

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОЛОГИИ» СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПАТОЛОГИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ ИМ. АК. Е. Н. МЕШАЛКИНА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Повещенко Ольга Владимировна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ
МОБИЛИЗОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МОНОНУКЛЕАРНЫХ
КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
В. И. Коненков

Новосибирск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В АНГИОГЕНЕЗЕ.....	18
1.1 Клеточные механизмы и факторы неоангиогенеза.....	18
1.1.1 Механизмы образования новой сосудистой сети.....	18
1.1.2 Ангиогенные факторы в регуляции ангиогенеза.....	20
1.1.3 Роль внеклеточного окружения в ангиогенезе.....	26
1.1.4 Способы стимуляции неоангиогенеза.....	28
1.1.4.1 Факторы роста в стимуляции ангиогенеза.....	28
1.1.4.2 Клетки-кандидаты для регенерации сосудов.....	28
1.2 Эндотелиальные прогениторные клетки в стимуляции ангиогенеза....	31
1.2.1 Фенотипическая характеристика популяций циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток.....	31
1.2.2 Эндотелиальные прогениторные клетки как диагностический и прогностический биомаркер.....	34
1.2.3 Участие эндотелиальных прогениторных клеток в процессах неоваскуляризации.....	35
1.2.4 Функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток.	38
1.2.4.1 Мобилизация эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь.....	38
1.2.4.2 Миграция и хоуминг эндотелиальных прогениторных клеток.....	40
1.2.4.3 Цитокинпродуцирующая активность циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и роль паракринных механизмов в неоваскуляризации.....	42
1.3 Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на мобилизацию эндотелиальных прогениторных клеток.....	44
1.3.1 Биологические эффекты гранулоцитарного	44

колониестимулирующего фактора.....	
1.3.2 Эффективность мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора...	45
1.3.3 Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на биологически активные молекулы.....	47
1.3.4 Эффективность введения мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором эндотелиальных прогениторных клеток при ишемии миокарда.....	48
1.3.5 Другие факторы мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток.....	49
1.4 Изучение ангиогенеза <i>in vitro</i>	51
1.4.1 Способы изучения ангиогенеза <i>in vitro</i>	51
1.4.2 Получение эндотелиальных прогениторных клеток при культивировании и их свойства.....	52
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1. Характеристика пациентов.....	59
2.2 Метод проведения мобилизации мононуклеарных клеток периферической крови.....	60
2.3 Методы исследования фенотипа мононуклеарных клеток периферической крови.....	61
2.4 Иммуноцитохимическое исследование мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками.....	61
2.5 Исследование цитологических параметров мобилизованных мононуклеарных клеток периферической крови методами световой микроскопии.....	62
2.6 Оценка пролиферативной активности мононуклеарных клеток МТТ-тестом.....	62
2.7 Исследование клеточного цикла и апоптоза CD34 ⁺ клеток.....	62
2.8 Оценка колониобразующей активности мононуклеарных	

клеток.....	63
2.9 Получение культуры эндотелиальных прогениторных клеток.....	63
2.10 Условия поддержания жизнеспособности культуры клеток эндотелиальной линии EA. Hy926 человека.....	64
2.11 Получение кондиционных сред культур клеток.....	65
2.12 Исследование концентрации цитокинов в кондиционных средах.....	65
2.13 Оценка пролиферативной активности культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. Hy926 на аппарате xCELLigence System.....	66
2.14 Оценка миграционной способности культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. Hy926 на аппарате xCELLigence System.....	66
2.15 Оценка миграционной способности клеток эндотелиальной линии EA. hy926 на аппарате Cell-IQ.....	67
2.16 Исследование продукции стойких метаболитов оксида азота в кондиционной среде от культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. hy926	68
2.17 Интрамиокардиальное введение мобилизованных мононуклеарных клеток и оценка эффективности введения.....	68
2.18 Статистическая обработка полученных результатов.....	69
ГЛАВА 3 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ МОБИЛИЗАЦИИ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ.	70
3.1 Оценка гемостимулирующей активности гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.....	70
3.2 Эффект введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на выход в периферическое русло крови эндотелиальных прогениторных клеток.....	76

3.3 Исследование функциональной активности мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками.....	88
3.3.1 Изучение пролиферативной активности мононуклеарных клеток в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.	88
3.3.2 Изучение экспрессии рецептора хоуминга CXCR ₄ на эндотелиальных прогениторных клетках в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.....	93
3.3.3 Цитокиновый профиль мононуклеарных клеток в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.....	95
3.3.4 Влияние цитокиновых стимулов на уровень биологически активных веществ мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками.....	97
3.4 Изучение взаимосвязей количества циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток, мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, с продукцией цитокинов и ростовых факторов.....	103
ГЛАВА 4 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПОСЛЕ МОБИЛИЗАЦИИ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ.	107
4.1 Оценка пролиферативных и морфологических свойств эндотелиальных прогениторных клеток, выращенных в <i>in vitro</i>	107
4.2 Исследование функциональной активности культуры эндотелиальных прогениторных клеток.....	111
4.2.1 Исследование уровня продукции цитокинов, ростовых факторов и метаболитов оксида азота эндотелиальными прогениторными клетками на белках внеклеточного матрикса.....	111
4.2.2 Корреляционные связи между продукцией цитокинов эндотелиальными прогениторными клетками на фибронектине и	

желатине.....	116
ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОВЛИЯНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И ЗРЕЛЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ EA.Hy926.....	119
5.1 Исследование уровня цитокинов, ростовых факторов и метаболитов оксида азота в кондиционной среде эндотелиальных прогениторных клеток и клеточной линии EA. hy926.....	119
5.2 Исследование функциональных свойств эндотелиальных прогениторных клеток при влиянии биологически активных веществ, продуцируемых клетками эндотелиальной линии EA. hy926.....	123
5.2.1 Исследование пролиферативного потенциала эндотелиальных прогениторных клеток под воздействием кондиционной среды клеток эндотелиальной линии EA. hy926.....	124
5.2.2 Исследование миграционного потенциала эндотелиальных прогениторных клеток под воздействием кондиционной среды клеток эндотелиальной линии EA. hy926.....	125
5.3 Исследование влияния секреторных факторов эндотелиальных прогениторных клеток на функциональные свойства клеток эндотелиальной линии EA. hy926.....	126
5.3.1 Исследование пролиферативного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hy926 под воздействием кондиционной среды эндотелиальных прогениторных клеток.....	127
5.3.2 Исследование миграционного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hy926 под воздействием кондиционной среды эндотелиальных прогениторных клеток.....	128
5.4 Исследование влияния фибронектина на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA. hy926.....	133
ГЛАВА 6 ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ОБОГАЩЕННЫХ	137

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ.....	
6.1 Функциональное состояние миокарда после интрамиокардиального введения моноклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью.....	137
6.2 Взаимосвязь количества эндотелиальных прогениторных клеток в периферической крови после мобилизации и клинических данных пациентов.....	139
6.3 Изучение взаимосвязей морфофункциональных свойств обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками аутологичных моноклеарных клеток с функциональными параметрами пациентов после интрамиокардиального введения.....	140
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	145
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	174
ВЫВОДЫ.....	176
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	179
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	180
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	182
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	223

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Периферическая кровь после фармакологической мобилизации клеток костного мозга человеческим рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) является доступным источником аутологичных эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) [223; 247; 265].

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 [148; 210; 222].

Изменения в количественном содержании и функциональной активности ЭПК выявлены при многих заболеваниях. При этом снижение пролиферации, миграции ЭПК в очаг повреждения, изменение секреторной активности рассматривается в качестве возможного механизма развития ишемической болезни сердца (ИБС) и хронической сердечной недостаточности (ХСН) [89; 129; 243].

Способность ЭПК стимулировать ангиогенез в ишемизированных органах, тем самым способствуя репарации, делает эти клетки привлекательными для терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Участие ЭПК в неоваскуляризации обусловлено не только их дифференцировкой в эндотелиальные клетки, но и их способностью продуцировать различные регуляторные ростовые факторы и цитокины, стимулирующие ангиогенез [236; 244]. Быстрое развитие клинического эффекта и очень низкое количество интегрированных в зоне повреждения ЭПК предполагает паракринные эффекты этих клеток [42; 312].

Действительно, исследования на животных и клинические испытания у человека показали, что как использование ростовых проангиогенных факторов,

так и введение различных популяций стволовых/прогениторных клеток (СПК), в том числе ЭПК, приводит к индукции неоангиогенеза, что сопровождается улучшением функционального состояния ишемизированных органов и тканей [79; 84; 223; 287].

Изучению ЭПК и их клинической апробации во многом способствовала разработка методов культивирования *in vitro*. Исследование ангиогенных свойств ЭПК осуществляется с использованием клеточных линий. Так, эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926 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 [203].

Свойства этих клеток, такие, как спектр и уровень продуцируемых ЭПК цитокинов, экспрессия поверхностных молекул и способность активировать различные этапы ангиогенеза, охарактеризованы недостаточно. Практически отсутствуют сравнительные данные о спектре секретируемых цитокинов циркулирующими ЭПК и выращенными *in vitro* в культуре ЭПК у пациентов с ХСН. Малоисследованным остается также вопрос, насколько эффективно может происходить мобилизация ЭПК из костного мозга у пациентов с ХСН и изменяется ли их функциональная активность при введении G-CSF. Наконец, большой интерес представляет связь морфофункциональных показателей ЭПК с параметрами функционального состояния ишемизированного миокарда.

Цель исследования

На основании анализа морфологических и функциональных свойств циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью, мобилизованных в периферическое русло введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, и эндотелиальных клеток, выращенных *in vitro*, обосновать возможность использования стволовых/прогениторных клеток в лечении сердечно-сосудистых

заболеваний.

Задачи исследования

1. Изучить морфологические/фенотипические свойства мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью до и после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.

2. Исследовать функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью до и после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором по их пролиферативной и секреторной активности, способности к миграции.

3. Установить взаимосвязь между фенотипом эндотелиальных прогениторных клеток и уровнем секреторной активности мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.

4. Исследовать морфологию и пролиферативную активность культур эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью, выращенных *in vitro*.

5. Оценить спектр продуцируемых цитокинов и ростовых факторов эндотелиальными прогениторными клетками пациентов с хронической сердечной недостаточностью с учетом сроков и условий культивирования на различных адгезионных белках.

6. Определить тип влияния биологически активных веществ, продуцируемых эндотелиальными прогениторными клетками, на такие показатели функциональной активности клеток эндотелиальной линии человека EA.Hu926, как пролиферация и миграция.

7. Изучить пролиферативный и миграционный ответ эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью на

влияние биологически активных веществ, продуцируемых клетками эндотелиальной линии человека EA. h926.

8. Оценить взаимосвязь между параметрами морфофункциональных свойств эндотелиальных прогениторных клеток и показателями функционального состояния миокарда после интрамиокардиального введения обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками мононуклеаров.

Научная новизна

Морфофункциональные исследования продемонстрировали, что выделенные из периферической крови мононуклеарные клетки пациентов с ХСН, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками путем введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, обладают высокой пролиферативной, миграционной и секреторной активностью, что может способствовать репарации ишемизированного миокарда.

Впервые установлена эффективность мобилизации ЭПК из костного мозга в периферическую кровь у пациентов с тяжелой формой ХСН. Проведено комплексное исследование фенотипа и функциональной активности ЭПК, мобилизованных введением G-CSF, у пациентов с ХСН. Показана гетерогенность популяций, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Впервые изучена пролиферативная активность МНК пациентов с ХСН, способность к миграции *in vitro*, установлен спектр секретируемых биологически активных веществ до и после мобилизации G-CSF. Показано, что после курса мобилизации G-CSF происходит увеличение пролиферативного потенциала мононуклеаров пациентов с ХСН на различные митогенные и цитокиновые стимулы (Кон А, Еро, G-CSF), увеличение количества колониеобразующих единиц и экспрессии рецептора хоуминга CXCR₄ на CD34⁺ ЭПК. Дополнено, что культивируемые МНК пациентов секретируют цитокины с регуляторными, в том числе и ангиогенными свойствами, такие как IL-10, IL-18, IL-8, Еро, VEGF, TNF- α , G-CSF. Выявлена взаимосвязь циркулирующих ЭПК различной степени дифференцировки и продукции цитокинов и ростовых факторов МНК пациентов с

ХСН.

Впервые получены ЭПК *in vitro* при культивировании МНК пациентов с ХСН после мобилизации. Показано, что культивируемые в «ранние» и «поздние» сроки ЭПК пациентов с ХСН обладают различной пролиферативной и секреторной активностью. Показано, что «ранние» эндотелиальные прогениторные клетки секретируют более высокий уровень IL-10, IL-18, IL-8, Eро, VEGF, TNF- α и NO. Продемонстрировано, что белки внеклеточного матрикса оказывают влияние на уровень секретируемых биологически активных веществ ЭПК при культивировании.

Впервые показано, что эндотелиальные прогениторные клетки пациентов и зрелые эндотелиальные клетки клеточной линии EA. hu926 взаимовлияют на функциональное состояние друг друга. Исследование пролиферативного и миграционного потенциала клеток под влиянием растворимых секреторных продуктов позволило получить новые данные о паракринных механизмах взаимовлияния различной степени дифференцировки эндотелиальных клеток. Кондиционная среда, полученная при культивировании клеток, содержит проангиогенные факторы, которые обуславливают функциональный потенциал как недифференцированных, так и зрелых эндотелиальных клеток.

Оценена взаимосвязь морфофункциональных показателей МНК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с показателями функционального состояния миокарда в отдаленные сроки после интрамиокардиального введения клеточного трансплантата (через 6 и 12 месяцев). Впервые показана вовлеченность различных эндотелиальных прогениторных клеток и секретируемых цитокинов в процесс регенерации ишемизированного миокарда у пациентов с ХСН.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты комплексного изучения фенотипов и функциональных свойств как циркулирующих, так и полученных при культивировании ЭПК пациентов с ХСН, расширяют представления о морфофункциональных свойствах СПК и ЭПК, в том числе как источника применения в практической медицине.

Полученные данные о спектре секретируемых проангиогенных молекул циркулирующими и культивируемыми ЭПК, а также их связь с функциональными свойствами эндотелиальных клеток, дополняют имеющиеся знания о паракринных и аутокринных взаимодействиях различной степени зрелости эндотелиальных клеток.

Проведённые исследования позволили получить новые данные о паракринных воздействиях ЭПК и эндотелиальных клеток на примере клеточной линии EA.hy926, что раскрывает закономерности взаимовлияния недифференцированных и зрелых эндотелиальных клеток, и имеет большое теоретическое значение.

Выявленное влияние условий и сроков культивирования на уровень секреторной активности ЭПК пациентов с ХСН акцентирует внимание на том, что культивируемые в «ранние» сроки ЭПК способны проявлять паракринное действие, что необходимо учитывать при разработке методов трансплантации СПК и оценке результатов при их введении.

Оценка эффективности влияния G-CSF на мобилизацию ЭПК из костного мозга у пациентов с ХСН и свойства клеток после мобилизации являются научной основой для оценки функциональных возможностей клеточного трансплантата для введения пациентам.

Чрезвычайно важными как с теоретической, так и с практической точки зрения является анализ связи показателей содержания в периферической крови пула клеток с прогениторной активностью и продукции цитокинов МНК, мобилизованными G-CSF у пациентов с ХСН, с функциональными параметрами клинической эффективности при интрамиокардиальном введении МНК.

Совокупность полученных результатов исследования может явиться теоретической основой для дальнейших экспериментальных и клинических исследований, необходимых для разработки новых репаративных подходов в области клеточной терапии ХСН.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В периферической крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью определяются популяции эндотелиальных прогениторных клеток разной степени дифференцировки, а введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора приводит к их эффективной мобилизации в периферическое русло крови. Обогащение периферической крови эндотелиальными прогениторными клетками приводит к повышению функционального потенциала мононуклеарных клеток – пролиферативной, синтетической активности и способности к миграции.

2. Эндотелиальные прогениторные клетки пациентов с хронической сердечной недостаточностью, культивированные *in vitro*, обладают высоким пролиферативным потенциалом и в процессе дифференцировки секретируют проангиогенные ростовые факторы и цитокины. Белки внеклеточного матрикса и сроки культивирования определяют уровень секреции проангиогенных биологически активных факторов в культуре.

3. Недифференцированные эндотелиальные прогениторные клетки и зрелые эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние на функциональное состояние друг друга, стимулируя пролиферацию и миграцию путем паракринных механизмов. Паракринные эффекты действия проангиогенных биологически активных факторов, секретируемых недифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками, сопоставимы со стимулирующим влиянием ангиогенных цитокинов.

4. Различные популяции разной степени дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью путем паракринных ангиогенных воздействий оказывают влияние на функциональные показатели миокарда, повышая перфузию миокарда и снижая степень хронической сердечной недостаточности, в отдаленном периоде наблюдения. Обогащение мононуклеарных клеток эндотелиальными прогениторными клетками приводит к улучшению функционального состояния ишемизированного миокарда пациентов при интрамиокардиальном введении.

Апробация результатов исследования

Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, доложены и обсуждены на международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008); Всероссийской научной школе-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009); международном симпозиуме «Актуальные вопросы донорского и персонального хранения стволовых клеток» (Москва, 2009); IV Всероссийском симпозиуме «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Санкт-Петербург, 2010); Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию Кузбасского кардиологического центра «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии» (Кемерово, 2010); Всероссийской конференции по патологии клетки (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); на международной конференции «Vascular biology, materials and engineering esvs spring meeting» (Frankfurt am Main, 2013); XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2013); на V всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013); на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине

(Москва, 2013); на расширенном семинаре научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии 24. 04. 2014.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы учитываются при комплексной терапии пациентов с ХСН в Институте патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина, г. Новосибирск.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 41 научная работа, 17 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов исследований, проведенных в рамках выполнения диссертационных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа изложена на 228 страницах машинописного текста, включает 34 рисунка, 18 таблиц и 1 схему. Список цитируемой литературы состоит из 386 источников, из них 353 иностранных.

Личный вклад автора

Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

Работа выполнена в лаборатории клеточных технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии и на базе центра хирургической

аритмологии Института патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина (руководитель центра – д. м. н. Покушалов Е. А.).

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту работы Академику РАН Коненкову Владимиру Иосифовичу, сотрудникам лаборатории клеточных технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии, сотрудникам центра хирургической аритмологии Института патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В АНГИОГЕНЕЗЕ

1.1 Клеточные механизмы и факторы неоангиогенеза

1.1.1 Механизмы образования новой сосудистой сети

Образование новой сосудистой сети или неоангиогенез представляет собой многоступенчатый процесс, в котором взаимодействуют несколько типов клеток и медиаторов. Как правило, неоангиогенез происходит в пролиферирующих, поврежденных или ишемизированных тканях [177; 333].

