

На правах рукописи

Сотникова Анна Геннадьевна

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ
ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА**

14.01.25 – пульмонология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства».

Научный руководитель:

Аверьянов Александр Вячеславович доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Степанян Игорь Эмильевич доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», ведущий научный сотрудник, советник директора по лечебной работе и издательской деятельности

Коган Евгения Алтаровна доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России заведующая кафедрой патологической анатомии имени академика А.И. Струкова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «18» декабря 2019 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.053.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства», по адресу: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, дом 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России (115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28; www.pulmonology-russia.ru).

Автореферат разослан « 17 » октября 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, д.м.н.

Данилевская Олеся Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) – специфическая форма хронической фиброзирующей интерстициальной пневмонии неизвестной этиологии, развивающейся, преимущественно, у лиц старшего возраста и поражающей только легкие (Raghu G., et al., 2011). Несмотря на относительно низкую распространенность, заболеваемость ИЛФ неуклонно возрастает, в среднем на 5% в год, что во многом обусловлено общим старением населения (Navaratnam V., et al., 2011, Selman M., et al. 2016). До эры антифиброзных препаратов медиана выживаемости пациентов с ИЛФ от момента постановки диагноза составляла 2,5-3,5 года (Raghu G., et al., 2011). Традиционно ИЛФ рассматривается как прогрессирующее заболевание, однако встречаются формы болезни как с быстрым падением легочной функции, так и остающиеся стабильными на протяжении многих месяцев, даже без какого-либо лекарственного вмешательства (Ley B., et al., 2011). Больные с быстро прогрессирующими формами болезни имеют наиболее неблагоприятный прогноз по выживаемости (Richeldi L., et al., 2017). При этом эффективность противофиброзных препаратов у данной категории пациентов пока не изучена. Кроме того, антифиброзная терапия нинтеданибом и пирфенидоном, более чем в 60% случаев сопровождается побочными эффектами, которые могут стать причиной их отмены (Richeldi L., et al., 2014; King T., et al., 2014). Одним из новых перспективных направлений лечения ИЛФ считается трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (Toonkel R.L., et al., 2013). МСК – субпопуляция стромальных клеток, представленных во многих органах и тканях, но максимально в костном мозге, жировой ткани, фетальном материале, пуповинной крови, амниотической жидкости и плаценте, которые чаще всего являются их источниками для последующего клинического применения (Wecht S., et al., 2016). Потенциальные эффекты МСК при легочном фиброзе обусловлены их способностью продуцировать целый ряд биологически активных субстанций, обладающих противовоспалительными, антифиброзными, иммуносупрессивными и ангиогенными свойствами (Liu M., et al., 2015). Экспериментальные исследования по трансплантации аллогенных МСК мелким животным с моделированным легочным фиброзом доказали их эффективность и безопасность. Тем не менее, многие вопросы применения клеточных препаратов остаются нерешенными. К примеру,

отсутствуют публикации о сравнительных исследованиях методов доставки стволовых клеток в легкие, а такой, потенциально простой и доступный способ для лекарственных препаратов, как ингаляции, ранее не применялся в терапии фиброза легких даже на уровне эксперимента. Результаты опубликованных клинических исследований I фазы с использованием клеточной терапии ИЛФ свидетельствуют о безопасности МСК при минимальной эффективности, однако все они включали пациентов с легким и умеренным нарушением функции легких без учета скорости ее предшествующего падения, общая доза введенных клеток не превышала 200 млн, и использовались разные пути доставки клеток в легкие – эндобронхиальный или внутривенный без сравнения их эффектов (Tzouveleakis A., et al., 2013; Chambers D.C., et al., 2014; Glassberg M.K., et al., 2018; Ntoliou P., et al., 2018). Таким образом, сравнительное исследование эффективности разных путей введения клеточного препарата в легкие, изучение безопасности и эффективности более высоких кумулятивных доз МСК у пациентов с ИЛФ, особенно с быстро прогрессирующим жизнеугрожающим течением, представляется весьма актуальным.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что лечение идиопатического легочного фиброза гетерогенными видами стволовых клеток в качестве возможной перспективы рассматривается более 10 лет, а в международной базе данных клинических исследований ClinicalTrials по ключевым словам «stem cells» и «idiopathic pulmonary fibrosis» зарегистрированы 11 ведущихся работ в данном направлении, включая нашу, до настоящего времени не было опубликовано результатов рандомизированных, плацебо-контролируемых клинических исследований, а три клинических исследования первой фазы оценивали безопасность и эффективность клеточных препаратов либо после однократного введения, либо в низкой кумулятивной дозе. В доступных источниках в Российской Федерации нам не удалось найти публикаций оригинальных исследований или патентов, касающихся данной тематики, а также сведений о подобных работах, ведущихся другими отечественными научными группами. Все это свидетельствует о недостаточной разработанности темы по оценке роли клеточных технологий в терапии ИЛФ.

Цель исследования

Изучить безопасность и эффективность трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в

экспериментальной модели легочного фиброза и в рамках пилотного клинического исследования у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом.

Задачи исследования

1. Сравнить степень выживаемости МСК при распылении через компрессорный, ультразвуковой и сетчатый небулайзеры.
2. Оценить сравнительные эффекты трансплантации аллогенных МСК костного мозга в экспериментальной модели легочного фиброза при внутривенной и ингаляционной доставке клеточного материала.
3. Изучить неблагоприятные эффекты при повторных внутривенных инфузиях МСК у больных с быстро прогрессирующими формами ИЛФ.
4. Оценить влияние клеточной терапии на клинические, функциональные и рентгенологические параметры у пациентов ИЛФ в течение 12 месячного наблюдения.

Научная новизна

Впервые доказана безопасность высоких кумулятивных доз аллогенных МСК у пациентов с ИЛФ

Показана эффективность высоких кумулятивных доз аллогенных МСК при сравнении с плацебо у пациентов с быстро прогрессирующим ИЛФ

Модифицирована модель экспериментального легочного фиброза у кроликов технологией прицельного эндобронхиального введения раствора блеомицина через ультратонкий бронхоскоп в рассчитанных дозировках;

Изучена выживаемость МСК при разных методах небулизации, доказано преимущество компрессорного небулайзера над ультразвуковым и сетчатым для сохранения жизнеспособности клеток.

Проведено сравнительное исследование эффективности МСК в экспериментальной модели легочного фиброза у кроликов при разных путях доставки препарата, доказана эквивалентность эффектов внутривенной инфузии и ингаляций МСК через компрессорный небулайзер в сопоставимых доставленных дозах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенного экспериментального исследования и установленные в ходе него новые научные факты позволяют рассматривать ингаляционный путь доставки клеточного препарата в дыхательные пути как возможный и сопоставимый по эффектам с

внутривенным введением клеток. Пилотное клиническое исследование закладывает фундамент для дальнейшего изучения высокодозной терапии аллогенными МСК, ранее не использовавшейся у человека, не только при ИЛФ, но и других хронических болезнях, при которых применение традиционных доз МСК было недостаточно эффективным. Результаты работы могут быть положены в основу разработки нового метода лечения быстро прогрессирующих форм ИЛФ путем внутривенной трансплантации аллогенных МСК костного мозга.

