Vignola, A.M. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis / A.M. Vignola, L. Riccobono, A. Mirabella et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1998. – Vol. 158. – P. 1945–1950.

759. Vistoli, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. / G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak, et al. // *Free radical research*. – 2013. – Vol. 47(1). – P.3-27.

760. Vogelmeier C. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. / C. Vogelmeier, A. Agusti, A Anzueto. // *The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*. – 2019. – Available online at:<http://www.goldcopd.org>.

761. Vogelmeier, C.F. Formoterol mono- and combination therapy with tiotropium in patients with COPD: a 6-month study / C. Vogelmeier, P. Kardos, S. Harari et al. // *Respiratory Medicine*. - 2008. - Vol. 102. - P. 1511 – 1520.

762. Vogelmeier, C.F. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. / C.F. Vogelmeier, G.J. Criner, F.J. Martinez A. et al. // *The European respiratory journal*. – 2017. – Vol. 49(3). – 1700214.

763. 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. // *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2012. – Vol. 302. – P. 185–192.

764. Volarevic, V. Mesenchymal stem cell-derived factors: immuno-modulatory effects and therapeutic potential / V. Volarevic, M. Gazdic, B. Simovic Markovic et al. // *BioFactors*. – 2017. – vol. 43(5). – P. 633–644.



765. Vos T. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. / T. Vos, A.D. Flaxman, M. Naghavi, et al. // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380(9859). P. 2163–2196.
766. Wagner, W. Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche / W. Wagner, P. Horn, S. Bork, A.D. Ho // *Experimental Gerontology*. – 2008. – Vol. 43 (11). – P. 974–980.
767. Wakai, J. Immunohistochemical localization of dopamine D2 receptor in the rat carotid body / J. Wakai, A. Takayama, T. Yokoyama et al. // *Acta Histochemica*. – 2015. – Vol. 117(8). – P. 784–789.
768. 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 Research in Cardiology*. – 2011. – Vol. 106(2). – P. 299–305.
769. Walker, L. The Notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse / L. Walker, A. Carlson, H.T. Tan-pertel et al. // *Stem Cells*. – 2001. – Vol. 19. – P. 543-552.
770. Walker, N. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts / N. Walker, L. Badri, S. Wettlaufer et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 178(6). – P. 2461 – 2469.
771. Walters, J.A. Injectable vaccines for preventing pneumococcal infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease / J.A. Walters, S. Smith, P. Poole, et al. // *The Cochrane Database Systematic Reviews*. – 2010. – Vol. 11. - № CD001390.
772. Walther, T.C. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. Annu / T.C. Walther, R.V. Farese // *Annual Review of Biochemistry*. – 2012. – Vol. 81. – P. 687–714.
773. Wan, E.S. Genetics of COPD and emphysema / E.S. Wan, E.K. Silverman // *Chest*. – 2009. – Vol. 136 – № 3 – P. 859–866.
774. Wang X.W. Impact of ABCB1 single-nucleotide polymorphisms on treatment outcomes with salmeterol/fluticasone combination therapy for stable chronic obstructive pulmonary disease. / X.W. Wang, Y.L. Zhang, Y. Xiong. // *Genetic testing and molecular biomarkers*. – 2015. – Vol. 19(10). – P. 566-572.
775. Wang, C. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study. / C. Wang, J. Xu, L. Yanget et al. // *Lancet*. – 2018. – Vol. 391(10131). – P. 1706–1717.
776. Wang, G. Genes associated with MUC5AC expression in small airway epithelium of human smokers and non-smokers / G. Wang, Z. Xu, R. Wang et al. // *BMC Medical Genomics*. – 2012. – Vol. 5(21). – P. 1 – 16.
777. Wang, J. Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: a study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease

(COPD) / J. Wang, R.A. Urbanowicz, P.J. Tighe et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. - № 3. – P. e58556.

778. 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. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284(23). – P. 15993–16003.

779. Wansleeben, C. Stem cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration, and disease / C. Wansleeben, C.E. Barkauskas, J.R. Rock, B.L. Hogan // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. – 2013. - Vol. 2(1). – P. 131 – 148.

780. Watanabe, H. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a rat lung transplantation model / H. Watanabe, T. Tsuchiya, K. Shimoyama et al. // *Journal of Surgical Research*. – 2018. – Vol. 227. – P. 17 – 27.

781. 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.

782. 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.

783. Wedzicha, J.A. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. / J.A. Wedzicha, T.A. Seemungal. // *Lancet*. – Vol. 370(9589). – 2007. – P. 786–796.

784. Wedzicha, J.A. Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD / J.A. Wedzicha, P.M. Calverley, K.F. Rabe // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2016. – Vol. 11. – P. :81 – 90.

785. Weiss, D.J. A placebo controlled, randomized trial of mesen-chymal stem cells in COPD / D.J. Weiss, R. Casaburi, R. Flannery et al. // *Chest*. – 2013. – Vol. 143. – P. 1590 – 1598.

786. 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.

787. Weisser, M. Hyperinflammation in patients with chronic granulomatous disease leads to impairment of hematopoietic stem cell functions / M. Weisser, U.M. Demel, S. Stein et al.// *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – 138(1). – 219-228.e9.

788. Wendel, D.P. Impaired distal airway development in mice lacking elastin / D.P. Wendel, D.G. Taylor, K.H. Albertine et al. // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 23(3) – P. 320–326.

789. Werner, N. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes / N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 353(10). – P. 999 – 1007.

790. Westhoff, B. Alterations of the Notch pathway in lung cancer / B. Westhoff, I. Colaluca, G. D’Ario et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2009. – Vol. 106. – P. 22293 – 22298.

791. Wilson, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches / A. Wilson, A. Trumpp // *Nature Reviews Immunology*. – 2006. – Vol. 6(2). – P. 93–106.
792. 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. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2010. – Vol. 207. – P. 535–552.
793. Wimalasena, K. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry / K. Wimalasena // *Medicinal Research Reviews*. – 2011. – Vol. 31(4). – P. 483–519.
794. Wittekindt, O.H. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation / O.H. Wittekindt // *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. – 2017. – Vol. 469(1). – P. 135–147.
795. 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. // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2009. – Vol. 53(1). – P. 1–9.
796. 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.
797. World Health Organization. The top 10 causes of death. 24 May 2018. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, (accessed 2020-5-3).
798. Wright, A.K. Myeloid-derived suppressor cell-like fibrocytes are increased and associated with preserved lung function in chronic obstructive pulmonary disease / A.K. Wright, C. Newby, R.A. Hartley et al. // *Allergy*. – 2017. – Vol. 72(4). – P. 645 – 655.
799. Wright, J.L. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig / J.L. Wright, A. Churg // *Chest*. – 2002. – Vol. 121(5). – P. 188S–191S.
800. Wright, J.L. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig / J.L. Wright, A. Churg // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1990. – Vol. 142(6)Pt 1. – P. 1422–1428.
801. Wright, J.L. Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs / J.L. Wright, S.G. Farmer, A. Churg // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – Vol. 166(7) – P. 954–960.
802. Wu, J.Y. Role of the osteoblast lineage in the bone marrow hematopoietic niches / J.Y. Wu, D.T. Scadden, H.M. Kronenberg // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2009. – Vol. 24 (5). – P. 759–764.
803. Wu, K.-C. Ugonin M, a *Helminthostachys zeylanica* constituent, prevents LPS-induced acute lung injury through TLR4-mediated MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways / K.-C. Wu, S.-S. Huang, Y.-H. Kuo et al. // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22 (573). – P. 1 – 15.
804. 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.

805. Wu, Y.H. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice / Y.H. Wu, S.Q. Hu, J. Liu et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2014. – Vol. 33(6). – P. 1498–1506.

806. Wüst, R.C. Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. / R.C. Wüst, H. Degens. // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. – 2007. – Vol. 2(3). – P. 289–300.

807. Wynn T.A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease / T.A. Wynn, A. Chawla, J.W. Pollard // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 445–455.

808. Xie, Y. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging / Y. Xie, T. Yin, W. Wiegraebe et al. // *Nature*. – 2009. – Vol. 457(7225). – P. 97-101.

809. Xie, Z. Association between the IL1B, IL1RN polymorphisms and COPD risk: a meta-analysis / Z. Xie, Q. Huang, J. Huang, Z. Xie // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 6202.

810. Xu S., Interleukin-17 and its expanding biological functions / S. Xu, X. Cao // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2010. – Vol. 7. – P. 164 – 174.

811. Xu X. SERPINE1 -844 and -675 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese Han population. / X. Xu, H. Wang, H. Li, X. Cui, H. Zhang. // *The Journal of international medical research*. – 2016. Vol. 44 – P. 1292-1301.

812. Xu, C. Molecular mechanism of icariin on rat asthmatic model / C. Xu, J. LE, X. Duan et al. // *Chinese Medical Journal (Engl)*. – 2011. – Vol. 124. – P. 2899 – 2906.

813. Xu, K. Notch signaling in lung development and disease / K. Xu, N. Moghal, S.E. Egan // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 727. – P. 89 – 98.

814. Xu, K. Notch signaling in lung development and disease / K. Xu, N. Moghal, S.E. Egan // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 727. – P. 89-98.

815. Xu, X. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats / X. Xu, Z. Xu, Y. Xu, G. Cui // *Coronary Artery Disease*. – 2005. – Vol. 16(4). – P. 245–255.

816. 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.

817. Yaffe, D. The ins and outs of vesicular monoamine transporters / D. Yaffe, L.R. Forrest, S. Schuldiner // *Journal of General Physiology*. – 2018. – V. 150(5). – P. 671-682.

818. Yamada, M. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury / M. Yamada, H. Kubo, S. Kobayashi et al. // *Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172(2). – P. 1266 – 1272.

819. Yamaguchi, Y. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential / Y. Yamaguchi, J. Ohno, A. Sato et al. // *BMC Biotechnol.* – 2014. – Vol. 14(1). – P. 105.
820. Yamasaki, K Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD / K. Yamasaki, S. Eeden // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – Vol. 19(2). – P. 582.
821. Yamashita, M. TNF- $\alpha$  Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration / M. Yamashita, E. Passegué // *Cell Stem Cell.* – 2019. – pii: S1934-5909(19)30223-1.
822. Yang, I.A. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease / I.A. Yang, M.S. Clarke, E.H.A. Sim, K.M. Fong // *The Cochrane Database of Systematic Reviews.* – 2012. – Vol. 7. – P. 2991.
823. Yang, J. Continuous AMD3100 Treatment Worsens Renal Fibrosis through Regulation of Bone Marrow Derived Pro-Angiogenic Cells Homing and T-Cell-Related Inflammation / J. Yang, F. Zhu, X. Wang et al. // *PloS one.* – 2016. – Vol. 11(2). – P. e0149926.
824. Yang, M. Cigarette smoke extract induces aberrant cytochrome-C oxidase subunit II methylation and apoptosis in human umbilical vascular endothelial cells / M. Yang, P. Chen, H. Peng, et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2015. – Vol. 308. – P. 378 – 384.
825. Yin, P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study / P. Yin, C.Q. Jiang, K.K. Cheng et al. // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370. - № 9589. – P. 751 - 757.
826. Yin, Q. The expression levels of Notch-related signaling molecules in pulmonary microvascular endothelial cells in bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis / Q. Yin, W. Wang, G. Cui et al. // *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* – 2017. – Vol. 66(2). – P. 305–315.
827. Yoder, M.C. Defining human endothelial progenitor cells / M.C. Yoder, H.B. Wells et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2009. – Vol. 7(s1). – P. 49–52.
828. 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.
829. Yokoyama, A. Production of IL-2 and IFN by TH2 clones / A. Yokoyama, B. Evavold, D.E. Dunn // *Immunology Letters.* – 1989. - Vol. 21. – P. 119 – 126.
830. 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.
831. 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.