До недавнего времени считалось, что формирование новых сосудов в постнатальном периоде осуществляется за счет двух процессов: ангиогенеза – развития коллатеральных сосудов; и ангиогенеза – развития новых капилляров путем миграции и пролиферации предсуществующих дифференцированных эндотелиальных клеток [78; 152]. Asahara в 1997 году показал, что популяция CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костномозгового происхождения, выделенных из периферической крови человека, способна дифференцироваться *in vitro* в клетки с фенотипом зрелых эндотелиальных клеток. Введение этих клеток в организм приводит к регенерации эндотелия и формированию новых сосудов в ответ на острую тканевую ишемию [226]. Вслед за Asahara в 1998 году Shi впервые выделил из циркулирующих мононуклеарных клеток популяцию незрелых эндотелиальных клеток [140].

Клетки-предшественники, участвующие в неоангиогенезе у взрослых, были названы эндотелиальными прогениторными клетками, а процесс образования новых сосудов из ЭПК – васкулогенезом.

Ангиогенез представляет собой многоступенчатый процесс образования новых кровеносных сосудов из предсуществующих капилляров посредством миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток [152; 349]. Ангиогенез включает в себя два разных механизма: «sprouting angiogenesis» – образование

эндотелиальных сосудистых отростков; и «intussusceptive angiogenesis» – образование сосудов путем инвагинации (впячивания).

Процесс ангиогенеза, проходящий путем образования отростков сосудов, состоит из нескольких последовательных шагов [102; 291]. Начальный этап ангиогенеза – расширение сосудов, увеличение их проницаемости и ослабление межклеточных связей. Затем происходит растворение базальной мембраны внеклеточного матрикса, вызываемое активацией протеаз, включая активацию ферментов, таких как коллагеназа IV типа, активатор плазминогена. Эндотелиальные клетки мигрируют из стенок сосудов через периваскулярную ткань и паренхиму по направлению к ангиогенному стимулу. Происходит выравнивание (регулировка) эндотелиальных клеток в биполярное состояние, репродукция их позади фронта мигрирующих эндотелиальных клеток. Образуется просвет отростка нового сосуда. Затем происходит развитие капилляров, миграция перицитов и фибробластов, возникновение базальных мембран новых сосудов. Перициты и гладкомышечные клетки, в конечном счете, выстраиваются в линию вдоль эндотелиальных клеток снаружи капилляра, формируя первичные сосудистые (тубулярные) структуры [182].

Инвагинирующий тип ангиогенеза также включает несколько этапов [182; 291]. Появляется выпячивание стенки вены на всем ее протяжении в регионе капиллярной циркуляции. Образуется перегородка в результате впячивания эндотелиального слоя в просвет сосуда. Перегородка формируется не только из эндотелиальных клеток, но и коллагеновых нитей, и покрыта фибрином. Синтез коллагеновых нитей является обязательным для образования внутрисосудистых перегородок и их стабилизации. Происходит деградация базальной мембраны и истончение эндотелиальных клеток, что приводит к образованию трансцеллюлярных полостей. Эндотелиальные клетки видоизменяются в кольцевые структуры, увеличиваются сосудистые просветы, сосудистые пространства. Деление сосудов происходит путем воссоединения тканевых складок, находящихся на противоположных сторонах сосудистой стенки, образуются более мелкие по диаметру сосуды. Происходит формирование

базальной мембраны, продолжение роста и развитие нового сосуда [314].

Артериогенез – это рост в мышечной ткани вспомогательных кровеносных сосудов (коллатералей) из уже существующих артериолярных анастомозов; его часто называют коллатерализацией [377].

Васкулогенез представляет собой процесс формирования кровеносных сосудов *in situ* из ЭПК. Изначально предполагали, что «истинный» васкулогенез происходит только в эмбриональном периоде. Однако получены доказательства участия ЭПК в формировании новых сосудов во взрослом организме [368].

Васкулогенез по аналогии с эмбриональным периодом начинается с образования первичных сосудистых сплетений, состоящих из ангиобластов по периферии и ГСК в центре. Во время раннего эмбрионального развития мезодермальные клетки мигрируют во внеэмбриональный желточный мешок и формируют гемопозитические островки. Наружный слой просвета этих островков содержит ангиобласты, тогда как внутренняя масса состоит из гемопозитических предшественников. Предполагают, что ЭПК и ГСК происходят от общего предшественника – гемангиобласта и несут определенные общие антигенные поверхностные маркеры, в том числе Flk-1, Tie-2 и CD34 [130]. Васкулогенез включает в себя участие ЭПК, которые мигрируют к месту образования нового сосуда, где уже на месте дифференцируются в эндотелиальные клетки [67; 321; 351; 383].

Таким образом, во взрослом организме образование новых сосудов может происходить не только путем артериогенеза, ангиогенеза, но и путем васкулогенеза.

Механизмы контроля ангиогенеза связаны с действием целого ряда факторов: цитокинов, ростовых факторов, гормонов.

1.1.2 Ангиогенные факторы в регуляции ангиогенеза

Факторы роста, провоспалительные и противовоспалительные цитокины, секретируемые эндотелиальными клетками, лимфоцитами и моноцитами,

регулируют процесс образования кровеносных сосудов и оказывают влияние на миграцию, пролиферацию, выживание, апоптоз эндотелиальных клеток [273; 316; 380].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является одним из важнейших факторов, регулирующих ангиогенез [338; 352]. Широкий диапазон действия VEGF опосредуется частично многочисленными подтипами VEGF и его рецептора (VEGFR).

VEGF-A участвует в сосудистом росте [272]. Роль VEGF-B в развитии сосудов мало изучена, но может быть связана с блокированием апоптоза эндотелиальных клеток [374]. VEGF-C и VEGF-D участвуют в лимфангиогенезе.

По данным литературы известно, что ЭПК, также как и макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, продуцируют VEGF. В физиологических условиях продукция VEGF слабо выражена. В ответ на активирующие сигналы, например при гипоксии или ишемии, продукция VEGF активированными клетками существенно возрастает. Кроме того, индукторами секреции VEGF могут выступать различные цитокины, ростовые факторы, оксид азота (NO). На дифференцированных эндотелиальных клетках и ЭПК имеются специфические рецепторы для VEGF, взаимодействуя с которыми VEGF вызывает рост, пролиферацию, миграцию эндотелиальных клеток и их предшественников, увеличивает проницаемость сосудов, необходимую для миграции эндотелиальных клеток. Этот комплекс факторов способствует вазодилатации, направленной миграции клеток и дальнейшему сосудообразованию [186; 323]. Кроме того, VEGF контролирует систему протеолиза, которая обеспечивает ремоделирование внеклеточного матрикса, что необходимо на начальных этапах ангиогенеза.

Доказательства роли VEGF в ангиогенезе представлены в ряде экспериментальных работ. В модели ишемии у животных показано, что уровень циркулирующего VEGF и VEGFR₂ коррелирует с миграцией ЭПК в ишемизированные ткани [41]. Кроме того, было показано, что локальное введение VEGF может улучшить заживление ран путем усиления продукции других ангиогенных цитокинов [362].

Фактор роста фибробластов (FGF) оказывает влияние на ангиогенез путем стимуляции ряда проангиогенных факторов, таких как VEGF, фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), тем самым активирует эндотелиальные и гладкомышечные клетки, способствует хоумингу моноцитов. FGF стимулирует экспрессию VEGF в эндотелиальных клетках.

Во многих экспериментальных моделях показано, что FGF-индуцированный ангиогенез ингибируется нейтрализующими антителами против VEGF-A и VEGFR [150; 229]. FGF также стимулирует экспрессию HGF, другого потенциально ангиогенного ростового фактора [268; 380]. В синергизме с PDGF в эксперименте FGF способствует формированию стабильных сосудов в течение длительного периода наблюдения и даже при истощении ангиогенных факторов. Примечательно, что при комбинации FGF с VEGF или PDGF с VEGF синергический эффект не наблюдается [52]. Показано, что эндотелиальные клетки лишены способности активирования в ответ на PDGF при отсутствии FGF. FGF же увеличивает уровень эндотелиального рецептора PDGF, тем самым повышая чувствительность к действию PDGF [51].

Фактор роста гепатоцитов (HGF) секретируется мезенхимальными клетками и действует как многофункциональный цитокин. HGF связывается с рецептором на эндотелиальных клетках, таким образом, влияя на их миграцию, пролиферацию и образование новых сосудов [181]. Кроме того, HGF улучшает мобилизацию СПК [355].

В отличие от других ангиогенных факторов HGF оказывает и тромболитическое действие [183].

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) продуцируется эндотелиальными, дендритными клетками, лимфоцитами. Показано, что GM-CSF как прямо активирует эндотелиальные клетки [237], стимулируя образование сосудистых структур *in vitro* [361], так и способствует секреции проангиогенных цитокинов различными клетками [233]. GM-CSF также вызывает мобилизацию ЭПК из костного мозга; стимулирует пролиферацию, миграцию и образование сосудистых структур ЭПК, что в какой-

то мере обусловлено усилением активности VEGF; увеличивает васкулогенез в экспериментальных моделях ишемии [384].

Трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β) относится к ингибиторам ангиогенеза, оказывая влияние на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток на ранних этапах ангиогенеза. С другой стороны, TGF- β является важным проангиогенным цитокином на последнем этапе ангиогенеза при образовании сосудистых структур. TGF- β модулирует развитие сосудов путем увеличения синтеза VEGF эндотелиальными и гемопозитическими клетками [109; 363].

Кроме того, показано, что TGF- β стимулирует рост сосудов, воздействуя на мышечную стенку сосудов, активирует дифференцировку ЭПК в миоциты [344].

Интерлейкин-18 (IL-18), являясь провоспалительным цитокином, вызывает миграцию эндотелиальных клеток и стимулирует процесс ангиогенеза как непосредственно путем активации эндотелиальных клеток [212; 376], так и косвенно, потенцируя продукцию проангиогенных медиаторов – SDF-1 α /CXCL12, MCP-1/CCL2, VEGF [216]. С другой стороны, IL-18 способен повышать продукцию IFN- γ , который в свою очередь индуцирует секрецию хемокинов, таких как IP-10 и MIG, оказывающих ингибирующее действие на ангиогенез [50].

Интерлейкин-8 (IL-8) является провоспалительным хемокином и оказывает влияние на миграцию и хоуминг лейкоцитов во взаимодействии с другими цитокинами [246]. Большинство клеток продуцируют IL-8 только в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами. Показано, что экспрессия IL-8 в клетках регулируется различными провоспалительными цитокиновыми сигналами (TNF- α и IL-1 β) [379]. Кроме того, IL-8 обладает мощным проангиогенным действием. Так, показано, что активирование рецептора IL-8 на эндотелиальных клетках индуцирует их пролиферацию, выживание и миграцию [75; 146; 293; 379]. В экспериментальной работе демонстрируется влияние IL-8 на ангиогенез *in vitro* путем усиления пролиферации эндотелиальных клеток пуповинной крови [194]. Причем эффект может быть как прямым, так и опосредованным, через усиление продукции VEGF и FGF.

Интерлейкин-10 (IL-10) является иммунорегуляторным цитокином,

ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов. Кроме того, IL-10 обладает кардиопротективным действием, уменьшая апоптоз кардиомиоцитов, модулируя синтез белков внеклеточного матрикса и повышая васкуляризацию ишемизированной ткани [196; 214].

IL-10 может выступать и как проангиогенный цитокин. Так, показана роль IL-10 как протектора возрастной эндотелиальной дисфункции [215].

Кроме того, IL-10 оказывает модулирующее влияние на функциональные свойства ЭПК при их трансплантации в ишемизированный миокард у экспериментальных животных [213]. Авторы показали, что системное введение в организм IL-10 приводит к повышению выживания трансплантированных ЭПК, что сопровождается усилением неоваскуляризации ишемизированного миокарда. А у мышей, дефицитных по IL-10, нарушается мобилизация и миграция ЭПК из костного мозга в периферическую кровь.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) обладает плеiotропным действием, в том числе цитопротективным, и индуцирует мобилизацию СПК из костного мозга. Показана роль G-CSF в регенерации миокарда и индукции ангиогенеза при ишемических заболеваниях [336]. Кроме того, G-CSF может стимулировать различные этапы ангиогенеза [174]. Так, в эксперименте демонстрируется, что G-CSF улучшает мобилизацию ЭПК и ангиогенез путем стимуляции секреции VEGF нейтрофилами, а введение G-CSF *in vivo* в ишемической модели улучшает кровоснабжение ишемизированной ткани, что зависит от экспрессии рецептора VEGF. В другой работе показано, что G-CSF обладает антиапоптотическим эффектом в отношении эндотелиальных клеток [170]. В модели оксидативного стресса *in vitro*, индуцированного введением перекиси водорода, G-CSF снижает апоптоз эндотелиальных клеток пуповинной крови.

G-CSF также повышает экспрессию рецепторов адгезии на эндотелиальных клетках, что приводит к миграции и хоумингу клеток-участников ангиогенеза [171]. Ангиогенный эффект G-CSF частично может быть связан с увеличением секреции VEGF моноцитарными клетками [174].

G-CSF также стимулирует продукцию NO, обладающего проангиогенной активностью, активируя Akt/NOsynthase сигнальный путь, что повышает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [159; 168]. G-CSF способствует стимуляции миграции и пролиферации эндотелиальных клеток. Так, показано, что культивирование клеток эндотелиальной линии CMEC с G-CSF приводит к увеличению их пролиферации, что связано с повышением уровня экспрессии p 53 и HIF-1 [348].

Эритропоэтин (Еро) является не только стимулятором гемопоеза, но и обладает проангиогенным действием, схожим с VEGF и FGF [136; 205; 304]. Рецепторы к Еро экспрессируются на эндотелиальных клетках, а взаимодействие Еро с рецептором приводит к активированию JAK-2, STAT5, PI3K/Akt сигнального пути [143].

Еро способствует ангиогенезу различными механизмами. Одним из путей стимуляции васкуляризации является индуцированное повышение экспрессии VEGF в ишемических тканях и воздействия Еро на эндотелиальные клетки, которые экспрессируют рецептор к Еро [240]. Авторы демонстрируют, что Еро стимулирует экспрессию белка VEGF через STAT3 путь, а секретируемый VEGF индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток и способствует встраиванию ЭПК в сосуды [371].

Также показано, что Еро влияет на ангиогенез путем стимуляции кардиомиоцитов к секреции VEGF и ангиопоэтина [137; 278; 334].

Еро может способствовать и расширению капилляров, активируя эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), предохраняя эндотелиальные клетки от повреждения в условиях гипоксии [135; 204].

Фактор некроза опухоли (TNF- α) продуцируется различными типами клеток, включая моноциты, лимфоциты, нейтрофилы и эндотелиальные клетки. TNF- α является не только цитокином с провоспалительным свойством. Показана роль TNF- α и в ангиогенезе. С одной стороны, TNF- α вызывает апоптоз эндотелиальных клеток и тем самым ограничивает неоангиогенез. С другой стороны, этот цитокин, как показано, индуцирует миграцию эндотелиальных

клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*, стимулирует продукцию матриксных металлопротеиназ в эндотелии [367]. Это способствует деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса, необходимых для миграции эндотелиальных клеток на начальных этапах ангиогенеза.

Также TNF- α действует опосредованно, путем повышения экспрессии VEGF и iNOS, что демонстрируется при стимуляции макрофагов в эксперименте *in vitro* [96]. Анализ генных сетей позволил выявить новые механизмы TNF-индуцированного ангиогенеза. Показано, что TNF- α индуцирует гены других цитокинов с проангиогенными свойствами – IL6 и IL8 [95].

К проангиогенным факторам относят также ангиопоэтины, ангиогенин, ангиотропин, IL-1, IGF, PlGF и другие.

Таким образом, цитокины с проангиогенными свойствами представляют собой группу полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, участвующих в различных этапах ангиогенеза и регулирующих функциональное состояние клеток. Ангиогенез регулируется процессом, включающим сбалансированное и синергичное взаимодействие биологически активных веществ, которые представляют собой ангиогенный каскад факторов.

1.1.3 Роль внеклеточного окружения в ангиогенезе

Развитие функционирующей сети кровеносных сосудов требует скоординированной сигнализации между клетками и окружающего их внеклеточного матрикса, который не только обеспечивает механическую поддержку клеток, но и принимает участие в регулировании поведения контактирующих с ним клеток – их пролиферации, миграции, дифференцировки [66; 256].

Основными компонентами внеклеточного матрикса являются коллаген, протеогликаны, гликопротеины и белки – фибронектин, ламинин, фибрин, эластин. К внеклеточному матриксу также относят компоненты соединительных тканей – плазму крови и лимфатическую жидкость.

Внеклеточный матрикс вносит вклад в процесс ангиогенеза несколькими способами. Белки внеклеточного матрикса, с помощью их связывания и активации рецепторов интегринов, регулируют пролиферацию, выживание и миграцию клеток эндотелия [62; 256].

Фибронектин является основным белком внеклеточного матрикса, который секретируется эндотелиальными клетками при ангиогенезе [308]. Короткие цепи фибронектина взаимодействуют с интегринными, такими, как $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 5$ and $\alpha \nu\beta 3$, что обеспечивает пролиферацию и образование сосудистых структур [297]. Экспрессия интегринного $\alpha 5\beta 1$ усиливается на ангиогенные стимулы FGF и IL-8, но не на VEGF [74], а экспрессия интегринного $\alpha 4\beta 1$ возрастает под действием VEGF, FGF, IL-1 β и TNF- α [211].

Ключевыми интегринными ламинина и коллагена являются $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$. Показано, что VEGF-A активирует экспрессию как $\alpha 1\beta 1$, так $\alpha 2\beta 1$ на эндотелиальных клетках, а функциональная блокада антителами обоих интегринов приводит к подавлению VEGF-индуцированного ангиогенеза [62]. Интегрин $\alpha 4\beta 1$, рецептор для VCAM и CS-1 фибронектина, способствует хоумингу ЭПК в ткани и неоваскуляризации. Адгезия CD34⁺ ЭПК человека и мышей к эндотелиальным клеткам *in vitro* и *in vivo* опосредована интегринным $\alpha 4\beta 1$ [35]. Также показано, что интегрин $\alpha \nu\beta 3$ экспрессируется при стимуляции ангиогенными факторами в моделях ангиогенеза, а экспрессия на эндотелиальных клетках $\alpha 2\beta 1$ -интегрин стимулируется такими проангиогенными ростовыми факторами, как FGF, TNF- α и IL-8.

