

На правах рукописи

СТЕПАНОВА

Инна Эрнестовна

**ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ И АНТИФИБРОТИЧЕСКИЙ
ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ
ЦИПРОГЕПТАДИНА И КЕТАНСЕРИНА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПНЕВМОФИБРОЗЕ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

14.03.03 – патологическая физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, заслуженный деятель
науки РФ

Дыгай Александр Михайлович

доктор медицинских наук

Першина Ольга Викторовна

Официальные оппоненты:

Ваизова Ольга Евгеньевна, доктор медицинских наук, доцент,
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, кафедра фармакологии, профессор кафедры

Иванова Светлана Александровна, доктор медицинских наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-
исследовательский институт психического здоровья», лаборатория
молекулярной генетики и биохимии, руководитель лаборатории,
заместитель директора по научной работе

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-
исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины»

Защита состоится “___” _____ 2015 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном
бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт
фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»
(634028, г. Томск, пр. Ленина, 3; адрес сайта <http://www.pharmso.ru>)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного научного учреждения «Научно-
исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
имени Е.Д. Гольдберга» и на сайте: pharmso.ru

Автореферат разослан “___” _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Основным компонентом патологических процессов многих распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы, печени, легких и почек является фиброз. Фиброз выступает ведущим патологическим признаком хронических аутоиммунных заболеваний, в том числе склеродермии, ревматоидного артрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, миелофиброза, системной красной волчанки. Фиброз может влиять на опухолевую инвазию и метастазирование, хроническое отторжение трансплантата и многие прогрессирующие миопатии. Независимо от этиологии и тканевой принадлежности общая формула фиброза – накопление молекул экстрацеллюлярного матрикса, представляющих собой рубцовую ткань, что, в конечном итоге, приводит к нарушению архитектуры ткани и полиорганной недостаточности [Gribbin J., Hubbard R.B, Jeune I.L. et al., 2006; Fernandez Perez E.R., Daniels C.E., Schroeder D. R. et al., 2010; Wynn T. A., 2011; Borthwick L.A., Wynn T.A., Fisher A.J., 2013]. Это делает фиброз одной из основных причин смертности во всем мире.

Триггером, способным запустить развитие фиброзной болезни, выступают наследственные генетические нарушения, многократные воздействия токсинов, курение, хроническое аутоиммунное воспаление, реакция трансплантат против хозяина при терапии донорскими клетками, инфаркт миокарда, высокий уровень холестерина в сыворотке крови, ожирение, диабетические нарушения и гипертония [Wynn T.A., 2008]. Хроническое воспаление играет важную роль в инициации фиброза [Spesa S. et al., 2012]. Важность клеток воспаления в поддержании легочного фиброза у животных и людей не подвергается сомнению. После повреждения альвеолярного эпителия нейтрофилы, а позднее макрофаги мигрируют к травмированной ткани, очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, при этом продуцируют различные цитокины и хемокины, в том числе, провоспалительные и профибротические [Bringardner B.D., Baran C.P., 2008]. Так, интерлейкин-1 β (IL-1 β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), IL-13 и трансформирующий фактор роста β (TGF- β) увеличивают количество клеток воспаления в области травмы и вызывают пролиферацию резидентных фибробластов. Потенциальным источником клеток воспаления в легких может выступать костный мозг. Костномозговые гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и прогениторные гемопоэтические клетки генерируют макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и другие клетки крови [Воробьев А.И., 2002]. При патологии системы крови ГСК вовлекаются в регенерацию костного мозга [Воробьев А.И., 2002; Дыгай А.М. и др., 2015]. Предполагается участие костномозговых стволовых клеток в инфекционном воспалении [Kolb-Mäurer A. et al., 2004; Ueda Y., Kondo M., Kelsoe G., 2005; Nagai Y. et al., 2006; Massberg S. et al., 2007; Jaiswal S. et al., 2009; Rodriguez S. et al., 2009; Baldrige M.T. et al., 2010; De Luca K. et al., 2009; Scumpia P.O. et al. 2010; Esplin B.L. et al., 2011].

Между тем, вопрос о роли ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в легочном воспалении при травмах мало изучен. Не исключено, что при пневмофиброзе чувствительность костномозговых ГСК к иммунной сигнализации повышается, и ГСК может выступать потенциальным звеном патогенеза воспаления в легких и участвовать в реализации негативного сценария пневмофиброза.

Хронические фиброзные заболевания печени, желудка, сердца и легких имеют в своей основе серотониновую составляющую. Локальная секреция серотонина тромбоцитами и тучными клетками может оказывать дополнительное вазоактивное действие на легочную артерию после травмы [MacLean M.R. et al., 2010]. Наряду с тромбоцитами и тучными клетками серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) синтезируют и секретируют легочные нейроэндокринные клетки [Johnson D.E., Georgieff M.K., 1989]. Сужая легочную артерию, 5-НТ вызывает бронхоспазм и стимулирует гиперпластические и гипертрофические изменения в клетках гладких мышц и миофибробластах. Этот эффект серотонина может инициировать склеротическое ремоделирование в легочных сосудах и/или дыхательных путях. Подтверждением связи фиброза легких и серотонина является повышение экспрессии 5-НТ1А/В и 5-НТ2В в легких у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ) и неспецифической интерстициальной пневмонией [Konigshoff M. et al., 2010]. При воспалении 5-НТ привлекает и удерживает лейкоциты в месте травмы, оказывает хемотаксическое действие на тучные клетки и эозинофилы [Boehme S.A. et al., 2004; Kushnir-Sukhov N.M. et al., 2006]. Амин через 5-НТ3, 5-НТ4 и 5-НТ7 рецепторы стимулирует секрецию IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 p40 и TNF- α моноцитами человека, предварительно обработанных липополисахаридами (ЛПС) [Durk T. et al., 2005]. 5-НТ ингибирует апоптоз моноцитов с помощью 5-НТ1 и 5-НТ7 рецепторов, что сохраняет моноциты в тканях и способствует воспалению [Soga F. et al., 2007]. ИЛФ сопровождается повышенной экспрессией 5-НТ2А рецепторов на фибробластах и 5-НТ2В рецепторов на эпителиальных клетках в легких. Исследования *in vitro* показали митогенное и профибротическое влияние серотонина на некоторые клоны мезенхимальных клеток. В частности, серотонин усиливает активность пролиферации фибробластов и миофибробластов в культуре легочных артерий у крыс при гипоксии [Lee S.L. et al., 1994; Welsh D.J. et al., 2004]. Исходя из этого, нам видится перспективным тактика использования антагонистов серотониновых рецепторов для блокады мезенхимальной составляющей фиброза легких.