832. Yu, J.G. Ketanserin improves cardiac performance after myocardial infarction in spontaneously hypertensive rats partially through restoration of baroreflex function. / J.G. Yu, E.H. Zhang, A.J. Liu et al. // *Acta pharmacologica Sinica*. – 2013. – Vol. 34(12). P. 1508–1514.

833. Yu, V.W.C. Hematopoietic stem cell and its bone marrow niche / V.W.C. Yu, D.T. Scadden // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2016. – Vol. 118. – P. 21-44.

834. Yu, X.L. Relationships of COX2 and MMP12 genetic polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis / X.L. Yu, J. Zhang, F. Zhao, X.M. Pan // *Molecular Biology Reports*. – 2014. – Vol. 41. - № 12. – P. 8149 – 8162.

835. Yuan, X. Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis / X. Yuan, H. Wu, H. Xu et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 10338.

836. Zacharias, W.J. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor / W.J. Zacharias, D.B. Frank, J.A. Zepp et al. // *Nature*. – 2018. – Vol. 555(7695). – P. 251 – 255.

837. Zafar, N. Genome size analysis of field grown and tissue culture regenerated *Rauvolfia serpentina* (L) by flow cytometry: Histology and scanning electron microscopic study for in vitro morphogenesis / N. Zafar, A. Mujib, M. Ali et al. // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – V.128. – P. 545-555.

838. Zanotti, S. Notch signaling in skeletal health and disease / S. Zanotti, E. Canalis // *European Journal of Endocrinology*. – 2013. – Vol. 168. – P. 95-103.

839. Zhang, B. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes / B. Zhang, Y. Yin, R.C. Lai, S.S. Tan et al. // *Stem Cells and Development*. – 2014. – Vol. 23(11). – P. 1233 – 1244.

840. Zhang, H. Histone deacetylation of memory T lymphocytes by You-Gui-Wan alleviates allergen-induced eosinophilic airway inflammation in asthma / H. Zhang, J. Fu, T. Fan et al. // *Chinese Medicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 9.

841. 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.

842. Zhang, S.J. Effect of TGF- $\beta$ 1/SDF-1/CXCR4 signal on BM-MSCs homing in rat heart of ischemia/perfusion injury / S.J. Zhang, X.Y. Song, M. He, S.B. Yu, // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – 20. – P. 899–905.

843. Zhang, W. PI3K and Notch signal pathways coordinately regulate the activation and proliferation of T lymphocytes in asthma / W. Zhang, Y. Nie, L. Chong et al. // *Life Sciences*. – 2013. – Vol. 92. – P. 890 – 895.

844. Zhang, Y. Intraperitoneal injection of cigarette smoke extract induced emphysema, and injury of cardiac and skeletal muscles in BALB/C mice / Y. Zhang, J. Cao, Y. Chen et al. // *Experimental lung research*. – 2013. – Vol. 31(1). – P. 18–31.

845. Zhang, Z.-Y. Characterization of human cytochromes P450 involved in theophylline 8-hydroxylation / Z.-Y. Zhang, L.S. Kaminsky // *Biochemical Pharmacology*. - 1995. - Vol. 50. - P. 205 – 211.

846. Zhao, M.Q. Alveolar epithelial cell chemokine expression triggered by antigen-specific cytolytic CD8+ T cell recognition / M.Q. Zhao, M.H. Stoler, A.N. Liu et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – Vol. 106 – № 6 – P. R49–R58.

847. 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(2). – P. 454–459.

848. 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 Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 18(10). – P. 1048–1058.

849. Zheng, L.T. The antipsychotic spiperone attenuates inflammatory response in cultured microglia via the reduction of proinflammatory cytokine expression and nitric oxide production / L.T. Zheng, J. Hwang, J. Ock et al. // *Journal of neurochemistry*. – 2008. – Vol. 107(5). – P. 1225 – 1235.

850. Zheng, Q. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases tumor growth and angiogenesis directly by promoting endothelial cell function and indirectly by enhancing the mobilization and recruitment of proangiogenic granulocytes / Q. Zheng, X. Li, X. Cheng et al. // *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 39(2), 1010428317692232.

851. Zhou, C. Lung cancer molecular epidemiology in China: recent trends / C. Zhou // *Transl Lung Cancer Research*. – 2014. – Vol. 3. – P. 270 – 279.

852. Zhou, D.C. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms with the risk of COPD: an updated meta-analysis of 2,644 cases and 4,804 controls / D.C. Zhou, C.F. Zhou, S. Toloo et al. // *Molecular Biology Reports*. – 2015. – Vol. 42. - № 2. – P. 409 – 422.

853. Zhou, M. Analysis of the expression of the Notch3 receptor protein in adult lung cancer / M. Zhou, W. Jin, Z. Fan, R. Han // *Oncology Letters*. – 2013. – Vol. 5. – P. 499 – 504.

854. Zhou, M. Blockade of Notch signaling by  $\gamma$ -secretase inhibitor in lung T Cells of asthmatic mice affects T cell differentiation and pulmonary inflammation / M. Zhou, Z. Cui, X. Guo et al. // *Inflammation*. – 2015. – Vol. 38. – P. 1281 – 1288.

855. Zhou, S. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype / S. Zhou, J.D. Schuetz, K.D. Bunting et al. // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. 7(9). – P. 1028–1034.

856. 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. // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2006. – Vol. 87. – P. 463–474.

857. Zhu, Y.G. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice / Y.G. Zhu, X.M. Feng, J. Abbott et al. // *Stem cells*. – 2014. – Vol. 32. – P. 116 – 125.

858. Zhua, D. Verification of the role of spiperone in the treatment of COPD through bioinformatics analysis / D. Zhua, N. Maa, L. Chen et al. // *International Immunopharmacology*. – 2021. – Vol. 101(A). – P. 108308.

859. Zong, D. Notch1 regulates endothelial apoptosis via the ERK pathway in chronic obstructive pulmonary disease / D. Zong, J. Li, S. Cai et al. // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2018. – Vol. 315(3). – P. C330-C340.

860. Zore, T. Sex differences in obesity, lipid metabolism, and inflammation-A role for the sex chromosomes? / T. Zore, M. Palafox, K. Reue // *Molecular Metabolism*. – 2018. – Vol. 15. – P. 35–44.

861. 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.

862. Zuk, P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. // *Tissue engineering*. – 2001. – Vol. 7(2). – P. 211 – 228.

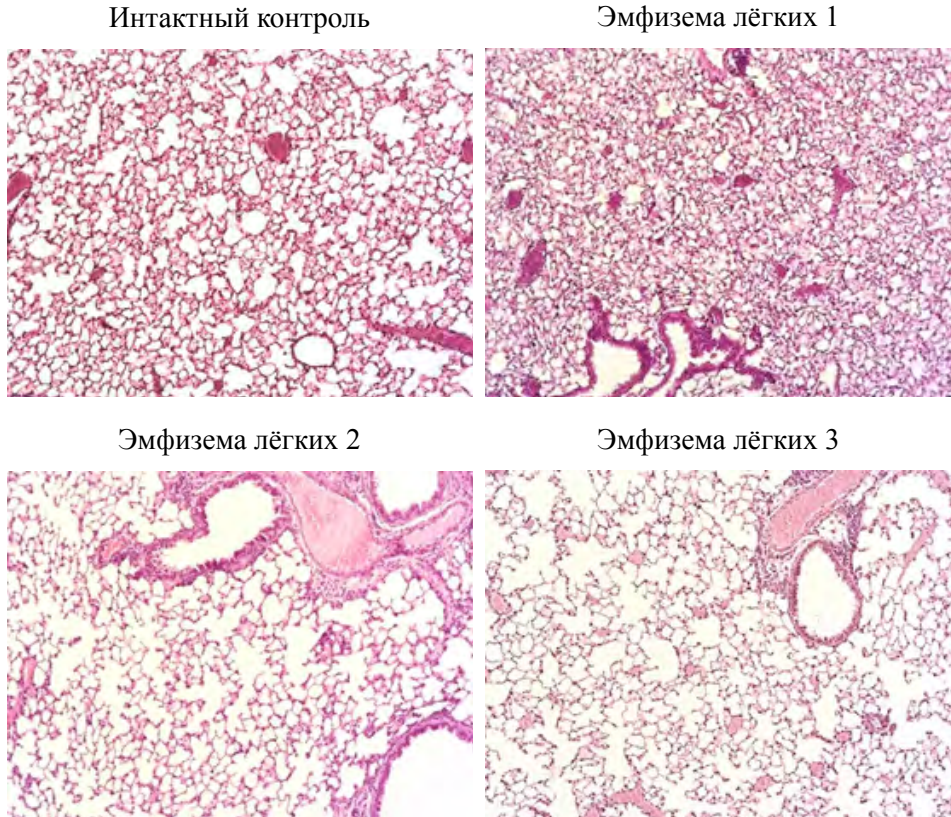
863. Zuo, L. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments / L. Zuo, F. He, G.G. Sergakis et al. // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. – 2014. – Vol. 307(3). – P. L205–L218.

864. Zuo, W.L. EGF-amphiregulin interplay in airway stem/progenitor cells links the pathogenesis of smoking-induced lesions in the human airway epithelium / W.L. Zuo, J. Yang, K. Gomi et al. // *Stem Cells*. – 2017. – Vol. 35(3). – P. 824 – 837.

865. ZuWallack, R.L. Salmeterol plus theophylline combination therapy in the treatment of COPD / R.L. ZuWallack, D.A. Mahler, D. Reilly et al. // *Chest*. – 2001. – Vol. 119. – P. 1661 – 1670.

