

На правах рукописи

Бондаренко Наталья Анатольевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (Новосибирск)

Научные руководители:

академик РАМН,
доктор медицинских наук,
профессор

Коненков Владимир Иосифович

доктор медицинских наук

Повещенко Александр Федорович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Толстикова Татьяна Генриховна
заведующая лабораторией фармакологиче-
ских исследований ФГБУН «Новосибир-
ский институт органической химии им.
Н.Н.Ворожцова» СО РАН

доктор биологических наук,
доцент

Постникова Ольга Алексеевна
заведующая кафедрой информатики и
математики Новосибирского государствен-
ного медицинского университета МЗ РФ

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский инсти-
тут молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии
медицинских наук (Новосибирск).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2013 г. в ____ ч на заседании Сове-
та по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.037.01 в ФГБУ «НИИ регио-
нальной патологии и патоморфологии» СО РАМН по адресу: 630117, Новосибирск, ул. Ти-
макова, 2, тел. 334-84-38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ региональной патологии и
патоморфологии» СО РАМН.

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
Совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
Д 001.037.

Молодых Ольга Павловна
доктор биологических наук, профессор

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) представляют собой уникальную популяцию клеток, которые, как и эмбриональные ангиобласты, способствуют формированию сосудов в постнатальном периоде как за счет ангиогенеза, так и путем васкулогенеза, когда в ответ на ангиогенные ростовые факторы ЭПК мигрируют из ниши костного мозга в кровеносное русло, циркулируют и трансформируются в тканях в локальные адгезивные ЭПК (Kawamoto A., 2003; Кескинов А.А., 2008; Fadini G., 2008; Jiga J., 2013). Доступным источником аутологичных ЭПК является периферическая кровь после фармакологической мобилизации клеток костного мозга человеческим рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) (Дыгай А.М., 2010; Румянцев С.А., 2010).

Участие ЭПК в неоваскуляризации обусловлено не только их способностью дифференцироваться в эндотелиальные клетки, участвуя в формировании новых сосудов, но и способностью продуцировать различные регуляторные ростовые факторы и цитокины, стимулирующие васкуло- и ангиогенез (Kinnaird T., 2004; Kim WS., 2013).

На сегодняшний день изучение ангиогенных свойств ЭПК осуществляется с использованием клеточных линий. Так, эндотелиальные клетки человека линии EA.Hu92 как морфологически, так и функционально отражают свойства зрелых эндотелиальных клеток, что позволяет оценить как влияние ЭПК на зрелые эндотелиальные клетки, так и влияние зрелых эндотелиальных клеток на ЭПК, моделируя взаимодействие различных популяций клеток в организме (Bauer J., Edgell C.J., 1992).

В экспериментальных моделях ишемии тканей показано стимулирующее действие ЭПК на формирование сосудистой сети как *in vitro*, так и *in vivo* (Rafii S., 2003). Хотя ЭПК уже используются в клеточной терапии хронической сердечной недостаточности (ХСН), их свойства у пациентов практически не изучены. В связи с этим необходимо более полное понимание биологических свойств используемых клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

Таким образом, представляется актуальным изучение функциональных свойств, таких как пролиферация, миграция, продукция проангиогенных факторов и способность стимулировать ангиогенез, различных популяций ЭПК пациентов с ХСН.

Цель исследования – охарактеризовать морфологические и функциональные свойства циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью, мобилизованных в периферическое русло введением G-CSF, и эндотелиальных клеток, выращенных *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Оценить фенотип и морфологию циркулирующих и культивируемых ЭПК при хронической сердечной недостаточности.

2. Изучить спектр продукции цитокинов и ростовых факторов ЭПК до и после мобилизации в периферическое русло введением G-CSF и с учетом условий культивирования на различных адгезионных белках и сроках культивирования.

3. Выявить тип влияния биоактивных веществ, продуцируемых ЭПК на функциональную активность (пролиферация, миграция) клеток эндотелиальной линии человека EA.Hu926.

4. Изучить влияние биоактивных веществ, продуцируемых клетками эндотелиальной линии человека EA.Hu926, на функциональную активность (пролиферация, миграция) ЭПК пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

Научная новизна. Впервые исследован популяционный состав и функциональная активность циркулирующих ЭПК, мобилизованных введением G-CSF, пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности. Показано, что при мобилизации G-CSF клеток из костного мозга происходит увеличение количества различных популяций ЭПК, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Впервые показано, что у мобилизованных G-CSF мононуклеарных клеток (МНК), обо-

гашенных ЭПК, отмечена высокая пролиферативная активность, способность к хоумингу, продукция широкого спектра цитокинов и ростовых факторов. Показано, что циркулирующие ЭПК различной степени зрелости пациентов с хронической сердечной недостаточностью сопряжены с продукцией цитокинов и ростовых факторов, продуцируемых МНК.

Впервые установлено, что культура ЭПК, полученная из МНК, мобилизованных введением G-CSF при хронической сердечной недостаточности, характеризуется пролиферативной и миграционной активностью. Показано, что «ранние» и «поздние» ЭПК *in vitro* обладают различной продуцирующей активностью цитокинов, ростовых факторов и оксида азота (NO).

Впервые выявлены аутокринные и паракринные взаимодействия ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток.

Научно-практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе исследования влияния G-CSF на мобилизацию стволовых/прогениторных клеток из костного мозга пациентов с ХСН расширяют представления о фенотипических и таких функциональных свойствах стволовых/прогениторных клеток, как пролиферация, миграция, продукция цитокинов и ростовых факторов.

Результаты диссертационной работы учитываются при комплексной терапии пациентов с ХСН в ФГБУ «ННИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ (Новосибирск). Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО НГПУ (Новосибирск).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Введение G-CSF приводит к мобилизации из костного мозга пациентов с хронической сердечной недостаточностью различных популяций ЭПК, находящихся на различных этапах дифференцировки.

2. МНК, обогащенные ЭПК, периферической крови и ЭПК, полученные *in vitro*, обладают высоким пролиферативным потенциалом и в процессе дифференцировки секретируют целый ряд проангиогенных цитокинов и ростовых факторов.