Методология, материалы и методы исследования

Предметом исследования диссертации явилась разработка метода лечения идиопатического легочного фиброза с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в эксперименте и клиническом исследовании. Объектами исследования явились 20 экспериментальных животных (кроликов) и 20 пациентов с быстро прогрессирующей формой ИЛФ. В ходе экспериментального этапа исследования была изучена выживаемость МСК при распылении через разные типы небулайзеров, наиболее оптимальный из которых был использован для доставки клеточного материала в дыхательные пути животных. В ходе эксперимента была модифицирована модель блеомицинового фиброза путем прицельного введения блеомицина через ультратонкий фибробронхоскоп лишь в одну долю легкого. Сравнительная оценка эффективности терапии МСК при внутривенной и ингаляционной доставке в эксперименте проведена с использованием методов морфометрии ткани легких, иммуногистохимического исследования, анализа бронхоальвеолярного лаважа и конфокальной лазерной эндомикроскопии нижних дыхательных путей. В ходе второго этапа – открытого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования у пациентов с ИЛФ для оценки безопасности и эффективности внутривенной трансплантации МСК были использованы методы функциональной и ультразвуковой диагностики, компьютерной томографии высокого разрешения.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При доставке в дыхательные пути стволовых клеток с достижением максимальной степени их выживаемости наиболее эффективным является компрессорный (струйный) небулайзер.

2. Внутривенное и ингаляционное введение МСК (в дозе, скорректированной по расчетной респираторной фракции) в лечении блеомин-индуцированного легочного фиброза у кроликов, вызывают сходные антифиброзные эффекты.

3. Аллогенные МСК костного мозга при повторных внутривенных трансплантациях в разовых дозах 2×10^8 и в суммарной кумулятивной дозе $1,6 \times 10^9$ клеток, вызывают больше нетяжелых побочных эффектов и существенное замедление скорости падения форсированной жизненной емкости легких и диффузионной способности легких в течение 12 месяцев в сравнении с плацебо у пациентов с быстро прогрессирующим ИЛФ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется достаточным объемом выборки и исследуемого материала, использованием методов рандомизации и плацебо-контроля, использованием современных методов исследований и статистики, экспертизой и регистрацией протокола клинического исследования на сайте <https://clinicaltrials.gov/> национальной медицинской библиотеки США.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Изучение эффективности и безопасности трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при тяжелых формах эмфиземы легких, идиопатического легочного фиброза, тяжелого сепсиса и септического шока» (2013-2015 гг.).

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на: XXVII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания, 19 октября 2017 года (Санкт-Петербург); III Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине, 15–18 ноября 2017 года (Москва); V Юбилейном международном конгрессе и школах для врачей «Кардиоторакальная радиология», Москва, 23 марта 2018 года; II Всероссийской конференции с международным участием StemCellBio-2018, 15-17 ноября 2018 г. (Санкт-Петербург); Ежегодном конгрессе Американского торакального общества (ATS 2019), 17-22 мая 2019 г., (Даллас, США); Международном конгрессе Европейского респираторного общества (ERS 2019), 28 сентября-2 октября 2019 г. (Мадрид, Испания).

Апробация диссертации состоялась 04.09.2019 г. (протокол № 6/19) на совместном заседании членов Ученого совета

Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России) и Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

По тематике, методам исследования, научным положениям диссертация соответствует шифру и формуле специальности научных работников: 14.01.25 – «пульмонология». Результаты выполненного исследования соответствуют пунктам 1-5 областей исследования паспорта специальности «пульмонология» (медицинские науки).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу пульмонологического отделения Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Материалы исследования представлены в отчёте по государственному заданию ФМБА России 2012-2014 гг. по теме: «Изучение эффективности и безопасности трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при тяжелых формах эмфиземы легких, идиопатического легочного фиброза, тяжелого сепсиса и септического шока».

Личный вклад автора

Автор принимала участие в разработке планов, протоколов исследования, целей, задач, проводила все основные этапы клинического исследования, участвовала в разработке экспериментальной модели легочного фиброза. Принимала непосредственное участие в ведении пациентов с ИЛФ, участвовавших в исследовании, самостоятельно выполнила сбор и обработку полученных материалов, статистические расчеты. В соавторстве подготовила публикации для печати.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах и изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий»,

рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, для опубликования основных научных результатов диссертаций, из них 1 публикация, входящая в международные базы данных (зарубежное издание Q1).

Объем и структура диссертации

Диссертация написана на 108 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 12 рисунками и 11 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы, включающего 173 источника, из них 8 отечественных и 165 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов и методов исследования

Работа состояла из двух этапов – экспериментального и пилотного клинического исследований.

В начале *экспериментального исследования* была проведена оценка выживаемости мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при распылении через разные типы небулайзеров. Были использованы 3 небулайзера, с разными способами распыления, производства компании OMRON Healthcare (Япония): Компрессорный (струйный) ComAir NE-C24; сетчатый (меш-небулайзер) MicroAir U22 и ультразвуковой небулайзер UltraAir NE-U17. Распыление производили в герметичный пластиковый контейнер в течение 10 минут, откуда забирался 1 мл аэрозольного конденсата для последующей оценки выживаемости клеток. Жизнеспособность МСК определяли при помощи окрашивания клеток 0,4% раствором трипанового синего (Invitrogen-Gibco, США) в автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Небулайзер, демонстрировавший наибольшую степень выживаемости распыленных МСК, был использован для ингаляционной доставки МСК в нижние дыхательные пути животных в ходе дальнейшего эксперимента. Экспериментальное исследование проводилось в условиях вивария ФГБУ Медицинский радиологический научный центр им. М.Ф. Цыба Минздрава России (г. Обнинск). Для экспериментальной модели были использованы двадцать молодых здоровых кроликов, самцов, породы «Шиншилла». Для моделирования легочного фиброза 15-ти животным была проведена бронхоскопия ультратонким фибробронхоскопом с наружным диаметром дистального конца 2,5 мм, модель Karl Storz 6000V (Германия), в заднюю долю правого легкого был инстиллирован

раствор блеомицина (Веро-блеомицин, ЛЭНС ФАРМ, Россия) в дозе 2,5 мг/кг в 3 мл 0,9% натрия хлорида. На следующий день 5 животных получили внутривенное введение в ушную вену 2 млн аллогенных кроличьих МСК костного мозга в 5 мл 0,9% NaCl; еще 5 кроликов подверглись ингаляционному введению 20 млн МСК в 5 мл 0,9% NaCl распыленных через компрессорный небулайзер ComrAir NE-C24 (OMRON Healthcare, Япония) с использованием неонатальной маски. Пять животных были использованы в качестве контроля блеомицинового фиброза, и оставшиеся пять как контрольная группа здоровых животных (рис. 1). На 28-й день все кролики были эвтаназированы. Непосредственно перед эвтаназией им проводилась фибробронхоскопия с бронхоальвеолярным лаважем (БАЛ) из заднедолевого бронха справа. Лаважная жидкость исследовалась цитологически, а также подверглась иммуноферментному анализу на определение цитокинов TNF- α , TGF- β 1, IL-6 на автоматическом плащечном ИФА-анализаторе ВЕР 2000 (Германия).