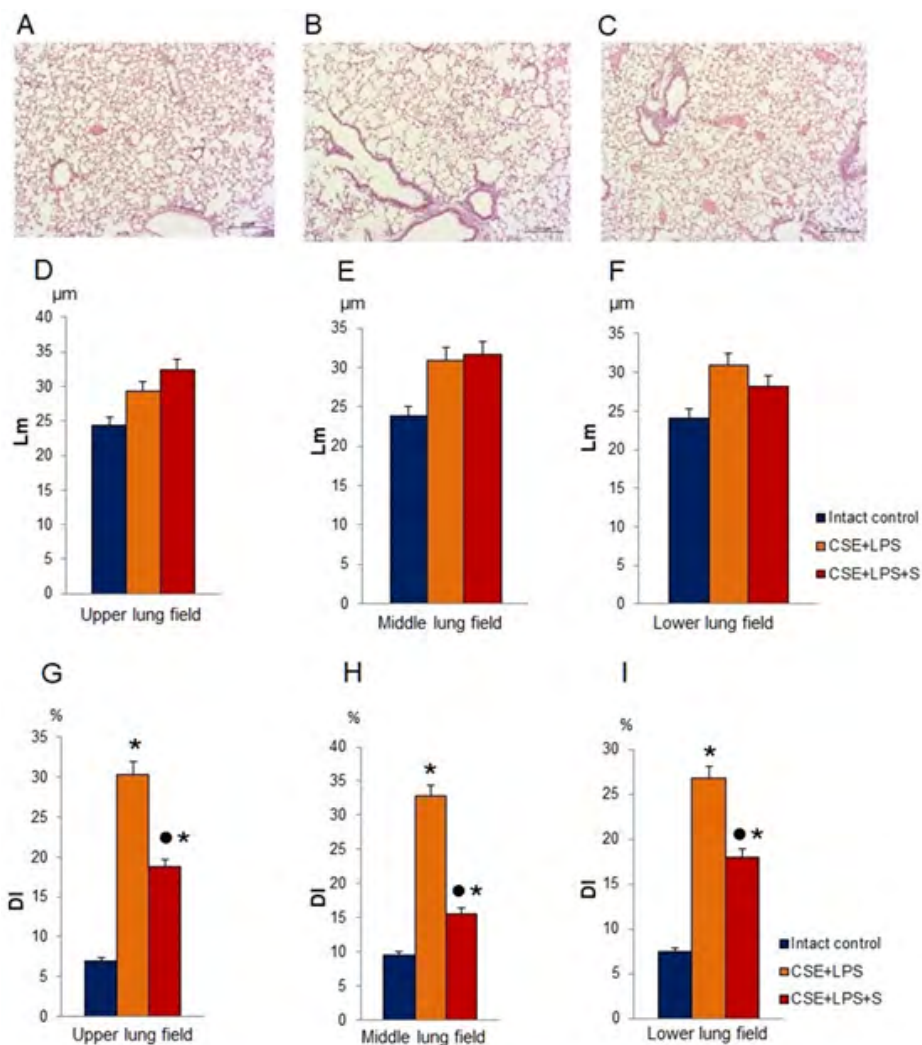


## ПРИЛОЖЕНИЕ

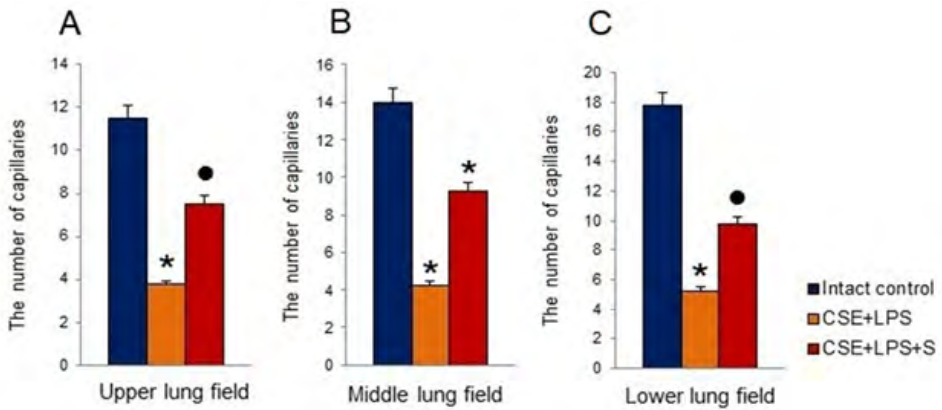


**Рис. 1.** Морфологическая картина лёгких мышей-самцов линии C57BL/6 интактного контроля и мышей-самцов линии C57BL/6 с эмфиземой лёгких. Окраска гематоксилином и эозином (общее увеличение камеры  $\times 16$ ), препараты изготовлены на 45-е сутки эксперимента. Эмфизему лёгких 1 (обратимая) моделировали и/н введением ЛПС (3 мкг/мышь) в фосфатном буфере на 0 и 3 сутки эксперимента и и/н введением ЭСД в фосфатном буфере на 1, 4, 7, 10, 13, 16 сутки. Эмфизему лёгких 2 (необратимая без гибели животных) моделировали и/н введением ЛПС (3 мкг/мышь) в фосфатном буфере на 0 и 3 сутки и и/н введением ЭСД в фосфатном буфере на 1, 4, 7, 10, 13, 16, 23, 30, 37 сутки. Эмфизему лёгких 3 (необратимая с 30% гибелью животных) моделировали и/н введением ЛПС (3 мкг/мышь) в фосфатном буфере на 0 и 3 сутки и и/н введением ЭСД в фосфатном буфере на 1, 4, 7, 10, 13, 16, 23, 30, 34, 37, 41, 44 сутки.

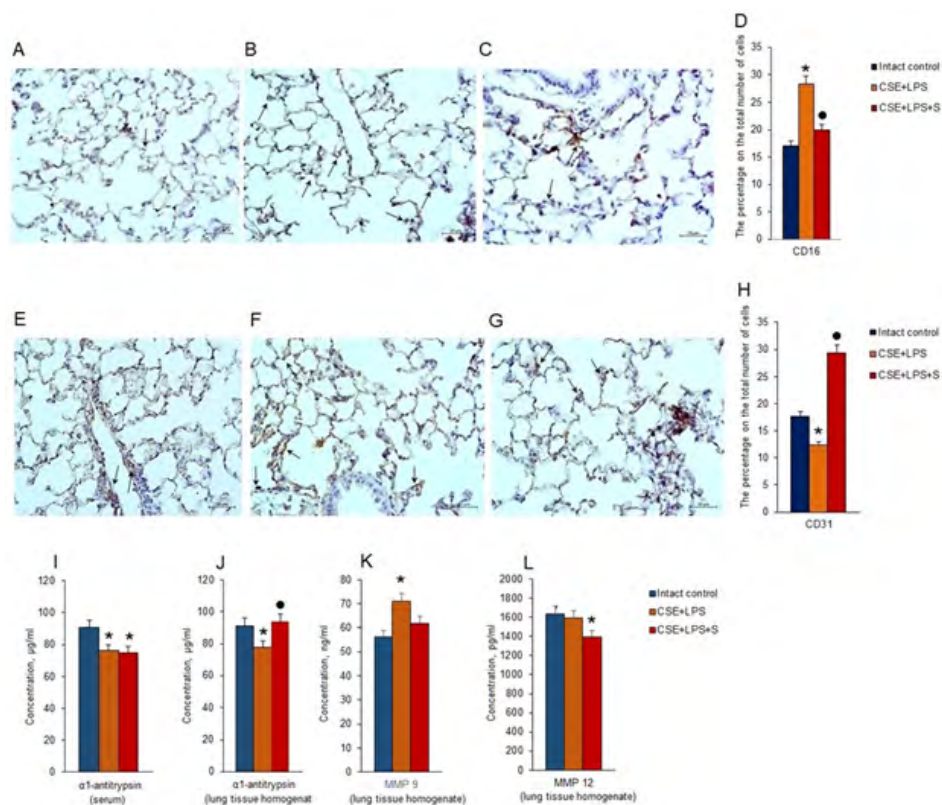
## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике



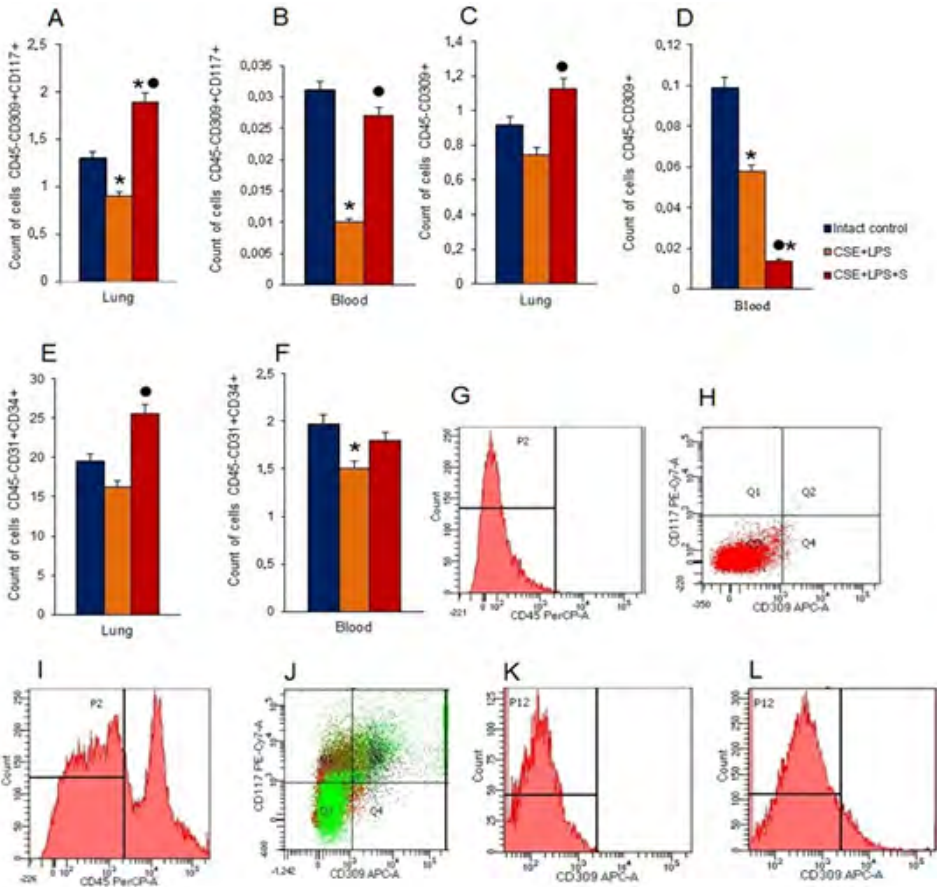
**Рис. 2.** Микрофотографии лёгких (нижнее лёгочное поле), полученные из самок мышей линии C57BL/6 на 45-е сутки эксперимента (A-C). Ткани окрашивали гематоксилин-эозином. Масштабная линейка 10 мкм. Стрелки указывают на разрыв альвеол. (A) Лёгкое мышей из контрольной группы; (B) лёгкое мышей с CSE/LPS индуцированной эмфиземой; (C) лёгкое мышей с эмфиземой, получавших спиперон с 1 по 45-е сутки. Каждому экспериментальному животному из всех экспериментальных групп делали не менее 10 микрофотографий лёгочной ткани при 100-кратном увеличении. (D-I) Количественная оценка эмфиземы лёгких и морфометрия лёгких самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки: (D-F) значения Lm и (G-I) DI мышей; (D и G) Верхнее; (E и H) среднее; (F и I) Нижнее лёгочное поле. Группы: интактный контроль – контрольная группа из интактных мышей, CSE+LPC – мыши с CSE+LPC индуцированной эмфиземой, CSE+LPC+S – мыши с эмфиземой в условиях введения Спиперона. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. n = 10 животных/группу; Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой CSE+LPC (по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. LPC, липополисахарид.