3. ЭПК обладают аутокринным и паракринным регуляторным потенциалом.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010); X Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии» (Новосибирск, 2011); VII научных чтениях, посвященных памяти академика РАМН Е.Н.Мешалкина (Новосибирск, 2011); IV Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2011); III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Актуальные вопросы клеточной и тканевой трансплантологии» (Уфа, 2012); Всероссийской научно-практической конференции «Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии» (Саратов, 2013); XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов, иллюстрирована 4 таблицами и 21 рисунком. Библиографический указатель включает 194 источников, в том числе 162 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИКЭЛ СО РАМН», г. Новосибирск. В исследовании использованы клетки периферической крови от 72 пациентов (64 мужчины и 8 женщин) в возрасте от 37 до 76 лет, страдающих ИБС с III-IV функциональным классом ХСН по Нью-Йоркской классификации (NYHA), проходящих лечение в ФГБУ «ННИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ. (Новосибирск). От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования.

Рекомбинантный человеческий G-CSF (Grasalva, Израиль) вводился подкожно в дозе 3,3 – 5,0 мкг/кг/сутки в течение 5 дней. МНК до и после мобилизации выделяли из сепарированной крови на градиенте плотности фиколла/верографина ($\rho=1,078$ г/л).

Фенотип ЭПК исследовали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител меченых FITC, PE и APC к CD34, CD45, CD133, рецептору к фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR₂), CD31, CXCR₄, CD14 (Becton Dickinson, США). Иммуноцитохимическим методом исследовали экспрессию CD34 на поверхности клеточной мембраны МНК после мобилизации G-CSF. Пролиферативную активность МНК крови исследовали в спонтанном и стимулированном тестах (Кон А – 5 мкг/мл; ЛПС – 10 мкг/мл (США)), в присутствии G-CSF (50 Ед/мл; Грасальва, Израиль) и Еро (33 Ед/мл; Рекормон, США) спектрофотометрически по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ).

Уровень продукции TNF- α , IL-8, IL-10, IL-18, VEGF, Еро и G-CSF в кондиционных средах (КС) культур МНК, ЭПК и клеточных линий определялся с помощью иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора ЗАО «Вектор-Бест», Россия.

Культура ЭПК была получена из МНК, мобилизованных введением G-CSF, от пациентов с ХСН. МНК культивировали в эндотелиальной среде (EGM-2, Lonza, Switzerland) с 10% FCS (Биолот, Россия), 160 мкг/мл гентамицин сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в культуральных флаконах, предварительно обработанных фибронектином (Sigma-Aldrich, США) и желатином (Мосхимфармпрепараты, Россия). Через 48 часов адгезивные клетки культивировали в течение 8 и 16 суток для получения культуры «ранних» и «поздних» ЭПК.

Клетки эндотелиальной линии EA.Hu926 были любезно предоставлены Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Культивирование клеток EA.Hu926 проводили в питательной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) в присутствии гипоксантина, аминоптерина и тимидина (ICN, США). КС ЭПК и клеток EA.Hu926 получали от 72 часовой культуры, хранили при -70°C до использования.

Пролиферативную и миграционную активность культуры ЭПК и клеток EA.Hu926 изучали на аппарате xCELLigence System (Roche, США). Оценивали уровень пролиферативной активности: 1) культур ЭПК при добавлении КС (30% от общего объема лунки) от клеток EA.Hu926, G-CSF (Грасальва, Израиль; 300 мкг/мл), VEGF (BioVision, США; 10 нг/мл), Еро (Рекормон, Германия; 33,4 МЕ/мл); 2) клеток EA.Hu926 при добавлении КС от культур ЭПК и Еро. В двухуровневых камерах изучали миграцию культур ЭПК при добавлении КС от клеток EA.Hu926; и клеток EA.Hu926 под влиянием КС от культур ЭПК, Еро, VEGF, TNF- α (Sigma-Aldrich, США; 5 нг/мл).

Горизонтальную миграцию клеток EA.Hu926 изучали при добавлении КС от культуры ЭПК путем десквамации конфлюэнтного монослоя клеток с помощью прибора Cell-IQ (CM Technologies Ltd., Финляндия). Изображения фиксировались каждые 15 минут в течение 24 часов.

Продукцию NO в КС определяли с помощью реактива Грисса, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 540 нм.

Полученные результаты исследования статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 6,0 for Windows (StatSoft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно критериям Колмогорова-Смирнова, меры централь-

ной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (LQ) и верхним (Hq) квартилями. Достоверность различий оценивали по критериям Манна-Уитни (в независимых группах). Наличие взаимосвязей между явлениями устанавливали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая характеристика ЭПК, мобилизованных G-CSF от пациентов с ХСН. Нами установлено, что у пациентов с ХСН в периферической крови до проведения процедуры мобилизации G-CSF содержится незначительное количество ЭПК, за исключением циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом CD34-/CD31+ и CD34-/VEGFR₂+, CD14-/VEGFR₂+, а также ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом CD14+/VEGFR₂+ (табл. 1).

Таблица 1. Относительное количество ЭПК от пациентов с ХСН (n=30)

Фенотип ЭПК	Количество клеток (в %; Me; LQ-HQ)	
	в периферической крови до мобилизации G-CSF	в периферической крови после мобилизации G-CSF
1. CD34+	0,01 (0,01-0,07)	0,425 (0,25-0,64) $p_u=0,000024$
2. CD34+/CD133+	0,01 (0,01-0,01)	0,025 (0,01-0,04) $p_u=0,01$
3. CD34-/CD133+	0,1 (0,05-0,1)	0,4 (0,05-0,6) $p_u=0,0039$
4. CD34+/VEGFR ₂ +	0,01 (0,01-0,02)	0,095 (0,08-0,1) $p_u=0,004$
5. CD34-/VEGFR ₂ +	0,275 (0,175-0,6)	0,95 (0,85-1,1) $p_u=0,004$
6. CD34+/CD31+	0,1 (0,05-0,28)	0,28 (0,04-0,3) $p_u=0,02$
7. CD34-/CD31+	15,9 (12,3-30,0)	18,0 (13-32) $p_u=0,04$
8. CD14-/VEGFR ₂ +	0,615 (0,415-2,425)	2,9 (1,35-5,35)
9. CD14+/VEGFR ₂ +	0,7 (0,1-3,9)	3,8 (0,13-6,3) $p_u=0,003$