Взаимодействие интегринов и внеклеточного матрикса также имеет решающее значение для приведения эндотелиальных клеток в биполярное состояние и образования сосудистых структур [224].

Кроме того, внеклеточный матрикс является источником как проангиогенных, так антиангиогенных пептидов [195; 313].

Таким образом, белковые компоненты внеклеточного матрикса являются не только каркасом для эндотелиальных клеток, но и активными участниками клеточных и цитокиновых взаимоотношений.

1.1.4 Способы стимуляции неоангиогенеза

Среди стратегий, направленных на восстановление эффективной перфузии ишемизированного миокарда и улучшения функционального состояния сердца, выделяют два главных способа стимуляции неоангиогенеза: 1) факторами роста [284; 345]; 2) СПК, в том числе эндотелиальными прогениторными клетками [9; 85; 249; 357].

1.1.4.1 Факторы роста в стимуляции ангиогенеза

В настоящее время разработаны эффективные системы доставки проангиогенных факторов на основе плазмид и векторов [284; 345], проведены исследования эффективности их действия [275]. Первоначально исследования были ориентированы на использование трех ангиогенных факторов – VEGF, FGF, HGF [231]. Показано, что перенос генов ангиогенных факторов не вызывал серьезных побочных эффектов, но длительного терапевтического эффекта достигнуто не было. Очевидно это связано не только с быстрой деградацией и элиминацией генетических конструкций, но и отсутствием технической возможности использования комплекса ростовых факторов, необходимых для обеспечения и стимулирования процесса неоангиогенеза [232].

1.1.4.2 Клетки-кандидаты для регенерации сосудов

В настоящее время неуклонно пополняется список клеток разного происхождения и с различными свойствами, которые потенциально могут способствовать регенерации сосудов и развитию новой сосудистой сети.

Источниками клеток для регенерации сосудов может служить костный мозг.

Клетки костного мозга (ККМ) представляют гетерогенную клеточную популяцию и содержат кроме ЭПК и ГСК, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) [307; 319]. В многочисленных экспериментальных

моделях *in vivo* показано, что трансплантация КKM улучшает функциональное состояние миокарда при остром инфаркте и хронической ишемии [24; 28; 34; 142].

Немало споров о механизмах, с помощью которых КKM способствуют регенерации. В более ранних работах высказывается мнение о возможности дифференцировки КKM в специализированные органные клетки, в частности в кардиомиоциты [270; 281], но последующие исследования не подтвердили полученные экспериментальные данные [250; 269]. В некоторых исследованиях рассматриваются механизмы дифференцировки КKM в эндотелиальные клетки и их паракринное действие путем продукции ростовых проангиогенных факторов [77; 250]. Показано, что ММСК способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки и образовывать сосудистую сеть *in vitro* [285; 354], а также способствовать кардиоваскулярной репарации паракринным механизмом путем секреции проангиогенных пептидов, включая инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), FGF, VEGF и ангиопоэтин-1 (Ang-1) [244; 352].

ЭПК, в частности селектированные популяции CD34⁺ или CD133⁺ клеток, способствуют ангиогенезу и улучшают сердечную функцию и в моделях на животных, и в проводимых клинических исследованиях [84; 179; 328; 351].

Стромальные васкулярные клетки, выделенные из жировой ткани, активно исследуются для возможности стимуляции репаративных процессов [121; 296]. Эти клетки экспрессируют как гемопоэтические, так и эндотелиальные маркеры, и способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки *in vitro* и *in vivo* [121; 157]. Проангиогенный эффект этих клеток может быть связан как с секрецией цитокинов, предотвращающих апоптоз эндотелиальных клеток, так и внедрением их в сосудистую сеть. Показано, что интракоронарное введение стромально-васкулярной фракции жировой ткани в моделях инфаркта миокарда приводит к улучшению перфузии миокарда [40; 219].

Мультипотентные кардиоваскулярные стволовые клетки, способные дифференцироваться в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки, сначала были идентифицированы в сердце эмбрионов [134]. Самовозобновляющиеся мультипотентные клетки выделены и из взрослого сердца

[93; 155]. Показано, что введение этих клеток в поврежденный миокард мышей приводит к улучшению функционального состояния сердца [225], а предварительная активация мышечных клеток факторами роста способствует развитию сосудистой сети и уменьшению размера инфаркта [153].

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) способны к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, но при использовании человеческих эмбрионов возникает много этических проблем. Недавно был предложен способ получения плюрипотентных клеток путем репрограммирования зрелых фибробластов [208; 209] и получения индуцированных плюрипотентных клеток (ИПК) путем трансдукции генов, кодирующих четыре фактора транскрипции стволовых клеток.

ИПК могут подвергнуться дифференцировке как в кардиомиоциты, так и в гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки [165; 290; 385]. Показано, что эндотелиальные клетки, полученные из ЭСК, при введении в организм способны интегрироваться в циркуляторное русло [372], способствуют ревазуляризации в моделях инфаркта [107]. В работе, отслеживающей судьбу трансплантированных в инфарцированный миокард эндотелиальных клеток, полученных из ЭСК, показано, что эти клетки визуализируются в течение длительного срока после инфаркта и повышают плотность сосудов в миокарде [107].

Но у плюрипотентности ЭСК/ИПК есть и негативная сторона – способность к образованию тератом. И не смотря на успешные доклинические исследования по применению ИПК, внедрение этих клеток в клиническую практику требует многих технических манипуляций [269].

Рядом исследователей были выявлены другие популяции клеток, способные дифференцироваться в эндотелиоциты и способствовать образованию сосудов [188]. Сосудистая стенка, селезенка, адвентиция также могут быть источниками ЭПК [122; 202; 373]. Выявлен высокий уровень прогениторных клеток в кишечнике и в печени [277].

Таким образом, на сегодняшний день выделяют несколько возможных источников эндотелиальных клеток. Точный вклад различных СПК в

формирование сосудов все еще находится в процессе интенсивного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образование новых сосудов во взрослом организме может происходить как путем ангиогенеза из предсуществующих зрелых эндотелиальных клеток, так и путем васкулогенеза из ЭПК *de novo*. В регуляции всех этапов ангиогенеза (пролиферация, миграция, адгезия эндотелиальных клеток, образование сосудистых структур) большая роль принадлежит ангиогенным факторам, продуцируемым различными типами клеток – клетками лимфоидного и миелоидного ряда, эндотелиальными клетками. Причем ангиогенные факторы являются активными медиаторами межклеточных взаимодействий и участниками цитокиновой сети, взаимовлияя друг на друга. В то же время неоангиогенез зависит и от окружающего клетки внеклеточного матрикса, сигнализация белковых компонентов которого способствует регулированию функционального состояния контактирующих с ним клеток.

Выделяют несколько возможных подходов стимуляции кровоснабжения ишемизированного миокарда, одним из которых являются СПК, в том числе ЭПК. Список клеток взрослого организма для стимуляции ангиогенеза неуклонно пополняется, тем не менее, точный вклад различных СПК клеток в формирование сосудов все еще находится в процессе интенсивного исследования.

ЭПК могут являться не только обязательными участниками васкулогенеза, но и стимуляторами ангиогенеза и артериогенеза.

1.2 Эндотелиальные прогениторные клетки в стимуляции ангиогенеза

1.2.1 Фенотипическая характеристика популяций циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток

Для идентификации ЭПК из периферической крови Asahara T. [70; 226]

использовал 2 маркера: антиген гемопоэтических предшественников – CD34 и зрелых эндотелиальных клеток – рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR₂/kinase insert domain-containing receptor – KDR). Указанная работа послужила началом изучения фенотипа, источников происхождения и роли ЭПК в процессе неоангиогенеза ишемизированных тканей.

Вопросы точного определения ЭПК продолжают широко обсуждаться. Методом идентификации ЭПК является проточная цитометрия, которая на основании иммунного мечения клеток позволяет идентифицировать определенные экстраклеточные маркеры [148].

В настоящее время считается, что ЭПК должны экспрессировать, по крайней мере, один антиген незрелых СПК (например, CD34 или CD133), а также, по крайней мере, один антиген зрелых эндотелиальных клеток (обычно VEGFR₂, иногда CD31).

Некоторые авторы выделяют «классическую» триаду маркеров ЭПК – CD34, CD133 и VEGFR₂ [139; 145; 187].

В эмбриональном развитии клетки периферической крови и эндотелиальные клетки сосудов развиваются параллельно, что предполагает для них наличие общего предшественника – гемангиобласта [320]. И очевидно, что поверхностные маркеры ГСК и ЭПК являются общими. Так, CD34 экспрессируется тканями мезодермального происхождения: клетками крови, эндотелиальными клетками, фибробластами, эпителиальными клетками.

CD34⁺ клетки периферической крови способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки. Показано, что культивирование клеток, экспрессирующих CD34 маркер, в специальных условиях на фибронектине приводит к экспрессии маркеров зрелых эндотелиальных клеток – VEGFR₂, CD31 и eNOS [70]. В то же время известно, что CD34 маркер экспрессируется в незначительном количестве и на зрелых эндотелиальных клетках [91].

Другим маркером ЭПК является CD133. Полагают, что популяция ЭПК, экспрессирующих CD133 маркер, является «незрелой» популяцией клеток и более «ранним» предшественником по сравнению с популяцией ЭПК, экспрессирующей

CD34, поскольку фенотип CD133⁺ характерен только для малодифференцированных типов клеток [148; 192].

VEGFR₂ является маркером зрелых эндотелиальных клеток, опосредует сигнал фактора роста эндотелия сосудов. Соответственно популяция ЭПК, экспрессирующая поверхностные маркеры CD34/VEGFR₂, является более «зрелой». В исследованиях ряда авторов было показано, что ЭПК с фенотипом CD34⁺/VEGFR₂⁺ присутствуют в пуповинной крови человека и в периферической крови после мобилизации ККМ в периферическое русло введением G-CSF [145; 351].

Также среди циркулирующих ЭПК выделяют популяцию клеток, экспрессирующих молекулу CD31 (молекула тромбоцитарно-эндотелиальной адгезии-1). Клетки с фенотипом CD34⁺/CD31⁺ характеризуют морфофункционально как «зрелую» популяцию ЭПК. Показано, что маркер CD31 экспрессируется как эндотелиальными клетками и ЭПК, так и кроветворными клетками, такими как моноциты, тромбоциты, нейтрофилы, натуральные киллеры, мегакариоциты и некоторые Т-клетки. Молекула CD31 участвует в адгезии как между эндотелиальными клетками, так и между эндотелиальными клетками и ЭПК [91; 148; 235].

Некоторые авторы считают, что ЭПК происходят из клеток, не экспрессирующих CD133 маркер [124; 190], другие выделяют две субпопуляции ЭПК – более примитивные CD133⁺/CD34⁺/VEGFR₂⁺ и более зрелые CD133⁻/CD34⁺/VEGFR₂⁺ клетки [80].

Вышеизложенные предположения подтверждаются результатами анализа экспрессии генов в популяции ЭПК с фенотипом CD45^{low}/CD34⁺/CD133⁺. Установлено, что интенсивность экспрессии гена маркера CD34 сохраняется до 21 дня культивирования данной популяции ЭПК, а экспрессия CD133 выявляется на ранних сроках культивирования до 7 дня [57]. В то же время изначально слабовыраженная экспрессия VEGFR₂ увеличивается к концу культивирования. Исходя из этих данных, авторы полагают, что поверхностная молекула CD133 является «ранним» маркером идентификации ЭПК, а коэкспрессия молекул CD34

и CD133 предположительно служит маркером циркулирующих в периферической крови ЭПК человека [359]. На основании разных сроков экспрессии генов CD133 и VEGFR₂ авторы делают вывод, что первые являются идентификаторами «ранних» ЭПК, а вторые – более «зрелых» ЭПК.

Кроме того было показано, что периферическая кровь содержит популяцию клеток моноцитарного происхождения с фенотипом CD14⁺/CD34⁻, которые по функциональным характеристикам идентичны ЭПК, могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки *in vitro* и образовывать сосудистую сеть *in vivo*. Исходя из вышеизложенного, становится очевидным, что клетки с фенотипом CD14⁺/VEGFR₂⁺ являются «зрелой» популяцией ЭПК моноцитарного происхождения [105; 277; 280; 310].

В настоящее время нет единой точки зрения на то, какие именно маркеры определяют фенотип ЭПК [63; 130]. В связи с этим не существует уникальных поверхностных маркеров для идентификации циркулирующих ЭПК [185]. Поскольку циркулирующие ЭПК представляют собой разнородные популяции клеток, то для их фенотипической характеристики используют комбинации различных поверхностных маркеров.

1.2.2 Эндотелиальные прогениторные клетки как диагностический и прогностический биомаркер

Установлено, что комплекс различных факторов кардиоваскулярного риска оказывает негативное влияние в отношении возникновения и прогрессирования ИБС.

Предполагается, что этот эффект опосредуется через механизмы мобилизации ЭПК, которые играют важную роль в восстановлении поврежденного сосудистого эндотелия и миокарда, а также в неоваскуляризации ишемизированных тканей [25; 26; 129]. Ишемия миокарда приводит к мобилизации ЭПК из костного мозга, а циркулирующие в периферической крови

ЭПК могут выступать в качестве биомаркеров тяжести заболевания, прогноза и ответа на терапию [43; 129].

Показано, что пониженный уровень циркулирующих ЭПК связан с высоким риском возникновения ишемической болезни сердца и инфаркта [148]. Количество ЭПК в периферической крови может зависеть от тяжести клинического течения ИБС. В ряде работ показано, что количество ЭПК у больных с острым инфарктом связано с благоприятным исходом заболевания [261; 350]. На ранних стадиях заболевания количество ЭПК, как правило, не изменено, но при прогрессировании ХСН значительно снижается [81; 311]. Имеется четкая связь между повышением количества циркулирующих ЭПК и снижением риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [303]. Количество циркулирующих ЭПК также является независимым предиктором выживания при ХСН, наряду с возрастом больных [89].

Необходимо отметить, что у пациентов с ХСН изменяется не только уровень циркулирующих ЭПК, но и ухудшается их функциональное состояние [243; 329].

Кроме того, такие факторы риска, как возраст, курение и воспаление ведут к ухудшению функциональной активности ЭПК [128; 303; 306].

Таким образом, можно предположить, что ЭПК связаны с развитием и течением ИБС, оказывают сосудопротективное действие и участвуют в процессах неоваскуляризации ишемизированных тканей.

1.2.3 Участие эндотелиальных прогениторных клеток в процессах неоваскуляризации

Быстрое восстановление поврежденного или обнаженного эндотелия является важным фактором в поддержании целостности сосуда и предотвращении гиперплазии интимы. Появляется все больше свидетельств того, что ЭПК способны мигрировать в область ишемии и активно участвовать в неоваскуляризации поврежденных тканей [1; 33; 38; 119; 125; 126; 148; 207; 346].

ЭПК считаются перспективными кандидатами для стимулирования ангиогенеза при различных заболеваниях, таких как ИБС, инсульт, атеросклероз, ишемия нижних конечностей и др. [228; 328; 378].

В различных экспериментальных моделях показано, что регенерация сосудов осуществляется не только за счет эндотелиальных клеток реципиентов, но и что эндотелизация может происходить исключительно клетками донора [92; 132]. В моделях ишемии как введенные ЭПК, так и мобилизованные эндогенные ЭПК, способствуют восстановлению монослоя эндотелия и снижению гиперплазии интимы [4; 100].

Не смотря на то, что степень реэндотелизации у животных выше, чем у человека, даже в отсутствии механического повреждения сосудов до 25 % введенных человеку ЭПК визуализируются в эндотелие аорты [274]. А ЭПК, введенные в зону экспериментального миокарда, активно функционируют, приводя к развитию коллатералей и повышению плотности капилляров, уменьшению размера зоны инфаркта и снижению апоптоза кардиомиоцитов, что сопровождается увеличением фракции выброса левого желудочка и улучшением функционального состояния миокарда [222].

Показано, что введенные в миокард ЭПК локализуются в области новообразованных сосудов миокарда и способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [227]. Yang J. продемонстрировал, что популяция CD34⁺ ЭПК способна встраиваться в уже сформированную зрелыми эндотелиальными клетками сосудистую сеть *in vitro* [82]. Введение данной популяции ЭПК при моделировании инфаркта у животных приводит к уменьшению зоны фиброза и значительному увеличению кровоснабжения миокарда.

В ряде исследований демонстрируется, что введение выделенных из периферической крови ЭПК, культивированных *ex vivo*, по данным сцинтиграфии приводит к улучшению кровоснабжения тканей, способствует увеличению плотности сосудов у мышей и крыс [210; 222].

Пилотные клинические исследования с применением ККМ, начатые в 1999 году, показали безопасность и эффективность введения СПК, связанную с

улучшением кровоснабжения и функционального состояния левого желудочка [15; 19; 36; 79; 84; 223; 366].

Введенные в миокард ЭПК, культивированные *ex vivo*, значительно улучшают коронарный резерв кровотока и функцию левого желудочка у больных с инфарктом миокарда [354]. Также показана эффективность интракоронарного введения популяций CD34⁺ и CD133⁺ ЭПК пациентам с ХСН, что приводит к увеличению фракции выброса левого желудочка, уменьшению зоны инфаркта в мышце и улучшению кровоснабжения миокарда [201].

Имеются противоречивые данные о количестве ЭПК, встраивающихся в стенки сосудов в области ишемии и неоагниогенеза. Так, ряд исследований подтверждает хорошую степень включения ЭПК в ишемизированную ткань, но в других исследованиях СПК костного мозга обнаруживаются только рядом с сосудом и не экспрессируют маркеры эндотелиальных клеток [71; 258].

Также были проведены сравнительные исследования оценки степени неоваскуляризации после введения ЭПК и дифференцированных моноцитарных клеток. Показана способность ЭПК внедряться в новообразованные сосудистые структуры и экспрессировать на поверхности клеточной мембраны эндотелиальные маркеры *in vivo* [72; 156]. При этом введение макрофагов (которые, как известно, способны продуцировать факторы роста, но не способны дифференцироваться в сосудистые структуры), вызывает лишь незначительное увеличение неоваскуляризации после экспериментальной ишемии [69].

Ряд авторов демонстрируют клиническую эффективность интракоронарного введения, как целостной фракции клеток костного мозга, так и популяции CD34⁺ ЭПК. Отмечено возрастание фракции выброса левого желудочка на 5 %, улучшение перфузии миокарда по данным сцинтиграфии [60; 199; 245; 295; 365].

В ряде исследований показано незначительное улучшение функционального состояния миокарда после введения СПК, а в некоторых из них – отсутствие положительного результата [11; 54; 61; 220].