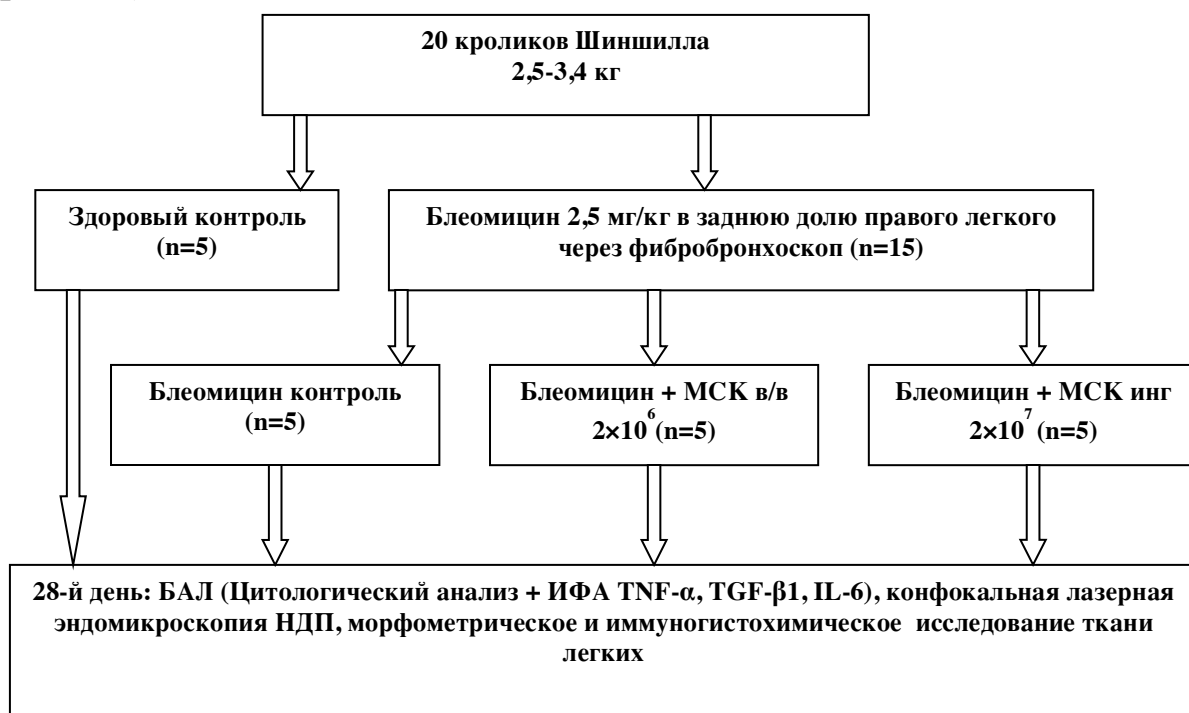


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента по моделированию и лечению легочного фиброза путем внутривенного или ингаляционного введения МСК

Для морфологического и иммуногистохимического анализов использовали ткань задней доли правого легкого. Морфологические признаки фиброза легких оценивали при световой микроскопии полуколичественным методом при помощи 9-балльной модифицированной шкалы Эшкрофта от (0 баллов – отсутствие

признаков фиброза до 8 баллов – тотальный фиброз без сохраненных альвеолярных пространств). Оценивалось 20 случайных полей зрения из препаратов каждого животного с определением средней величины степени фиброза в баллах. Для оценки степени аккумуляции коллагена как маркера легочного фиброза в качестве первичных антител использовали моноклональные кроличьи антитела против Collagen IV (GTX) с помощью специализированной автоматизированной системы Ventana BenchMark® ULTRA (USA). Оценку иммуногистохимической реакции в каждом срезе оценивали по 10 случайным полям зрения полуколичественным методом (до 5% экспрессии – 0 баллов; 5-39% – 1 балл; 40-69% – 2 балла; более 70% – 3 балла).

Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) нижних дыхательных путей выполнялась через 4 часа после эвтаназии животных на нефиксированной ткани легких с помощью диагностической системы Cellvizio® (Mauna Kea Technologies, Франция) с минизондом Alveoflex (наружный диаметр 1,4 мм), длина волны 488 нм. Для полуколичественной оценки присутствия макрофагов в альвеолах была использована 6-балльная шкала: от 0 баллов (отсутствие клеток) до 5 баллов (покрытие макрофагами всего поля зрения). Признаки фиброза оценивались полуколичественным методом по 5-балльной шкале от 0 баллов (отсутствие признака) до 4 баллов (тотальный фиброз).

Пилотное клиническое исследование было выполнено в период с 2013 по 2017 гг. на базе пульмонологического отделения ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, являющегося клинической базой ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией и правилами GCP, было одобрено локальным Этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (Протокол: 5-11-03-2013 от 05.03.2013) и зарегистрировано на сайте <https://clinicaltrials.gov> (идентификатор NCT02594839). Данное исследование I-IIА фазы, было открытым, рандомизированным, плацебо-контролируемым, выполненном в 2-х группах пациентов.

Критерии включения в исследование (обязательное наличие всех критериев):

1. Диагноз ИЛФ, основанный на:

А) клинических симптомах, продолжительностью более 12 месяцев,

Б) Гистологический и/или радиологический (по данным КТВР) паттерн обычной интерстициальной пневмонии в зависимости от их сочетания (*табл. 1*);

Таблица 1 – Трактовка диагноза в зависимости от сочетания КТВР и морфологического паттернов

	Хирургич. биопсия недоступна	Морф. паттерн типичной ОИП	Морф. паттерн возможной ОИП	Морф. признаки, противоречащие ОИП
КТВР паттерн типичной ОИП	+	+	+	–
КТВР паттерн возможной ОИП	–	+	+	–
КТВР паттерн противоречащий ОИП	–	–	–	–

+ диагноз ИЛФ правомочен; – диагноз ИЛФ неправомочен; ОИП – обычная интерстициальная пневмония

2. Мужчины и женщины от 30 до 80 лет;
3. ФЖЕЛ > 40% от должного;
4. Коэффициент диффузии (DLCO) > 20% от должного;
5. Снижение ФЖЕЛ или DLCO более чем на 10% за последние 12 месяцев;
6. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения (присутствие хотя бы одного из них делало невозможным включение пациента):

1. Диагноз другого заболевания легких;
2. Диагноз другого заболевания, которое потенциально может вызывать фиброз легких;
3. Наличие значимой бронхиальной обструкции: ОФВ1/ФЖЕЛ < 0.70;
4. Обострение ИЛФ менее 4-х недель до включения в исследование;
5. Активный инфекционный процесс любой локализации менее 4-х недель до включения в исследование;
6. Онкологическое заболевание в анамнезе менее 5 лет до включения в исследование;
7. Невозможность выполнения процедур, запланированных в протоколе исследования;
8. Беременность или кормление грудью;
9. Прием высоких доз преднизолона (30 и более мг в сутки), цитостатиков, пирфенидона, D-пеницилламина, биологических

- препаратов, содержащих моноклональные антитела в сроки менее 6 месяцев до рандомизации;
10. Нахождение в листе ожидания на трансплантацию легких;
11. Злоупотребление алкоголем менее 1 года до включения в исследование;
12. Участие в другом клиническом исследовании.