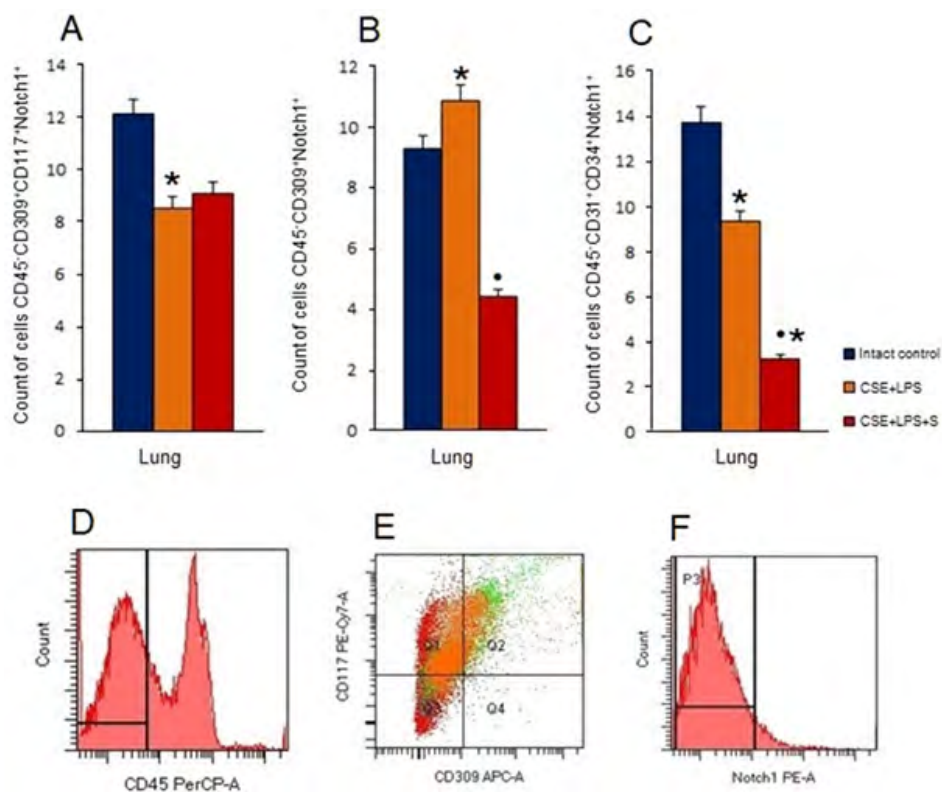
**Рис. 3.** Количество капилляров в 5 последовательных полях срезов лёгких (верхнее, среднее и нижнее лёгочное поле), полученных от самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки эксперимента. (A) Верхнее поле лёгкого; (B) среднее поле лёгкого; (C) нижнее поле лёгкого. Группы: интактный контроль – контрольная группа из интактных мышей, CSE+LPC – мыши с CSE+LPC индуцированной эмфиземой, CSE+LPC+S – мыши с эмфиземой в условиях введения Спиперона. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой CSE+LPC (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. LPC, липополисахарид.



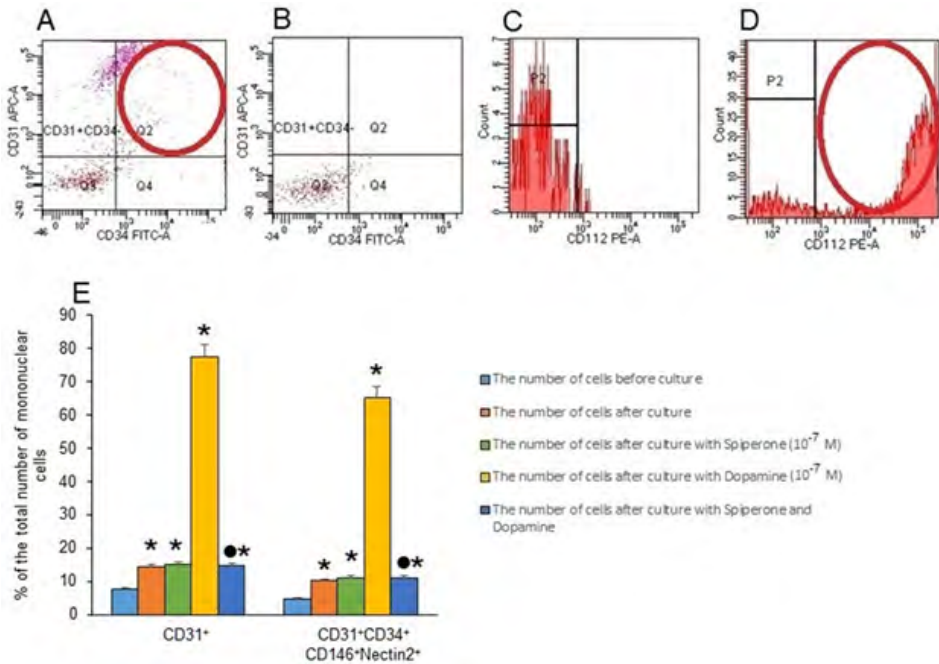
**Рис. 4.** Иммуногистохимическая оценка экспрессии специфических клеточных маркеров: (А–С) CD16 и (Е–Г) CD31 в лёгких (нижнее лёгочное поле) самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки эксперимента. Все срезы докрасивали гематоксилином. Масштабная линейка 10 мкм. Стрелки указывают на положительные клетки. (А, Е) фотографии контрольной группы; (В, F) фотографии лёгких мышей с эмфиземой, индуцированной CSE/LPS; (С, G) фотографии лёгких мышей с эмфиземой, получавших спиперон между с 1 по 45 день; (D) иммуногистохимическое окрашивание на CD16 позитивные клетки в лёгких самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки; (H) иммуногистохимическое окрашивание на CD31 позитивные клетки в легких самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки. Концентрация  $\alpha$ 1-антитрипсина в сыворотке (I) и уровни  $\alpha$ 1-антитрипсина (J), ММП 9 (K) и ММП 12 (L) в гомогенате легких самок мышей линии C57BL/6 с поражением легких, вызванным интратрахеальным введением CSE и LPS на 45 сутки. Группы: интактный контроль – контрольная группа из интактных мышей, CSE+LPS – мыши с CSE/LPS, индуцированной эмфиземой, CSE+LPS+S – мыши с эмфиземой в условиях введения Спиперона. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой CSE+LPC (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. LPC, липополисахарид.



**Рис. 5.** Характеристика эндотелиальных клеток-предшественников, VEGF<sup>2+</sup> эндотелиальных клеток и предшественников ангиогенеза в лёгких и крови самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки. Клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием антител против CD45, CD31, CD34, CD117 и CD309. Точечные графики являются репрезентативными для трёх независимых экспериментов со средним значением из трёх независимых экспериментов. (A) количество предшественников ангиогенеза (CD45<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>) в лёгких самок мышей линии C57BL/6; (B) количество предшественников ангиогенеза (CD45<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>) в крови самок мышей линии C57BL/6; (C) количество VEGF<sup>2+</sup> эндотелиальных клеток (CD45<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>) в лёгких самок мышей линии C57BL/6; (D) количество VEGF<sup>2+</sup> эндотелиальных клеток (CD45<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>) в крови самок мышей линии C57BL/6; (E) число эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) в лёгких мышей-самок линии C57BL/6; (F) количество ЭПК (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) в крови самок мышей C57BL/6. Группы: интактный контроль – контрольная группа из интактных мышей, CSE+LPC – мыши с CSE/LPC, индуцированной эмфиземой, CSE+LPC+S – мыши с эмфиземой в условиях введения Спиперона. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой CSE+LPC (по критерию Манна–Уитни (p<0,05)). (G) Гистограмма изотипического контроля IgG2b (PerCP); (H) Точечный график контроля изотипа для IgG2b (PE-Cy7) и IgG2b (APC); (I) Гистограмма экспрессии CD45 (PerCP); (J) Установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD117 (PE-Cy7) и CD309 (APC); (K) Контроль изотипа для IgG2b (APC); (L) Гистограмма экспрессии CD309 APC. CSE, экстракт сигаретного дыма. LPC, липополисахарид.

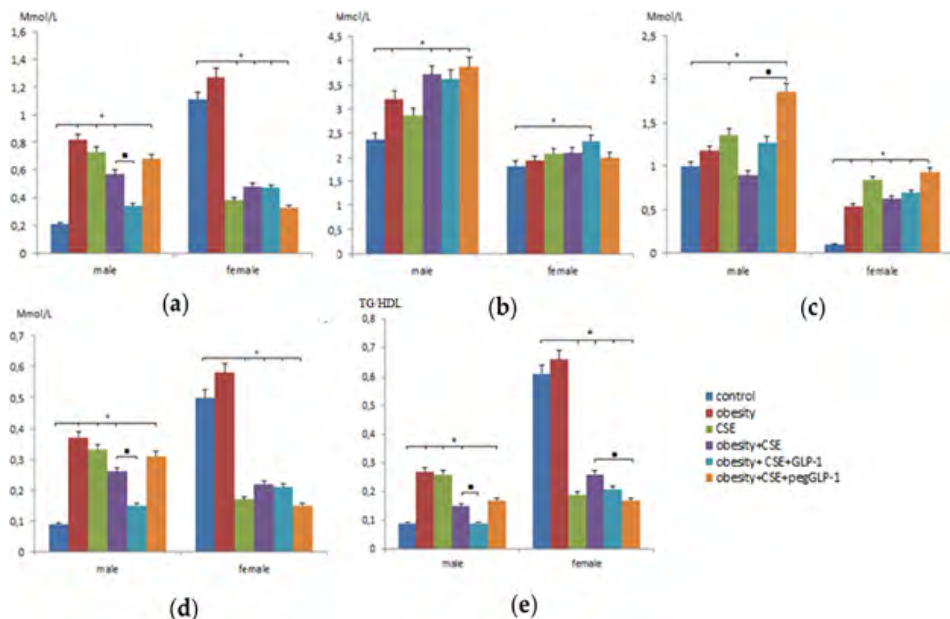


**Рис. 6.** Характеристика Notch1<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в лёгких самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки. Клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием антител против CD45, CD31, CD34, CD117, CD309 и Notch1. Точечные графики являются репрезентативными для трёх независимых экспериментов со средним значением из трёх независимых экспериментов. (A) Количество предшественников ангиогенеза (CD45<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup>) в лёгких самок мышей линии C57BL/6; (B) количество VEGF2<sup>+</sup> эндотелиальных клеток (CD45<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup>) в лёгких самок мышей линии C57BL/6; (C) количество эндотелиальных клеток-предшественников (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>Notch1<sup>+</sup>) в лёгких самок мышей линии C57BL/6. Группы: интактный контроль – контрольная группа из интактных мышей, CSE+LPC – мыши с CSE/LPC-индуцированной эмфиземой, CSE+LPC+S – мыши с эмфиземой, получавшие Спиперон. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – по сравнению с интактным контролем; • – по сравнению с группой CSE+LPC (по критерию Манна–Уитни (p < 0,05)). (D) Гистограмма экспрессии CD45 (PerCP); (E) Установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD117 (PE-Cy7) и CD309 (APC); (F) Гистограмма экспрессии Notch1 PE. CSE, экстракт сигаретного дыма. LPC, липополисахарид.