Принимая во внимание вышеизложенное, является актуальным изучение фармакологических эффектов препаратов с антисеротониновой активностью, а так же механизма их действия, связанного со стволовыми и прогениторными клетками гемопоэтического и мезенхимального происхождения, в условиях пневмофиброза.

Степень разработанности. По оценкам зарубежных экспертов около

45% всех случаев смерти могут быть отнесены к заболеваниям, где фиброз играет важную патогенетическую роль. Подобный тренд отмечается специалистами Российской Федерации. Это ставит фиброз в ряд ведущих и не разрешенных до сих пор проблем современной медицины. За последние 10 лет были достигнуты существенные успехи в понимании патогенеза ИЛФ. Акцент с преимущественно провоспалительной компоненты заболевания сместился в сторону фибробластического процесса, нефизиологического ремодулирования тканей, чрезмерного накопления белков внеклеточного матрикса (коллагена) и ангиогенеза. Однако ни Европейское медицинское агентство (European Medicines Agency, ЕМЕА) и Северо-американское агентства (FDA) по лекарственным средствам, ни соответствующие структуры в других ведущих странах мира, в том числе Китае, России и Японии, на настоящий момент не могут предложить эффективную антифибротическую терапию. Активно внедряемый в клиническую практику препарат для лечения ИЛФ пирфенидон замедляет, но не останавливает фиброз, применение его вызывает различные побочные эффекты. Это подчеркивает настоятельную необходимость поиска новых методов лечения фиброза.

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

На настоящий момент, рынок лекарственных средств представлен достаточным количеством препаратов, антагонистов серотониновых рецепторов, хорошо зарекомендовавших себя в клинической практике. В случае обнаружения высокой антифибротической активности на моделях экспериментального фиброза легких эти лекарственные средства не потребуют масштабных финансовых и временных затрат для внедрения в практику, как в случае новых молекул. Ни один из известных препаратов этой группы в качестве потенциального антифибротического средства для лечения пневмофиброза не исследовался.

Цель исследования. Изучить противовоспалительную и антифибротическую активности ципрогептадина и кетансерина, а также механизм их действия при пневмофиброзе.

Задачи исследования:

1. В условиях блеомициновой травмы альвеолярного эпителия исследовать возможность коррекции ципрогептадином и кетансерином воспалительной реакции в легких.
2. Изучить антифибротическую активность ципрогептадина и кетансерина при легочном фиброзе.
3. Исследовать действие ципрогептадина на морфологически распознаваемые клетки крови, гемопоэтические стволовые клетки и прогениторные гемопоэтические клетки при пневмофиброзе.
4. Оценить состояние клеток мезенхимального происхождения в условиях коррекции пневмофиброза ципрогептадином и кетансерином.

Научная новизна работы. В работе на модели блеомициновой травмы альвеолярного эпителия показано, что ципрогептадин и кетансерин препятствуют развитию воспаления и фиброза в легочной ткани у мышей линии C57BL/6. Противовоспалительная и антифибротическая активности ципрогептадина превосходят таковые у кетансерина. Гистологические эффекты ципрогептадина и кетансерина сопровождается ингибированием стволовых и прогениторных клеток гемопоэтического и мезенхимального происхождения.

Из результатов исследований следует, что в условиях однократной интратрахеальной инстилляцией блеомицина ципрогептадин более выражено, чем кетансерин снижает уровни IL-1 β и TGF- β в гомогенатах легких (3-и сутки), при этом уровень сывороточного TNF- α под влиянием ципрогептадина повышается до значений интактного контроля и остается низким в случае назначения кетансерина. По данным гистологических исследований препараты препятствуют инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов лимфоцитами, нейтрофилами и плазматическими клетками в воспалительную фазу пневмофиброза (7-е сутки), анализ поверхностных маркеров указывает на уменьшение количества CD45⁺-клеток в тканях легких в фибротическую фазу болезни (21-е сутки).

В воспалительную фазу пневмофиброза ципрогептадин сокращает популяции CD34⁻ГСК и CD34⁺ГСК, гемопоэтических прогениторных клеток (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺) в поврежденных блеомицином легких, и увеличивает их число в костном мозге. Дополнительной характеристикой действия ципрогептадина выступает тот факт, что при его введении уменьшается количество нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге и периферической крови, наблюдается падение клональной активности костномозговых, селезеночных и циркулирующих в крови гемопоэтических прогениторных клеток (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г, КОЕ-Э).

Препараты снижают уровни общего коллагена, коллагена I типа, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в гомогенатах легких, и препятствуют отложению соединительной ткани в паренхиме легких у мышей в фибротическую фазу болезни (21-е сутки). Следует отметить, что ципрогептадин более эффективно препятствует накоплению гиалуроновой

кислоты и блокирует синтез коллагена в травмированных легких, чем кетансерин.

В фибротическую фазу пневмофиброза препараты уменьшают клональную активность прогениторных фибробластных клеток (КОЕ-Ф) костного мозга, селезенки и легких. Блокада кетансеринем 5-HT₂ серотониновых рецепторов сокращает популяцию клеток с иммунофенотипом мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в костном мозге и легких, уменьшает потенциал к самообновлению и активность дифференцировки в клетки стромальных линий (адипоциты, хондроциты и фибробласты) легочных МСК-подобных клеток.

Теоретическое и практическое значение работы. В условиях моделирования однократной блеомициновой травмы альвеолярного эпителия продемонстрировано, что ципрогептадин и кетансерин препятствуют развитию воспалительной реакции, нарушают синтез и отложение коллагена в легких у мышей линии C57BL/6. По противовоспалительной и антифибротической активности ципрогептадин превосходит кетансерин. Полученные результаты указывают на то, что блокаду 5-HT₂ серотониновых рецепторов следует рассматривать в качестве нового подхода лечения легочного фиброза.

Представленные в настоящем исследовании впервые вскрытые эффекты ципрогептадина и кетансерина указывают на перспективность их дальнейшего исследования в клинической практике по новому назначению – лечение легочного фиброза.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны современные высокоинформативные методологические подходы, имеющиеся в научно-исследовательских лабораториях НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. В качестве объекта исследования выступали мыши-самцы линии C57BL/6 в возрасте 8-10 недель. В исследовании использовались гистологические методы для оценки интенсивности воспаления и определения относительной площади фиброзированной ткани в легких. Цитометрический анализ поверхностных маркеров позволил определить фенотип клеток. Культуральными методами оценивали функциональную активность стволовых и прогениторных клеток различных классов и различного происхождения. ИФА позволил оценить уровни медиаторов воспаления, общего коллагена, проколлагена I типа, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в биологических жидкостях. Результаты исследования обработаны методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. На модели блеомициновой травмы альвеолярного эпителия показано, что препараты препятствуют инфильтрации альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления, гемопоэтическими стволовыми клетками (CD34⁻ГСК, CD34⁺ГСК) и прогениторными гемопоэтическими клетками (Lin⁻Sca-1⁺c-

kit⁺), снижают уровни сывороточного и легочного IL-1 β , легочного TGF- β у мышей линии C57BL/6. Ципрогептадин более выражено уменьшает концентрацию IL-1 β в легких по сравнению с кетансерином, в отличие от кетансерина нормализует уровень сывороточного TNF- α и уменьшает уровень легочного TGF- β . Одновременно с противовоспалительной активностью ципрогептадин снижает клональную активность костномозговых и циркулирующих в крови прогениторных гемопоэтических клеток (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г, КОЕ-Э), уменьшает гиперплазию костного мозга и отменяет лейкоцитоз в крови, при этом наблюдается увеличение количества CD34⁺ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в костном мозге.