В исследование были включены 20 пациентов (средний возраст $60,9 \pm 9,22$ лет), 11 мужчин и 9 женщин с диагнозом идиопатического легочного фиброза, установленного на основании типичного паттерна обычной интерстициальной пневмонии по данным КТВР и/или морфологического исследования ткани легких, при условии исключения других заболеваний, имеющих сходные клинические, радиологические и морфологические проявления в соответствии с клиническими рекомендациями ATS/ERS/JRS/ALAT 2011 г. У 13 из 20 пациентов диагноз ИЛФ имел морфологическое подтверждение (1 – путем ТББЛ, 6 – видеоторакоскопической биопсией, 6 – хирургической биопсией). Общая характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в *таблице 2*.

Таблица 2 – Характеристика пациентов, включенных в исследование

№	Пол	Возраст (полных лет)	ФЖЕЛ % от должного	DLCO % от должного	Доза преднизолона (мг)	Морфология	Курение > 10 пачка/лет	ГЭРБ
1	М	61	67	41	20	+	+	–
2	Ж	60	75	22	20	+	+	+
3	М	50	36	24	25	+	–	+
4	Ж	74	79	28	0	–	–	+
5	Ж	58	43	28	10	–	+	+
6	М	33	52	31	15	+	+	+
7	М	68	48	33	10	+	–	+
8	М	61	55	27	20	–	+	–
9	Ж	59	51	22	20	+	–	+
10	Ж	70	40	20	25	+	+	–
11	М	56	61	38	20	+	+	+
12	Ж	59	53	29	25	–	–	+
13	Ж	65	48	26	20	+	–	+
14	М	69	61	35	15	+	–	+
15	М	52	50	31	12,5	+	–	+
16	М	71	45	24	15	–	+	–
17	М	69	52	30	15	–	+	+
18	Ж	60	64	39	15	+	–	+
19	М	58	45	21	25	+	+	+
20	Ж	66	49	21	25	–	–	+
Итого	11/9	$61 \pm 8,7$	$53,7 \pm 10,9$	$27,8 \pm 5,6$	$17,6 \pm 6,3$	13	10	16

ИМТ – индекс массы тела, *ГЭРБ* – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

В соответствии с протоколом исследования после скринирования, пациенты были рандомизированы на 2 группы по 10 больных в каждой. 1-я группа получала лечение МСК через каждые 12 недель (2 внутривенные инфузии по 200 млн клеток в 400 мл физ. раствора в течение 60 мин. с интервалом 7 дней) и 2 группа – плацебо (дважды по 400 мл физиологического раствора) с интервалом в 7 дней через каждые 12 недель).

Последнее введение МСК проводилось через 39 недель от начала исследования. Наблюдение пациентов продолжалось до 53 недели от начала терапии. Каждые 12 недель пациенты госпитализировались в пульмонологическое отделение для проведения лечения и оценки безопасности и эффективности проводимой терапии в соответствии с планом-графиком исследования (табл. 3).

Таблица 3 – План-график исследования

	Скрининг	39-недельное лечение		Преждевременное выбытие	Наблюдение после лечения
Визиты	1 Скрининг	2 Первичный	3-5 каждые 12 нед		6
Недели	от -4 до -1	0	13, 26, 39,		53 (12 недель после последнего введения клеток)
ПРОЦЕДУРЫ					
Информированное согласие	×	–	–	–	–
Критерии включения/исключения	×	×	–	–	–
Анамнез, включая факторы риска	×	–	–	–	–
Общий осмотр	×	×	×	×	×
ЭКГ	×	–	–	×	×
Спирометрия	×	×	×	×	×
Диффузионный тест	×	×	×	×	×
SpO ₂	×	×	×	×	×
Тест с 6 минутной ходьбой	×	×	×	×	×
ЭХО-кардиография	×	×	×	×	×
КТВР	×	–	26 нед.	×	×
Общий анализ крови	×	×	×	×	×
Общий анализ мочи	×	×	×	×	×
Биохимический ан. крови	×	×	×	×	×
Введение клеточного препарата или плацебо*	–	×	×	–	–

* Клеточный препарат или плацебо вводились при каждой госпитализации (визите) дважды с интервалом 7 дней

МСК выделялись из моноклеарной фракции костного мозга в соответствии со стандартным протоколом (Lennon D.P., et al., 2006). Для половины пациентов ($n = 5$) костный мозг был получен от их здоровых молодых родственников (20-35 лет). В случае отсутствия подходящих родственных доноров или их отказа от донорства костного мозга, был использован костный мозг здоровых доноров того же пола, что и пациент. Костный мозг был получен путем пункции подвздошной кости под местной анестезией 0,5% раствором новокаина с забором 100-150 мл костного мозга. Каждый донор был обследован для исключения носительства гематогенных инфекций (ВИЧ, Гепатиты В, С, сифилис, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, Т-лимфотропный вирус человека тип I), подписывал информированное согласие на забор костного мозга.

Протокол забора костного мозга был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (№. 4-11-03-2013 от 03 марта 2013 г.). После культивирования (не более 5 пассажей) МСК были иммунофенотипированы по маркерам CD, характерным для мезенхимальных клеток, кариотипированы, а также проверены на стерильность. Стерильность препаратов проверяли с помощью посева на питательные среды и с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа (Microflex LRF, Bruker) в бактериологической лаборатории ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Спирометрическое исследование и исследование диффузионной способности легких проводилось на универсальной трансмуральной бодикамере (MasterScreen, Vyasis, Германия), в соответствии с рекомендациями Европейского респираторного общества (2005 г). *Тест с 6-минутной ходьбой* выполнялся в соответствии с рекомендациями Американского торакального общества (2002 г). *ЭХО-кардиография* проводилась при помощи на ультразвуковом анализаторе Vivid T8 pro (General Electric Healthcare, США) в соответствии с рекомендациями Американского общества по эхо-кардиографии (2005). Компьютерная томография органов грудной клетки выполнялась на спиральных компьютерных томографах 128 Philips Ingenuity (Филипс, Нидерланды) и Toshiba Aquilion 64 (Тошиба, Япония). Полуколичественная оценка фиброза легких (индекс фиброза) проводилась независимым рентгенологом по методу K. Oda et al. (2014).

Статистическая обработка результатов

Для обоих этапов данные представлены как выборочное среднее \pm стандартное отклонение. Достоверность различий оцениваемых

показателей между исследуемыми группами в экспериментальном этапе вычислялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Достоверность различий между исследуемыми группами по оценке эффективности проводилось методом Манна-Уитни. Сравнение частоты побочных эффектов между группами проводилось с использованием критерия Фишера. Результаты считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Статистическая обработка результатов исследования производилась при помощи пакета прикладных программ «Statistica for Windows StatSoft Inc. Версия 7.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование

Наиболее высокие показатели выживаемости стволовых клеток были достигнуты при использовании компрессорного (струйного) небулайзера (72% жизнеспособных клеток), тогда как после небулизации ультразвуковым ингалятором данная цифра составляла всего 20%, а после прохождения через сетчатый небулайзер живых МСК в конденсате вообще не определялось (рис. 2).