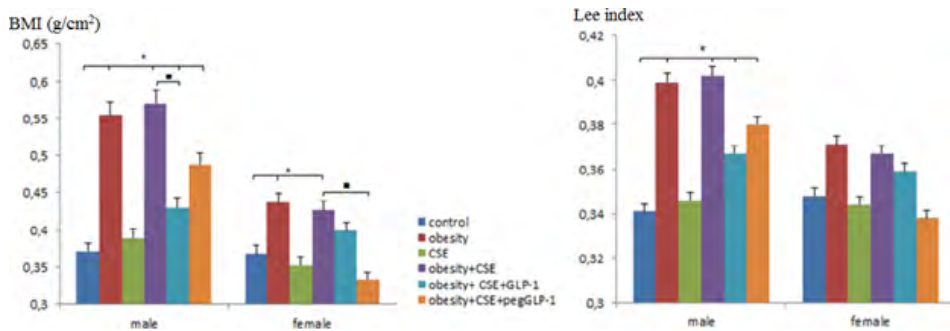
**Рис. 7.** Характеристика эндотелиальных клеток Nectin2<sup>+</sup> в лёгких самок мышей C57BL/6 на 45-е сутки эксперимента. Клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием антител против CD45, CD31, CD34, CD146 и CD112 (Nectin2). (A) Установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD31 (APC) и CD34 (FITC); (B) Точечный график контроля изотипа для IgG2b (APC) и IgG2a (FITC); (C) Гистограмма изотипического контроля IgG2b (PE); (D) Гистограмма экспрессии CD112 (Nectin2) (PE); (E) влияние дофамина и спиперона на содержание зрелых эндотелиальных клеток и их предшественников (% от общего числа мононуклеарных клеток) в культуре мононуклеарных клеток, выделенных из лёгких самок мышей линии C57BL/6 с CSE/LPS индуцированной эмфиземой на 45-е сутки (M ± m). Представлены результаты 3 независимых экспериментальных серий. Группы: 1 группа – контрольная группа (CD31<sup>+</sup> клетки до культивирования), 2 группа – CD31<sup>+</sup> клетки после культивирования на 5 день, 3 группа – CD31<sup>+</sup> клетки после культивирования со спипероном (10<sup>-7</sup> M), 4 группа – CD31<sup>+</sup> клетки после культивирования с дофамином (10<sup>-7</sup> M), а группа 5 – клетки CD31<sup>+</sup> после культивирования со спипероном (10<sup>-7</sup> M) и дофамином (10<sup>-7</sup> M). Достоверные различия \* – по сравнению с 1-й группой. ● – по сравнению со 2-й группой (по критерию Манна–Уитни (p < 0,05)).

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

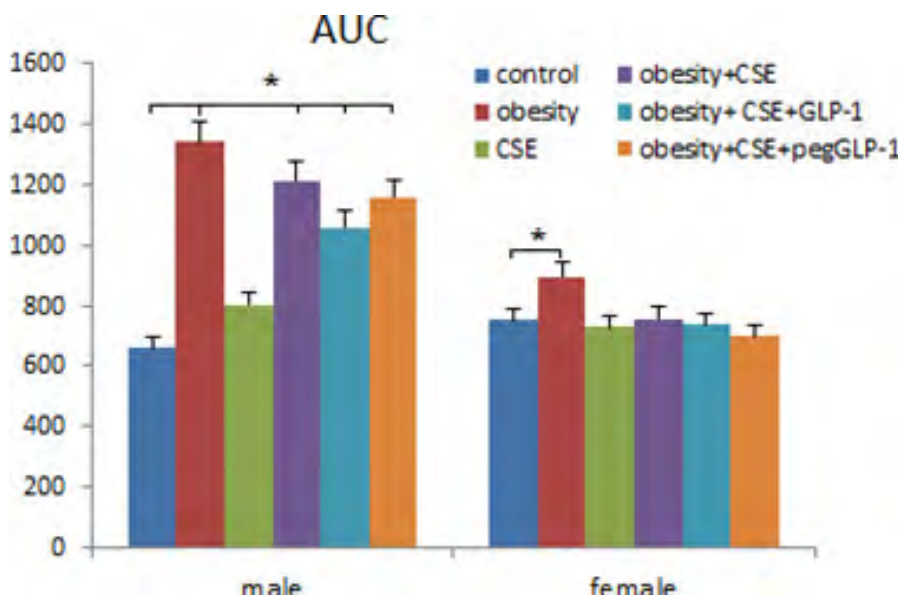


**Рис. 9.** Измерения липидного профиля в крови самок и самцов мышей C57BL/6 на 189 сутки: (a) Уровень триглицеридов в сыворотке (Ммоль/л); (b) Уровень липопротеинов высокой плотности (Ммоль/л); (c) Уровень липопротеинов низкой плотности (Ммоль/л); (d) Уровень липопротеинов очень низкой плотности (Ммоль/л); (e) Отношение триглицеридов к липопротеинам высокой плотности (TG/HDL). Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения GLP-1, ожирение+CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой ожирения+CSE (по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.

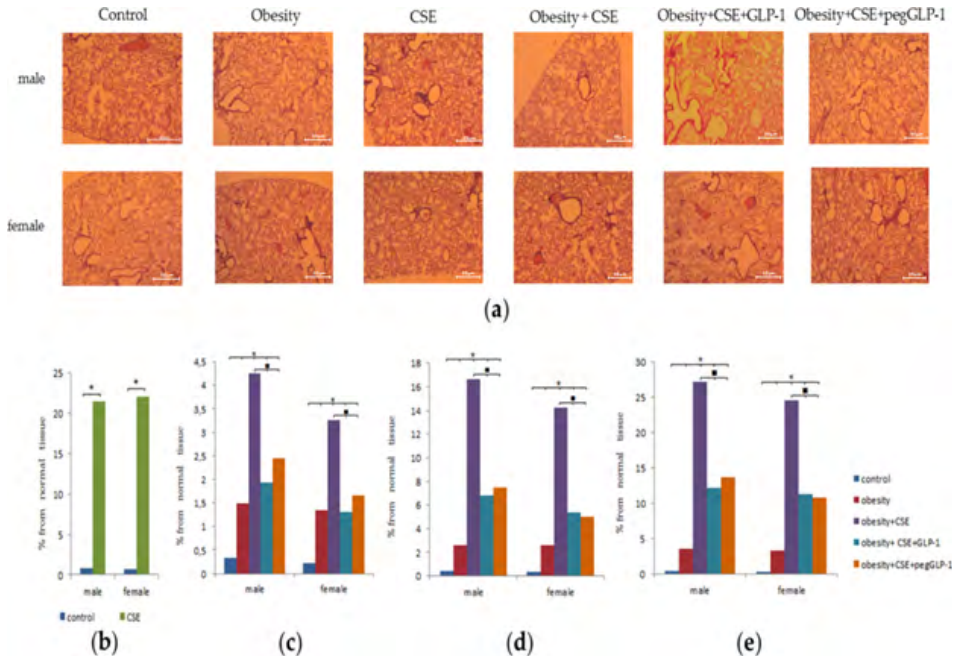




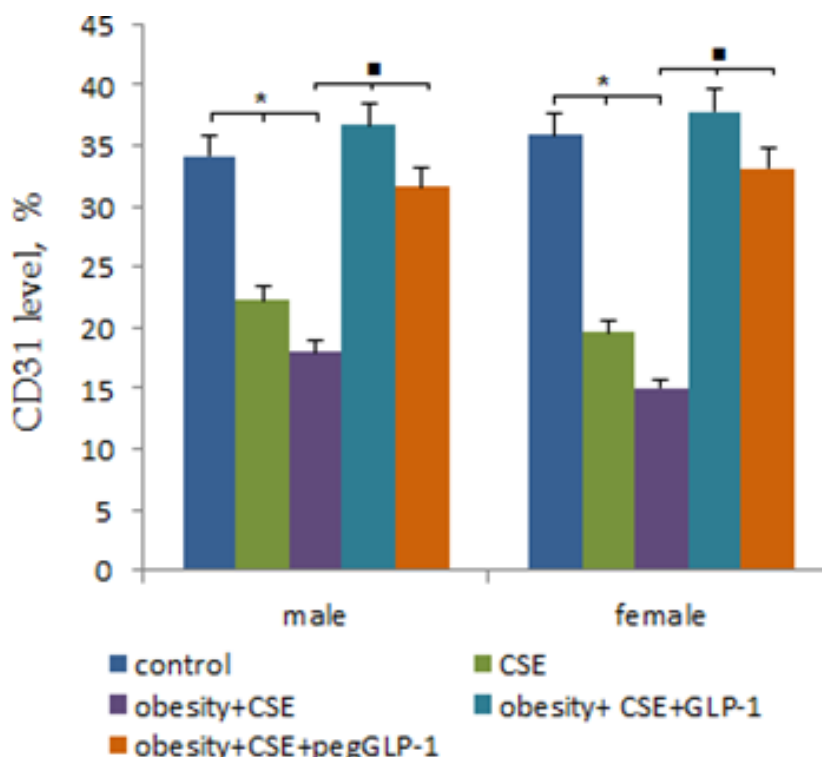
**Рис. 10.** Влияние глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и пегилированного GLP-1 (pegGLP-1) на индекс массы тела (ИМТ) и индекс Ли самцов и самок мышей C57BL/6 на 189 сутки: (а) ИМТ (г/см<sup>2</sup>); (б) Индекс Ли. Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения GLP-1, ожирение+CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ); ● – по сравнению с группой ожирения+CSE (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.



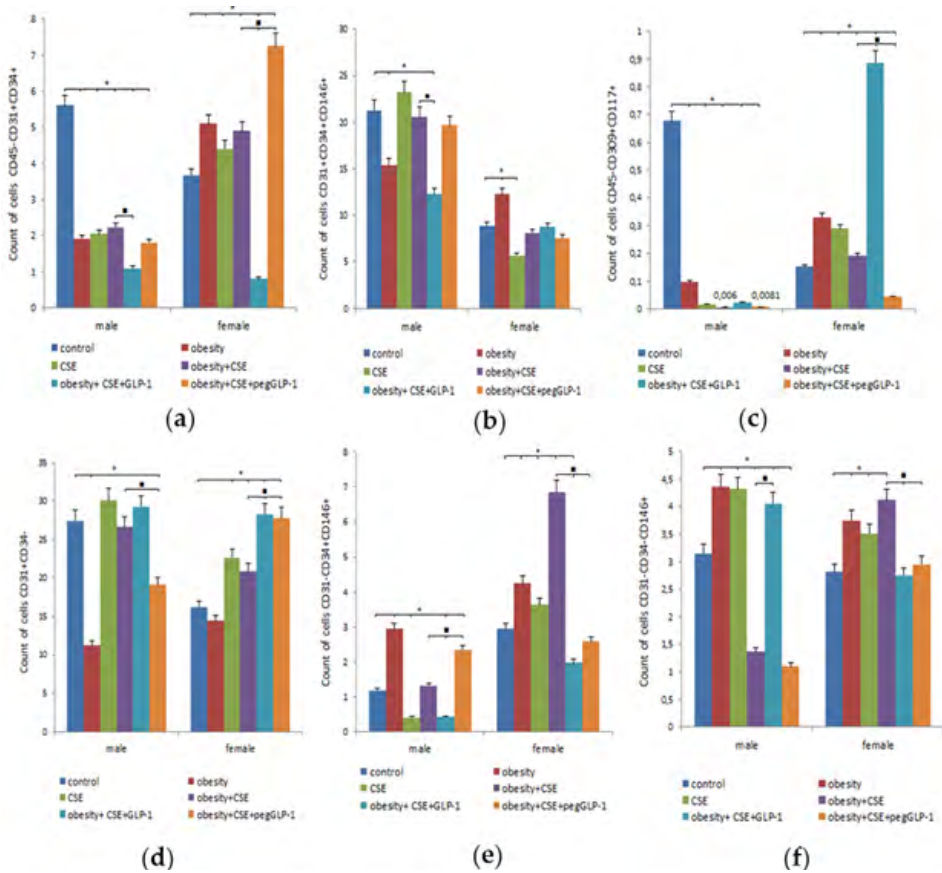
**Рис. 11.** Площадь под кривой (AUC) самок и самцов мышей C57BL/6 во время теста на толерантность к глюкозе (188 сутки). Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения GLP-1, ожирение+CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* – достоверность различий по сравнению с интактным контролем (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.