Однако сравнение результатов клинической эффективности этих и других исследований не является корректным, поскольку исследования различаются как

по методам выделения клеток, так и по дозе и времени введения после перенесенного инфаркта. Эти противоречивые результаты обусловлены и использованием клеток с разным фенотипом и функциональным состоянием [326]. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости характеристики клеточных популяций с ангиогенными свойствами.

В связи с активным применением ЭПК и других типов СПК для лечения сосудистых заболеваний в настоящее время сформулировано понятие терапевтического ангиогенеза [18], целью которого является обеспечение реваскуляризации ишемизированных тканей за счет стимуляции естественных процессов образования и роста сосудов. Стратегия ангиогенной терапии включает в себя и введение СПК.

Однако конкретный вклад ЭПК в неоваскуляризацию по-прежнему обсуждается. Возможно, что ЭПК могут напрямую встраиваться в стенки сосудов, или проникают в периваскулярные пространства и способствуют неоваскуляризации опосредованно через секрецию паракринных факторов.

1.2.4 Функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток

Для эффективной стимуляции ангиогенеза ЭПК должны обладать рядом функциональных свойств – способностью мигрировать из мест локализации (например, из костного мозга) в ответ на внешние стимулы, такие как тканевая ишемия или влияние мобилизирующих факторов, успешно достигать мест ишемии, и принимать участие в образовании сосудов.

1.2.4.1 Мобилизация эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь

Ниша стволовых клеток служит специальным местом, где ЭПК находятся

как в недифференцированном, покоящемся состоянии, так и в дифференцированной форме [39; 381]. Вспомогательные клетки ниши взаимодействуют со стволовыми клетками и регулируют их самоподдержание и дифференцировку.

Выход СПК из ниши и поступление в периферическое русло крови происходит под влиянием различных стимулов, основным из которых является гипоксия. Гипоксия является преобладающим физиологическим сигналом, вызывающим мобилизацию и ЭПК из костного мозга и хоуминг ЭПК в ишемизированные ткани [86]. Этот процесс находится под контролем фактора индукции гипоксии (HIF-1), что приводит к активированию проангиогенных пептидов, в том числе стромального фактора 1 (SDF-1) и его рецептора CXCR₄. Связь сигнализирующей молекулы SDF-1 с CXCR₄ является важным механизмом в нише костного мозга, который регулирует мобилизацию и ГСК, и ЭПК [238; 335].

Тем не менее, SDF-1 также в большом количестве продуцируется в костном мозге вокруг синусоидов, вблизи эндоста и действует как фактор, удерживающий прогениторные или стволовые клетки в костном мозге [248]. Высокая конститутивная экспрессия SDF-1 в гипоксических условиях костного мозга позволяет поддерживать стволовые клетки в стабильном состоянии [180]. Клетки в местах ишемии секретируют ростовые факторы, хемокины, матриксные металлопротеиназы, которые способствуют рекрутированию стволовых клеток.

Важными HIF-регулируемыми факторами мобилизации ЭПК являются ряд цитокинов – G-CSF, GM-CSF, VEGF, EPO, IL-8 [101; 331].

Кроме того, мобилизация ЭПК зависит от биодоступности NO в костном мозге. Последние исследования показывают, что NO, продукция которого регулируется e-NOS, играет важную роль в ангиогенезе с участием зрелых эндотелиальных клеток и неоангиогенезе с участием ЭПК [44; 110;]. Эти данные согласуются с тем фактом, что у мышей с дефицитом e-NOS снижена мобилизация ЭПК, демонстрируя роль NO в мобилизации СПК в периферическое русло крови [53; 123].

Также обсуждаются новые механизмы мобилизации СПК с участием кининов и ангиотензина, системы комплемента, липидных медиаторов, нейротрофинов [298; 343].

На сегодняшний день молекулярные сигнальные пути, по которым осуществляется мобилизация ЭПК из костного мозга в периферическое русло, пока не определены. Однако некоторые исследования указывают на важную роль в индуцированном повышении уровня ЭПК в крови активации PI3K/Akt-пути [44; 342].

После мобилизации из костного мозга в кровеносное русло по «градиенту» гипоксии СПК проникают в поврежденные органы и ткани.

1.2.4.2 Миграция и хоуминг эндотелиальных прогениторных клеток

Рекрутирование стволовых клеток в очаг ишемии имеет сходство с воспалительным ответом. Прогениторные клетки взаимодействуют с поврежденным монослоем эндотелия подобно тому, как лейкоциты взаимодействуют с активированными эндотелиальными клетками [266].

Молекулы адгезии, вовлеченные в движение и адгезию лейкоцитов, идентифицированы как ключевые регуляторы хоуминга ЭПК. Начальная стадия хоуминга прогениторных клеток в ишемическую ткань включает адгезию прогениторных клеток к эндотелиальным клеткам и трансмиграцию через эндотелиальный монослой, обусловленную интегринами [267]. Селектины (P-selectin, E-selectin) обуславливают начальный процесс, интегрины (b2-integrins), молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1) способствуют адгезии и миграции ЭПК к поврежденному эндотелиальному монослою, катепсины (cathepsin L) и металлопротеиназы (MMP-2) способствуют деградации матрикса и инвазии ЭПК [317].

ЭПК начинают дифференцироваться в эндотелиальные клетки еще по мере движения к поврежденным тканям. Иницируют этот каскад цитокины (VEGF и SDF-1) и механическое давление, оказываемое током крови [330]. Далее

происходит аутокринная и паракринная активация ЭПК, в результате которой осуществляется пролиферация и дифференцировка ЭПК, и новообразование сосудов [149]. Адгезия и трансмиграция являются составной частью хоуминга ЭПК и СПК в ткани с активным ангиогенезом и в зону ишемии.

Миграция ЭПК контролируется также SDF-1, который способствует хоумингу ЭПК в места повреждения эндотелия. Показано, что уже после первого дня индукции инфаркта миокарда в эксперименте увеличивается уровень SDF-1 в периферической крови, что стимулирует миграцию прогениторных клеток в ишемизированную ткань миокарда [59].

В ряде работ подчеркивается роль антагонистов CXCR₄, например, Plerixafor (AMD3100), который блокирует связывание SDF-1 с CXCR₄ и тем самым улучшает мобилизацию СПК из костного мозга, что приводит к восстановлению миокарда после ишемии [46; 339].

Кроме того, недавние исследования выявили прямую сопряженность количества ЭПК с фенотипом CD34⁺/CXCR₄⁺, мобилизованных G-CSF, с увеличением фракции выброса у пациентов с инфарктом миокарда [260], а также вовлеченность CD34⁺/CXCR₄⁺ ЭПК в процессы ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [364].

Таким образом, мобилизация, миграция и хоуминг СПК из костного мозга и пути мобилизации регулируются комплексным взаимодействием молекул адгезии, цитокинов, протеолитических ферментов, стромальных клеток, ГСК и ЭПК.

ЭПК, достигнув поврежденных тканей, начинают активно принимать участие в репарации сосудов как путем васкулогенеза, образуя новые кровеносные сосуды, так и путем продукции различных цитокинов и ростовых факторов, в том числе и медиаторов ангиогенеза, стимулируют резидентные эндотелиальные клетки.

Эффективность неоваскуляризации может быть связана как с включением ЭПК в новообразованные сосуды, так и с паракринным эффектом, обусловленным секрецией клетками проангиогенных факторов, направленных на стимуляцию ангиогенеза.

1.2.4.3 Цитокинпродуцирующая активность циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и роль паракринных механизмов в неоваскуляризации

Установлено, что СПК костного мозга продуцируют широкий спектр ростовых факторов с проангиогенным действием: ангиопоэтин-1, VEGF, HGF, FGF, TGF- β , IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , белок хемоаттрактант моноцитов (MCP), GM-CSF, G-CSF и др. [236; 244]. При этом спектр продуцируемых цитокинов и ростовых факторов исследован у общей популяции клеток костного мозга, которая кроме ЭПК содержит ГСК, ММСК. Что касается продуцирующей активности циркулирующих ЭПК, то данные немногочисленны и в основном касаются определения секрета адгезивных культивируемых в ранние сроки ЭПК.

Группа ученых под руководством J. Rehman исследовала уровень проангиогенных секреторных факторов ЭПК. Показано, что адгезивная фракция ЭПК, экспрессирующая моноцитарные маркеры, не отличаясь высоким пролиферативным потенциалом, секретирует ростовые факторы – VEGF, HGF, G-CSF, GM-CSF [310]. Содержание VEGF и G-CSF в кондиционной среде культивируемых ЭПК является наиболее высоким. В более поздней работе исследуется сравнительный секрет этих факторов, но в ранние и поздние сроки культивирования [312].

Другими авторами показано, что кондиционная среда при культивировании ЭПК доноров содержит VEGF, G-CSF, IL-8 и IL-17, причем возраст не влияет на уровень секреции данных цитокинов [42].

При культивировании в течение 72 часов ЭПК крыс продуцируют ангиогенин, HGF, IL-8, PDGF, SDF-1 и VEGF. Отмечено, что уровень секреции цитокинов значительно выше в гипоксических условиях [353].

Также показано, что CD34⁺133⁺ ЭПК мышей экспрессируют несколько изоформ VEGF, причем при культивировании значительно увеличивается экспрессия VEGF-120 и VEGF-164 [144].

Исследовано, что уровень секреции IL-1 β значительно выше у клеток с фенотипом CD34⁺, чем у CD34⁻ ЭПК [194].

Таким образом, спектр продуцируемых ЭПК биологически активных молекул касается в основном факторов роста, а цитокинпродуцирующая активность по литературным данным исследована недостаточно.

В настоящее время паракринное влияние путем секреции различных ростовых факторов и цитокинов рассматривается как основной механизм действия ЭПК [351; 247]. Локальные сигнальные молекулы, полный список которых еще предстоит определить, способствуют неоангиогенезу, влияя на все этапы образования сосудистых структур. Кроме того, они способны регулировать локальное воспаление и оказывать антиапоптотическое действие. Паракринные сигналы также влияют на внеклеточный матрикс и активируют соседние резидентные СПК [193].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за счет мобилизующих факторов различные популяции разной стадии дифференцировки ЭПК поступают из ниши костного мозга в периферическое русло крови, затем с помощью направляющих факторов путем хоуминга достигают ишемизированных тканей, далее путем адгезии закрепляются в ткани, пролиферируют и способствуют неангиогенезу.

Однако конкретный вклад ЭПК в неоваскуляризацию по-прежнему обсуждается. Некоторые авторы считают, что ЭПК могут напрямую встраиваться в стенки сосудов, другие полагают, что ЭПК проникают в периваскулярные пространства и способствуют неоваскуляризации секрецией паракринных факторов.

Исследования показывают, что, во-первых, приживление и выживание после трансплантации СПК доноров наблюдается только у 1–5 % клеток, что слишком мало, чтобы оказать влияние непосредственно на кровоснабжение органа. Во-вторых, ЭПК могут оказывать свой эффект в короткий срок после их введения,

что исключает их дифференцировку в зрелые эндотелиальные клетки в эти сроки. В-третьих, кондиционированные среды, полученные при культивировании СПК, оказывают сопоставимый с клетками эффект, что показано в экспериментальных условиях. Взятые вместе, эти косвенные и прямые данные показывают, что ЭПК могут улучшить кровоснабжение не путем дифференцировки в эндотелиальные клетки, а через сложные паракринные влияния.

Роль различных популяций ЭПК в неоангиогенезе исследована не достаточно, а биологически активные молекулы, в том числе с проангиогенным действием, секретлируемые ЭПК, охарактеризованы не в полном объеме.

1.3 Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на мобилизацию эндотелиальных прогениторных клеток

ЭПК, которые, как правило, находятся в костном мозге, могут высвободиться в циркуляцию после применения ряда биологически активных веществ.

1.3.1 Биологические эффекты гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Фармакологическая мобилизация клеток костного мозга в клинической практике осуществляется человеческим рекомбинантным G-CSF благодаря высокой эффективности и отсутствию токсичности, что позволяет обогатить периферическую кровь СПК, в том числе ЭПК, и выделить СПК из доступного источника. Данная процедура служит альтернативой забору костного мозга [223].

G-CSF способствует мобилизации ЭПК двумя механизмами. Во-первых, подавлением экспрессии стромальными клетками SDF-1 и активацией протеаз, препятствующих связыванию CXCR₄, уменьшая функцию интегрин-β1. Во-вторых, дополнительным увеличением сывороточных уровней хемокинов, цитокинов и факторов роста [8; 27; 161; 309; 343].

Биологические эффекты G-CSF обусловлены связыванием с рецептором, экспрессирующимся на гранулоцитах. Протеолитические ферменты, такие, как эластаза, катепсин-G, MMP-9, высвобожденные из активированных нейтрофилов и моноцитов, могут деградировать и/или инактивировать молекулы адгезии (VCAM-1/VLA-4), хемокины (SDF-1/CXCR₄), что приводит к нарушению контакта между СПК и костномозговым окружением. В результате перечисленных процессов ГСК и ЭПК мигрируют из костного мозга в периферическую кровь.

В экспериментальных исследованиях показано, что мобилизация G-CSF может быть обусловлена и непрямым сигнальным воздействием на костномозговое окружение [285; 358].

G-CSF первоначально был идентифицирован как фактор роста для нейтрофилов [103], причем экспрессия рецептора к G-CSF возрастает по мере дифференцировки СПК в зрелые клетки миелоидного ряда. Эффекты G-CSF на клетки кроветворной системы включают не только стимуляцию пролиферации и дифференцировки СПК, но активацию эффекторных функций циркулирующих клеток крови. Показано, что связывание G-CSF с его рецептором может стимулировать миелоидный, лимфоидный, эритроидный, мегакариоцитарный ростки кроветворения, а также активировать зрелые эндотелиальные клетки [48].

1.3.2 Эффективность мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Известно, что ЭПК с фенотипом CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ в небольшом количестве присутствуют в периферической крови у здоровых людей, а после проведения мобилизации G-CSF у доноров их количество значительно возрастает.

Наиболее часто используемая доза G-CSF для мобилизации у здоровых доноров в гематологической практике составляет 10 мкг/кг веса подкожно в течение пяти дней. Различные авторы не обнаружили увеличения количества CD34⁺ ЭПК при более высоких дозах G-CSF [137; 265].

Показано, что в периферической крови здоровых доноров количество ЭПК

с фенотипом $CD34^+$ при мобилизации возрастает в 34 раза, а количество ЭПК с фенотипом $CD34^+/133^+$ увеличивается в 40 раз [282]. Содержание ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$ в периферической крови у здоровых доноров составляет 2 % от общей популяции моноцитов и при мобилизации также увеличивается [280].

В то же время у пациентов с ИБС количество циркулирующих ЭПК снижено. Доза G-CSF, используемая для мобилизации СПК у пациентов ИБС, варьирует, но является менее 10 мкг/кг, чаще всего 2,5–5,0 мкг/кг [223]. Показано, что стимуляция G-CSF приводит к увеличению количества в периферической крови ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD133^+$ и $CD34^+/VEGFR_2^+$ с $(0,5 \pm 0,2) \times 10^3/\text{мл}$ до $(59,5 \pm 10,6) \times 10^3/\text{мл}$ и с $(0,0007 \pm 0,04) \times 10^3/\text{мл}$ до $(1,9 \pm 0,6) \times 10^3/\text{мл}$ соответственно. Количество ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ увеличивается с $(4 \pm 28) \times 10^3/\text{мл}$ до $(183 \pm 66) \times 10^3/\text{мл}$. Также установлено, что у пациентов с ХСН количество $CD34^+$ клеток увеличивается с $(1,9 \pm 0,2) \times 10^3/\text{мл}$ до $(55,7 \pm 11,1) \times 10^3/\text{мл}$ [282].

Другими авторами также показано, что при введении G-CSF происходит увеличение количества циркулирующих ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD133^+$, что сопровождается улучшением функционального состояния миокарда после ишемии [162; 164].

Mozid A. M. продемонстрировал, что введение G-CSF пациентам с ишемической сердечной недостаточностью приводит не только к увеличению количества циркулирующих $CD34^+$ ЭПК, но и улучшает их функциональное состояние [247]. В работе авторов [112] показано, что в модели поражения коронарных артерий при болезни Кавасаки у мышей снижается воспалительная инфильтрация тканей, увеличивается количество эластина в них, что связано с пролиферацией, адгезией и миграцией ЭПК.

Таким образом, мобилизация путем введения G-CSF приводит к выходу из костного мозга ЭПК не только у здоровых людей, но и у пациентов ишемической сердечной недостаточностью.

1.3.3 Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на биологически активные молекулы

G-CSF также моделирует функциональное состояние циркулирующих клеток крови, так как рецептор к G-CSF экспрессируется не только на недифференцированных СПК и ЭПК, но и на зрелых эндотелиальных и гемопоэтических клетках [73; 176].

В литературе имеются единичные данные о влиянии мобилизации G-CSF на цитокинпродуцирующую активность клеток периферической крови. В основном это данные у здоровых доноров, мобилизованные клетки периферической крови которых применяются для аллотрансплантации при гемобластозах.

Начальные исследования показали, что G-CSF изменяет продукцию про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови. В частности, введение G-CSF приводит к снижению уровня IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-18 и TNF- α при активировании МНК воспалительным стимулом липополисахарида (ЛПС) [73; 167]. Также показано, что введение G-CSF снижает уровень продукции IFN- γ и IL-4 [163].

В работе Hill G. R. исследовался уровень цитокинов спленоцитов мышей при мобилизации, секретируемых Т-хелперами 1-го типа (IFN- γ и TNF- α), Т-хелперами 2-го типа (IL-4, IL-5 и IL-10) и Т-хелперами 17-го типа (IL-17) [337]. Введение G-CSF не изменяет секреции IFN- γ и TNF- α , но приводит к снижению уровней IL-4 и увеличению IL-5, IL-10, IL-17.

У доноров снижается продукция IL-4, и повышается IFN- γ и IL-2 [173]. Также показано, что экспрессия IL-10 моноцитами у доноров и у пациентов с гемобластозами увеличивается после мобилизации, и повышается в ответ на провоспалительные стимулы при культивировании [198].

При исследовании цитокинов в сыворотке крови при мобилизации показано, что уровень IL-12, TNF- α и IL-6 не изменяется [169].

Таким образом, малочисленные исследования секреторного уровня цитокинов при мобилизации G-CSF касаются доноров или экспериментальных

данных у животных. У пациентов с ХСН в процессе мобилизации G-CSF секреторная активность клеток периферической крови не исследована.