Выявлено статистически значимое возрастание количества популяций ЭПК с фенотипом CD34+, CD34+/CD133+ и CD34+/VEGFR₂+. Относительное количество CD34-/CD133+ клеток, представляющие собой самую незрелую популяцию анализируемых ЭПК, статистически значимо увеличивается в 16 раз после мобилизации G-CSF по сравнению с популяцией клеток CD34+/CD133+, которые являются более зрелыми ЭПК ($p < 0,05$). Выявлено статистически значимое увеличение пула циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом CD34-/VEGFR₂+ в 10 раз по сравнению с количеством зрелых ЭПК с фенотипом CD34+/VEGFR₂+ ($p < 0,02$). Показано статистически значимое увеличение количества зрелых ЭПК с фенотипом CD34+/CD31+ и циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом CD34-/CD31+ после мобилизации G-CSF. В процессе мобилизации статистически значимо возрастает количество ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом CD14+/VEGFR₂+

Иммуноцитохимическое исследование показало наличие экспрессии на поверхности клеточной мембраны CD34 МНК после мобилизации G-CSF.

Таким образом, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью в процессе

мобилизации отмечено увеличение количества различных популяций ЭПК разной степени зрелости.

Исследование функциональной активности МНК, содержащих обогащенную фракцию ЭПК, полученных в ходе процедуры мобилизации G-CSF от пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

Изучение пролиферативной активности показало, что после процедуры мобилизации G-CSF, как в спонтанных условиях, так и при стимуляции митогенами и цитокинами, происходит увеличение пролиферации МНК по сравнению с аналогичными показателями до процедуры мобилизации G-CSF ($p < 0,05$). Причем, с увеличением количества CD34+ ЭПК, возрастает пролиферативная активность МНК, что говорит о вовлечении в пролиферативный ответ данной популяции клеток. Кроме того, пролиферативный потенциал подтверждает увеличение колониеобразующей активности МНК, обогащенных ЭПК, пациентов с ХСН после процедуры мобилизации G-CSF в виде увеличения количества КОЕ в 63 раза ($p < 0,01$).

Выявлено, что у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF увеличивается количество ЭПК с фенотипом CD34+, экспрессирующих на своей поверхности хоуминг-рецептор CXCR₄, с $132 \times 10^3/\text{л}$, до $1,06 \times 10^6/\text{л}$ ($p = 0,04$), что отражает способность данной популяции ЭПК к миграции в места ишемии, и вероятность встраивания клеток в поврежденный миокард.

Цитокиновый профиль МНК, обогащенных ЭПК, в ходе мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН. Было выявлено, что МНК после мобилизации G-CSF продуцируют регуляторные цитокины и ростовые факторы как спонтанно, так и в ответ на различные стимулы (табл. 2). Установлено статистически значимое увеличение спонтанной продукции IL-18, VEGF, EPO и сохранность продукции IL-10, IL-8 в процессе мобилизации. С другой стороны, уровень TNF- α и G-CSF статистически значимо снизился по сравнению с продукцией до введения G-CSF. Ранее нами показана сопряженность секреторного уровня МНК TNF- α , EPO и GM-CSF и перфузии миокарда у пациентов с ХСН (Коненков В.И., 2011).

В то же время, обнаружено статистически значимое увеличение продукции IL-8, VEGF и G-CSF в ответ на митогенный стимул КонА и снижение продукции IL-8, по сравнению с показателями продукции до проведения мобилизации. В ответ на ЛПС наблюдается статистически значимое увеличение продукции МНК IL-18 и G-CSF и снижение продукции TNF- α по сравнению с уровнем продукции до мобилизации G-CSF.

Кроме того, добавление в культуру проангиогенных цитокинов G-CSF или EPO приводит к статистически значимому увеличению продукции TNF- α , IL-10, VEGF и G-CSF. Это свидетельствует не только о возможных паракринных воздействиях, но и аутокринном влиянии указанных цитокинов, продуцируемых МНК. ЭПК вносят вклад в продукцию указанных цитокинов. Так, нами показано, что введение G-CSF приводит к мобилизации в периферическую кровь различных популяций стволовых клеток - гемопоэтических, эндотелиальных, мультипотентных мезенхимальных, функциональная активность которых обусловлена секрецией цитокинов. (Коненков В.И., 2011).

Таким образом, установлено, что МНК, обогащенные ЭПК, обладают высокой пролиферативной активностью, способны к осуществлению хоуминга и продуцируют широкий спектр цитокинов, в том числе, с проангиогенным действием, которые могут вносить существенный вклад в аутокринный и паракринный эффекты ЭПК на процессы репарации/регенерации ишемизированной ткани.

Таблица 2. Показатели уровней цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах от МНК, обогащенных ЭПК, до и после завершения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n=35)

Уровни продукции (Me; LQ-HQ)		Тип продукции				
		Спонтанная	Кон А	ЛПС	G-CSF	Еро
TNF- α (пг/мл)	до	102 (100-175,6)	420 (172-1376)	644 (405-900)	80,5 (55-110)	100 (99-101)
	после	33 (23-85) p_u=0,0003	278(188-738) p _u =0,59	240 (130-370) p _u =0,14	425 (208-888) p_u=0,002	990 (792-1298) p_u=0,0007
IL-10 (пг/мл)	до	67,7 (57,1-101)	570,6 (101-745,9)	534,7 (345-694)	525 (338-650)	294,5 (189-300)
	после	72 (22-102) p _u =0,72	484,6(101748,3) p _u =0,47	680,3 (102-119,6) p _u =0,75	1294 (990-1520) p_u=0,001	895 (790-1190) p_u=0,001
IL-18 (пг/мл)	до	33 (18-102)	58 (50-64,5)	39,2 (36-40)	181(167-198)	399 (212-415)
	после	103 (67-135,5) p_u=0,034	197 (102-374,8) p_u=0,017	147,2 (102-256) p_u=0,0004	235 (113-274) p _u =0,4	190,5 (104-227,8) p_u=0,05
IL-8 (пг/мл)	до	732,9 (103-965)	1550 (147-4450)	1425 (120-4000)	3115 (2980-3345)	3840 (2890-4160)
	после	735,7 (103-822,5) p _u =0,31	740,2 (420-4805) p=0,09	735 (350-4065) p _u =0,14	1729 (357-3586) p _u =0,17	1578 (348-3100) p_u=0,008
Еро (МЕ/мл)	до	27 (17,8-101)	215,7 (161,4-277)	234,8 (171,9-240)	90 (80-101)	2085 (237-2350)
	после	102 (35,6-306,5) p_u=0,008	213,5 (130-289) p _u =0,67	162,5 (129-222,6) p _u =0,63	176,5 (132-201) p_u=0,05	1671,5 (1267-1896) p _u =0,4
G-CSF (пг/мл)	до	13 (10-101)	135,5 (127-165)	16,1 (15-18)	9,5 (8,5-11)	8,5 (7,8-10,5)
	после	11 (10-30,2) p _u =0,3	967 (769-1010) p_u=0,0007	940 (763-3332) p_u=0,0007	986 (815-3680) p_u=0,006	865,5 (586-3660) p_u=0,0007
VEGF (пг/мл)	до	256 (102-450)	293,5 (256-300)	448 (432,7-458,4)	172,9(156,3-180)	253,4 (219,6-270)
	после	298 (113-340) p_u=0,03	300 (287,5-339,5) p_u=0,01	386,7 (211,5-470) p _u =0,09	298 (240,5-389) p_u=0,001	327 (278-492) p_u=0,03