**Рис. 12.** Морфологическое исследование лёгкого, полученное от самцов и самок мышей C57BL/6 (n = 6): (a) Микрофотография срезов левого лёгкого (нижнее легочное поле) (189 сутки). Ткани окрашивали гематоксилин-эозином; (b) Область расширенной эмфиземой лёгочной ткани (нижнее легочное поле) мышей из всех групп (на 148 сутки); (c) Область расширенной эмфиземой лёгочной ткани (верхнее легочное поле) мышей из всех групп (на p); (d) Область расширенной эмфиземой лёгочной ткани (среднее легочное поле) мышей из всех групп (189 сутки); (e) Область расширенной эмфиземой лёгочной ткани (нижнее среднее легочное поле) мышей из всех групп (189 сутки). Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения GLP-1, ожирение+CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой легких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем, ● – с группой ожирение+CSE (по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.

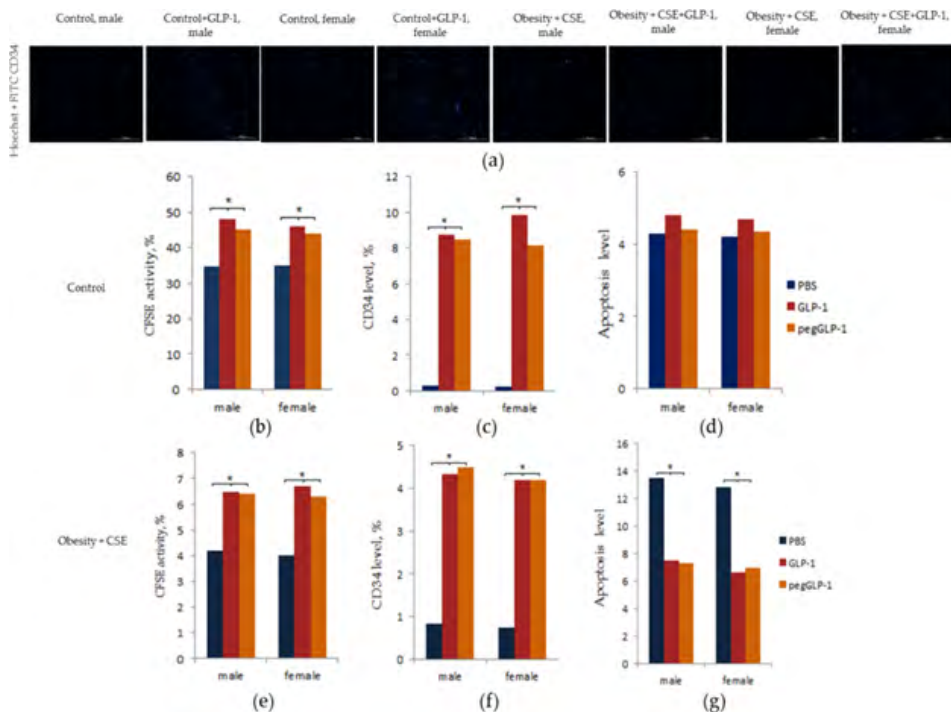


**Рис. 13.** Относительное содержание клеток, экспрессирующих антиген CD31 в лёгких, выделенных у самцов и самок мышей C57BL/6 при иммуногистохимическом окрашивании на специфический клеточный маркер: CD31 (189 сутки). Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения GLP-1, ожирение+CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой лёгких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем, • – с группой ожирение+CSE (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.

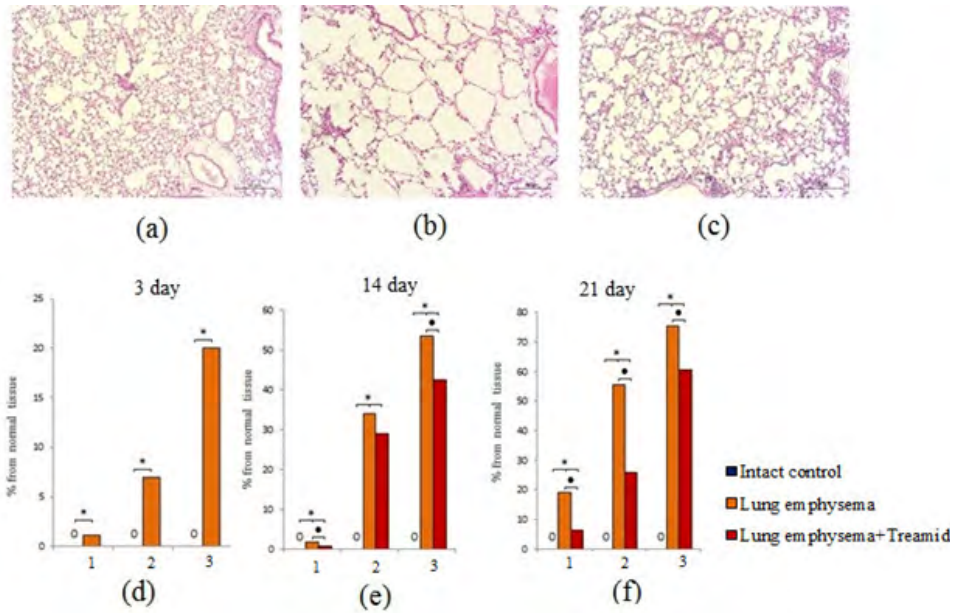


**Рис. 14.** Характеристика популяции клеток, выделенных из лёгкого самца и самки мыши C57BL/6 на 189 сутки. (a) Содержание эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) ( $CD45^+CD31^+CD34^+$ ); (b) содержание EPC ( $CD31^+CD34^+CD146^+$ ); (c) содержание предшественники ангиогенеза ( $CD45^+CD309^+CD117^+$ ); (d) содержание клеток в просвете зарождающегося сосуда ( $CD31^+CD34^+$ ); (e) содержание сосудистых гладкомышечных клеток ( $CD31^+CD34^+CD146^+$ ); (f) содержание перицитов ( $CD31^+CD34^+CD146^+$ ). Клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием антител к мышам CD31, CD34, CD45, CD146, CD117, CD309. Точечные графики являются репрезентативными для трёх независимых экспериментов со средним значением из трёх независимых экспериментов. Группы: контроль – мыши интактного контроля, ожирение – мыши с метаболическими нарушениями (МН) (ожирение и гипергликемия), CSE – мыши с эмфиземой лёгких, ожирение+CSE – мыши с МН и эмфиземой лёгких, ожирение+CSE+GLP-1 – мыши с МН и эмфиземой легких в условиях введения GLP-1, ожирение +CSE+pegGLP-1 – мыши с МН и эмфиземой легких в условиях введения pegGLP-1. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем, • – с группой ожирение+CSE (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). CSE, экстракт сигаретного дыма. Obesity, ожирение.

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике

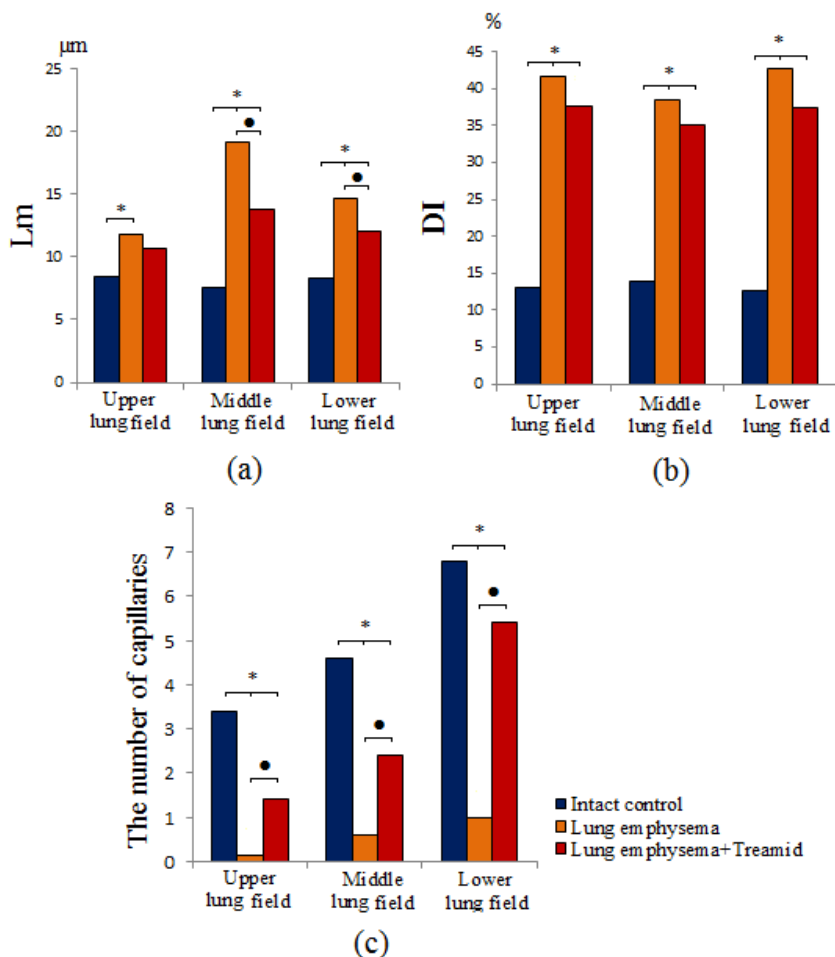


**Рис. 15.** Эффекты лечения GLP-1 и regGLP-1 на эндотелиальных клетках CD31<sup>+</sup>, выделенных из лёгких самцов и самок мышей C57BL/6 на 189 сутки. Исследование *in vitro*: (a) Изображения клеток CD31<sup>+</sup>, окрашенных: Hoechst (синий) для идентификации клеточных ядер; CD34 FITC (зелёный) (Hoechst + CD34) составное изображение с использованием всех двух цветов. Все шкалы равны 100 м; (b–g) Эндотелиальные клетки CD31<sup>+</sup> из лёгких предварительно культивировали в течение 5 дней, инкубировали с GLP-1 ( $10^{-7}$  M) или без GLP-1 ( $10^{-7}$  M) или regGLP-1 ( $10^{-7}$  M) в течение 24 ч и затем метили Hoechst, сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) (b, e) CD34 FITC (c, f), Аннексин V и 7-аминоактиномицин D (7-AAD) (d, g) перед флуоресцентным микроскопическим анализом. (b) активность CFSE после культивирования клеток, выделенных из лёгкого интактных мышей; (c) уровень клеток CD34<sup>+</sup> после культивирования клеток, выделенных из лёгкого интактных мышей; (d) количество клеток с апоптозом после культивирования клеток, выделенных из лёгкого интактных мышей; (e) активность CFSE после культивирования клеток, выделенных из лёгкого мышей с MD и эмфиземой легких; (f) уровень клеток CD34<sup>+</sup> после культивирования клеток, выделенных из легкого мышей с MD и эмфиземой лёгких; (g) количество клеток с апоптозом после культивирования клеток, выделенных из лёгкого мышей с MD и эмфиземой легких. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).