1.3.4 Эффективность введения мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором эндотелиальных прогениторных клеток при ишемии миокарда

В экспериментальных моделях инфаркта миокарда введение G-CSF способствует мобилизации ЭПК в ткани сердца, улучшает регенерацию кардиомиоцитов и кровеносных сосудов [17]. Было показано, что введение G-CSF приводит к снижению индуцированного апоптоза кардиомиоцитов и предотвращению ремоделирования сердца после инфаркта миокарда [55; 162; 271]. Кроме того, при введении G-CSF отмечена активация ангиогенеза и возрастание уровня экспрессии ICAM-1 на эндотелиоцитах [158].

В нескольких клинических исследованиях с использованием G-CSF для мобилизации СПК как монотерапии после инфаркта миокарда, не удалось улучшить функцию сердечной мышцы [76; 115; 160; 175; 259; 318; 336].

Отсутствие клинического эффекта было обусловлено ограничениями в дизайне исследований, а также влияния G-CSF на сигнальный путь SDF-1/CXCR₄, что не приводит к хоумингу мобилизованных циркулирующих в периферической крови СПК в инфарцированную ткань сердца. Рассматриваются способы ингибирования CXCR₄, например AMD3100, применение которого в модели инфаркта у мышей способствует их выживанию, а также улучшению кровоснабжения миокарда. В то же время показано, при длительной блокаде CXCR₄ нарушается приживляемость СПК в миокарде [98].

Одним из подходов стимуляции репаративных процессов в миокарде является сочетание мобилизации ЭПК с локальным или системным введением выделенных ЭПК пациенту.

В одних исследованиях показано, что интракоронарное введение СПК, полученных после мобилизации G-CSF из костного мозга в периферическую

кровь, способствует улучшению кровоснабжения миокарда и сердечной функции по сравнению с одиночной терапией G-CSF у пациентов с инфарктом миокарда [221; 292]; в других – не приводит к выраженному увеличению фракции выброса левого желудочка, а также снижению класса сердечной недостаточности [164; 343].

При интрамиокардиальном введении мобилизованных клеток демонстрируется более сильный клинический эффект (повышение толерантности к физической нагрузке и снижение класса сердечной недостаточности) [223].

Таким образом, мобилизация СПК G-CSF как моноподход для терапии ИБС не способствует улучшению функционального состояния ишемизированного миокарда.

Данные по эффективности введения мобилизованных МНК периферической крови являются противоречивыми, и в основном касаются интракоронарного способа введения. При интрамиокардиальном введении, когда клетки вводятся непосредственно в ишемизированный миокард, и способность их к хоумингу не является определяющей функциональной характеристикой, эффект более выражен, но результаты таких исследований являются единичными.

1.3.5 Другие факторы мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток

Ряд ростовых факторов и цитокинов также приводят к мобилизации ЭПК из депо костного мозга в периферическую кровь – VEGF, EPO, IL-8, GM-CSF, статины и другие.

В экспериментальных моделях было исследовано, что генная терапия VEGF приводит к увеличению уровня ЭПК в кровотоке [370]. Также показано, что VEGF в сочетании с антагонистами рецептора к SDF-1 (CXCR₄) мобилизует исключительно ЭПК и ММСК, в то время как на популяцию ГСК влияет незначительно [106].

Введение EPO существенно увеличивает мобилизацию ЭПК и повышает

количество циркулирующих Sca-1⁺Flk-1⁺ клеток в экспериментальных моделях, стимулирует мобилизацию CD34⁺ циркулирующих прогениторных клеток у человека [138; 239]. Более того, выявлена корреляционная взаимосвязь между содержанием Eро в сыворотке крови и количеством CD34⁺ или CD133⁺ ЭПК костномозгового происхождения у пациентов с ИБС, что также подчеркивает важную роль эндогенного уровня Eро как физиологической детерминанты мобилизации ЭПК.

IL-8 также мобилизует ЭПК. Так, связывание рецептора CXCR₄, экспрессирующегося на эндотелиальных клетках, полученных из пупочной вены человека, с IL-8 приводит к увеличению пролиферации эндотелиальных клеток и образованию сосудистых структур *in vitro* [197]. Кроме того, установлено, что при остром инфаркте миокарда продукция IL-8 связана с увеличением пула циркулирующих CD133⁺ ЭПК [218].

GM-CSF, как и G-CSF, эффективно способствует мобилизации CD34⁺ ЭПК [276]. Надо отметить, что введение GM-CSF, в отличие от G-CSF, приводит к мобилизации более зрелых ЭПК, а также дендритных клеток [37].

Статины, относящиеся к атеропротективным препаратам, способны увеличивать не только количество, но и функциональную активность ЭПК, что демонстрируется в экспериментах и у пациентов с ИБС [368].

К факторам, способствующим увеличению количества циркулирующих ЭПК в периферическом русле крови, также относятся эстрогены, физические упражнения, как у здоровых доноров, так и у пациентов с ХСН, употребление зеленого чая, средиземноморская диета и умеренное потребление красного вина [65; 113; 114; 142; 207; 253].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мобилизация СПК путем введения G-CSF приводит к выходу из костного мозга ЭПК не только у здоровых людей, но и у пациентов ишемической сердечной недостаточностью. Введение G-CSF изменяет секреторную активность

клеток периферической крови, что показано в ряде экспериментальных работ, определено у доноров, однако не исследовано у пациентов с ХСН. Данные по эффективности введения мобилизованных G-CSF МНК периферической крови в основном касаются интракоронарного, а не интрамиокардиального способа введения и являются противоречивыми.

Таким образом, за счет мобилизующих факторов ЭПК поступают из ниши костного мозга в периферическое русло крови, затем с помощью направляющих факторов путем хоуминга достигают ишемизированных тканей, далее путем адгезии закрепляются в ткани, пролиферируют и дифференцируются в «зрелые» эндотелиальные клетки, образуя новые кровеносные сосуды, которые улучшают перфузию и способствуют репарации поврежденной ткани [131; 241].

Так, циркулирующие ЭПК, мигрируя в ткани, становятся тканевыми ЭПК.

1.4 Изучение ангиогенеза *in vitro*

1.4.1 Способы изучения ангиогенеза *in vitro*

Для образования нового кровеносного сосуда эндотелиальные клетки разрушают базальную мембрану сосуда, мигрируют по направлению к ангиогенным стимулам, начинают пролиферировать и образуют трехмерные сосудистые тубулярные структуры – новые кровеносные сосуды.

Каждый из этих этапов может быть протестирован *in vitro* и являться мишенью для воздействия. Эти методы (пролиферации, миграции и формирования трубочек, или сосудистых тубулярных структур) могут быть использованы для идентификации ангиогенных факторов роста или ингибиторов ангиогенеза.

В настоящее время для изучения функциональных свойств клеток в исследованиях *in vitro* используются различные клеточные линии эндотелиальных клеток. Поскольку первичные культуры эндотелиальных клеток имеют ограниченный пролиферативный потенциал и отличаются широкой

вариабельностью результатов, которая зависит от особенностей доноров, то перевиваемые клеточные линии стабильно воспроизводят свойства эндотелиальных клеток, что является их существенным преимуществом.

Одной из наиболее полно охарактеризованных перевиваемых линий человека является линия человеческих эндотелиальных клеток EA. hu926. По морфологическим, биохимическим, функциональным и генетическим характеристикам клетки этой линии очень близки к эндотелиальным клеткам макрососудов человека [203]. В связи с этим на такой перевиваемой линии человеческих эндотелиальных клеток EA. hu926 можно изучать различные этапы ангиогенеза *in vitro*.

Так, показано, что миграция EA. hu926 в модели десквамированного монослоя увеличивается при добавлении в культуру IL-8 [217], пролиферация изменяется под влиянием блокаторов ангиогенеза [49], а IL-6 увеличивает пролиферацию и миграцию EA. hu926 [230]. Эндотелиальные клетки EA. hu926 спонтанно секретируют IL-8, а преинкубация их с TNF- α приводит к повышению секреции IL-8, экспрессии белков адгезии ICAM-1 VCAM-1 [5]. Изучается воздействие различных стимулирующих или ингибирующих ангиогенез факторов на образование первичных тубулярных сосудистых структур клетками EA. hu926 на белках внеклеточного матрикса, в том числе на матрикеле, как *in vitro*, так и *in vivo* [58; 116].

1.4.2 Получение эндотелиальных прогениторных клеток при культивировании и их свойства

У человека ЭПК можно получить с помощью трех общепринятых методик.

Первая методика заключается в идентификации ЭПК по экспрессии поверхностных маркеров [289].

Вторая методика направлена на выделение ЭПК из крови или костного мозга по их способности образовывать кластеры эндотелиальных клеток [185].

Третья методика заключается в получении ЭПК из МНК путем их

дифференцировки [133; 310].

Преимущество первой методики в том, что можно доступно выделить ЭПК из периферической крови. Тем не менее, количество выделенных ЭПК является минимальным, и необходимо много времени, чтобы получить достаточное количество клеток для дальнейшего культивирования *in vitro*.

В противоположность данной методике значительно большее количество ЭПК можно получить в короткие сроки при культивировании МНК периферической крови в специальной эндотелиальной среде, содержащей факторы роста, на обработанном белками внеклеточного матрикса культуральном пластике.

Для выделения и культивирования ЭПК используют фибриллярные белки внеклеточного матрикса (фибронектин и коллагены I и III типа) и белки базальной мембраны (ламинин и коллаген IV типа) [184]. Также применяют матригель из растворимой базальной мембраны опухолей, включающий в себя ламинин и коллаген IV типа; и желатин (гидролизированный коллаген) [45].

Культивирование МНК на обработанном белками внеклеточного матрикса культуральном пластике приводит к выявлению двух различных популяций ЭПК, определяемых в различное время в культуре. Это «ранние» эндотелиальные клетки (endothelial cell-like cells) и «поздние» эндотелиальные клетки (endothelial outgrowth cells) [263; 305].

Эти два типа клеток по-разному участвуют в неоваскуляризации, но при этом экспрессируют схожие поверхностных маркеры, такие как CD31, фактор фон-Виллебранда [226]. «Ранние» ЭПК, при культивировании в течение 4–7 суток, в основном представлены CD34⁺ клетками, экспрессируют VEGFR₂ и связывают липопротеиды низкой плотности (LDL) [294]. В самом начале адгезивные клетки неоднородны по морфологии: круглые клетки располагаются в центре, а веретенообразные клетки на периферии [315]. В отличие от зрелых эндотелиальных клеток, «ранние» ЭПК экспрессируют моноцитарный маркер CD14 и панлейкоцитарный маркер CD45, отличаются низкой экспрессией маркеров эндотелиальных клеток. Это, вероятно, свидетельствует о

происхождении «ранних» ЭПК от общего гемопоэтического предшественника. Они имеют удлинённую форму, характеризуются ограниченным пролиферативным потенциалом и не формируют сосудистую сеть *in vitro* [130; 305].

Предлагается также термин «циркулирующие ангиогенные клетки» [185].

Следует отметить, что некоторые методы краткосрочных культур, используемые для изоляции ЭПК (в том числе и метод, используемый Асахара), не позволяют проводить селекцию чисто эндотелиальной клеточной популяции. При культивировании популяция клеток является гетерогенной и включает моноциты/макрофаги и Т-лимфоциты [68; 97; 375].

Значительные изменения в протокол были внесены Н. Ito и J. Hill.

Первый автор использовал МНК периферической крови, которые культивировались во флаконах, предварительно обработанных фибронектином, в эндотелиальной среде, но через 24 часа неприлипшие клетки заново пересеивали во флаконы с фибронектином. Данный протокол минимизировал попадание в культуру ЭПК клеток моноцитарного происхождения и зрелых эндотелиальных клеток [127].

В дальнейшем J. Hill с коллегами усовершенствовал предлагаемую методику. МНК культивировали во флаконах, предварительно обработанных фибронектином в течение 48 часов, затем неприлипшие клетки удалялись, а образовавшиеся колонии клеток были представлены ЭПК [90]. Появляющиеся колонии клеток были названы «колонии ЭПК», «колониеобразующие единицы (КОЕ) эндотелиальных клеток» и, наконец, «КОЕ-Хилла». Таким образом, способность клеток образовывать КОЕ-Хилла является особенностью и морфологическим маркером ЭПК.

Показано, что изолированные CD14⁺ клетки приводят к образованию «ранних» ЭПК, а истощение культивируемых клеток по CD14⁺ популяции предотвращает образование КОЕ [68].

Метод длительной культуры клеток (14–21 дней) «ранних» ЭПК приводит к изоляции более чистой популяции клеток с эндотелиальным фенотипом, которые

могут быть отнесены к «поздним» ЭПК [148]. При этом образование кластеров перестает быть критерием для идентификации «ранних» ЭПК.

«Поздние» ЭПК не экспрессируют CD14 маркер, происходят от CD45⁻/CD133⁻/CD34⁺ клеток. Морфологически «поздние» ЭПК имеют вид булыжной мостовой и экспрессируют такие поверхностные маркеры, как CD31, CD105, CD146, VE-кадгерин и VEGFR₂. В культуре клетки появляются на 10-й день, имеют высокий пролиферативный потенциал, способны длительно делиться и образовывать сосудистую сеть *in vitro* [130; 155; 305]. «Поздние» ЭПК играют ключевую роль в неоангиогенезе *in vivo* и являются сосудоформирующими ЭПК. «Поздние» ЭПК не экспрессируют маркеров предшественников и морфологически неотличимы от зрелых эндотелиальных клеток. Некоторые авторы идентифицируют эти клетки как CD34⁺CD45⁻ ЭПК [124].

В ряде работ вместо мононуклеарных клеток периферической крови в качестве исходного материала для культивирования используются селектированные CD34⁺ или CD133⁺ клетки. В то время как некоторые авторы не смогли получить колонии зрелых эндотелиальных клеток [190], другие показали, что культура выделенных клеток экспрессирует маркеры эндотелиальных клеток [82; 141; 189] Возможно, что условия культивирования определяют полученные противоречивые данные.

Из данных литературы известно, что «ранние» и «поздние» ЭПК, полученные *in vitro*, вносят различный вклад в развитие сосудистой сети [148].

Так, опосредованное участие «ранних» ЭПК в регенерации эндотелия сосудов подтвердили экспериментальные исследования, которые продемонстрировали влияние «ранних» ЭПК на процессы сосудообразования путем продукции цитокинов и ростовых факторов.

«Ранние» ЭПК продуцируют ряд ростовых факторов: SDF-1, VEGF, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), HGF, IL-8. Эти медиаторы способны увеличивать пролиферацию, миграционную активность «зрелых» эндотелиальных клеток [368].

Важно отметить, что спектр продукции цитокинов и ростовых факторов малоизучен. Данные о миграционной активности культуры ЭПК *in vitro* немногочисленны.

При совместном культивировании «ранних» ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток показано увеличение сосудообразования *in vitro*, что подтверждает участие «ранних» ЭПК в процессе ангиогенеза путем паракринного механизма [338]. Так, пролиферация эндотелиальных клеток линии EA.hy926 повышается в присутствии кондиционной среды при культивировании в ранние сроки ЭПК *in vitro* [147].

Очевидно, что «ранние» ЭПК участвуют в регенерации зрелых эндотелиальных клеток через клеточные и паракринные механизмы, но при этом не способны напрямую участвовать в образовании эндотелия. Предполагают, что появление «ранних» ЭПК является первым ключевым шагом на пути к регенерации эндотелия сосудов.

Кроме того, клинические исследования показали снижение количества и функциональной активности «ранних» ЭПК у пациентов с такими факторами сердечно - сосудистого риска, как артериальная гипертензия и ИБС [79; 302; 386].

Также выявлена обратная корреляционная зависимость между количеством КОЕ-Хилла и факторами сердечно-сосудистого риска (по шкале оценки вероятности развития сосудистых рисков по Framingham) у пациентов с ИБС [90; 128].

Таким образом, «ранние» ЭПК не в состоянии сформировать сосудистую сеть непосредственно, но оказывают косвенное паракринное влияние на ангиогенез путем секреции ангиогенных факторов в локальное микроокружение.

В свою очередь «поздние» ЭПК способны внедряться в уже сформированную сосудистую сеть, что показано при совместном культивировании ЭПК со зрелыми эндотелиальными клетками *in vitro*. «Поздние» ЭПК также могут формировать сосудистую сеть *in vivo* путем васкулогенеза [283; 338]. В связи с этим «поздние» ЭПК считаются «истинными» ЭПК, напрямую участвующими в репарации ишемизированной ткани.

Было показано, что совместное введение «ранних» и «поздних» ЭПК животным с моделью ишемии нижних конечностей приводит к синергическому взаимодействию между двумя типами клеток, что повышает сосудобразование и перфузию в ишемизированной ткани [341]. Данный факт объясняется тем, что «ранние» ЭПК за счет высокой продукции проангиогенных биологически активных веществ (IL-8, MMP) стимулируют и поддерживают пролиферацию, миграцию и формирование новой сосудистой сети «поздними» ЭПК [248].

Как известно, при культивировании МНК на разных адгезионных белках фибронектине и желатине, полученная культура ЭПК отличается как морфологически, так и функционально. Данные различия связаны с особенностью белков внеклеточного матрикса [264].

Так, фибронектин, способствует адгезии и миграции эндотелиальных клеток, стимулирует пролиферацию, контролирует дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвует в воспалительных и репаративных процессах [251; 360].

Желатин, в свою очередь, активно влияет на процессы пролиферации эндотелиальных клеток [94].

Показано, что при культивировании МНК, как из периферической крови, так и из костного мозга, во флаконах, предварительно обработанных желатином, пролиферация клеток значительно увеличивается по сравнению с МНК, культивированных во флаконах, предварительно обработанных фибронектином [94]. При этом жизнеспособность клеток выше при культивировании МНК с фибронектином, что объясняется лучшей адгезией клеток к пластику и развитием большего числа контактов между клетками [257].

Таким образом, в настоящее время ангиогенез *in vitro* изучают с использованием зрелых эндотелиальных клеток клеточных линий, что позволяет определить влияние различных ангиогенных стимулов на различные этапы процесса ангиогенеза, в том числе на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток в стабильных воспроизводимых условиях. ЭПК при культивировании продуцируют биологически активные вещества, которые способствуют

формированию сосудов. Данные о секретируемых ЭПК ростовых факторов и цитокинов, а также исследования паракринного взаимодействия ЭПК и эндотелиальных клеток малочисленны. Использование в качестве стимуляторов секретируемых данными клетками биологически активных молекул позволят определить паракринные взаимоотношения недифференцированных и зрелых эндотелиальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что эндотелиальные прогениторные клетки способствуют ангиогенезу в постнатальном периоде. Участие ЭПК в неоваскуляризации обусловлено не только их способностью дифференцироваться в эндотелиальные клетки, участвуя в формировании новых сосудов, но и способностью продуцировать различные регуляторные, в том числе проангиогенные ростовые факторы и цитокины. Экспериментальные и клинические исследования показали, что как использование ростовых проангиогенных факторов, так и введение различных популяций СПК, в том числе ЭПК, приводит к индукции неоангиогенеза. ЭПК, как циркулирующие, так и тканевые, секретируя проангиогенные факторы, способны оказывать паракринное действие, что делает эти клетки привлекательными для терапии ХСН.