Примечание: p_u – достоверность различий по сравнению с показателями продукции цитокинов и ростовых факторов до введения G-CSF (U- критерий Манна-Уитни)

Изучение взаимосвязей количества циркулирующих ЭПК мобилизованных G-CSF с продукцией цитокинов и ростовых факторов. Нами установлено наличие высокой и прямой взаимосвязи между количеством в периферической крови у пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF ЭПК с фенотипом CD34-/CD133+ и уровнем TNF- α (R=0,729; p=0,02); между количеством CD34+/VEGFR₂- и CD34+/VEGFR₂ ЭПК и продукцией IL-18 (R=0,7; p=0,03 и R=0,82; p=0,01; соответственно). Уровень секреции Еро имел высокую и прямую сопряженность с количеством ЭПК с фенотипом CD34-/VEGFR₂+, а продукция VEGF взаимосвязана с количеством ЭПК с фенотипом CD34+/CD31+. Также установлена высокая и прямая сопряженность количества ЭПК с фенотипом CD34-/CD31+ с продукцией IL-10 (R=0,9; p=0,03). Таким образом, можно предположить, что клетки практически всех анализируемых фенотипов (CD34-/CD133+, CD34+/VEGFR₂-, CD34+/VEGFR₂, CD34-/VEGFR₂+, CD34+/CD31+, CD34-/CD31) принимают активное участие в продукции цитокинов, обладающих выраженной проангиогенной активностью.

Многими авторами показано, что циркулирующие в периферической крови ЭПК

способны дифференцироваться *in vitro* в два типа ЭПК («ранние» и «поздние») (Hill J., 2003; Yoder M.C., 2007; Timmermans F., 2009). В связи с этим необходимо было исследовать способность ЭПК пациентов с ХСН образовывать культуры эндотелиальных клеток *in vitro*.

Получение культуры ЭПК из МНК после мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН. Показана способность МНК, с учетом предобработки культуральных флаконов адгезионными белками межклеточного матрикса фибронектином и желатином, дифференцироваться в те или иные типы ЭПК.

Установлено, что до 10-го дня культивирования МНК адгезируют к поверхности флакона и к 14 дню формируют монослой, преимущественно состоящий из мелких округлых и слабо пролиферирующих клеток (рис. 1, А). Кроме этого, к 14-м суткам отмечено появление кластеров ЭПК, а затем и колоний (рис. 1, Б). Затем к 21-м суткам культивирования ЭПК приобретают веретенообразную форму и выстраиваются в тубулоподобные структуры, что свидетельствует о способности данных клеток к сосудообразованию (рис. 1, В).