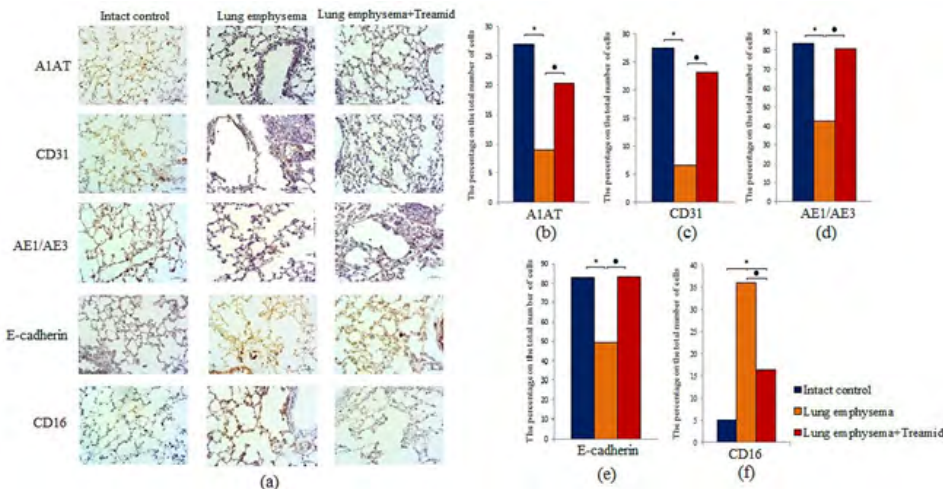
**Рис. 17.** Микрофотографии срезов лёгкого (среднее легочное поле), полученных от мышшей-самок линии C57BL/6 интактного контроля (a, Intakt control), мышшей с эмфиземой легких, вызванной введением эластазы (b, Lung emphysema) и мышшей с эмфиземой легких в условиях введения Триамида (c, Lung emphysema+Treamid). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$ . Препараты изготовлены на 21 сутки эксперимента. Содержание соединительной ткани в легких мышшей в условиях эмфиземы на 3 (d), 14 (e) и 21 (f) сутки эксперимента. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с группой «Intakt control» ( $p < 0,05$ ); ● – с группой «Lung emphysema» ( $p < 0,05$ ) (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).

**Хроническая обструктивная болезнь лёгких:  
перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике**

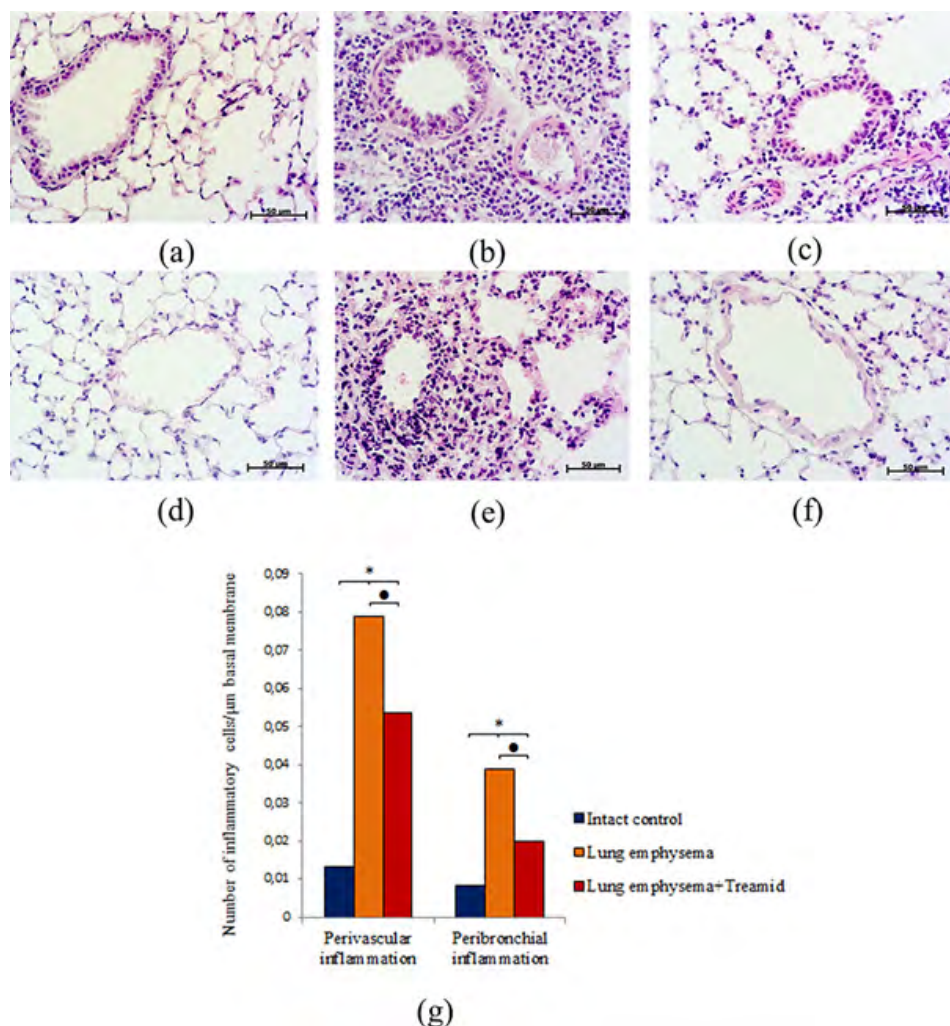


**Рис. 18.** Средний линейный перехват (Mean linear intercept, Lm) у мышей-самок интактного контроля (Intakt control), мышей с эмфиземой лёгких (Lung emphysema), вызванной введением эластазы и мышей с эмфиземой лёгких в условиях введения Триамида (Lung emphysema+Treamid), для верхнего, среднего и нижнего лёгочного поля (а). Деструктивный индекс (Destructive index, DI) у мышей интактного контроля, мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы и мышей с эмфиземой лёгких, пролеченных Триамидом для верхнего, среднего и нижнего лёгочного поля (б). Количество капилляров (в 5 полях зрения) в верхнем, среднем и нижнем лёгочном поле у мышей интактного контроля, мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы и мышей с эмфиземой лёгких в условиях введения Триамида на 21 сутки эксперимента (с). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).

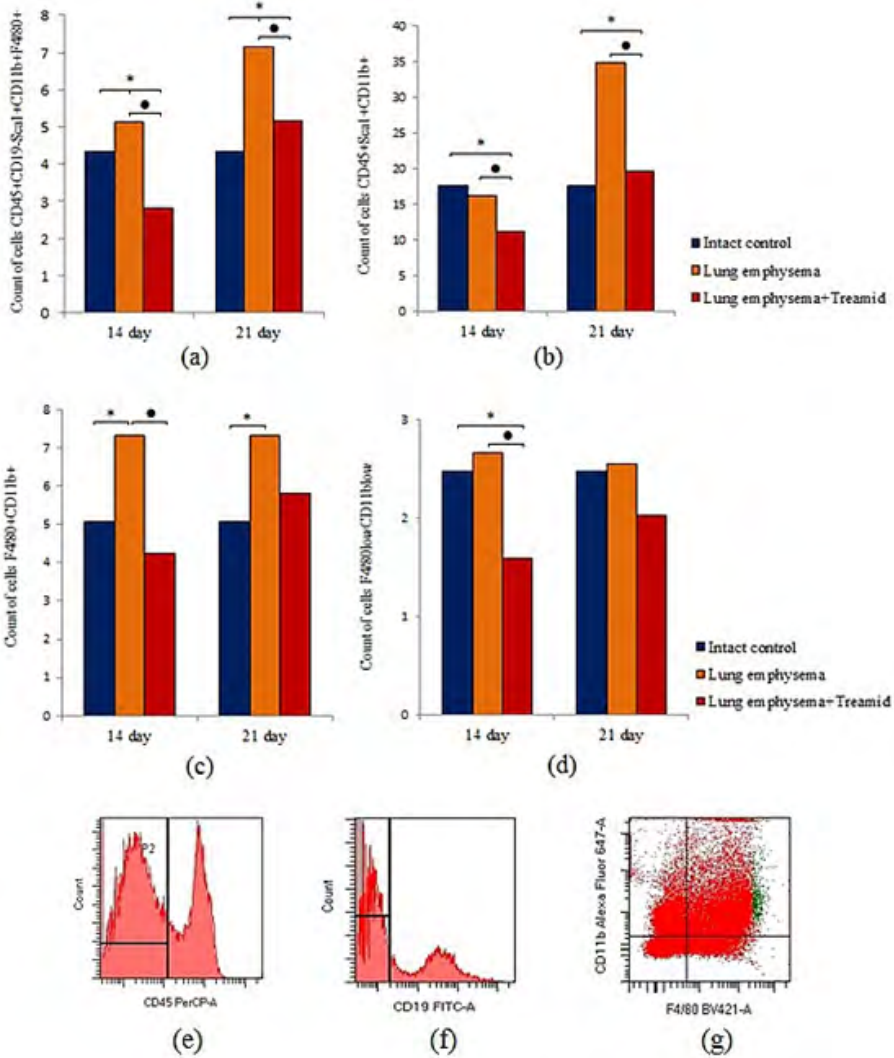




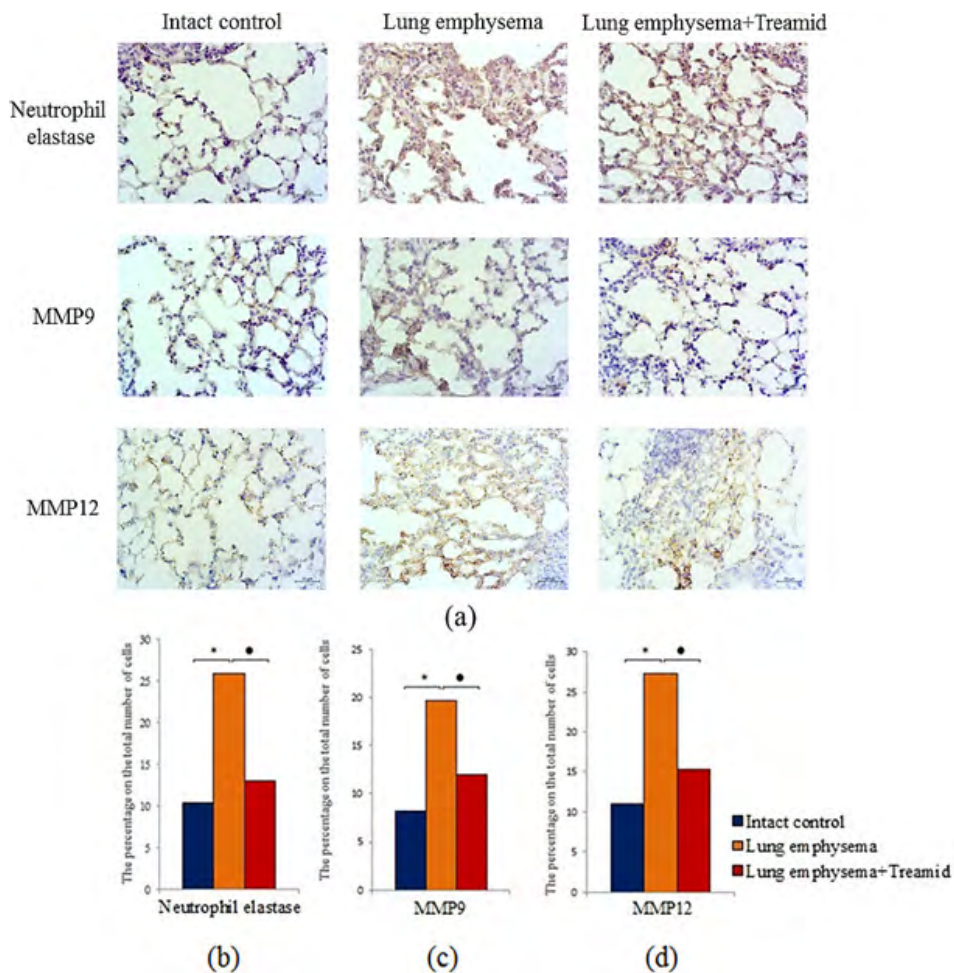
**Рис. 19.** Иммуногистохимическое окрашивание (коричневая окраска) на специфические клеточные маркеры:  $\alpha$ 1-антитрипсин (A1AT), CD31, панцитокератин (AE1/AE3), E-кадгерин, CD16 в лёгких мышей C57BL/6 (a). Относительное содержание клеток, экспрессирующих антигены альфа-1 антитрипсина (A1AT) (b), CD31 (c), пан-цитокератина (AE1/AE3) (d), E-кадгерина (e) и CD16 (f) в лёгких мышей интактного контроля («Intact control»), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой в условиях введения Триамида («Lung emphysema+Treamid»), выделенных от самцов мышей C57BL / 6 при иммуногистохимическом окрашивании на специфический клеточный маркер: альфа-1 антитрипсин, CD31, пан-цитокератин, E-кадгерин и CD16, (21 сутки эксперимента). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).