Однако до сих пор свойства этих клеток (включая спектр и уровень продуцируемых ЭПК цитокинов, экспрессию поверхностных молекул и способность активировать различные этапы ангиогенеза), охарактеризованы недостаточно. Практически отсутствуют сравнительные данные о спектре секретируемых цитокинов циркулирующими ЭПК и выращенными *in vitro* в культуре у пациентов с ХСН. Малоисследованным остается также вопрос, насколько эффективно может происходить мобилизация ЭПК из костного мозга у пациентов с ХСН и изменяется ли их функциональная активность при введении G-CSF. Вышесказанное определило направление наших исследований.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали:

- 1) МНК периферической крови пациентов ИБС с III-IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности;
- 2) клетки эндотелиальной линии человека EA. hu926.

Работа выполнена на базе лаборатории клеточных технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии и на базе центра хирургической аритмологии Института патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина (руководитель центра д. м. н. Покушалов Е. А.).

2.1 Характеристика пациентов

Исследование проведено у 77 пациентов, страдающих ИБС с III–IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности (NYHA), давших информированное согласие, согласно протоколам, утвержденным этическими комитетами и учеными советами обоих учреждений соисполнителей (протокол № 5 от 02.06.2008 г. – Институт клинической и экспериментальной лимфологии; протокол № 26 от 24.02.2009 г. – Институт патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина).

Средний возраст пациентов составил $(57,0 \pm 7,6)$ лет, 89 % из них мужчины (таблица 1). Длительность заболевания ИБС составила $(7,94 \pm 5,86)$ лет, количество перенесенных ИМ составило $1,59 \pm 0,77$. Пациенты проходили обследование и плановое хирургическое лечение в центре хирургической аритмологии Института патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина.

Данные общего анализа крови предоставлены Романовым А. Б., Институт патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина. Данные о пациентах и функциональных параметрах миокарда предоставлены Кливер Е. Н., Институт патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с ХСН

Количество пациентов	77
Возраст пациентов, лет	57,0 ± 7,6
Пол (муж/жен)	64/8
Функциональный класс (NYHA)	III–IV
Длительность заболевания, лет	7,94 ± 5,86
Количество перенесенных инфарктов	1,59 ± 0,77
Фракция выброса левого желудочка, %	26,6 ± 5,2
Тест 6-минутной ходьбы, м	235 ± 32
Перфузия миокарда, баллы	30,2 ± 5,6 (покой)
	34,5 ± 5,4 (нагрузка)

2.2 Метод проведения мобилизации мононуклеарных клеток периферической крови

Рекомбинантный человеческий G-CSF (Grasalva, Израиль) вводился подкожно в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки общим количеством пять инъекций. До и после мобилизации G-CSF у пациентов забиралась венозная кровь.

На шестые сутки пациентам проводилась процедура аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови (Haemonetics MCS⁺, США). Использовалась программа PBSC (получение периферических стволовых клеток), параметры циркуляции и рециркуляции (recirculation № 2, recirc ratio 1/3).

МНК из сепарированной крови выделяли на градиенте плотности фиколла/верографина ($\rho = 1,078$ г/л), дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), подсчитывали количество, жизнеспособность выделенных клеток оценивали окрашиванием витальным красителем (трипановый синий).

2.3 Методы исследования фенотипа мононуклеарных клеток периферической крови

Фенотип МНК периферической крови исследовали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител меченных FITC и PE к CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 (Сорбент, Россия). Фенотип ЭПК исследовали с использованием моноклональных антител меченных FITC и PE к CD34, CD45, CD133, VEGFR₂, CD31, CD14 (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя. Экспрессию рецептора CXCR₄ изучали на CD34⁺ клетках с использованием моноклональных антител меченных APC.

2.4 Иммуноцитохимическое исследование мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками

Для иммунофлуоресцентного окрашивания суспензию МНК периферической крови фиксировали 4 %-м раствором формалина (объем/объем) в течение 10 мин. Пермеабиллизацию осуществляли в 0,4 %-м растворе Triton X-100 при комнатной температуре в течение 10 мин, с последующей двукратной отмывкой ЗФР. Далее препараты инкубировали с блокирующим буфером (раствор бычьего сывороточного альбумина 25 мг/мл в ЗФР) при комнатной температуре в течение 30 мин, без отмывки препараты гибридизовали в течение двух часов с разведенными в блокирующем буфере первыми антителами (CD34, Abcam, Великобритания). После двойной отмывки препарата ЗФР, инкубировали в течение одного часа со вторыми антителами (Alexa Fluor 568; Abcam, Великобритания).

После двукратной отмывки ЗФР прокрашивали ядра клеток 10 %-м раствором Vectashield Mounting Medium with DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол; VectorLabs, США). Микроскопию полученных мазков проводили на инвертированном микроскопе Axio Observer.Z1 (увеличение × 40) с использованием программного обеспечения фирмы Carl Zeiss (Германия).

2.5 Исследование цитологических параметров мобилизованных мононуклеарных клеток периферической крови методами световой микроскопии

Для световой микроскопии (увеличение $\times 90$) суспензию МНК периферической крови фиксировали 96 %-м раствором этанола в течение 30–40 минут, после высушивания стекол препараты окрашивали по Романовскому-Гимзе в течение 5–7 минут. Стекла промывали и высушивали, далее проводили микроскопическое исследование мазков [6].

2.6 Оценка пролиферативной активности мононуклеарных клеток МТТ-тестом

Интенсивность пролиферативного потенциала МНК крови исследовали в триплетах (2×10^5 клеток/лунка) в спонтанном и стимулированном тестах (5 мкг/мл Конканавалина А – Кон А, США), а также в присутствии G-CSF (50 Ед/мл; Graspalva, Израиль) и Еро (33 Ед/мл; Рекормон, США) на спектрофотометре (Stat Fax 2100, США) при длине волны 492 нм по включению клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США) и преобразования его в формазан митохондриальными дегидрогеназами [363].

Далее снимали значения оптической плотности субстрата в лунках, полученные значения выражали в условных единицах оптической плотности (ед. опт. пл.). Индекс стимуляции (ИС) пролиферации рассчитывали как опт. пл. продукта реакции в опыте/опт. пл. продукта реакции в контроле.

2.7 Исследование клеточного цикла и апоптоза CD34⁺ клеток

В популяции CD34⁺ клеток исследовали клеточный цикл и уровень апоптоза методом двуцветной проточной цитофлюориметрии с помощью окрашивания

клеток пропидиумом иодида (Vecton Dickinson, США) согласно инструкции производителя. Анализ клеточного цикла проводился по оценке гистограмм ДНК. Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G_0/G_1 фазах; ДНК=2n) и гиперпloidным (клетки в S, G_2/M фазах; ДНК > 2n–4n) набором ДНК определяли в гейте CD34⁺ клеток. Апоптотические клетки, ДНК которых подвергалась фрагментации, формировали характерный гиподиплоидный пик (ДНК < 2n).

2.8 Оценка колониобразующей активности моноклеарных клеток

Колониобразующую активность определяли по числу колониобразующих единиц (КОЕ), сформированных в полутвердой среде MethoCult (Stemcell Technologies, США). Постановку теста осуществляли согласно инструкции производителя. Суспензию МНК разводили средой MethoCult (STEMCELL Technologies, Канада) до концентрации 2×10^4 клеток/мл, высаживали в триплетах и инкубировали при 37 °С при 5 % содержании CO₂. Численность КОЕ, содержащих более пятидесяти клеток, подсчитывали через 14 дней.

2.9 Получение культуры эндотелиальных прогениторных клеток

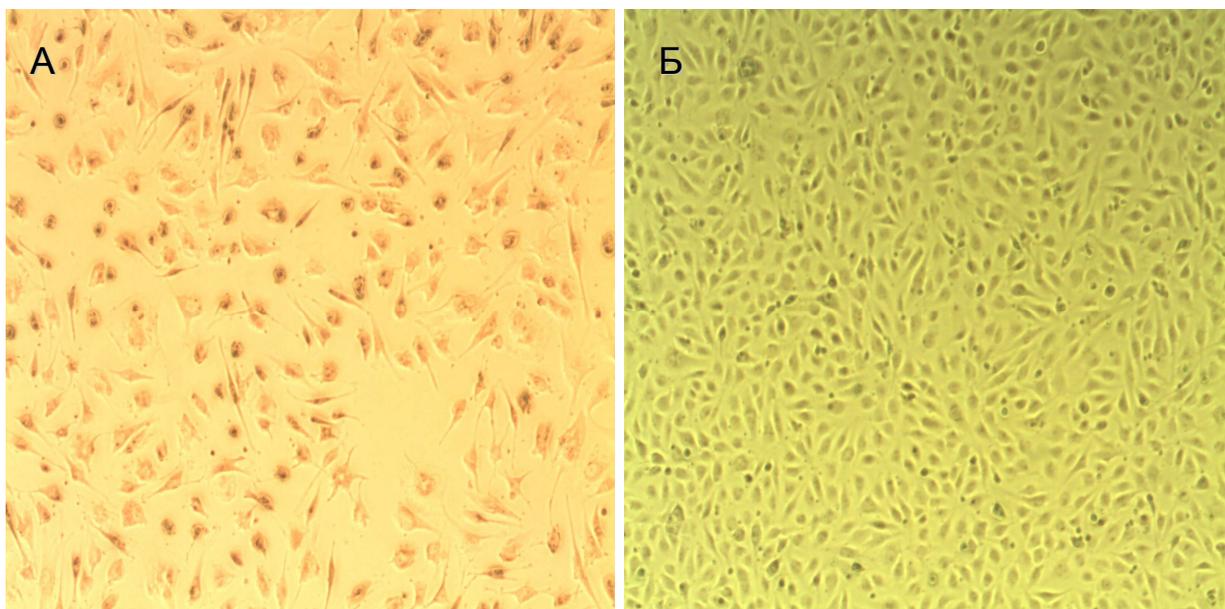
Культура ЭПК была получена из МНК, мобилизованных введением G-CSF, от пациентов с ХСН. Культивирование МНК проводили в эндотелиальной среде (EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland) с добавлением факторов роста – 10 % FCS (Биолот, Россия), 160 мкг/мл гентамицин сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 ммоль L-глутамина (ICN, США). Клетки культивировали в культуральных флаконах для прилипающих культур, предварительно обработанных фибронектином (Sigma-Aldrich, США) и желатином (Мосхимфармпрепараты, Россия) в концентрации 1×10^6 клеток/мл при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержания CO₂ в течение 48 часов. Затем культуральные флаконы промывали 2 раза ЗФР для удаления неприлипших клеток и далее культивировали

в эндотелиальной среде с ростовыми факторами и 10 % FCS в течение 8 суток для получения культуры «ранних» ЭПК, и 16 суток – для «поздних» ЭПК. Смена среды для роста осуществлялась каждые три дня.

2.10 Условия поддержания жизнеспособности культуры клеток эндотелиальной линии EA. hu926 человека

Клетки эндотелиальной линии EA. hu926 были любезно предоставлены Dr. C. J. Edgel (Университет Каролины, США).

Культура клеток была получена гибридизацией первичной эндотелиальной линии HUVEC с клетками карциномы легкого A-549 [203]. Для клеток эндотелиальной линии EA. hu926 характерно сохранение основных морфологических, фенотипических и функциональных свойств, присущих клетками эндотелия макрососудов (рисунок 1).



Примечание – (А) – 8-е сутки культивирования; (Б) – 16-е сутки культивирования. Увеличение 4×10

Рисунок 1 – Культура эндотелиальной линии EA. hu926

Культивирование клеток эндотелиальной линии EA. hu926 проводили в

питательной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % FCS, 160 мкг/мл гентамицин сульфата, 2 ммоль L-глутамина и НАТ, добавку к среде, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ICN, США) – полная посадочная среда (ППС). Клетки культивировали в культуральных флаконах для прилипающих культур в концентрации $1,7 \times 10^5$ /мл при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержания CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя. Пересев осуществляли 1 раз в 3–4 дня.

2.11 Получение кондиционных сред культур клеток

Для получения кондиционных сред ЭПК после мобилизации и клетки линии EA. hu926 инкубировали в питательной среде с добавлением 1 % FCS (HyClone, США), 160 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 ммоль L-глутамина (ICN, США). Через 72 часа надосадочную жидкость снимали, фильтровали через шприцевые насадки с диаметром пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария), разливали по аликвотам и хранили при минус 70 °С до момента использования в работе.

2.12 Исследование концентрации цитокинов в кондиционных средах

Уровень продукции цитокинов изучали в кондиционных средах (КС) от 72-часовых культур МНК, как в спонтанном тесте, так и стимулированных тестах (5 мкг/мл Кон А, США; 10 мкг/мл ЛПС, США), а также в присутствии G-CSF (50 Ед/мл; Graspalva, Израиль) и Еро (33 Ед/мл; Рекормон, США), от 72-часовых культур ЭПК, полученных после мобилизации, и клеточной линии EA. hu926 человека.

Аликвоты собранных КС замораживали и хранили при минус 20 °С до тестирования. Содержание в КС TNF- α , IL-8, IL-10, IL-18, VEGF, Еро и G-CSF определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест»

(п. Кольцово, Новосибирская область, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Индекс стимуляции (ИС) секреторного уровня рассчитывали как опт. пл. продукта реакции в опыте/опт. пл. продукта реакции в контроле.

2.13 Оценка пролиферативной активности культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. hu926 на аппарате xCELLigence System

Пролиферативную активность клеток эндотелиальной линии EA. hu926 изучали на аппарате xCELLigence System (Roche, США).

Система измеряет электрический импеданс, создаваемый микроэлектродами, встроенными на дне планшетов. Измерение импеданса предоставляет количественную информацию о статусе клеток, включая число клеток, их выживаемость. Величина электрического импеданса выражается в значении клеточного индекса (КИ).

В лунки вносится ППС и тестируемые вещества в объеме 130 мкл, снимается значение импеданса, далее вносятся клетки в питательной среде в объеме 30 мкл. В условиях исследования задается общее время сканирования и интервал сканирования. Все измерения производятся в автоматическом режиме без вмешательства экспериментатора.

Оценивали уровень пролиферативной активности культур ЭПК при добавлении: G-CSF (Грасальва, Израиль; 300 мкг/мл), VEGF (BioVision, США; 10 нг/мл), Еро (Рекормон, Германия; 33,4 МЕ/мл) и 30 % от общего объема лунки КС от клеток эндотелиальной линии EA. hu926; клеток эндотелиальной линии EA. hu926 при добавлении Еро или 30 % от общего объема лунки КС от культур ЭПК.

2.14 Оценка миграционной способности культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. hu926 на аппарате xCELLigence System

По изменению электрического импеданса на аппарате xCELLigence System в двухуровневых камерах оценивали миграционную активность культуры ЭПК и клеток эндотелиальной линии EA. hu926.

В нижние лунки вносится по 100 мкл питательной среды с добавлением ростовых факторов, в верхнюю лунку – 30 мкл питательной среды без клеток, снимается значение импеданса. Далее вносятся клетки в объеме 30 мкл питательной среды в верхнюю часть камеры. Изучали влияние на миграционный потенциал культур ЭПК 30 % от общего объема лунки КС от клеток эндотелиальной линии EA. hu926. Изучали влияние на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA. hu926 EPO (Рекормон, Германия; 33,4 МЕ/мл); VEGF (BioVision, США; 10 нг/мл); TNF- α (Sigma-Aldrich, США; 5 нг/мл) и 30 % от общего объема лунки КС от культур ЭПК.

Миграция клеток эндотелиальной линии EA. hu926 оценивалась с предварительной инкубацией верхних лунок камеры с фибронектином в течение 60 мин при 37 °С в дозировке 20 мкг/мл и с добавлением фибронектина в дозировке 20 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) в нижние лунки камер. В нижние лунки вносилось по 100 мкл культуральной среды добавлением ростовых факторов, в верхние лунки – 30 мкл среды без клеток, снималось значение импеданса, далее вносились клетки EA. hu926 в объеме 30 мкл в верхнюю часть камеры.

2.15 Оценка миграционной способности клеток эндотелиальной линии EA. hu926 на аппарате Cell-IQ

Миграцию клеток эндотелиальной линии EA. hu926 изучали с применением культурального метода с десквамацией монослоя с помощью прибора Cell-IQ

(CM Technologies Ltd., Финляндия). Прибор сочетает в себе условия для долгосрочной инкубации клеток с получением изображений методом фазового контраста в режиме реального времени и позволяет анализировать изменения морфофункциональных характеристик клеток.

Клетки эндотелиальной линии EA. hu926 культивировались в 6-луночных планшетах (Costar, Cambridge, MA) до 80–90 % слияния в среде, содержащей 1 % FCS в течение суток. Далее образованный конфлюэнтный слой клеток десквамировали, соскабливая часть клеток. Для этого по центру лунки проводили наконечником объемом 200 мкл вертикальную ровную линию от края до края лунки. Затем лунки промывали ЗФР для удаления неприлипших клеток и культивировали в среде, содержащей 5 % FCS (контроль) и с 30 % КС от культуры ЭПК. Изображения фиксировались каждые 15 минут в течение 24 часов, используя 4× объектив Cell-IQ (CM Technologies Ltd, Финляндия). Миграция клеток эндотелиальной линии EA. hu926 при заживлении раны была проанализирована с помощью Cell-IQ Analyzer (CM Technologies Ltd., Финляндия).

2.16 Исследование продукции стойких метаболитов оксида азота в кондиционной среде от культуры эндотелиальных прогениторных клеток и клеток эндотелиальной линии EA. hu926

ЭПК пациентов с ХСН и клетки эндотелиальной линии EA. hu926 культивировали в одном мл питательной среды в 24-луночных планшетах (TPP, Швейцария) при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержания CO₂. Кондиционную среду собирали через 48 часов и хранили при минус 70 °С до использования. Далее 100 мкл аликвоты вносили в 96-луночный планшет с добавлением равного количества реактива Грисса (1 % сульфаниламида и 0,1 % N-1-(нафтил) этилендиамина дигидрохлорида в 2,5 % H₃PO₄). Затем планшет инкубировали в течение пяти минут и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

2.17 Интрамиокардиальное введение мобилизованных мононуклеарных клеток и оценка эффективности введения

Процедуру введения мобилизованных МНК периферической крови, оценку клинической эффективности проводили на базе института патологии кровообращения им. ак. Е.Н. Мешалкина. Пациентам интрамиокардиально под контролем навигационной системы NOGA XP в 10 точках вводили клетки по $1,5 \times 10^8$ /мл в объеме 2 мл. Эффективность интрамиокардиального введения мобилизованных G-CSF МНК периферической крови оценивали через 6 и 12 месяцев по изменению функционального класса СН по NYHA, объему фракции выброса левого желудочка сердца с помощью ЭХО КГ и изменению перфузии миокарда по данным ЭКГ-синхронизированной томосцинтиграфии (SPECT) с технецием (Tc-99m) в покое и при нагрузке, индуцированной введением аденозина; толерантности к физической нагрузке.