2. Препараты препятствуют отложению фибротических масс в легких в условиях введения блеомицина у мышей линии C57BL/6, при этом ципрогептадин более эффективно снижает уровень общего коллагена, коллагена типа I, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в гомогенатах легких по сравнению с кетансерином. Антифибротический эффект ципрогептадина и кетансерина сопровождается ингибцией прогениторных фибробластных клеток в костном мозге, селезенке и легких.

3. При назначении кетансерина наблюдается уменьшение количества клеток с МСК-подобным иммунофенотипом (CD31⁻ CD34⁻ CD45⁻ CD44⁺ CD73⁺ CD90⁺ CD106⁺) в легких у мышей с пневмофиброзом, одновременно у мезенхимальных предшественников снижается потенциал к самообновлению и активность дифференцировки в адипоциты, хондроциты и фибробласты.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов, высокотехнологичного оборудования и адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на II-ом Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины: возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2012), IV-ом съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), 5th International Conference on Drug Discovery & Therapy (Dubai, 2013), 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (Dalian, China, 2013), 1-м Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013), 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (Haikou, China, 2014), VIII-ом Московском международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), 8th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (Busan, Republic of Korea, 2015), II-ом Международном симпозиуме «Век регенеративной медицины» (Ставрополь, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 218 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 рисунками, 23 таблицами и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 561 источник, из них 22 отечественных и 539 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. Изложены современные представления об этиологии, эпидемиологии, патогенезе и лечении идиопатического легочного фиброза (ИЛФ). Представлены результаты клинических и экспериментальных исследований гемопоэтической стволовой клетки при воспалении. Рассмотрены стратегии повышения результативности регенерации тканей стволовыми и прогениторными клетками. Последние разделы главы "Обзор литературы" посвящены роли серотонина в воспалении, фиброзе и регенерации тканей, и эффектам ципрогептадина и кетансерина.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Эксперименты выполнены на 579 мышах-самцах линии C57BL/6 в возрасте 8-10 недель. Животные 1 категории (конвенциональные линейные мыши) получены из питомника НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (ветеринарное удостоверение имеется). Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Для моделирования токсической травмы альвеолярного эпителия использовали блеомицин (Blenoxane[®]; «São Paulo», Бразилия). Повреждение легких вызывали однократным интратрахеальным введением блеомицина (80 мкг /в 30 мкл 0,9% NaCl /мышь) [Sebti S.M. et al., 1989; Chua F. et al., 2005]. В работе исследовали гидрохлорид ципрогептадин сесквигидрат («Sigma», США) и кетансерин («Sigma», США). Ципрогептадин блокирует H₁-рецепторы и серотониновые 5-HT₂ рецепторы, обладает антихолинергической активностью, оказывает влияние на ГАМК. Кетансерин селективный антагонист 5-HT₂ рецепторов.

Ципрогептадин (2 мг/кг в 100 мкл 0,9% NaCl) и кетансерин (1,5 мг/кг в 100 мкл 0,9% NaCl) вводили внутривентриально через 3 ч и на 1, 3, 6, 7, 13-21-й день после однократного интратрахеального введения блеомицина.

Контрольным животным во всех сериях экспериментов в аналогичных условиях вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Фоновые показатели получали при использовании интактных животных.

Гистологическое исследование ткани легких выполняли по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону [Лилли Р., 1969; Меркулов Г.А., 1969]. Клеточный состав периферической крови и костного мозга определяли стандартными гематологическими методами [Гольдберг Е.Д. и др., 1992]. Экспрессию мембранных рецепторов анализировали с использованием мышинных моноклональных антител («BD Biosciences», США). Иммуноферментным твердофазным методом с использованием набора для лабораторной диагностики мышей методом иммуноферментного анализа (Cusabio Biotech CO., LTD, Китай) изучали уровни гидроксипролина, коллагена типа I, гиалуроновой кислоты и общего коллагена в гомогенате легкого, и уровни IL-1 β , TGF- β и TNF- α в сыворотке крови и гомогенате легкого. Для определения клональной активности CD45⁺- и CD45⁻-клеток костного мозга, крови, селезенки и легких использовали методы культуры клеток [Гольдберг Е.Д. и др., 1992; Skurikhin E.G. et al., 2014]. Исследовали формирование колониеобразующих единиц недифференцированного (КОЕ-Н), гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарного (КОЕ-ГЭММ), гранулоцитарного (КОЕ-Г), эритроидного (КОЕ-Э) и фибробластного (КОЕ-Ф) типа. Дополнительным методом количественной оценки гемопоэтических стволовых клеток выступал метод лимитирующих разведений [Ventura G.J., Hester J.P., Stephen E. et al., 1990; Хмелевская Е.С., 2011]. В условиях длительного культивирования оценивали способность мезенхимальных стволовых клеток легких к самоподдержанию [Mensing N. et al., 2011; Скурихин Е.Г. и др., 2012]. Изучали дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток легких в клетки стромальных линий: остеобласты, адипоциты, хондроциты и фибробласты [Pershina O., Skurikhin E., Khmelevskaya E., 2012]. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием программы статистики SPSS 12,0 и пакета статистических программ «Statistica 8.0». Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5% ($P < 0,05$). Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному. В случаях нормального распределения признаков для статистической оценки применяли параметрический t-критерий Стьюдента. При больших отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали непараметрический критерий U-критерий Уилкоксона [Гланц С., 1999; Гмурман В.Е., 2002].

В третьей главе диссертации представлены результаты собственных наблюдений. Числовые данные представлены в виде таблиц и рисунков.

На первом этапе нашей работы на модели блеомицин-индуцированного пневмофиброза изучались противовоспалительные и антифибротические эффекты ципрогептадина и кетансерина у мышей линии C57BL/6. Так, на 3 и 7-е сутки развития блеомицининдуцированного воспаления ципрогептадин препятствовал инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления (макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты, плазматические клетки) (рисунок 1). На 21-е сутки препарат уменьшал концентрацию гиалуроновой кислоты, общего коллагена, коллагена I типа и гидроксипролина в гомогенате легкого, сокращал площадь соединительной ткани у больных животных (рисунок 1; таблица 1).