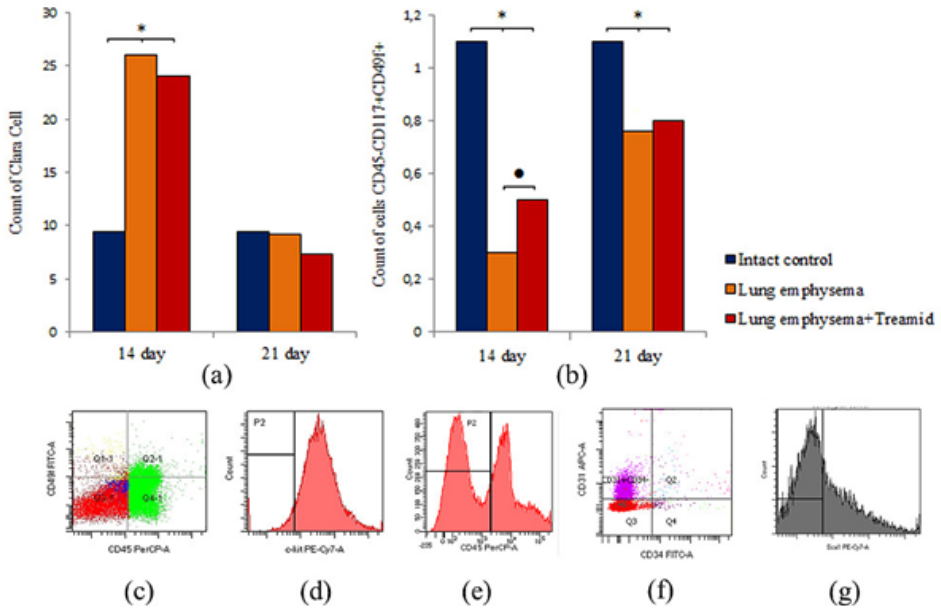
**Рис. 20.** Микрофотографии срезов легкого (среднее лёгочное поле), полученных от мышей-самок линии C57BL/6 интактного контроля (a, d, Intakt control), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы (b, e, Lung emphysema) и мышей с эмфиземой лёгких в условиях введения Триамида (c, f, Lung emphysema+Treamid). Перебронхальное (a, b, c) и периваскулярное (d, e, f) воспаление в легочной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 400$ . Препараты изготовлены на 21 сутки эксперимента. Количественная оценка воспаления на гистологических препаратах лёгких (g). Общий индекс воспаления (количество клеток воспаления /  $\mu\text{m}$  базальной мембраны) был определен во всех трёх группах. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).



**Рис. 21.** Характеристика популяции клеток воспаления CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> и F4/80<sup>low</sup>CD11b<sup>low</sup>, выделенных из лёгких мышей самок C57BL/6 на 21 сутки эксперимента. Клетки анализировали проточной цитометрией с использованием антител CD45, CD19, CD11b, Sca1, F4/80. Точечные графики представляют три независимых эксперимента со средним значением из трёх независимых экспериментов. Содержание клеток воспаления CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (a) CD45<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (b), F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (c) и F4/80<sup>low</sup>CD11b<sup>low</sup> (d) в лёгких мышей интактного контроля («Intact control»), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой в условиях введения Триамида («Lung emphysema+Treamid»). Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни (p < 0,05)). (e) Установление фенотипа и качественный анализ CD45 (PerCP). (f) Установление фенотипа и качественный анализ CD19 (FITC). (g) установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD11b (Alexa-647) и F4/80 (BV421).

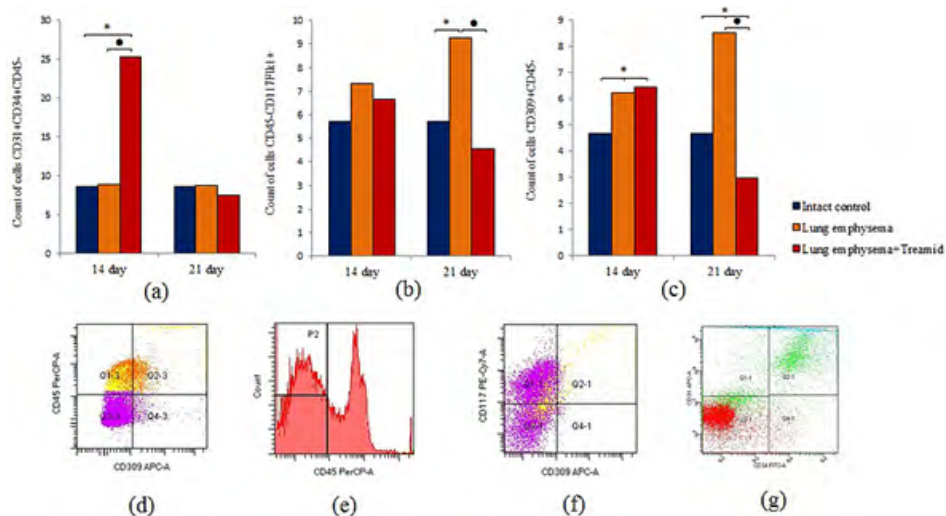


**Рис. 22.** Иммуногистохимическое окрашивание (коричневая окраска) на специфические клеточные маркеры: нейтрофильная эластаза, ММП9 и ММП12 в лёгких мышей C57BL/6 (а). Относительное содержание клеток, экспрессирующих антигены нейтрофильной эластазы (b), ММП9 (c) и ММП12 (d) в лёгких мышей интактного контроля («Intact control»), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой в условиях введения Триамида («Lung emphysema +Treamid»), выделенных от самцов мышей C57BL/6 при иммуногистохимическом окрашивании на специфический клеточный маркер: нейтрофильная эластаза, ММП9, ММП12 (21 сутки эксперимента). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).

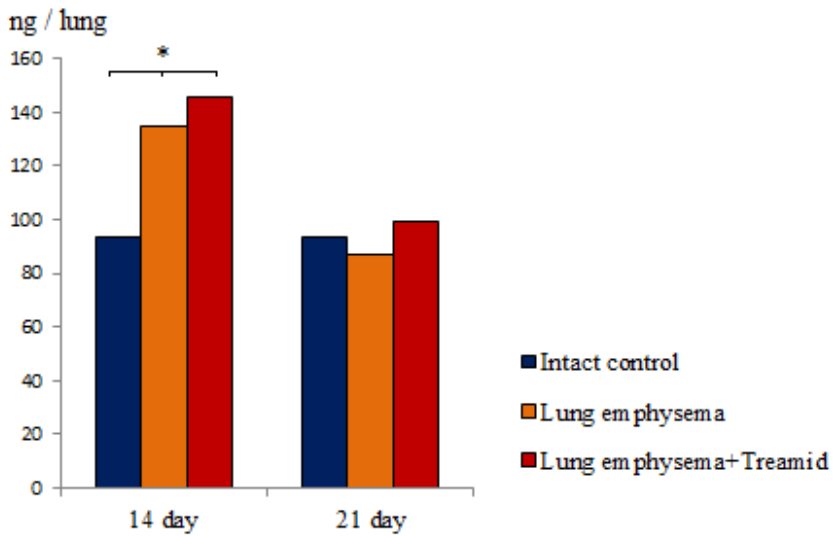


**Рис. 23.** Характеристика популяции клеток Клара ( $CD45-CD31-CD34-Sca1^+$ ) и стволовых клеток лёгких ( $CD45-CD117^+CD49f^+$ ), выделенных из лёгких мышей самок C57BL/6 на 21 сутки эксперимента. Клетки анализировали проточной цитометрией с использованием антител CD31, CD34, CD45, CD49f, CD117 (c-kit), Sca1. Точечные графики представляют три независимых эксперимента со средним значением из трёх независимых экспериментов. Содержание клеток Клара (a), стволовых клеток лёгких  $CD45-CD117^+CD49f^+$  (b) в лёгких мышей интактного контроля («Intact control»), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой лёгких в условиях введения Триамида («Lung emphysema+Treamid»). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; • – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). (c) установление фенотипа и качественный анализ CD45 (PerCP) и CD49 (FITC). (d) установление фенотипа и качественный анализ CD117 (c-kit) (PE-Cy7). (e) установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD45 (PerCP). (f) установление фенотипа и качественный анализ CD34 (FITC) и CD31 (APC). (g) установление фенотипа и качественный анализ экспрессии Sca1 (PE-Cy7).

## Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике



**Рис. 24.** Характеристика популяций эндотелиальных прогениторных клеток  $CD31^+CD34^+CD45^-$  и  $CD309^+CD45^-$ , клеток предшественников ангиогенеза  $CD45-CD117^+Flk1^+$ , выделенных из лёгких мышей самок C57BL/6 на 21 сутки эксперимента. Клетки анализировали проточной цитометрией с использованием антител CD45, CD31, CD34, CD117, CD309 (Flk1). Точечные графики представляют три независимых эксперимента со средним значением из трёх независимых экспериментов. Содержание эндотелиальных прогениторных клеток  $CD31^+CD34^+CD45^-$  (a), клеток предшественников ангиогенеза  $CD45-CD117^+Flk1^+$  (b), эндотелиальных клеток  $CD309^+CD45^-$  (c) в лёгких мышей интактного контроля («Intact control»), мышей с эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой в условиях введения Триамида («Lung emphysema+Treamid»). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем; ● – с группой «Lung emphysema» (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )). (d) установленные фенотипа и качественный анализ CD45 (PerCP) и CD309 (APC). (e) установление фенотипа и качественный анализ CD45 (PerCP). (f) установление фенотипа и качественный анализ экспрессии CD117 (PE-Cy7) и CD309 (APC). (g) установление фенотипа и качественный анализ CD34 (FITC) и CD31 (APC).



**Рис. 25.** Содержание протеина клеток Клара в гомогенате лёгких мышей линии C57BL/6 интактного контроля («Intact control»), мышей эмфиземой лёгких, вызванной введением эластазы («Lung emphysema»), и мышей с эмфиземой в условиях введения Триамида («Lung emphysema +Treamid») на 21 сутки эксперимента. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверные различия \* – с интактным контролем (по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ )).

А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, Э.С. Пан

**ХРОНИЧЕСКАЯ  
ОБСТРУКТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ ЛЁГКИХ:  
ПЕРСПЕКТИВЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ  
РЕГУЛЯЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
В КЛИНИКЕ**

Формат 70x100 1/16

Гарнитура Times

Усл.-п. л. 20,15. Уч.-изд. л. 15,5

Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Публикуется в авторской редакции

Верстка и печать – УНИД РАН

Отпечатано в экспериментальной цифровой типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета  
Российской академии наук (НИСО РАН) от 01.02.2022 г.  
и распространяется бесплатно