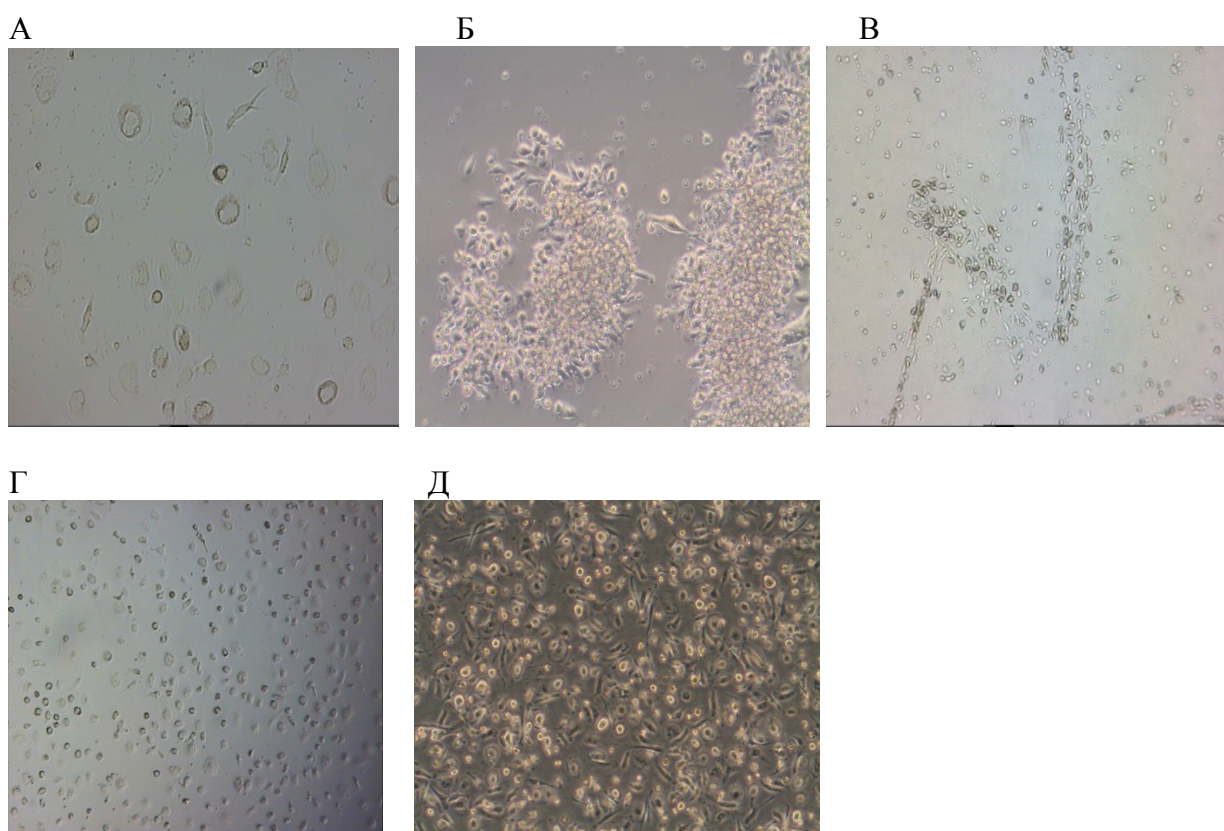


Рис. 1. Морфология адгезировавшей фракции МНК, полученных от пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (x10) (n=6).

Примечание. А) монослой клеток на 14 сутки, Б) кластеры ЭПК, В) выстраивание ЭПК в тубулоподобные линии на 21 сутки, Г) активно пролиферирующие ЭПК на 21 сутки, Д) морфология ЭПК на 27 сутки культивирования *in vitro*.

Далее при культивировании МНК отмечается увеличение плотности клеток, что свидетельствует об активном высоком пролиферативном потенциале данных клеток (рис. 1 Г). В период на 30 – 60 сут культивирования ЭПК сохраняли высокий пролиферативный потенциал. В эти сроки ЭПК претерпевали морфологические изменения, становились расплывчатыми и приобретали вид «глыбчатой мостовой», что является морфологической характеристикой принадлежности такого типа клеток к ЭПК (рис. 1, Д).

Таким образом, в периферической крови пациентов с ХСН по завершении курса моби-

лизации G-CSF подтверждено наличие МНК, дающих начало росту ЭПК.

Исследование функциональной активности культуры ЭПК периферической крови после курса мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН. Показано, что пролиферация ЭПК культуры, полученной после мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН, статистически значимо увеличивается к 4-му часу эксперимента в присутствии КС от клеток EA.Hu926 (КИ=0,26; $p=0,01$), по сравнению со спонтанной пролиферацией ЭПК (КИ=0,19). Надо отметить, что КС от клеток EA.Hu926 оказывает большее стимулирующее воздействие на пролиферацию, чем такие известные ангиогенные факторы, как VEGF, G-CSF, EPO (КИ=0,22; 0,24; 0,25 соответственно).

На более длительных сроках наблюдения установлено, что наибольшим стимулирующим эффектом на пролиферацию ЭПК обладали КС клеток EA.Hu926 (КИ=0,3; $p=0,02$) и EPO (КИ=0,28; $p=0,03$) (рис. 2, А). С другой стороны, КС, содержащая продукты секреции ЭПК от пациентов с ХСН, также статистически значимо увеличивает пролиферацию клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 (КИ=0,7; $p=0,01$) в сравнении со спонтанной пролиферацией (КИ=0,1), что сопоставимо с влиянием на пролиферацию EPO (КИ=0,8; $p=0,02$) (рис. 2, Б).

Помимо пролиферации, важной функциональной характеристикой ЭПК является способность к миграции, в том числе в ишемизированные ткани. Поэтому следующим этапом стало изучение миграции ЭПК культур пациентов и клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 под влиянием цитокинов и ростовых факторов.

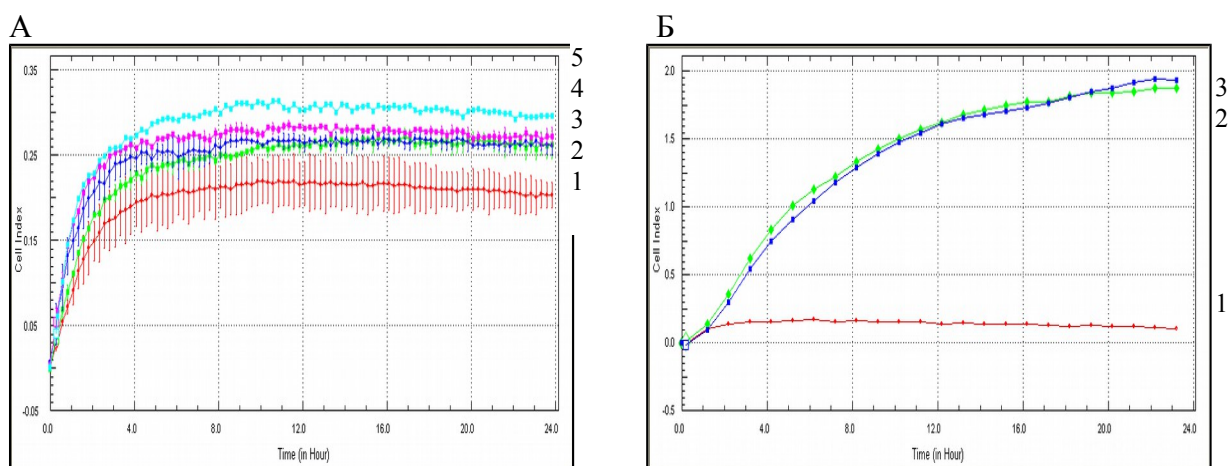


Рис. 2. Показатели пролиферативного потенциала: А) культуры ЭПК, мобилизованных G-CSF от пациентов с ХСН; Б) клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 (n=8).

Примечание. А: красная линия (1)– спонтанная пролиферация; зеленая линия (2)– пролиферация в присутствии VEGF; синяя линия (3) – пролиферация в присутствии G-CSF; розовая линия (4)– пролиферация в присутствии ЭПО; голубая линия (5) – пролиферация в присутствии 30% КС от эндотелиальной линии EA.Hu926; по оси абсцисс – клеточный индекс; по оси ординат – время (в часах). Б: красная линия (1) – спонтанная пролиферация; зеленая линия (2)– пролиферации в присутствии EPO; синяя линия (3)– пролиферации в присутствии 30% кондиционной среды от ЭПК мобилизованных G-CSF.