При оценке эффектов клеточной терапии экспериментального фиброза легких в группе блеомицинового контроля общий цитоз без лечения был достоверно выше, чем у животных из группы здорового контроля (567 против 365 кл/мкл), однако, данный показатель в группах лечения МСК хотя и имел тенденцию к снижению, тем не менее не продемонстрировал статистически значимых различий с контрольной группой. Сходные изменения наблюдались и в клеточных фракциях (табл. 4).

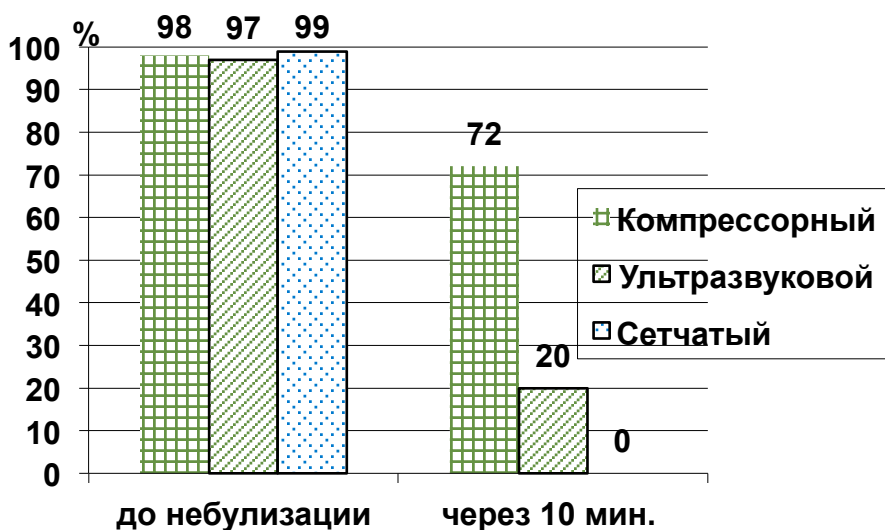


Рисунок 2 – Доля жизнеспособных МСК после 10-минутного распыления через сравниваемые типы небулайзеров

Цитокиновый профиль жидкости БАЛ оказался недостаточно информативным в связи с тем, что TNF- α и IL-6 pg/ml у здоровых животных не определялись, а показатели TGF- β 1 хотя и были количественно выше в группах, получивших блеомицин, однако, из-за большого разброса показателей достоверно не отличались как между собой, так и со здоровым контролем (табл. 4).

Таблица 4 – Цитологический и цитокиновый профиль жидкости БАЛ в экспериментальных группах

	Контроль	Блеомициновый фиброз	Блеомицин + МСК в/в	Блеомицин + МСК инг.
Общее число клеток/мкл	365 \pm 72	567 \pm 112*	495 \pm 122	528 \pm 129
Нейтрофилы, %	3 \pm 3	13 \pm 5**	10 \pm 5*	10 \pm 9
Макрофаги, %	85 \pm 11	65 \pm 18	78 \pm 15	76 \pm 17
Лимфоциты, %	10 \pm 4	21 \pm 12*	12 \pm 11	14 \pm 9
Эозинофилы, %	2 \pm 4	3 \pm 3	1 \pm 4	1 \pm 3
Эритроциты, %	2 \pm 5	2 \pm 4	2 \pm 2	1 \pm 1
TNF- α pg/ml	Не опред.	122 \pm 65	95 \pm 77	101 \pm 36
TGF- β 1 pg/ml	26 \pm 11	56 \pm 32	44 \pm 24	51 \pm 18
IL-6 pg/ml	Не опред.	44 \pm 36	Не опред.	Не опред.

* $p < 0,05$ в сравнении со здоровым контролем

При оценке морфологических изменений ткани легких в исследуемых группах у всех животных с эндобронхиально введенным блеомицином наблюдалось в разной степени утолщение межальвеолярных перегородок, инфильтрация их и стенок сосудов нейтрофилами и лимфоцитами, а также деформация ацинарных структур (рис. 3).

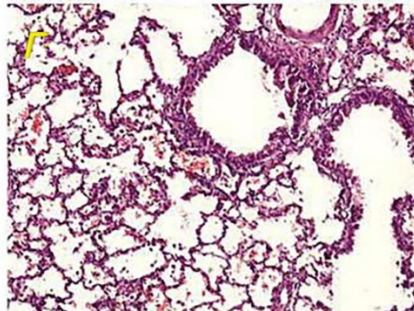
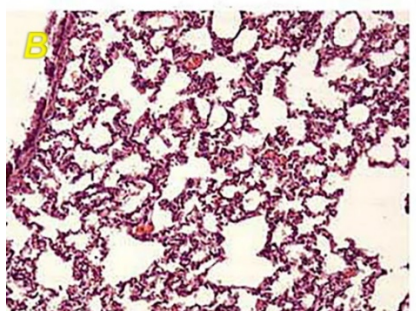
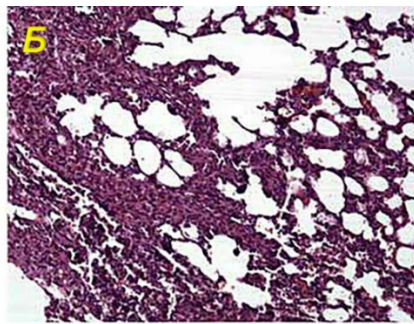
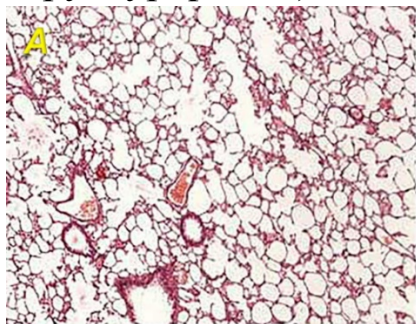


Рисунок 3 – Легкие кроликов в группах исследования.

А – здоровый контроль;
 Б – блеомициновый контроль;
 В – группа внутривенной терапии МСК;
 Г – группа ингаляционной терапии МСК.
 Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

В группах, получивших внутривенное или ингаляционное лечение МСК, эти изменения хотя и присутствовали, но были выражены существенно меньше, чем в контрольной группе, подвергшейся введению блеомицина, без клеточной терапии. Здесь, помимо описанных изменений, выявлены массивные поля фиброза, участки полной облитерации альвеол и сосудистого русла.

При полуколичественной оценке степени фиброза у животных, получивших лечение МСК, выраженность фиброза была достоверно меньше, чем в контрольной группе блеомицинового фиброза: 2,34 и 2,11 против 4,15 баллов (табл. 5).