2.18 Статистическая обработка полученных результатов

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 центральной тенденции и рассеяния описаны в случае нормального распределения признаков средним их значением (M) и средним квадратичным отклонением ($\pm\sigma$), а параметры, не имеющие нормального распределения – медианой (Me), нижним (25 % – LQ) и верхним (75 % – 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 $p < 0,05$ [7; 23].

ГЛАВА 3 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ МОБИЛИЗАЦИИ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ

3.1 Оценка гемостимулирующей активности гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Известно, что введение G-CSF условно здоровым лицам ведет к увеличению количества лейкоцитов в периферической крови, обусловленное в основном разрастанием гранулоцитарного ростка кроветворения [48; 265]. Эффективность действия G-CSF, по данным литературы, оцененная на первом этапе по приросту количества нейтрофилов в периферической крови, зависит как от дозы и режима введения G-CSF, так и от возраста и наличия различных заболеваний [137; 265; 280; 282].

Первоочередная задача нашего исследования состояла в оценке способности введения G-CSF в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки в течение пяти дней приводить к увеличению количества нейтрофилов в периферической крови у пациентов с ХСН, как первичного показателя эффективности мобилизации СПК.

Для сбора обогащенных СПК мононуклеарных клеток периферической крови по завершении курса мобилизации введением G-CSF на 6-е сутки была проведена процедура цитафереза.

Объем аферезного продукта составил $(47,33 \pm 17,18)$ мл, а количество выделенных МНК – $(3,52 \pm 1,70) \times 10^9$ клеток. Поскольку данная программа сепарации учитывает антропометрические, лабораторные данные и пол пациента, объем эксфузированной крови и конечного продукта был индивидуален.

Не было выявлено корреляционных связей между количеством выделенных МНК из аферезного продукта и клиническими показателями – возрастом пациентов, количеством перенесенных инфарктов и длительностью ишемического

анамнеза (таблица 2).

Таблица 2 – Корреляционные связи между количеством выделенных МНК из аферезного продукта и клиническими показателями пациентов с ХСН (n = 72)

Показатели	Количество МНК	
	Возраст	R = 0,008
Количество инфарктов	R = - 0,150	p = 0,09
Длительность ишемического анамнеза	R = - 0,091	p = 0,09
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции		

Введение G-CSF пациентам с ХСН приводило к увеличению количества лейкоцитов в периферической крови в 4,9 раз к 6-м суткам мобилизации (таблица 3). Причем большая часть прироста лейкоцитов приходилась на 1-е сутки введения G-CSF. Повышение количества лейкоцитов обусловлено увеличением абсолютного содержания в крови нейтрофилов в 6,8 раз (рисунок 2).

Между количеством нейтрофилов и количеством лейкоцитов в периферической крови выявлена сильная положительная корреляционная связь (R = 0,987; p = 0,004).

В то же время прирост количества нейтрофилов не зависел от возраста пациентов, количества перенесенных инфарктов и длительности ишемического анамнеза (R = 0,287; p = 0,4).

Биологические эффекты G-CSF опосредуются его взаимодействием с рецептором, который экспрессируется не только на клеточной поверхности нейтрофилов.

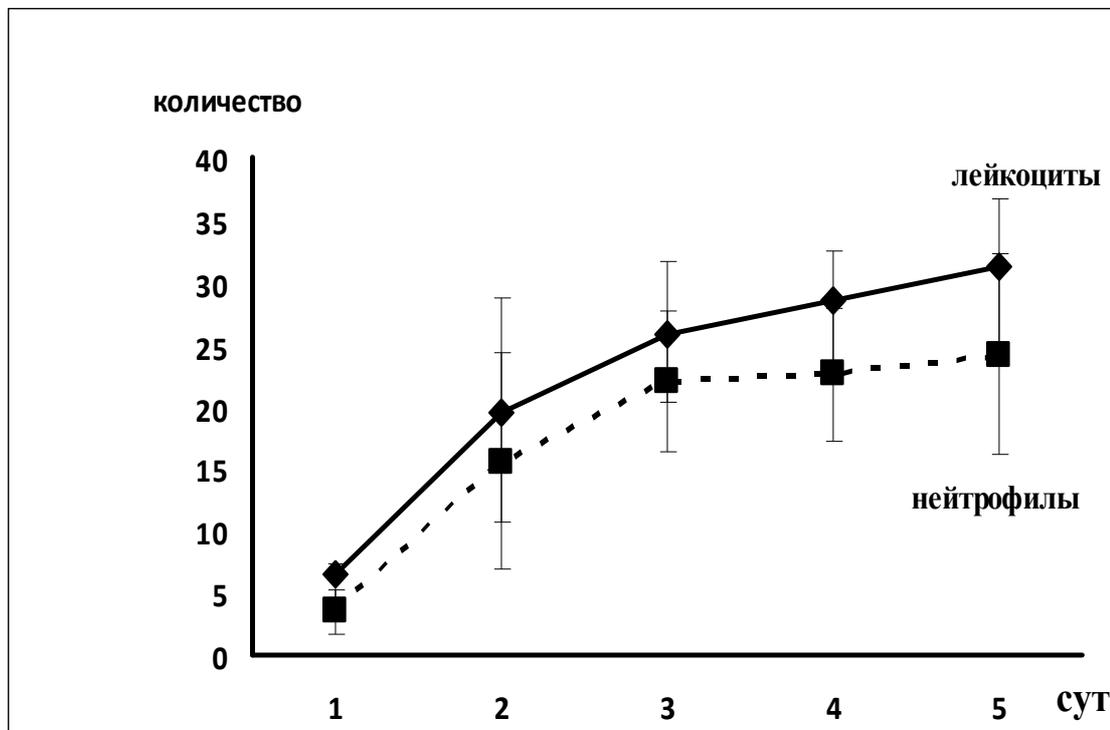
Ранее в исследованиях показано, что введение G-CSF в дозе 10,0 мкг/кг веса и выше в течение 5 суток приводит к стимуляции миелоидного, лимфоидного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения [48].

Таблица 3 – Динамика изменения абсолютных и относительных значений показателей общего анализа крови у пациентов с ХСН на фоне мобилизации G-CSF (n = 58)

Показатели крови	До введения G-CSF (0-е сутки)		После окончания введения G-CSF (6-е сутки)	
	Абсолютное количество, $10^9/\text{л}$	Относительное количество, %	Абсолютное количество, $10^9/\text{л}$	Относительное количество, %
Лейкоциты	$6,39 \pm 1,22$	—	$31,25 \pm 6,03$ (p = 0,0015)	—
Нейтрофилы	$3,53 \pm 0,78$	$52,96 \pm 4,54$	$24,18 \pm 4,52$ (p = 0,0015)	$77,92 \pm 4,64$ (p = 0,0015)
Лимфоциты	$2,23 \pm 0,38$	$35,27 \pm 7,82$	$4,29 \pm 1,32$ (p = 0,0025)	$10,18 \pm 3,11$
Моноциты	$0,61 \pm 0,22$	$8,45 \pm 2,33$	$1,07 \pm 0,84$ (p = 0,094)	$5,73 \pm 2,51$
Тромбоциты	$209,20 \pm 58,11$	—	$210,73 \pm 32,73$	—
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$4,24 \pm 0,72$	—	$4,17 \pm 0,79$	—
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде средних значений ($M \pm \sigma$); 3. p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF				

Результаты нашего исследования показали, что доза вводимого пациентам G-CSF 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки приводила к статистически незначимому снижению относительного количества лимфоцитов и моноцитов в периферической крови. Абсолютное же количество лимфоцитов статистически значимо увеличивалось в 1,9 раз, моноцитов – в 2,9 раз, но оставалось в пределах

нормативных значений. Не выявлено статистически значимых различий между количеством эозинофилов и базофилов до и после мобилизации G-CSF. Введение G-CSF не сопровождалось изменением количества тромбоцитов и эритроцитов.



Примечания:

1. данные представлены в виде средних значений ($M \pm \sigma$);
2. по оси абсцисс – время после введения G-CSF(сутки); по оси ординат – количество клеток $\times 10^9/\text{л}$

Рисунок 2 – Результаты исследования количества лейкоцитов и нейтрофилов в процессе мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН

При исследовании показателей общего анализа крови через 6 месяцев после мобилизации МНК G-CSF у пациентов с ХСН отмечено, что содержание лейкоцитов и нейтрофилов достигло исходных показателей до проведения процедуры мобилизации МНК G-CSF. В частности, количество лейкоцитов до введения G-CSF и через 6 месяцев после мобилизации G-CSF составило $(6,39 \pm 1,22) \times 10^9/\text{л}$ и $(6,31 \pm 1,71) \times 10^9/\text{л}$ (соответственно), а нейтрофилов – $(3,53 \pm 0,78) \times 10^9/\text{л}$ и $(3,32 \pm 1,73) \times 10^9/\text{л}$ (соответственно).

При микроскопии мазка концентрата клеток после мобилизации G-CSF, полученного путем градиентного выделения, было показано, что $(90,5 \pm 5,8)$ % клеток составляли лимфоциты, в том числе, малые лимфоциты, оставшиеся клетки были представлены моноцитами (рисунок 3).

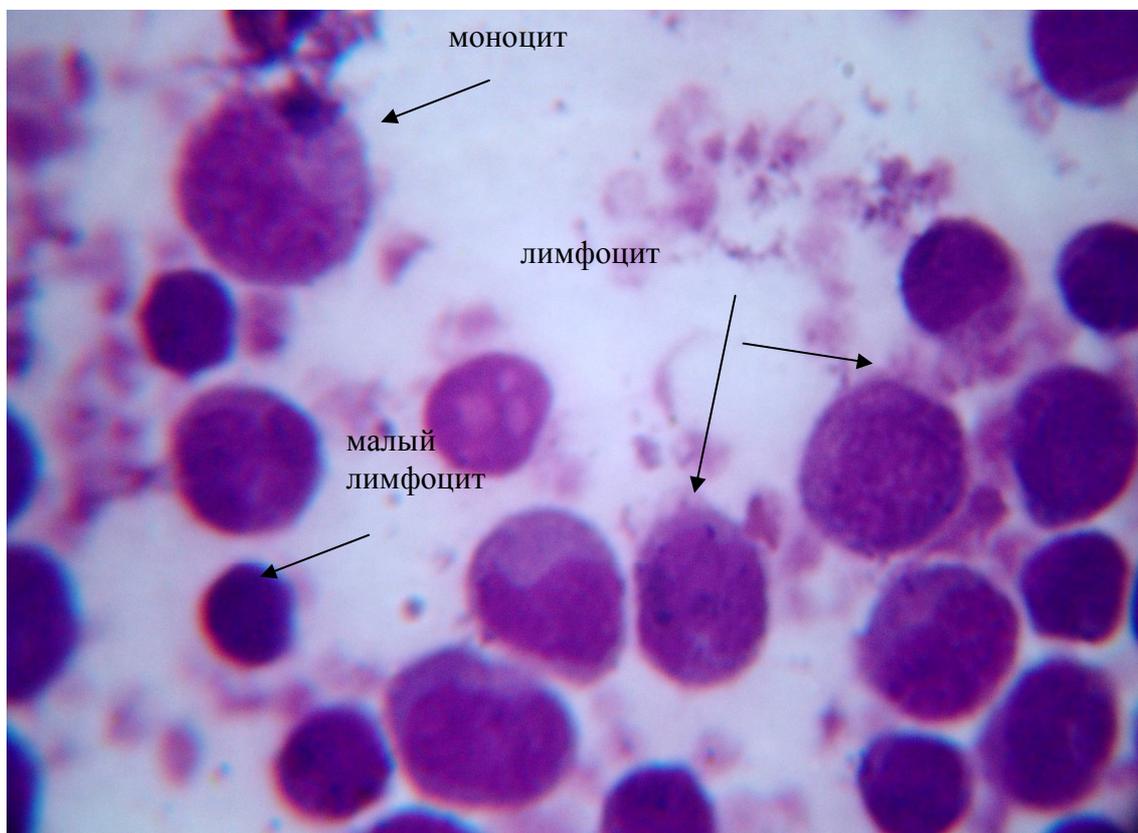


Рисунок 3 – Морфология мазка концентрата клеток крови после мобилизации G-CSF, обогащенного выделением на градиенте плотности фиколл/верографина у пациентов с ХСН. Увеличение $\times 90$

Результаты исследования популяционного состава МНК периферической крови у пациентов с ХСН на фоне мобилизации МНК G-CSF по данным проточной цитометрии представлены в таблице 4.

Каких-либо статистически значимых различий в количестве популяций $CD3^+$ Т-лимфоцитов и субпопуляций Т-клеток (CD4, CD8), В-лимфоцитов (CD19), и в количестве $CD14^+$ моноцитов на фоне мобилизации МНК G-CSF не выявлено.

Таблица 4 – Количество основных популяций МНК периферической крови у пациентов с ХСН на фоне мобилизации G-CSF (n = 26)

Фенотип МНК	Количество популяций МНК, %	
	0-е сутки	6-е сутки
CD3 ⁺	61,57 ± 15,37	66,00 ± 8,37 p = 0,3
CD4 ⁺	38,33 ± 11,25	39,00 ± 9,33 p = 0,6
CD8 ⁺	20,75 ± 10,26	23,63 ± 9,23 p = 0,5
CD19 ⁺	1,36 ± 1,11	1,63 ± 0,17 p = 0,09
CD14 ⁺	8,26 ± 6,39	8,06 ± 4,10 p = 0,8
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде средних значений (M±σ); 3. p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF		

Таким образом, введение G-CSF пациентам с ХСН в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки приводит к увеличению количества лейкоцитов и гранулоцитов в периферической крови, и не влияет на субпопуляционный состав МНК.

Увеличение количества нейтрофилов свидетельствует об их экспансии в костном мозге, что, следовательно, ведет к мобилизации СПК в периферическое русло крови.

3.2 Эффект введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на выход в периферическое русло крови эндотелиальных прогениторных клеток

Известно, что G-CSF регулирует пролиферацию СПК костного мозга и их миграцию из костного мозга в кровь, а на фоне мобилизации G-CSF экспансия гранулоцитов ведет к нарастанию количества СПК, в том числе и ЭПК [145]. Поэтому следующим этапом работы стало исследование влияния мобилизации МНК G-CSF на содержание ЭПК у больных с ХСН.

Ранее в данных литературы показано, что в периферической крови здоровых доноров содержание циркулирующих ЭПК является невысоким, а применение G-CSF приводит к их мобилизации из костного мозга, и как следствие этого – увеличению количества ЭПК в периферической крови [280; 282; 322]. Данные же о количестве различных популяций ЭПК у пациентов с ХСН являются противоречивыми [164], а эффект мобилизации ЭПК при введении G-CSF практически не исследован. В единичных работах охарактеризован фенотип только «классических» популяций ЭПК.

В связи с этим следующий этап исследования направлен на идентификацию различных популяций ЭПК, с одной стороны, а с другой стороны – оценку влияния введения G-CSF на содержание этих популяций в периферической крови в процессе мобилизации у пациентов с ХСН.

В таблице 5 представлены результаты фенотипирования МНК периферической крови пациентов с ХСН, которые позволили на основании сочетания экспрессии CD маркеров выявить различные популяции разной степени дифференцировки ЭПК.

Показано наличие девяти популяций ЭПК в периферической крови. Причем, CD34⁻/CD133⁺ клетки являются самой ранней в дифференцировочном отношении популяцией ЭПК – так называемые «незрелые» ЭПК.

Таблица 5 – Относительное количество ЭПК у пациентов с ХСН (n = 30)

Фенотип ЭПК	Количество клеток	
	в периферической крови до мобилизации G-CSF	в периферической крови после мобилизации G-CSF
CD34 ⁺	0,01 (0,01–0,07)	0,42 (0,25–0,64) p = 0,000024
CD34 ⁺ /CD133 ⁺	0,01 (0,01–0,01)	0,02 (0,01–0,04) p = 0,01
CD34 ⁻ /CD133 ⁺	0,10 (0,05–0,10)	0,40 (0,05–0,60) p = 0,0039
CD34 ⁺ /VEGFR ₂ ⁺	0,01 (0,01–0,02)	0,09 (0,08–0,10) p = 0,004
CD34 ⁻ /VEGFR ₂ ⁺	0,27 (0,17–0,60)	0,95 (0,85–1,10) p = 0,004
CD34 ⁺ /CD31 ⁺	0,10 (0,05–0,28)	0,28 (0,04–0,30) p = 0,02
CD34 ⁻ /CD31 ⁺	15,90 (12,30–30,00)	18,00 (13,00–32,00) p = 0,04
CD14 ⁻ /VEGFR ₂ ⁺	0,61 (0,41–2,42)	2,90 (1,35–5,35) p = 0,06
CD14 ⁺ /VEGFR ₂ ⁺	0,70 (0,10–3,90)	3,80 (0,13–6,30) p = 0,003
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75 % квартильных значений (LQ – UQ); 3. p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF		

Клетки, экспрессирующие CD34/CD133, CD34 маркеры, являются «более зрелыми» популяциями ЭПК. Коэкспрессия маркера зрелых эндотелиальных клеток VEGFR₂ или CD31 к CD34 маркеру стволовых клеток позволяет определить еще две популяции зрелых ЭПК – CD34⁺/VEGFR₂⁺ и CD34⁺/CD31⁺ клетки. Утрата экспрессии маркера стволовых клеток CD34 на этих двух популяциях клеток характеризует эндотелиальные циркулирующие клетки,

представленные фенотипами $CD34^-/VEGFR_2^+$, $CD34^-/CD31^+$ и $CD14^-/VEGFR_2^+$.

Также выявлены ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$.