Так, установлено, что КС от клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 увеличивает миграционную активность культуры ЭПК к 4 часу эксперимента (КИ=0,05; $p=0,01$) по сравнению со спонтанной активностью ЭПК (КИ=0,001) (рис. 3, А). Максимального уровня миграционная активность ЭПК достигает к 12 часам эксперимента. Клетки эндотелиальной линии EA.Hu926 к 4-му часу эксперимента статистически значимо быстрее мигрируют в присутствии КС от культуры ЭПК (КИ=0,56; $p=0,01$) по сравнению со спонтанной миграцией (КИ=0,26). В данном случае EPO и VEGF не оказывают влияния на миграцию

ЕА.Ну926 (КИ=0,3 и КИ=0,27соответственно) (рис. 3, Б). На последующих сроках эксперимента отмечено статистически значимое увеличение миграции клеток ЕА.Ну926 в присутствии КС от ЭПК (КИ=1,4; $p=0,01$) и Еро (КИ=1,3; $p=0,02$), достигавшее максимально стимулирующего эффекта этих веществ к 24 часам эксперимента.

Нами исследован паракринный эффект биологически активных веществ, содержащихся в КС ЭПК от пациентов с ХСН, на горизонтальную миграцию клеток эндотелиальной линии ЕА.Ну926 в режиме реального времени. Выявлено, что клетки эндотелиальной линии ЕА.Ну926 к 48 часам эксперимента закрывают бесклеточную поверхность до 70% от исходных значений. В то же время, площадь закрытия бесклеточной поверхности в присутствии 30% КС от ЭПК пациентов с ХСН достигает 90%. Причем, под действием КС от культуры ЭПК клетки ЕА.Ну926 более активно мигрируют в зону повреждения уже в первые часы эксперимента, и к 6 часу эксперимента покрывают до 45% площади бесклеточной поверхности.

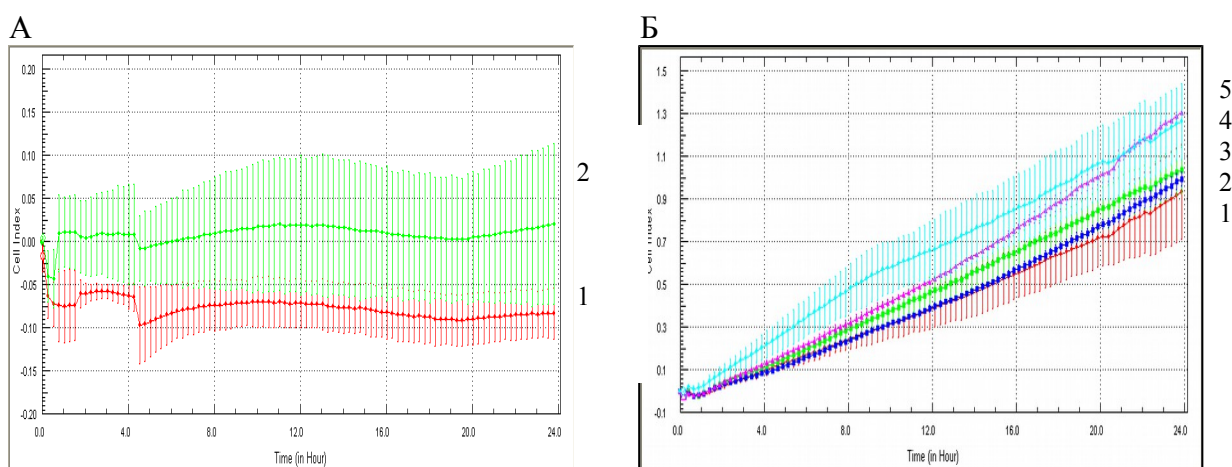


Рис. 3. Показатели миграционной активности: А) культуры ЭПК, мобилизованных G-CSF, от пациентов с ХСН; Б) клеток эндотелиальной линии Еа.Ну926 (n=8).

Примечание А: красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии 30% КС от эндотелиальной линии ЕА.Ну926; по оси абсцисс – клеточный индекс; по оси ординат – время (в часах). Б: красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии VEGF; синяя линия – миграция в присутствии TNF- α ; розовая линия – миграция в присутствии Еро; голубая линия – миграция в присутствии 30% КС от ЭПК мобилизованных G-CSF.

Таким образом, ЭПК стимулируют пролиферацию и миграцию зрелых эндотелиальных клеток (на примере эндотелиальной линии ЕА.Ну926), и в свою очередь зрелые эндотелиальные клетки способствуют пролиферации и миграции ЭПК путем паракринного механизма.

Исследование цитокинового профиля культур «ранних» и «поздних» ЭПК периферической крови после курса мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН. Исследования ряда авторов показали, что два вида ЭПК («ранние» и «поздние») различаются как морфологически, так и функционально, в частности по продукции цитокинов и ростовых факторов, и тем самым вносят различный вклад в развитие сосудистой сети (Hur J., 2003; Urbich C., 2005; Sugiyama T, 2006).

Нами показано, что ЭПК от пациентов с ХСН в культуре продуцируют ряд цитокинов и ростовых факторов, с учетом культивирования на разных адгезионных белках внеклеточного матрикса и сроках культивирования.

Так, ЭПК при культивировании на фибронектине к 8-м суткам (культура представлена «ранними» ЭПК), продуцируют широкий спектр цитокинов и ростовых факторов, таких как TNF- α (10 пг/мл), IL-10, (668,7 пг/мл), IL-18 (612 пг/мл), IL-8 (4442 пг/мл), Еро (132,5

мМЕ), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (536,7 пг/мл) (рис. 4, А). На более поздних сроках культивирования, когда в культуре ЭПК появляются «поздние» ЭПК (16 сутки) отмечено, что продукция большинства цитокинов и ростовых факторов, принимающих участие на разных этапах ангиогенеза, статистически значимо снижается IL-10 (320 пг/мл; $p=0,05$), IL-18 (95 пг/мл; $p=0,003$), IL-8 (1040 пг/мл; $p=0,003$), Epo (5 мМЕ; $p=0,003$), VEGF (255 пг/мл; $p=0,004$), но в тоже время продукция провоспалительного цитокина TNF- α (10,5 пг/мл) и G-CSF (10 пг/мл) остается на том же уровне. Что же касается культуры ЭПК, культивировавшихся на желатиновой основе, то к 8 суткам (культура представлена «ранними» ЭПК) продукция цитокинов и ростовых факторов ими составила TNF- α (297 пг/мл) и Epo (900 мМЕ), что выше по сравнению с культурой ЭПК, культивировавшихся на фибронектине (рис. 4, Б).