Таблица 5 – Полуколичественная оценка фиброза и экспрессии коллагена в группах исследования

	Здоровый контроль	Блеомицин. контроль	Блеомицин + МСК в/в	Блеомицин + МСК инг
Шкала фиброза Эшкрофта, баллы	0.24±0.11	4.15±1.8**	2.34±1.6*	2.11±1.3*
Экспрессия коллагена, баллы	0,15±0,20	2,1±0,65**	0,79±0,55	0,51±0,29*

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

Значимых различий по морфометрическим изменениям между группами с ингаляционной и внутривенной доставкой МСК не установлено. Похожая картина наблюдалась в степени экспрессии коллагена – максимальная в группе блеомицинового повреждения без лечения (2,1 против 0,15 баллов в здоровой группе), в то время как у животных получивших МСК, данный показатель был существенно ниже: в среднем 0,79 балла при внутривенной терапии и 0,51 балл при ингаляционной доставке (табл. 5, рис. 4).

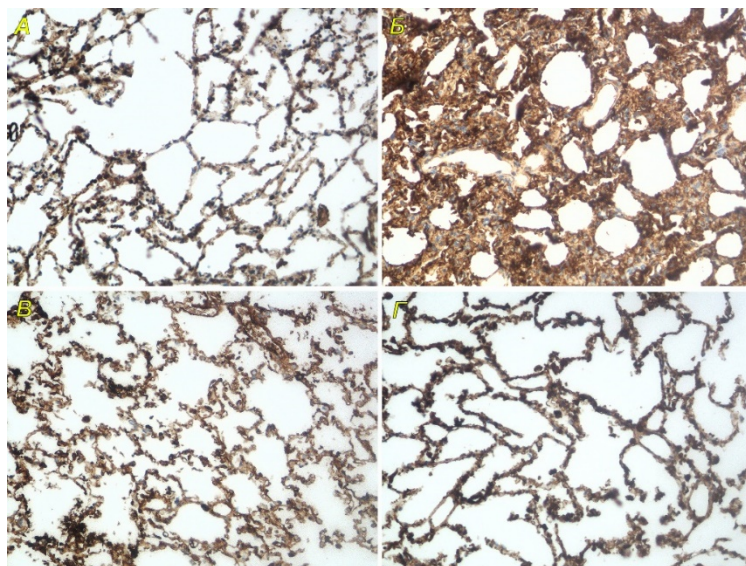


Рисунок 4 – Легкие кроликов с экспрессией иммуногистохимического маркера коллагена IV типа в исследуемых группах
 А – здоровый контроль;
 Б – блеомициновый контроль;
 В – группа внутривенной терапии МСК; Г – группа ингаляционной терапии МСК.
 Иммуногистохимическая реакция с GTX антителами, ×200

Картина альвеолоскопических изображений, полученных в результате проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии нижних дыхательных путей (КЛЭМ) у экспериментальных животных в целом соответствовала морфологическим изменениям, выявленным при световой микроскопии гистологических препаратов и характеризовалась резким нарушением архитектоники альвеолярных структур в большинстве полей зрения и большим количеством макрофагов в просветах альвеол в группе блеомицинового контроля (*рис. 5Б*). В группе животных, подвергшихся внутривенной терапии МСК, структура альвеол прослеживалась преимущественно четко, однако многие альвеолярные пространства были существенно увеличены в диаметре, достигая размеров 232 мкм, средний размер составил 154 ± 43 мкм (*рис. 5В*). Толщина межальвеолярных перегородок составила $4,7 \pm 1,5$ мкм и была близка к таковой в группе контроля. Полуколичественная оценка макрофагов не превышала показатель в 1-2 балла.

В экспериментальной группе с ингаляционной доставкой МСК КЛЭМ изображения демонстрировали нормальные по форме альвеолы, так же как в предыдущей группе несколько увеличенные в размере, однако данный признак был менее выражен. Размер альвеол составил 122 ± 30 мкм, а толщина альвеолярных перегородок $4,9 \pm 1,1$ мкм (*рис. 5Г*). Макрофаги были единичными в поле зрения – 0-1 балла.

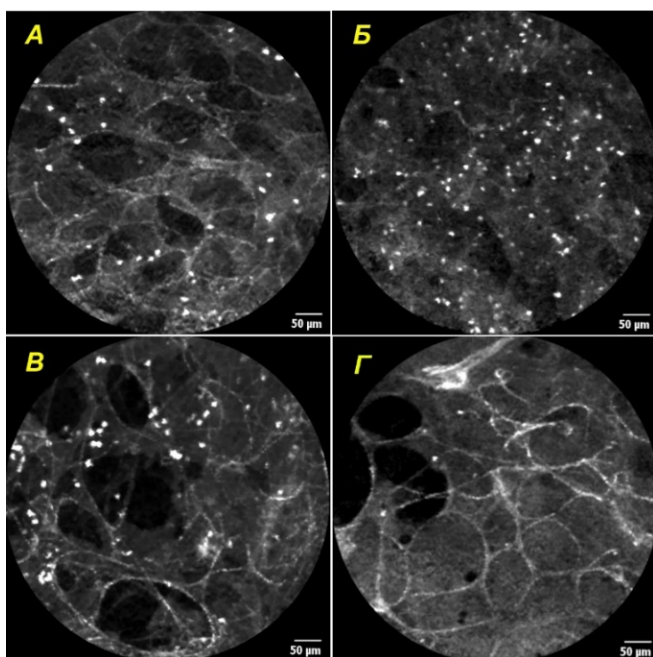


Рисунок 5 – Репрезентативные КЛЭМ изображения, демонстрирующие изменения в альвеолах в исследуемых группах
 А – контроль;
 Б – блеомициновый фиброз;
 В – группа внутривенной терапии МСК;
 Г – группа ингаляционной терапии МСК

Пилотное клиническое исследование

Из 20 рандомизированных пациентов исследование завершили 16. Четверо больных 3 женщины, 1 мужчина умерли от прогрессирования дыхательной недостаточности, вследствие основного заболевания между 14-й и 34-й неделей исследования. Все они исходно имели низкие показатели DLCO (20-22% от должного), ФЖЕЛ (40-51%), дистанцию 6-минутной ходьбы (89-150 метров), высокий индекс фиброза легких по данным КТВР (167-190 баллов) и принимали более высокие дозы преднизолона, чем остальные пациенты (20-25 мг).

Побочные эффекты чаще наблюдались в группе, получавшей МСК, среди них доминировали повышение температуры тела, ассоциированная с нею слабость и озноб в течение 1 суток после введения клеточного препарата (*табл. 6*). Однако эти реакции носили легкий характер и не привели к прерыванию исследования.