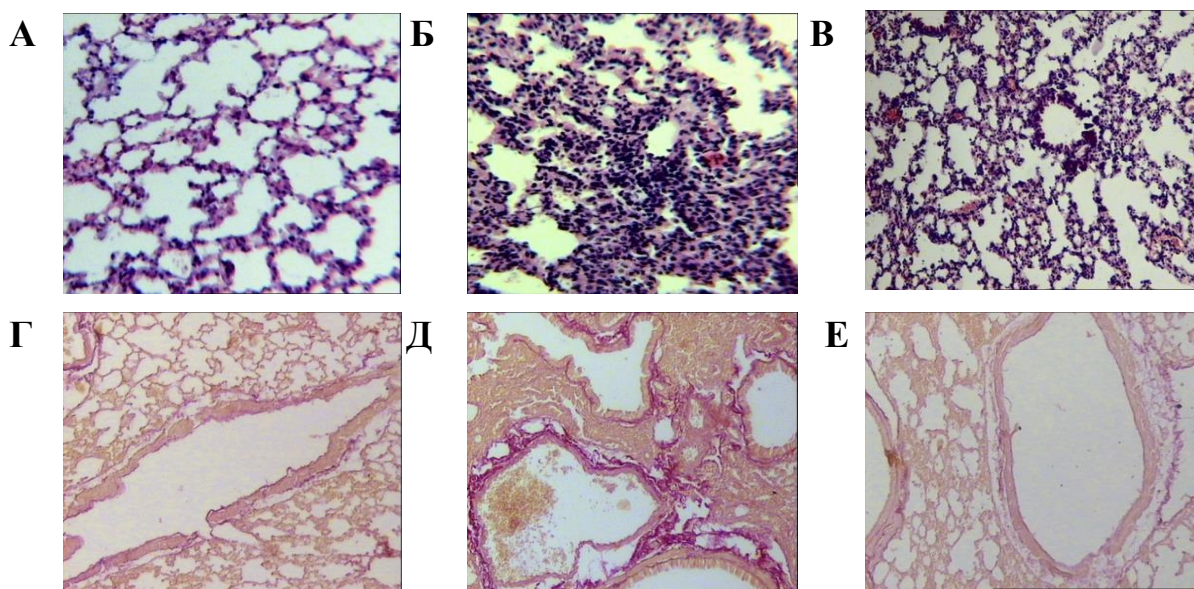


Рисунок 1 – Морфологическая картина легких мышей линии C57BL/6 интактного контроля (А, Г), в условиях пневмофиброза (Б, Д), при лечении пневмофиброза ципрогептадином (В, Е). Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, В), ув. $\times 300$, препараты изготовлены на 7-е сутки опыта; окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (Г, Д, Е), ув. $\times 100$, препараты изготовлены на 21-е сутки опыта.

Данные гистологических исследований и иммуноферментного анализа указывают на то, что при экспериментальном пневмофиброзе ципрогептадин препятствовал развитию воспаления, нарушал формирование профибротического матрикса, ингибировал синтез и отложение коллагена. Противовоспалительную и антифибротическую активность демонстрирует и кетансерин (таблицы 1, 2, 3, 4). По сравнению с ципрогептадином ингибирующее действие кетансерина на медиаторы воспаления, общий коллаген, коллаген I типа, гидроксипролин и гиалуроновую кислоту было менее выражено.

Эти результаты позволяют рассматривать препараты с антисеротониновой активностью как потенциальные лекарственные средства для лечения фиброзных заболеваний легких, в том числе ИЛФ.

Таблица 1 - Содержание соединительной ткани (% от площади ткани) в легких мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином и кетансерином ($M \pm m$)

Сроки исследования, сутки	Пневмофиброз	Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	Пневмофиброз, леченный кетансерином
Интактный контроль	1,26±0,25		
7	1,98±0,28	1,27±0,26 ●	1,24±0,13 ●
14	3,09±0,23 *	2,28±0,21 ●	
21	3,94±0,34 *	1,99±0,22 ●	2,34±0,25 * ●
25	5,33±0,54 *	3,22±0,35 * ●	

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

Как известно, на начальной стадии воспаления макрофаги и нейтрофилы не только очищают рану и элиминируют чужеродные организмы, но и продуцируют различные цитокины и хемокины (в том числе IL-1 β , TNF, IL-13 и TGF- β) [Hesse M. et al., 2001; Bringardner B.D. et al., 2008]. Т-хелперные клетки участвуют в формировании характерного для различных фиброзных состояний легкого профиля воспалительных цитокинов [Agostini C., Gurrieri C., 2006]. Элементами профиля являются IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TGF- β . TGF- β относят не только к воспалительным медиаторам, цитокин выступает индуктором миграции фибробластов вдоль границы внеклеточного матрикса [Garcia-Alvarez J. et al. 2006; Gill S.E. et al., 2008], стимулирует продукцию фибробластами коллагена [Wenzel S.E. et al., 2002; Malavia N.K. et al., 2008].

Таблица 2 - Содержание общего коллагена, коллагена I типа, гидроксипролина и гиалуроновой кислоты в легких у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансерином на 21-е сутки опыта ($M \pm m$)

Группы исследования	Коллаген I типа (нг/легкое)	Гидроксипролин (нг/легкое)	Гиалуроновая кислота (пг/легкое)	Общий коллаген (мкг/легкое)
Интактный контроль	121,1±11,7	2915±240	28054±2441	69,6±6,3
Пневмофиброз	233,3±22,4 *	8714±651 *	98948±6954 *	117,2±11,4 *
Пневмофиброз, леченный кетансерином	214,6±19,7 *	4867±389 * ●	47211±4211 * ●	109,9±9,7 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	141,8±13,5 ● ▲	3901±364 ● ▲	39541±3725 * ● ▲	79,3±7,4 ● ▲

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

В своей работе мы изучили действие ципрогептадина и кетансерина на IL-1 β , TNF- α и TGF- β . Проведенный иммуноферментный анализ биологических сред позволил выявить ряд закономерностей. Так, блеомицин снижал концентрацию TNF- α и TGF- β в гомогенате легкого и TNF- α в сыворотке (3-и сутки) (таблицы 3, 4).