В то же время, продукция таких цитокинов и ростовых факторов, как IL-10 (11 пг/мл), IL-18 (7,5 пг/мл) IL-8 (520 пг/мл), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (107 пг/мл) была снижена по сравнению с продукцией аналогичных биоактивных веществ культурой ЭПК, культивировавшихся на фибронектине. С увеличением срока культивирования к 16-м суткам на желатине и появлением в культуре «поздних» ЭПК отмечается снижение продукции TNF- α (66 пг/мл; $p=0,004$), IL-8 (205 пг/мл; $p=0,003$), Epo (155,5 пг/мл; $p=0,004$), при этом сохраняется на прежнем уровне продукция G-CSF (10 пг/мл). В то же время, статистически значимо увеличивается продукция IL-10 (147,5 пг/мл; $p=0,01$), IL-18 (178 пг/мл; $p=0,04$) и VEGF (171 пг/мл; $p=0,02$), по сравнению с продукцией данных цитокинов и ростовых факторов «ранними» ЭПК (рис. 4, Б). «Ранние» и «поздние» ЭПК способствуют неоангиогенезу за счет синергичного взаимодействия между собой, обеспечивая сосудообразование и перфузию в ишемизированной ткани (Yoon С.Н., 2005).

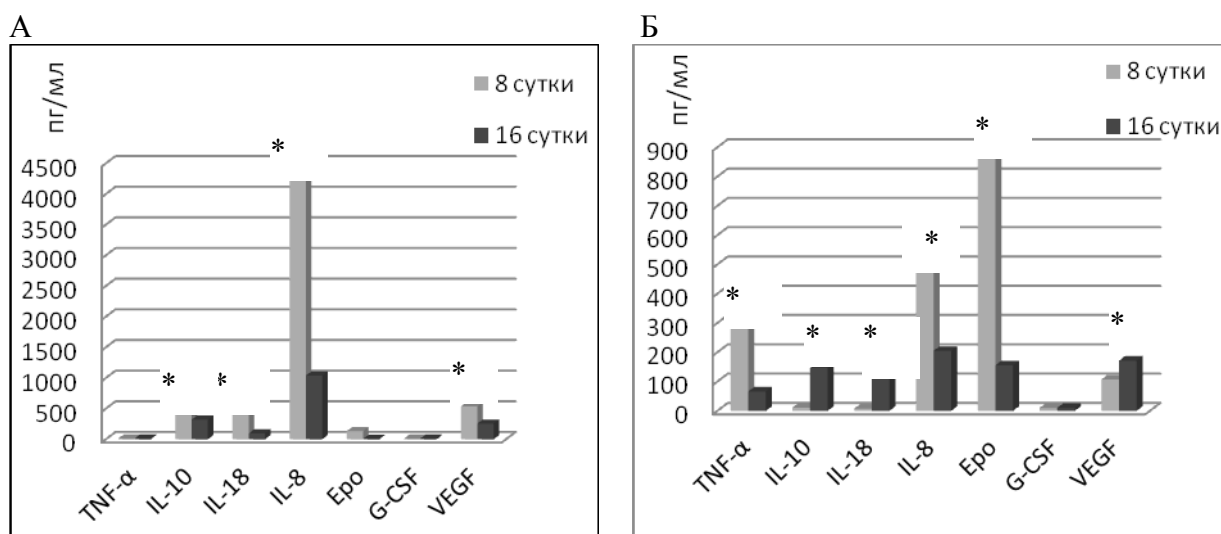


Рис. 4. Уровни продукции цитокинов и ростовых факторов ЭПК в разные сроки (n=8): А) культивированные на фибронектине, Б) культивированные на желатине. Примечание: * – достоверность различия параметров на 8- и 16-е сутки культивирования ЭПК (U – критерий Манна-Уитни).

Кроме того, эндотелиальные клетки характеризуются продукцией стойких метаболитов NO- вазодилатора, который повышает проницаемость эндотелия сосудов, способствуя, тем самым, миграции клеток из кровеносного русла в ткани, что необходимо для ангиогенеза.

Показано, что ЭПК, культивировавшиеся на фибронектине, к 16 суткам статистически значимо снижают уровень продукции NO ($p<0,01$). В то время как для ЭПК, культивированных на желатине, характерно увеличение уровня продукции NO к 16 суткам ($p<0,01$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что на желатине культура в большей степени представлена «поздними» ЭПК, которые за счет увеличенной продукции NO лучше мигрируют в ткани и напрямую участвуют в ангиогенезе ([Hamed S., 2011](#)).

Так, спектр продукции биологически активных веществ, в том числе, цитокинов и ростовых факторов, зависит от сроков и условий культивирования ЭПК.

Подводя итог, можно сделать вывод о том, что МНК полученные от пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF, характеризуются высокой функциональной активностью, способны *in vitro* давать начало культуре ЭПК, клетки которой также активно пролиферируют, мигрируют и продуцируют спектр биологически активных веществ. Таким образом, и циркулирующие ЭПК и ЭПК выращенные *in vitro* можно использовать для трансплантации пациентам с ХСН в целях регенерации поврежденного миокарда.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ХСН введение G-CSF приводит к увеличению количества клеток с фенотипом CD34+/CD45+, CD34+/CD133+, CD34+/VEGFR₂+, CD133+/CD34-, CD34+/CD31+, VEGFR₂+/CD34-, CD31+/CD34-, CD14+/VEGFR₂+, VEGFR₂+/CD14-, что свидетельствует о выходе в периферическое русло ЭПК, находящихся на различных этапах дифференцировки и созревания клеток.