Таблица 6 – Частота побочных эффектов в исследуемых группах

	МСК суспензия $2 \times 10^8 + 400$ ml 0,9% NaCl Число пациентов (%) / число событий	Плацебо 400 мл 0,9% NaCl Число пациентов (%)/число событий
Повышение температуры тела	4 (40)/6	1 (10)/1
Озноб	2 (20)/2	0
Тошнота	2 (20)/2	2 (20)/2
Инфекции верхних дыхательных путей	2 (20)/3	2 (20)/2
Инфекции нижних дыхательных путей	2 (20)/2	2 (20)/2
Ишемический инсульт	1 (10)/1	0
Кашель	2 (20)/2	2 (20)/2
Головная боль	2 (20)/4	3 (30)/3
Слабость	4 (40)/4	1 (10)/1
ИЛФ обострение	0	1 (10%)/1
Кожная сыпь	0	1 (10)/1
Всего нежелательных событий	26	15

Динамика основных показателей, использованных для оценки эффективности клеточной терапии у 8 пациентов, получивших полную дозу клеточного препарата, представлена в *таблице 7*.

После первых 3-х месяцев лечения (введения 400 млн МСК) мы не наблюдали достоверной разницы между группами в динамике ни одного из исследуемых показателей исключением дистанции 6 минутной ходьбы – она увеличилась в группе МСК на 8,3%, а в группе плацебо снизилась на 1,8%.

Таблица 7 – Динамика показателей эффективности терапии в группах МСК и плацебо

	Начало лечения	13 неделя	26 неделя	39 неделя	52 неделя
ФЖЕЛ (% от должного)					
МСК	56,9±15,4	53,6±14,2	53,8±14,5	54,9±15,1*	54,5±15,0**
Плацебо	54,3±6,9	51,6±6,6	50,3±7,2	48,3±6,3	47,1±6,3
DLCO (% от должного)					
МСК	30,5±6,4	30,6±4,4	30,3±6,8*	28,4±7,2	28,8±6,1**
Плацебо	31,5±5,4	29,9±5,9	28,9±5,8	27,1±5,3	26,0±5,6
Дистанция 6-минутной ходьбы (метры)					
МСК	294,6±95,8	319,1±90,0**	337,6±104,9**	334,5±93,9**	346,4±103,6**
Плацебо	309,1±93,1	303,5±89,0	297,0±89,1	288,6±89,2	280,6±90,3
Ра систолическое в легочной артерии (мм рт. ст.)					
МСК	41,1±19,7	42,4±25,5	44,8±24,8	35,1±7,8*	33,6±5,7*
Плацебо	37,5±8,3	39,3±8,2	41,5±9,5	43,6±10,0	46,4±14,1
КТВР индекс фиброза (баллы)					
МСК	148,5±21,7	–	146,8±18,1	–	149,9±19,9
Плацебо	135,0±10,1	–	138,8±9,6	–	138,5±8,2

* p<0,05, ** p<0,01 при сравнении динамики между группами

К 26-й неделе после начала терапии, в группе, получавшей лечение МСК, наблюдалась достоверно лучшая динамика DLCO (-0,7%; vs -8,3% в группе плацебо) и дистанции 6 минутной ходьбы (+14,6% vs -3,9%) по сравнению с исходными цифрами. К 39 неделе после суммарной дозы клеток $1,2 \times 10^9$ разница в динамике наблюдалась в ФЖЕЛ (-3,5% vs -11,1%), (+13,5% vs -6,6%) и систолического давления в легочной артерии (-14,6% vs +16%). После завершения курса лечения и достижения суммарной дозы 1,6 миллиарда клеток к 52-й неделе исследования достоверные различия между группами были достигнуты по показателям динамики ФЖЕЛ (-4,2% vs -13,2%), DLCO (-5,6% vs -17,5%), дистанции 6 минутного теста (+17,6% vs -9,2%) и уровня систолического давления в легочной артерии (-18,2% vs +23,7%) в сравнении с исходными показателями. Индекс фиброза легких по данным КТВР достоверно не различался как на 26-й (МСК -1,1% vs плацебо +2,5%), так и на 52-й неделе наблюдения в группе терапии (МСК +1%; Плацебо +2,6%).

При сравнении динамики FVC за 12 месяцев, предшествовавших терапии, и 12 месяцев лечения, установлено значительно более существенное снижение скорости падения функциональных параметров в группе, получавшей МСК (с -11,8 до -4,2%), по сравнению с плацебо (с -12,23 до -13,2%) (рис. 6).

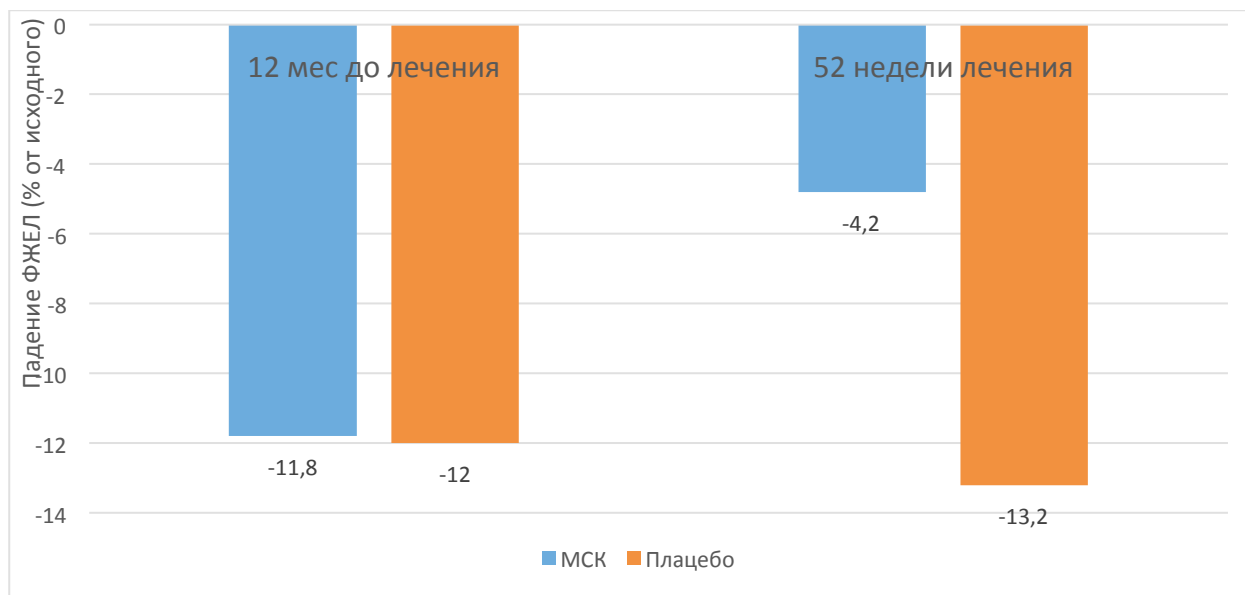


Рисунок 6 – Изменение скорости падения ФЖЕЛ в группах до и после лечения

Данное исследование стало первым, продемонстрировавшим сопоставимые эффекты внутривенной и ингаляционной трансплантации МСК в экспериментальной модели легочного фиброза, а также преимущество компрессорного небулайзера для доставки жизнеспособных клеток в дыхательные пути. Несмотря на определенные ограничения, результаты диссертации открывают возможность для дальнейших работ по изучению эффектов МСК как при ИЛФ, так и других видах патологии, прежде всего с точки зрения применения более высоких доз и частоты введения клеточных препаратов, а также разработки нового метода лечения фиброзных заболеваний легких.

