

РЕАКЦИЯ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА ЭМФИЗЕМУ ЛЕГКИХ

Э.С.Пан, В.А. Крупин

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Е.Г. Скурихин

НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Российская Федерация, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: artifexpan@gmail.com

RESPONSE OF STEM AND PROGENITOR CELLS ON EMPHYSEMA

E.S.Pan, V.A. Krupin

Goldberg research institute of pharmacology and regenerative medicine, Russian federation, Tomsk, Lenin prospect 3, 634028.

E-mail: artifexpan@gmail.com

Abstract. We studied inflammation, proteins of extracellular matrix, stem and progenitor cells from female C57Bl/6 mice on the model of elastase-induced emphysema. It was shown that diffuse emphysema reduces the amount of endothelial (CD45-CD31+ CD34+) and epithelial cells (CD45-CD117+CD49f+), the area of the connective tissue, causes a disturbance of microcirculation. The pulmonary emphysema is accompanied by infiltration of macrophages and lymphocytes in alveolar septum. Simultaneously with inflammation in the lung we observed an increase of the count of multipotentmesenchymal stromal cells (CD45-CD90+CD73+CD106+CD44+) and overexpression of extracellular matrix proteins (hydroxyproline, connective tissue growth factor, collagen, fibronectin), Clara cell protein and Clara cells (CD45-CD34-CD31-Sca1+). On the contrary elastase reduces the count of angiogenesis progenitor (CD45-CD117+ Flk1+).

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой многофакторное заболевание легких, приводящее к тяжелым нарушениям функции дыхания. В основе прогрессирующей потери альвеолярной паренхимы при ХОБЛ лежит эмфизематозное расширение бронхиол и воспаление дыхательных путей [1]. Распространенность ХОБЛ очень высока [2]. Во многом заболевание связано с вдыханием вредных внешних агентов, хроническое и прогрессирующее течение характерно для пожилых людей (преимущественно у мужчин) [2, 3]. Наконец, для ХОБЛ отмечают повышенный риск развития рака [4].

Для ХОБЛ отмечается важность не только апоптоза альвеолярного эпителия и микрососудистых осложнений, но и недостаточной активности синтеза коллагена фибробластами [5]. Несмотря на достаточно большое количество экспериментальных и клинических исследований понимание патогенеза ХОБЛ ограничено, эффективных подходов лечения заболевания нет.

Восстановление структуры и функций многих тканей при патологии не обходится без участия биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (квалификационный сертификат имеется). Исследование одобрено Комитетом по контролю за использованием и содержанием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Мышей делили на 2 группы. В 1-ю группу вошли мыши, находившиеся в естественных условиях (интактный контроль, n=20); во 2-ю группу – животные эмфиземой легких (n=40). Эмфизему легких моделировали однократным интратрахеальным введением эластазы (Sigma, США) в дозе 0.6 Е/мышь в 30 мкл. NaCl 0,9% [7]. День операции приняли за 0 день эксперимента. Мышей выводили из эксперимента на 7 и 14 сутки эксперимента передозировкой CO₂ тканеспецифичных стволовых и

прогениторных клеток [6]. Однако при ХОБЛ вопрос регенерации эндотелия и эпителия, восполнения матриксных белков с участием соответствующих тканеспецифичных стволовых и прогениторных клеток мало изучен.

Целью настоящего исследования явилось изучение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, предшественников гемангиогенеза и клеток Клара легких при моделировании эмфиземы легких.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на 7-8-недельных мышцах-самках линии C57Bl/6 (n=60). Животные получены из питомника отдела.

Для гистологического исследования легких по стандартной методике готовили парафиновые блоки. Получали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином для изучения содержания лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и по Ван-Гизону на соединительную ткань.

Иммуноферментным анализом (ИФА) исследовались коллаген, гидроксипролин, фибронектин, фактор роста соединительной ткани, протеин клеток Клара в гомогенате легкого (согласно инструкции производителя (CusabioBiotech CO., LTD, Китай).