В тоже время уровень сывороточных IL-1 β и TGF- β возрастал. Считается, что такое соотношение воспалительных и фибротических медиаторов выступает плохим прогностическим критерием для экспериментального фиброза в легких [Fabre A. et al., 2008]. Действительно, гистологическими методами исследования нами было показано, что на 14, 21 и 25-е сутки после инстилляций блеомицина содержание соединительной ткани в 2,45 раза и более превосходило таковое у животных интактного контроля. Лечение животных ципрогептадином снижало высокий уровень сывороточных IL-1 β и TGF- β , а также в гомогенате легкого (3-и сутки). Препарат нормализовал концентрацию TNF- α в сыворотке крови.

Таблица 3 - Уровни IL-1 β , TGF- β и TNF- α в сыворотке крови у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансеринном на 3-и сутки опыта (M \pm m)

Группы исследования	IL-1 β , pg/ml	TGF- β , ng/ml	TNF- α , pg/ml
Интактный контроль	29,6 \pm 2,8	0,6 \pm 0,05	48,3 \pm 4,3
Пневмофиброз	160,4 \pm 15,4 *	30,2 \pm 2,7 *	18,3 \pm 1,5 *
Пневмофиброз, леченный кетансеринном	95,8 \pm 8,8 *●	8,6 \pm 1,2 *●	18,8 \pm 1,5 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	118,9 \pm 10,3 *●	11,2 \pm 0,9 *●▲	49,8 \pm 4,7 ●▲

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

Представленные выше результаты позволяют сделать вывод о том, что одним из механизмов выявленных гистологических эффектов ципрогептадина может выступить нарушение соотношения воспалительных и фибротических медиаторов. В частности, ингибирующее действие ципрогептадина на IL-1 β и TGF- β , по всей видимости, влечет за собой нарушение хоминга клеток воспаления в легкие и миграции их во внеклеточном матриксе, ингибицию синтеза коллагена фибробластами.

Обращало на себя внимание то обстоятельство, что кетансерин был менее эффективен в отношении IL-1 β , TNF- α и TGF- β по сравнению с ципрогептадином (таблицы 3, 4). Кетансерин – антагонист 5-HT $_2$ серотониновых рецепторов. Ципрогептадин кроме блокады серотониновых рецепторов, блокирует адренергические и H $_1$ -гистаминовые рецепторы. Вероятно, с этим связано более выраженные изменения концентрации медиаторов в биологически активных жидкостях при лечении ципрогептадином.

Таблица 4 - Уровни IL-1 β , TGF- β и TNF- α в гомогенатах правой доли легкого у мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза ципрогептадином или кетансерином на 3-и сутки опыта (M \pm m)

Группы исследования	IL-1 β , pg/ml	TGF- β , ng/ml	TNF- α , pg/ml
Интактный контроль	517,2 \pm 50,3	81,8 \pm 8,4	75,2 \pm 7,1
Пневмофиброз	561,2 \pm 55,9	57,9 \pm 4,8 *	46,1 \pm 3,7 *
Пневмофиброз, леченный кетансерином	287,6 \pm 24,4 *●	70,6 \pm 8,6	47,5 \pm 4,4 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	64,2 \pm 6,2 *●▲	26,5 \pm 2,3 *●▲	44,6 \pm 4,1 *

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

При бактериальной и вирусной инфекциях регистрируется увеличение костномозговой фракции ГСК [Rodriguez S. et al., 2009; Scumpia P.O. et al. 2010]. Такое поведение костномозговых ГСК S.Jaiswal с коллегами (2009) связывают с медиаторами воспаления (IL-1 β , TNF- α и TGF- β). Некоторые авторы не исключают изменение активности и направления дифференцировки ГСК под воздействием медиаторов воспаления [Baldrige M.T. et al., 2010]. В настоящей работе изучение гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток в фазу воспаления методами проточной цитометрии позволило обнаружить расширение фракции «коротко живущих» ГСК (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺) в легочной ткани (7-е сутки) (таблица 5). Как известно, источником ГСК выступает костный мозг. По нашим данным блеомицин не влиял на костномозговые ГСК и прогениторные гемопоэтические клетки.

С помощью культуральных методов выявлено возрастание клональной активности гранулоцито-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных (3-и сутки), эритроидных (3-и сутки) и гранулоцитарных (3, 7, 14, 21-е сутки) клеток-предшественников в костном мозге, селезенке и крови.

Таким образом, для блеомицин-индуцированного воспаления характерна активация прогениторных гемопоэтических клеток в костном мозге. С увеличением количества гемопоэтических предшественников с высокой митотической активностью мы связываем активацию костномозгового гемопоэза: в кроветворной ткани отмечалось достоверное повышение количества нейтрофильных гранулоцитов (3, 25-е сутки), лимфоцитов (14-е сутки) и эритрокариоцитов (14-е сутки), в периферической крови развивался лейкоцитоз (в силу накопления нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов) (3, 7, 14 и 25-е сутки).

Серотонин через 5HT₂ влияет на мегакариопоэз [Yang M. et al., 1996] и участвует в экспансии циркулирующих в крови CD34⁺ стволовых/прогениторных клеток [Yang M. et al., 2007]. В этой связи нами

не исключается, что в условиях блеомициновой травмы альвеолярного эпителия механизмом противовоспалительного эффекта ципрогептадина может быть ингибция предшественников клеток воспаления – гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток.

Таблица 5 - Содержание ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в легких мышей линии C57BL/6 в условиях пневмофиброза и при лечении пневмофиброза кетансерином или ципрогептадином на 7-е сутки опыта (% от всех окрашенных мононуклеаров) (M±m)

Группы исследования	«Длительно живущие» ГСК (Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD34 ⁻)	«Коротко живущие» ГСК (Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD34 ⁺)	Прогениторные гемопоэтические клетки (Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺)
Интактный контроль	0,020±0,002	0,005±0,0004	0,025±0,002
Пневмофиброз	0,0133±0,001 *	0,0067±0,0006 *	0,020±0,002
Пневмофиброз, леченный кетансерином	0,0067±0,0006 * ●	0,0033±0,0003 * ●	0,010±0,001 * ●
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	0,0061±0,0006 * ●	0,0029±0,0002 * ●	0,009±0,0009 * ●

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

При изучении вопроса влияния ципрогептадина на гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки выявлен ряд закономерностей. Во-первых, препарат заметно снижал количество прогениторных гемопоэтических клеток, CD34⁻ГСК («длительно живущие») и CD34⁺ГСК («коротко живущие») в легких у животных с пневмофиброзом (7-е сутки) (таблица 5). Костномозговая фракция CD34⁻ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток у леченных животных с травмой легких, напротив, расширялась. Подобные изменения были выявлены и при использовании кетансерина. По современным представлениям соотношение между CD34⁺ГСК и CD34⁻ГСК указывает на интенсивность дифференцировки ГСК. По нашим данным при пневмофиброзе это соотношение составило 1,45, при лечении ципрогептадином значение показателя снижается до 1,05, при назначении кетансерина – до 1,06. Значения соотношения указывают на то, что препараты оказывают ингибирующее действие на дифференцировку ГСК.