ВЫВОДЫ

1. При формировании аэрозоля в разных видах небулайзеров наибольшая выживаемость МСК была выявлена в компрессорном небулайзере (72%), при использовании ультразвукового небулайзера наблюдалась гибель 90% клеток, а после прохождения через в сетчатый (меш) небулайзер живые клетки в аэрозольном конденсате не определялись.
2. При внутривенной и ингаляционной доставке аллогенных МСК костного мозга кроликам с экспериментальным блеомициновым фиброзом легких было выявлено существенное снижение степени выраженности фиброза в легких по модифицированной шкале Эшкрофта, депозиции коллагена в интерстиции при световой микроскопии, толщине межальвеолярных перегородок и числу внутриальвеолярных макрофагов по данным

альвеолоскопии в сравнении с контрольной группой не леченного блеомицинового фиброза.

3. Эффекты, достигнутые в результате клеточной терапии экспериментального фиброза легких, достоверно не отличаются при внутривенном и ингаляционном введении клеточного препарата, за исключением существенно более низкого числа эндомикроскопически визуализированных внутрипросветных макрофагов в зоне блеомицинового поражения при ингаляционной доставке, чем при внутривенной инфузии МСК.
4. Терапия МСК в кумулятивной дозе $1,6 \times 10^9$ клеток у пациентов с ИЛФ сопровождалась бóльшим числом нетяжелых побочных эффектов, в виде транзиторной лихорадки, озноба и слабости по сравнению с плацебо (26 против 15 эпизодов), которые быстро купировались и не требовали отмены клеточного препарата.
5. Внутривенные инфузии МСК в кумулятивной дозе $1,6 \times 10^9$ клеток у пациентов с ИЛФ к 52-й неделе от начала лечения приводили к существенному замедлению скорости падения ФЖЕЛ и диффузионной способности легких, увеличению дистанции 6-минутной ходьбы и снижению систолического давления в легочной артерии, но не влияли на фиброзный индекс по данным КТВР в сравнении с группой плацебо

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Аллогенные мезенхимальные стволовые клетки могут рассматриваться в качестве терапевтического средства для лечения быстро прогрессирующих форм ИЛФ при непереносимости или недоступности противофиброзных препаратов. В качестве разовой безопасной терапевтической дозы рекомендуется 200 млн клеток, а суммарная безопасная доза может достигать 1 млрд 600 млн МСК.
2. Мезенхимальные стволовые клетки для внутривенного введения должны быть собраны с кондиционной среды не позднее, чем за 2 часа до начала инфузии, в стерильных условиях перенесены в 200-400 мл физиологического раствора при комнатной температуре, суспендированы путем медленного покачивания флакона в течение 3-х минут для равномерного распределения клеточного материала в объеме жидкости.
3. Клеточный препарат должен вводиться внутривенно медленно со средней скоростью 30 капель в минуту,

- используя систему для переливания компонентов крови (не для солевых растворов).
4. Для купирования пирогенной реакции, которая может возникнуть при инфузии клеточного препарата, следует использовать внутривенное болюсное введение 8 мг дексаметазона или 60 мг раствора преднизолона.
 5. Для ингаляционной доставки стволовых клеток в дыхательные пути рекомендуется использование компрессорного небулайзера, при суспендировании клеточной массы в 10 мл физиологического раствора.
 6. При планировании новых клинических исследований клеточных препаратов, расчета дозировок, частоты и кратности введения следует учитывать постепенное и дозозависимое развитие эффектов трансплантированных клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Данилевская, О.В. Особенности проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии дистальных дыхательных путей и принципы морфометрического анализа / О.В. Данилевская, А.В. Сорокина, А.В. Аверьянов, Д.В. Сазонов, Ф.Г. Забозлаев, О.П. Кузовлев, О.Р. Шабловский, А.Г. Сотникова, Ю.Д. Удалов // Эндоскопическая хирургия. – 2013. – № 5. – С. 28-36.
2. Аверьянов, А.В. Сравнительное исследование эффектов мезенхимальных стволовых клеток при различных методах доставки в экспериментальной модели фиброза легких / А.В. Аверьянов, А.Г. Коноплянников, Ф.Г. Забозлаев, А.Г. Сотникова, О.В. Данилевская, М.А. Коноплянников, А.Р. Татарский // Клиническая практика. – 2018. – Том 9, №4. – С. 4-14.
3. Аверьянов, А.В., Эффективность клеточной терапии быстро прогрессирующего легочного фиброза – результаты рандомизированного плацебо контролируемого исследования / А.В. Аверьянов, М.А. Коноплянников, И.А. Королева, А.Г. Сотникова, В.А. Кальсин, В.П. Баклаушев // StemCellBio-2018. Фундаментальная наука как основа клеточных технологий. Санкт-Петербург, 2018. – С. 5-6.
4. Averyanov, A. Safety and Efficacy of Transplantation of High Cumulative Dose Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Rapid

- Lung Function Decline / A. Averyanov, I. Koroleva, A. Sotnikova, M. Konoplyannikov, V. Lesnyak, O. Danilevskaya, V. Baklaushev // *Am J Resp Crit Care Med.* – 2019 – 199-A2640.
5. Averyanov, A. High cumulative dose of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with progressive idiopathic pulmonary fibrosis / A. Averyanov, A. Sotnikova, I. Koroleva, M. Konoplyannikov, O. Danilevskaya, V. Lesnyak, V. Baklaushev // *ERJ suppl.* – ERS Congress abstracts. – 2019. PA1297.
 6. Аверьянов, А.В. Перспективы клеточных технологий в лечении идиопатического легочного фиброза / А.В. Аверьянов, А.Г. Сотникова // *Практическая пульмонология.* – 2019. – № 2. – С. 51-56.
 7. Averyanov, A. First-in-human high cumulative dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline / A. Averyanov, I. Koroleva, M. Konoplyannikov, V. Revkova, V. Lesnyak, V. Kalsin, O. Danilevskaya, A. Nikitin, A. Sotnikova, S. Kotova, V. Baklaushev // *Stem Cells Transl Med.* – 15 Oct 2019. – P. 1-11. Epub ahead of print. DOI: 10.1002/sctm.19-0037.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
 ГЭРБ – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь
 ИЛФ – идиопатический легочный фиброз
 КЛЭМ – конфокальная лазерная эндомикроскопия
 КТ – компьютерная томография
 КТВР – компьютерная томография высокого разрешения
 МСК – мезенхимальные стволовые клетки
 ОИП – обычная интерстициальная пневмония
 ОФV₁ – объем форсированного выдоха за первую секунду
 СК – стволовые клетки
 ФГБУ – Федеральное государственное бюджетное учреждение
 ФМБА – Федеральное медико-биологическое агентство
 ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких
 ФНКЦ – Федеральный научно-клинический центр
 DLCO – диффузионная способность легких по монооксиду углерода
 IL-6 – интерлейкин 6
 SpO₂ – сатурация кислорода
 TGF-β1 – трансформирующий фактор роста бета-1
 TNF-α – фактор некроза опухоли альфа