Экспрессию мембранных рецепторов моноклеаров анализировали с использованием мышинных моноклональных антител методом проточной цитофлуориметрии. Для анализа использовали прибор FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США). В легких изучали содержание мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК - CD45⁻CD90⁺CD73⁺CD106⁺CD44⁺), клеток Клара (CD45⁻CD34⁻CD31⁻Sca1⁺), клеток-предшественников ангиогенеза (CD45⁻CD117⁺Flk1⁺), эпителиальных клеток (CD45⁻CD117⁺CD49f⁺), эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺CD34⁺).

Результаты. В ходе проведенных экспериментов выявлено, что эластаза истончала стенки альвеол и бронхиол, значительно увеличивала площадь просвета, вызывала разрывы альвеолярных стенок. Оценка поверхностных маркеров выявила снижение количества эпителиальных клеток (CD45⁻CD117⁺CD49f⁺) до 27% (P<0,05) относительно интактного контроля. Дополнительно на гистологических препаратах обнаружены умеренная гиперемия капилляров межальвеолярных перегородок и нарушение микроциркуляции. Эмфизематозным изменениям в легких сопутствует инфильтрация макрофагами и лимфоцитами альвеолярных перегородок. С другой стороны, в эластазных легких площадь соединительной ткани уменьшалась более чем в 3 раза (P<0,05) по сравнению с интактным контролем на 7 и 14-е сутки.

Регенерация клеток и тканей не обходится без участия костномозговых, циркулирующих в крови и тканеспецифичных стволовых и прогениторных клеток. В эмфизематозных легких на фоне уменьшения числа клеток эпителия число клеток Клара увеличивалось (в 2,7 раза, P<0,05) по отношению к интактному контролю, одновременно регистрировался высокий уровень секретируемого клетками Клара белка (CCSP – Clara Cell Secretory Protein).

В эмфизематозных легких обнаружено уменьшение количества клеток-предшественников ангиогенеза и эндотелиальных клеток. Источником матриксных белков в легких выступают фибробласты. В свою очередь, ММСК, дифференцируясь, пополняют популяцию фибробластов в легких [6]. В эмфизематозно расширенных легких количество ММСК увеличивалось (7-е сутки), возрастала концентрация гидроксипролина и фактора роста соединительной ткани, коллагена и фибронектина (7,

14-е сутки).

Заключение. Результатом действия эластазы явились деструктивные изменения альвеолярных стенок, характерные для диффузной эмфиземы. Патологические изменения затронули микроциркуляцию и соединительную ткань. Одновременно с развитием эмфиземы регистрируется воспаление: легкие инфильтрируются лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами. Одновременно с увеличением количества ММСК и гиперэкспрессией белков внеклеточного матрикса регистрируется расширение популяции клеток Клара и повышение уровня, секретируемого клетками Клара белка, что является компенсаторной реакцией на разрушение соединительнотканного матрикса легких и уменьшение числа клеток эпителия. С другой стороны, эластаза сокращала популяцию клеток-предшественников ангиогенеза. С этой точки зрения, при моделировании эмфиземы воспалительная среда выступает негативным фактором для восстановления морфологических параметров легких, нарушается интеграция между стволовыми и прогениторными клетками, участвующими в регенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hogg J.C., Timens W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* pp. 435-459.
2. Rabe K. F., Hurd S., Anzueto A., Barnes P. J., Buist S. A., Calverley P., Fukuchi Y., Jenkins C., Rodriguez-Roisin R., van Weel C., Zielinski J. (2007). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* no 176(6). pp. 532-555.
3. American Thoracic Society. (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* no. 161(2, Pt 1). pp. 646-664.
4. Koshiol J., Rotunno M., Consonni D., Pesatori A. C., De Matteis S., Goldstein A. M., Chaturvedi A. K., Wacholder S., Landi M. T., Lubin J. H., Caporaso N. E. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease and altered risk of lung cancer in a population-based case-control study. *PLoS One.* no. 9 (4). pp. 1-7.
5. Chilosi M., Poletti V., Rossi A. (2012). The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil?. *Respiratory Research.* no. 13. doi: 10.1186/1465-9921-13-3
6. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2 / Под ред. М. А. Пальцева. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико», 2009. - 456 с.
7. Lüthje L., Raupach T., Michels H., Unsöld B., Hasenfuss G., Kögler H., Andreas S. (2009). Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respiratory Research.* no. 10. doi: 10.1186/1465-9921-10-7.