Во-вторых, ципрогептадин значительно сокращал количество ПСКК в костном мозге (3, 7, 14-е сутки), селезенке (7-е сутки) и крови (14-е сутки).

В-третьих, ципрогептадин снижал клональную активность костномозговых, циркулирующих в крови и селезеночных гранулоцитоэритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных КОЕ (3, 7, 14, 21-е сутки, 3,

7-е сутки и 7, 14-е сутки соответственно). Ингибиции были подвержены КОЕ-Г и КОЕ-Э костного мозга (7-е сутки и 3, 7, 14, 21-е сутки соответственно), крови (7-е сутки) и селезенки (7, 14-е сутки и 14, 21-е сутки соответственно).

В-четвертых, ципрогептадин уменьшал количество морфологически распознаваемых клеток гранулоцитарного и лимфоидного ростков кроветворения в костном мозге (3-и сутки), отменял лейкоцитоз в периферической крови (7, 14-е сутки) у мышей с диффузным пневмофиброзом.

Представленные данные культуральных исследований, проточной цитометрии, морфологии костного мозга и периферической крови позволили нам сделать следующее предположение. Вероятно, при пневмофиброзе ципрогептадин блокирует 5HTR₂ на ГСК и прогениторных гемопоэтических клетках костного мозга и таким образом снижает активность их дифференцировки в миелоидном и лимфоидном направлении. Следствием взаимодействия лиганда-рецептора выступает уменьшение клеточности гранулоцитарного и лимфоидного ростков кроветворения.

При анализе литературы мы обратили внимание на сообщения о том, что в естественных условиях TNF- α способен ингибировать пролиферацию ГСК у мышей и человека [Jacobsen S.E. et al., 1992; Jacobsen F.W. et al., 1994; Selleri C. et al., 1995; Zhang Y. et al. 1995; Rebel V.I. et al., 1999; Dybedal I. et al., 2001; Pronk C.J. et al., 2011]. TNF- α регулирует ответ ГСК на инфекционный патоген [Schuettpepel L.G., Link D.C., 2008]. В этой связи мы не исключаем, что при пневмофиброзе ингибиция дифференцировки костномозговых ГСК ципрогептадином происходит опосредовано через 5HTR₂ механизмы продукции TNF- α .

Серотонин участвует в вазоконстрикции [Nishihira K. et al., 2006; Kekewska A. et al., 2012]. Его относят к основному медиатору начальных микроциркуляторных нарушений в очаге воспаления и быстрого повышения сосудистой проницаемости. Вазоконстрикторное действие серотонина обусловлено, в том числе, взаимодействием с 5HTR₂ мембран гладкомышечных клеток [Машковский М.Д., 2006; Венгеровский А.И., 2007]. Этот процесс может блокироваться ципрогептадином и кетансерином. Кроме торможения вазоконстрикции препараты могут нарушать серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Вазоконстрикторный эффект серотонина частично обусловлен тромбоксаном А₂, высвобождающимся при агрегации тромбоцитов и лейкоцитов в участках сосуда с поврежденным эндотелием. Триггерным механизмом усиления сосудистой спазма под действия тромбоксанов служит активация 5HTR₂ на поверхности тромбоцитов. При воспалительных заболеваниях легких серотонин, сужая сосуды микроциркуляторного русла, вызывает увеличение давления в капиллярах, что на фоне повышения клеточной (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги) проницаемости усиливает трансудацию жидкости во внесосудистое

пространство легких. Этот механизм во многом объясняет массивную инфильтрацию легких «коротко живущими» ГСК [Nishihira K. et al., 2006; Kekewska A. et al., 2012].

Объяснение изменениям количества клеток воспаления и их предшественников в блеомициновых легких при назначении ципрогептадина и кетансерина нам видится в нарушении взаимодействия серотонина с 5HT₂ сосудов. Это приводит к частичному восстановлению гемодинамики в микроциркуляторном русле, уменьшению проницаемости и снятию бронхоспазма. Нельзя исключить возможное влияние антисеротониновых препаратов на микроциркуляторное русло в костном мозге. В условиях введения блеомицина этот эффект может нарушать мобилизацию из костного мозга в циркуляцию гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток.

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

Ципрогептадин обладает несколькими видами фармакологической активности. Кроме блокады серотониновых рецепторов, отмечается антигистаминная активность, аффинность молекулы ципрогептадина с дофаминовыми, адренергическими и мускариновыми рецепторами высока [Clineschmidt V.V., 1976; Remy D.C., 1977]. Препарат ингибирует калиевые (K⁺) и натриевые (Na⁺) каналы, N-тип и L-тип кальциевых (Ca²⁺) каналов [Kotake H., 1987]. С этих позиций не исключено, что основой более выраженного противовоспалительного эффекта ципрогептадина по сравнению с кетансерином выступает дополнительное действие на гистаминовые, дофаминовые, адренергические и мускариновые рецепторы, 5-HT₂ рецептор-независимое влияние на ионные каналы. В частности, антигистаминная активность препарата может привести к блокаде провоспалительных эффектов гистамина.

Клетки мезенхимального происхождения – это другая важная популяция клеток, участвующая в фиброзных изменениях в легких после блеомициновой травмы [Fabre A. et al., 2008; Skurikhin E.G. et al., 2014]. В настоящей работе, мы стремились исследовать наиболее распространенные маркеры, используемые для характеристики МСК. Легочные мезенхимальные клетки, привлеченные в легкие мышей на 21-е сутки фиброза, были охарактеризованы как CD31, CD34, CD45 отрицательные и CD44, CD73, CD90, CD106 положительные. Эта фракция относится к мультипотентным клеткам, так как в длительных культурах демонстрирует высокий потенциал к самообновлению [Skurikhin E.G. et al., 2014]. Кроме

этого, полученные в культуре МСК-подобные клетки (CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD106⁺) дифференцировались в адипоциты, хондроциты, остеобласты и фибробласты. В настоящем исследовании мы подтвердили возможность к самообновлению и дифференцировке МСК-подобных клеток *in vitro* в фибробластные клетки. Дополнительной характеристикой фибротической фазы болезни выступило накопление в легких прогениторных фибробластных клеток, способных формировать в культуре КОЕ-Ф (таблица 6).

Для терапии фиброза важен вопрос происхождения мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток в легких. Ряд исследователей указывают на то, что МСК способны мигрировать к поврежденным тканям [Ortiz L.A. et al., 2003; Le Blanc K., Pittenger M., 2005; Siniscalco D. et al., 2008; Moodley Y. et al., 2009]. В нашем исследовании помимо клональной активности легочных адгезирующих клеток мы наблюдали стимуляцию роста КОЕ-Ф в культуре адгезирующих клеток костного мозга, селезенки и крови. Эти данные косвенно указывают на то обстоятельство, что инстиляция блеомицина мобилизует прогениторные фибробластные клетки костного мозга и селезенки, которые выходят в циркуляцию в кровь и мигрируют к очагу воспаления в легких.