2. Мобилизация G-CSF пациентов с ХСН приводит к увеличению пролиферативного потенциала МНК, обогащенных ЭПК, на различные стимулы, колониеобразующей активности, миграции и широкого спектра продукции цитокинов и ростовых факторов по сравнению с исходными показателями их функциональной активности.

3. ЭПК, мобилизованные в периферическое русло введением G-CSF, от пациентов с ХСН *in vitro* при культивировании на разных адгезионных белках с увеличением срока культивирования имеют различный функциональный потенциал по продукции цитокинов и ростовых факторов, что позволяет условно разделить их на популяции «ранних» и «поздних» ЭПК.

4. Продукты секреции ЭПК статистически значимо стимулируют пролиферативный и миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.Hy926, а продуцируемые клетками эндотелиальной линии EA.Hy926 биоактивные вещества в свою очередь статистически значимо увеличивают функциональный потенциал ЭПК, что позволяет судить о наличии аутокринного и паракринного эффекта регуляции в этих клеточных популяциях.

5. ЭПК, полученные в ходе мобилизации в периферическое русло введением G-CSF пациентам с ХСН, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, обусловленную нахождением на разных этапах дифференцировки, характеризующихся высокой пролиферативной, миграционной и цитокинпродуцирующей активностью, потенциально могут использоваться для стимуляции репарации и регенерации поврежденных сосудов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Кон А – конканавалин А

КС – кондиционная среда

ЛПС – липополисахарид

МНК – мононуклеарные клетки

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭПК – эндотелиальная прогениторная клетка

CXCR₄ – хемокиновый рецептор 4 типа к SDF-1

Еpo – эритропоэтин

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

NO – оксид азота

SDF-1 – стромальный фактор роста-1
TNF- α – фактор некроза опухоли
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR₂ – рецептор к фактору роста эндотелия сосудов

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коненков В.И., Повещенко О.В., Ким И.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Гульева Н.А. (Бондаренко Н.А.), Бернвальд В.В., Шевченко А.В., Голованова О.В., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. [Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью](#) // [Клеточная трансплантология и тканевая инженерия](#). – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 71-75.
2. Коненков В.И., Покушалов Е.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Романов А.Б., Гульева Н.А. (Бондаренко Н.А.), Бернвальд В.В., Соловьева А.О., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. [Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью](#) // [Клеточные технологии в биологии и медицине](#). – 2012. – № 1. – С. 9-13.
3. Гульева Н.А. (Бондаренко Н.А.), Повещенко О.В., Ким И.И., Бернвальд В.В., Янкайте Е.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. [Характеристика проангиогенных свойств мононуклеарных клеток периферической крови после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациентов с ишемической болезнью сердца](#) // [Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: X Международная конференция](#). – Новосибирск, 2011. – С. 125-126.
4. Ким И.И., Повещенко О.В., Коненков В.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Бондаренко Н.А., Повещенко А.Ф., Сергеевичев Д.С., Караськов А.М. [Эффективность мобилизации CD34+ прогениторных клеток препаратом g-G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью](#) // [Патология кровообращения и кардиохирургия](#). – 2012. – № 1. – С. 75-78.
5. Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. [Влияние криоконсервирования на количество эндотелиальных прогениторных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца](#) // [Вестник Уральской медицинской академической науки](#). – 2012. – № 4 (41). – С. 18-19.
6. Повещенко О.В., Ким И.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Бондаренко Н.А., Повещенко А.Ф., Караськов А.М., Коненков В.И. [Клеточные лимфотропные технологии реабилитации пациентов с хронической сердечной недостаточностью](#) // [Профилактическая и восстановительная медицина: Материалы научных советов ЦЭЭР](#). – Новосибирск, 2012. – С. 43-58.
7. Повещенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. [IL-10 и TNF- \$\alpha\$ после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца](#) // [Вестник Уральской медицинской академической науки](#). – 2012. – № 4(41). – С. 148-149.
8. Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Повещенко А.Ф., Ким И.И., Миллер Т.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Коненков В.И. [Оценка эффекта проангиогенных факторов на пролиферативную и миграционную активность клеток эндотелиальной линии EA.Hy926](#) // [Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук](#). – 2013. – Т. 33, № 4. – С. 23-29.
9. Гульева Н.А. (Бондаренко Н.А.), Ким И.И., Повещенко О.В., Бернвальд В.В., Пове-

щенко А.Ф., Колесников А.П., Янкайте Е.В., Хабаров Д.В., Комбанцев Е.А., Смагин А.А., Романов А.Б., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Возможности аутологичной клеточной терапии ишемической сердечной недостаточности // Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции. – Москва, 2010. – С. 24-25.

10. Повещенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Янкайте Е.В., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Сергеевичев Д.С., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у пациентов с ишемической болезнью сердца // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник тезисов IV Всероссийской научной школы-конференции. – Москва, 2011. – С.64-65.

11. Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Повещенко А.Ф., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Караськов А.М., Коненков В.И. Влияние криоконсервации на фенотип прогениторных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колоние-стимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца // Актуальные вопросы клеточной и тканевой трансплантологии: Сборник тезисов V Всероссийского симпозиума с международным участием. – Уфа, 2012.

12. Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Ким И.И., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Изучение пролиферативного потенциала стволовых/прогениторных клеток, мобилизованных введением Г-КСФ у больных с ИБС в режиме реального времени на приборе XCelligence // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: Сборник тезисов III международной научно-практической конференции. – Казань, 2012. – С.198-199.

13. Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Ким И.И., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Коненков В.И. Исследование пролиферации и миграции стволовых/прогениторных клеток, мобилизованных введением Г-КСФ от больных с ишемической болезнью сердца // Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции. – Саратов, 2013. – С. 74.

14. Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Ким И.И., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Коненков В.И. Исследование пролиферации и миграции стволовых/прогениторных клеток, мобилизованных введением Г-КСФ больных с ишемической болезнью сердца и клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: Сборник тезисов XI международной конференции. – Новосибирск, 2013. – С. 50-53.

15. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Янкайте Е.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Коненков В.И. Сравнительная оценка цитокин-продуцирующей активности эндотелиальных прогениторных клеток и зрелых эндотелиальных клеток человека // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: Сборник тезисов XI международной конференции. – Новосибирск, 2013. – С. 181-184.

Соискатель

Н.А.Бондаренко