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

Группы	КОЕ-Ф
Интактный контроль	0
14-е сутки	
Пневмофиброз	6,25 \pm 0,45 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	2,45 \pm 0,28 * ●
Пневмофиброз, леченный кетансерином	2,84 \pm 0,47 * ●
21-е сутки	
Пневмофиброз	15,24 \pm 1,25 *
Пневмофиброз, леченный ципрогептадином	4,50 \pm 0,47 * ●
Пневмофиброз, леченный кетансерином	5,75 \pm 0,75 * ●

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

Лечение пневмофиброза ципрогептадином приводило к снижению клональной активности КОЕ-Ф костного мозга (21, 40-е сутки), крови и селезенки (21-е сутки), легких (14, 21-е сутки). Ингибция роста КОЕ-Ф в культуре адгезирующих клеток легких мышей с пневмофиброзом наблюдалась и при назначении кетансерина (таблица 6).

Итак, при пневмофиброзе ципрогептадин и кетансерин оказывают ингибирующее действие на прогениторные фибробластные клетки.

Другой важный аспект антифибротического действия ципрогептадина и кетансерина мы связываем с МСК. В настоящей работе было

продемонстрировано, что блокада препараты увеличивали количество МСК в легких (21-е сутки). Эти данные противоречат морфологическим эффектам ципрогептадина и кетансерина. Оценка МСК *in vitro* позволила выявить основу антифибротических свойств антисеротониновых препаратов. Исследовались легочные CD45⁻-клетки, полученные у больных мышей на 21-й день эксперимента. Так как ципрогептадин кроме блокады серотониновых рецепторов выступает антагонистом гистаминовых и адренергических рецепторов, а в эксперименте необходима избирательная блокада 5HT₂, в этой связи в качестве инструмента мы выбрали кетансерин.

Культуральные методы позволили выявить, что кетансерин уменьшал активность формирования монослоя из легочных CD45⁻-клеток с фибробластоподобной морфологией. При этом количество CD31⁺, CD34⁺, CD45⁻, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD106⁺ клеток в образцах опытной группы на 30% снижается по сравнению с контрольной группой. Кетансерин оказывал ингибирующее влияние и на дифференцировку МСК, полученных в результате длительного культивирования. В культурах МСК опытной группы отмечалось достоверное уменьшение доли клеток с окрашенными кислотными и ацетатными муцинами, и доли клеток с липофильными включениями по отношению к соответствующим культурам контрольной группы. Кроме этого, лечение уменьшало выход фибробластов в образцах опытной группы до уровня интактного контроля. Интенсивность остеогенной дифференцировки оставалась без изменений.

Итак, кетансерин снижает потенциал к самоподдержанию МСК при длительном культивировании, уменьшает активность дифференцировки МСК в направлении хондроцитов, адипоцитов и фибробластных клеток *in vitro*. С нашей точки зрения, этот механизм выступает основой гистологических эффектов антисеротониновых препаратов.

Подводя итог разделу нашей работы, посвященному изучению мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток, необходимо сказать о том, что легочная фракция CD45⁻ незрелых клеток мезенхимального происхождения гетерогенна. Помимо прогениторных фибробластных клеток и МСК, участвующих в фиброгенезе, фракция обогащена клетками с фенотипом (CD34, CD45, CD3, CD8, CD19)⁻ (Sca-1, CD44, CD73)⁺, способных дифференцироваться в эпителиальные клетки и, тем самым, участвовать в регенерации легочного эпителия [Bitencourt C.S. et al., 2011]. Можно предположить, что антисеротониновые препараты способствуют избирательной стимуляции дифференцировки (CD34, CD45, CD3, CD8, CD19)⁻ (Sca-1, CD44, CD73)⁺-клеток в эпителиальные клетки (мезенхимально-эпителиальный переход). Нами не исключается стимуляция кетансерином регенерации альвеолярного эпителия путем вовлечения в процесс стволовых клеток бронхиол (клетки Клара; CD45⁻ CD31⁻ CD34⁻ Sca-1^{low} AF^{low}), которые, как и изученные нами МСК и прогениторные фибробластные клетки, негативны по CD45.

Антисеротониновые препараты не только купируют серотонин-

индуцированную вазо- и бронхоконстрикцию, блокируют синтез коллагена фибробластами и продукцию TGF- β в легких [Fabre A. et al., 2008], но и ингибируют самообновление и дифференцировку легочных МСК в клетки стромальных линий, в том числе, в фибробласты, миграцию мезенхимальных предшественников в легкие. С блокадой 5HT $_2$ мы связываем ингибицию костномозговых ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток (дифференцировка, клональная активность, мобилизация в циркуляцию).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ципрогептадин, вводимый внутривенно, препятствует развитию воспалительной реакции (инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления, продукции IL-1 β и TGF- β), уменьшает концентрацию, ключевого элемента профибротического матрикса, гиалуроновой кислоты и активность синтеза и отложения коллагена в легких у мышей линии C57BL/6 при пневмофиброзе. Противовоспалительное и антифибротическое действие ципрогептадина превосходит таковое у кетансерина.

В воспалительную фазу пневмофиброза ципрогептадин уменьшает количество ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в поврежденных блеомицином легких, отменяет лейкоцитоз в крови, и увеличивает число предшественников и зрелых клеток крови в костном мозге. Кроме этого ципрогептадин уменьшает клональную активность костномозговых, циркулирующих в крови гемопоэтических прекурсоров (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г, КОЕ-Э).

В фибротическую фазу болезни ципрогептадин и кетансерин сокращают популяцию прогениторных фибробластных клеток в костном мозге, селезенке и легких. Кетансерин оказывает ингибирующее действие на самообновление и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток.

Итак, блокада 5-HT $_2$ серотониновых рецепторов снижает активность гемопоэтических и мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток, что препятствует развитию воспаления и фиброза в легких. Полученные результаты являются основой для проведения клинических исследований по новому назначению ципрогептадина с целью профилактики и лечения фиброзных заболеваний легких.

ВЫВОДЫ

1. При блеомициновой травме легких ципрогептадин и кетансерин препятствуют инфильтрации интерстиция альвеол и альвеолярных ходов клетками воспаления, гемопоэтическими стволовыми и прогениторными клетками у мышей линии C57BL/6. Препараты снижают уровни

сывороточных IL-1 β и TGF- β , при этом при назначении ципрогептадина уровень TNF- α в сыворотке крови повышается до уровня интактного контроля. Ингибирующее действие ципрогептадина на легочной IL-1 β более выражено, чем у кетансерина.

2. Противовоспалительный эффект ципрогептадина сопровождается уменьшением активности костномозгового гемопоэза и отменой лейкоцитоза в периферической крови. При лечении возрастает количество CD34⁺ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток в костном мозге, снижается способность костномозговых и циркулирующих в крови прогениторных гемопоэтических клеток формировать колонии (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Г, КОЕ-Э) *in vitro*.

3. Ципрогептадин и кетансерин препятствуют формированию профибротического матрикса, оказывают ингибирующее действие на синтез коллагена и отложению фибротических масс в интерстиции легких животных с пневмофиброзом. Ингибирующее действие ципрогептадина на общий коллаген, коллаген I типа, гидроксипролин и гиалуроновую кислоту в легких более выражено, чем у кетансерина.

4. В фибротическую фазу пневмофиброза ципрогептадин и кетансерин уменьшают клональную активность (КОЕ-Ф) прогениторных фибробластных клеток костного мозга, селезенки и легких.

5. Блокада 5-HT₂ серотониновых рецепторов кетансерином сокращает популяцию клеток с фенотипом мезенхимальных стволовых клеток в костном мозге и легких у мышей с пневмофиброзом, при этом отмечается снижение потенциала к самообновлению и активности дифференцировки в клетки стромальных линий (адипоциты, хондроциты, фибробласты) легочных МСК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дыгай, А.М. Реакции системы крови и стволовых клеток в условиях блеомициновой модели фиброза легких / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, Т.В. Андреева, Л.А. Ермолаева, Е.С. Хмелевская, О.В. Першина, В.А. Крупин, А.М. Резцова, **И.Э. Степанова**, В.Е. Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – 152, №8. – С. 132-136.

2. Скурихин, Е.Г. Влияние антисеротонинового препарата на развитие фиброза легких и систему крови при интратрахеальном введении блеомицина / Е.Г. Скурихин, Т.В. Андреева, Е.С. Хмелевская, Л.А. Ермолаева, О.В. Першина, В.А. Крупин, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, **И.Э. Степанова**, В.Е. Гольдберг, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – №4. – С. 206-211.

3. Скурихин, Е.Г. Дифференцировка мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток легких при пневмофиброзе / Е.Г. Скурихин, Е.С. Хмелевская, О.В. Першина, Н.Н. Ермакова, В.А. Крупин, А.М. Резцова, Л.А. Ермолаева, В.Д. Якушина, **И.Э. Степанова**, В.М.

Резцова, Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, А.М. Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 4. – С. 192-199.

4. Дыгай, А.М. Гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки в патогенезе пневмофиброза / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, О.В. Першина, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, Л.А. Ермолаева, В.А. Крупин, А.М. Резцова, **И.Э. Степанова** // Сборник тезисов II Российского конгресса с международным участием: Молекулярные основы клинической медицины возможное и реальное – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2012. – С.239 – 240.

5. Дыгай, А.М. Стволовая клетка, как мишень в коррекции пневмофиброза / А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, О.В. Першина, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, В.А. Крупин, А.М. Резцова, **И.Э. Степанова**, А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Д.Н. Киншт, П.Г. Мадонов // IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». Материалы съезда. – М., Казань. – 2012. – С. 61.

6. Skurikhin, E.G. The Role of Endogenous Stem Cells and Progenitor Cells in the Pathogenesis of Myelosuppression, Pneumofibrosis and Diabetes / E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, E.S. Khmelevskaya, N.N. Ermakova, V.A. Krupin, A.M. Reztsova, L.A. Ermolaeva, V.M. Reztsova, **I.E. Stepanova**, A.M. Dygai // BIT's 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells. – 2013, Dalian, China. – P.645.

7. Digay, A.M. Stem and progenitor cells in the pneumofibrosis pathogenesis /A.M. Digay, E.G. Skurikhin, O.V. Pershina, E.S. Khmelevskaya, N.N. Ermakova, A.M. Reztsova, V.A. Krupin, V.M. Reztsova, **I.E. Stepanova** // Pathogenesis. – 2013. – Vol. 11, №1. – P. 35-50.

8. Дыгай. А.М. Реакция гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, мезенхимальных стромальных клеток на введение кетансерина при пневмофиброзе /А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин, О.В. Першина, **И.Э. Степанова**, Е.С. Хмелевская, Н.Н. Ермакова, А.М. Резцова, В.А. Крупин, Д.В. Рейхарт, В.Е. Гольдберг // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2014. – Т.158, № 7. – С.25-30.

9. Skurikhin, E.G. Regulation Endogenous Stem and Progenitor Cells: a New Approach for Degenerative Diseases Treatment / E.G. Skurikhin, N.N. Ermakova, E.S. Khmelevskaya, O.V. Pershina, V.A. Krupin, A.M. Reztsova, **I.E. Stepanova**, A.M. Dygai // BIT's 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells. – 2014, Dalian, Haikou. – P.59.

10. Skurikhin, E. Investigation of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells in Experimental. Possible Ways of Regulation of the Differentiation of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells / E. Skurikhin, O. Pershina, N. Ermakova, V. Krupin, **I. Stepanova**, A. Pakhomova, A. Dygai // II International Symposium “Age of Regenerative Medicine” on Proliferation and Differentiation of human ecto-mesenchymal Stem Cells from Human Palate evaluated *in vitro* and *ex vivo*. – 2015, Stavropol Sate Medical University, Russian Federation. – P.14

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАМК – Гамма-аминомасляная кислота
ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка
ИЛФ – идиопатический легочный фиброз
КОЕ -Н, -КОЕ-ГЭММ, -Г, -Э, -Ф - колониеобразующая единица
недифференцированная, гранулоцито-эритроидно-макрофагально-
мегакариоцитарная, гранулоцитарная, эритроидная, фибробластная
МСК – мезенхимальная стволовая клетка
ПСКК – полипотентные стволовые кроветворные клетки
ЕМЕА – European Medicines Agency
FDA – Food and Drug Administration
5-НТ – 5-hydroxytryptamine (5-гидрокситриптамиин, серотонин)
5НTR₂ – 5-hydroxytryptamine receptor 2 (рецептор 5-гидрокситриптамина 2)
IL-1 α , -1 β , -4, -5, -6, -8, -9, -10, 12p40, -13, -21 – (интерлейкин) interleukin
1alpha, -1beta, -4, -5, -6, -8, -9, -10, -12p40, -13, -21
LPS – Lipopolysaccharides (липополисахарид)
TNF- α – Tumor necrosis factor alpha (фактор некроза опухоли альфа)
TGF- β – Transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста
бета)