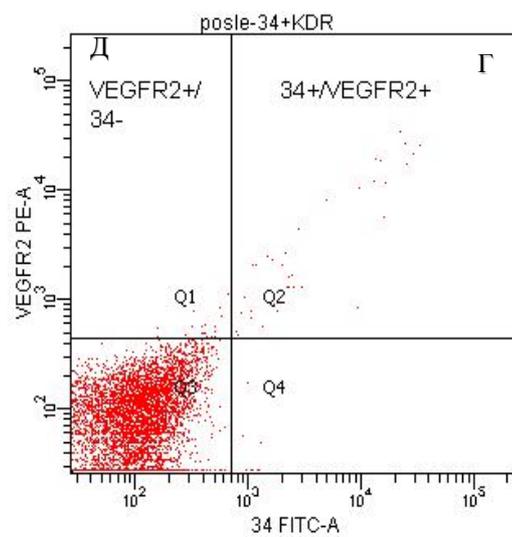
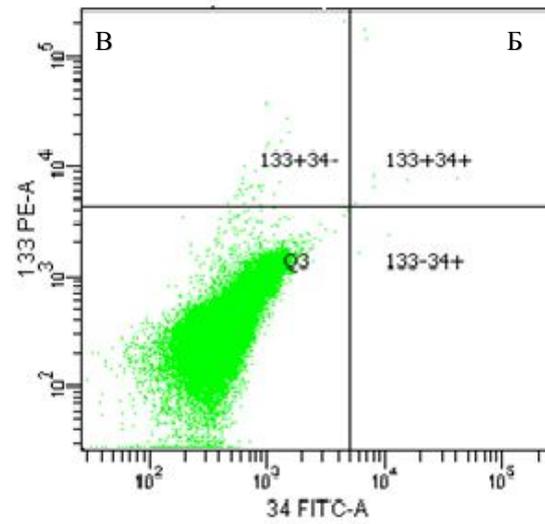
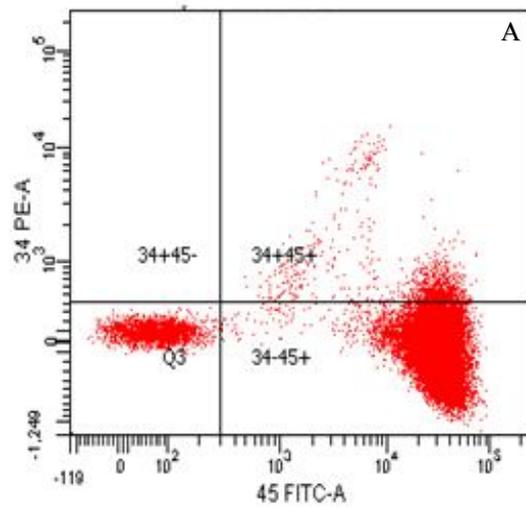
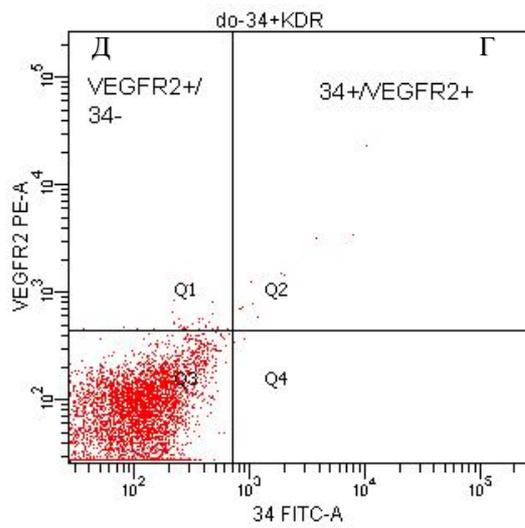
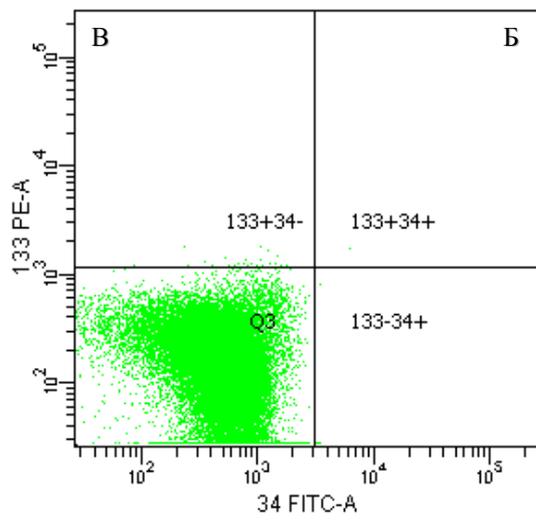
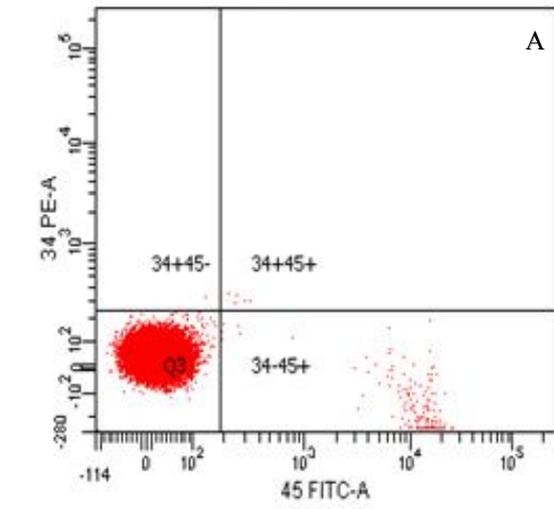
Установлено, что у пациентов с ХСН в периферической крови до проведения процедуры мобилизации G-CSF содержится незначительное количество ЭПК, за исключением циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом $CD34^-/CD31^+$ и $CD34^-/VEGFR_2^+$, $CD14^-/VEGFR_2^+$, а также ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$.

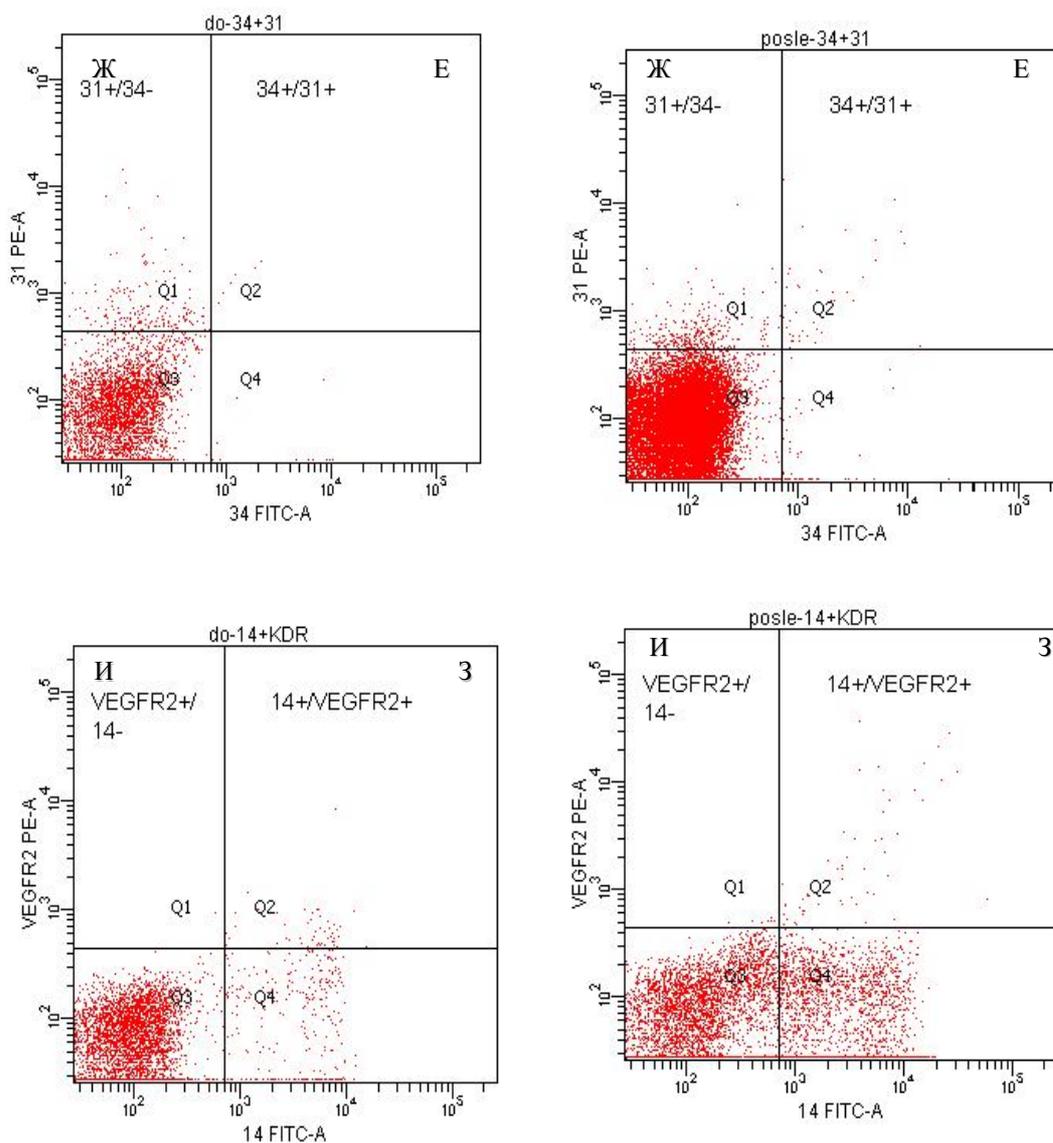
Так, в частности, относительное количество клеток с фенотипом $CD34^+/CD133^+$ (более «зрелая» популяция ЭПК) было статистически значимо ниже количества клеток с фенотипом $CD34^-/CD133^+$ («незрелая» популяция ЭПК) ($p < 0,01$). Также до проведения процедуры мобилизации G-CSF отмечено статистически значимое снижение относительного количества клеток с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ («зрелая» популяция ЭПК) по сравнению с $CD34^-/VEGFR_2^+$ клетками (циркулирующие зрелые эндотелиальные клетки) ($p < 0,01$).

Аналогично показано, что относительное количество ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ («зрелая» популяция ЭПК) в периферическом русле крови статистически значимо меньше ($p < 0,01$), чем ЭПК с фенотипом $CD34^-/CD31^+$ (циркулирующие «зрелые» эндотелиальные клетки).

По относительному количеству ЭПК моноцитарного происхождения до проведения процедуры мобилизации G-CSF статистически значимых различий выявлено не было.

Введение G-CSF пациентам с ХСН приводило к мобилизации из костного мозга в периферическую кровь всех анализируемых популяций ЭПК (таблица 5; рисунок 4).





Примечания:

- (1) – до мобилизации; (2) – после мобилизации;
- (А) – CD34⁺; (Б) – CD133⁺/CD34⁺; (В) – CD133⁺/CD34⁻; (Г) – CD34⁺/VEGFR₂⁺; (Д) – CD34⁻/VEGFR₂⁺; (Е) – CD34⁺/CD31⁺; (Ж) – CD34⁻/CD31⁺; (3) – CD14⁺/VEGFR₂⁺; (И) – CD14⁻/VEGFR₂⁺ популяции клеток

Рисунок 4 – Двухпараметрические гистограммы распределения ЭПК, полученные в результате цитофлуориметрического исследования МНК периферической крови при мобилизации G-CSF у пациентов с XCH

Выявлено статистически значимое возрастание количества так называемых «классических» популяций ЭПК с фенотипом CD34⁺, CD34⁺/CD133⁺ и CD34⁺/VEGFR₂⁺.

Относительное количество $CD34^-/CD133^+$ клеток, представляющих собой самую незрелую популяцию анализируемых ЭПК, статистически значимо увеличилось в 16 раз 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 $CD34^-/VEGFR_2^+$ в 10 раз по сравнению с количеством зрелых ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ ($p < 0,02$).

Также показано статистически значимое увеличение количества циркулирующих зрелых ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ и зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом $CD34^-/CD31^+$ после мобилизации G-CSF у пациентов.

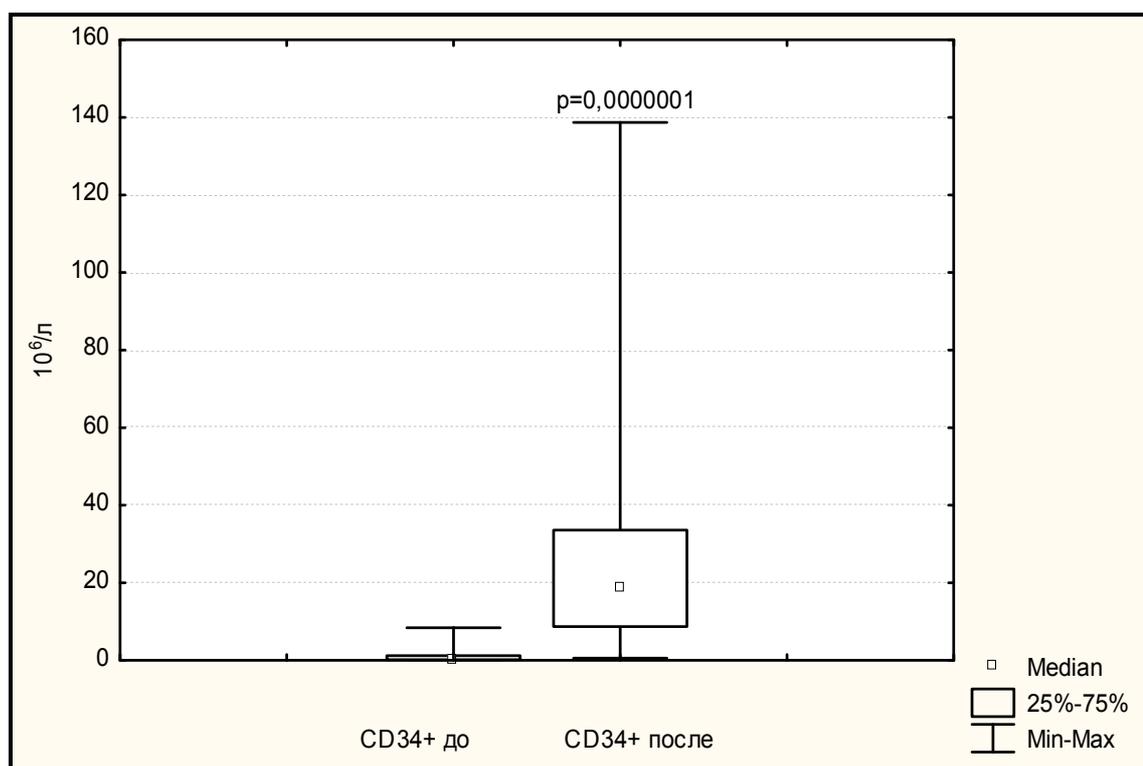
В процессе мобилизации статистически значимо возрастает и количество ЭПК моноцитарного происхождения, коэкспрессирующих к маркеру зрелых эндотелиальных клеток $VEGFR_2$ моноцитарный маркер CD14 – популяции клеток с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$.

В то же время увеличение количества клеток, экспрессирующих $CD14^-/VEGFR_2^+$, не является статистически значимым.

На следующем этапе проводилась оценка абсолютного содержания в периферической крови пациентов с ХСН популяций ЭПК до и после мобилизации G-CSF.

Анализ абсолютных значений популяций ЭПК у пациентов с ХСН до и после проведения процедуры мобилизации G-CSF показан на рисунках 5–9.

Выявлено статистически значимое увеличение количества «классической» популяции ЭПК, экспрессирующей $CD34^+$ маркер с $0,24 \times 10^6/\text{л}$ до $18,70 \times 10^6/\text{л}$ (рисунок 5).

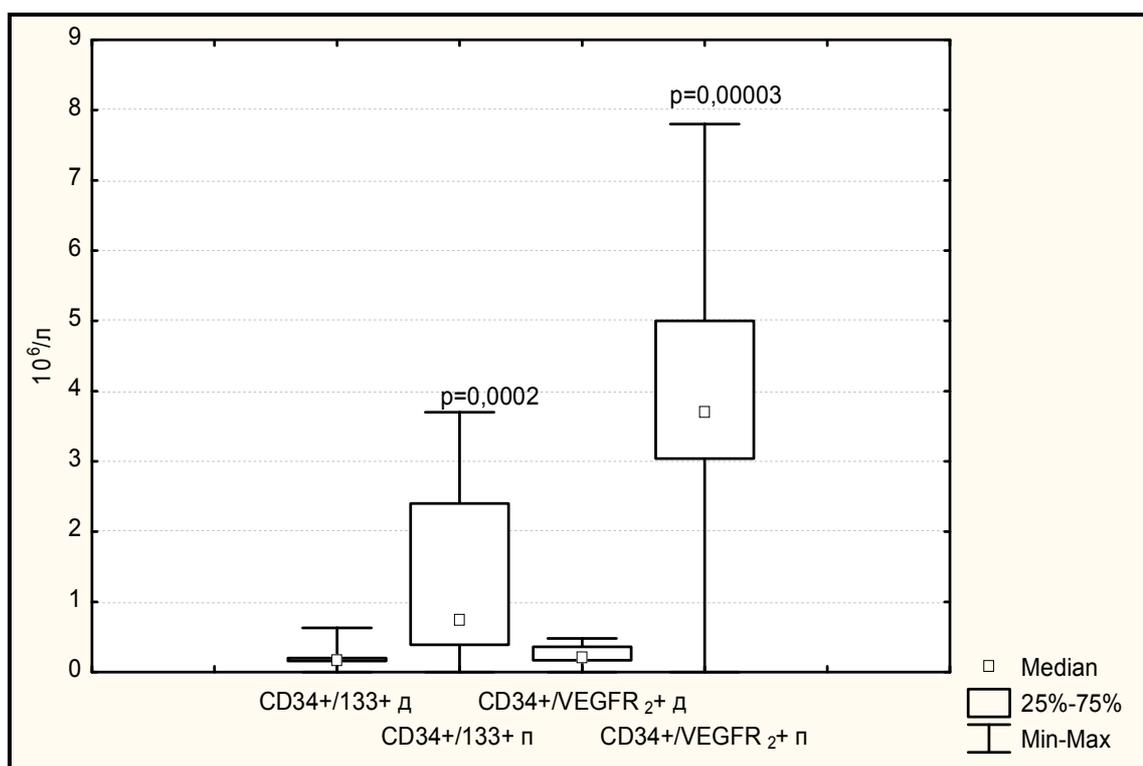


Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: (д) – до процедуры мобилизации G-CSF; (п) – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 5 – Динамика изменения абсолютного количества ЭПК с фенотипом CD34⁺ в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 30)

Происходит статистически значимое увеличение абсолютного количества в периферической крови ЭПК двух других «классических» популяций ЭПК с фенотипом CD34⁺/CD133⁺ (с $0,23 \times 10^6/\text{л}$ до $0,96 \times 10^6/\text{л}$) и CD34⁺/VEGFR₂⁺ (с $0,21 \times 10^6/\text{л}$ до $3,95 \times 10^6/\text{л}$) (рисунок 6).

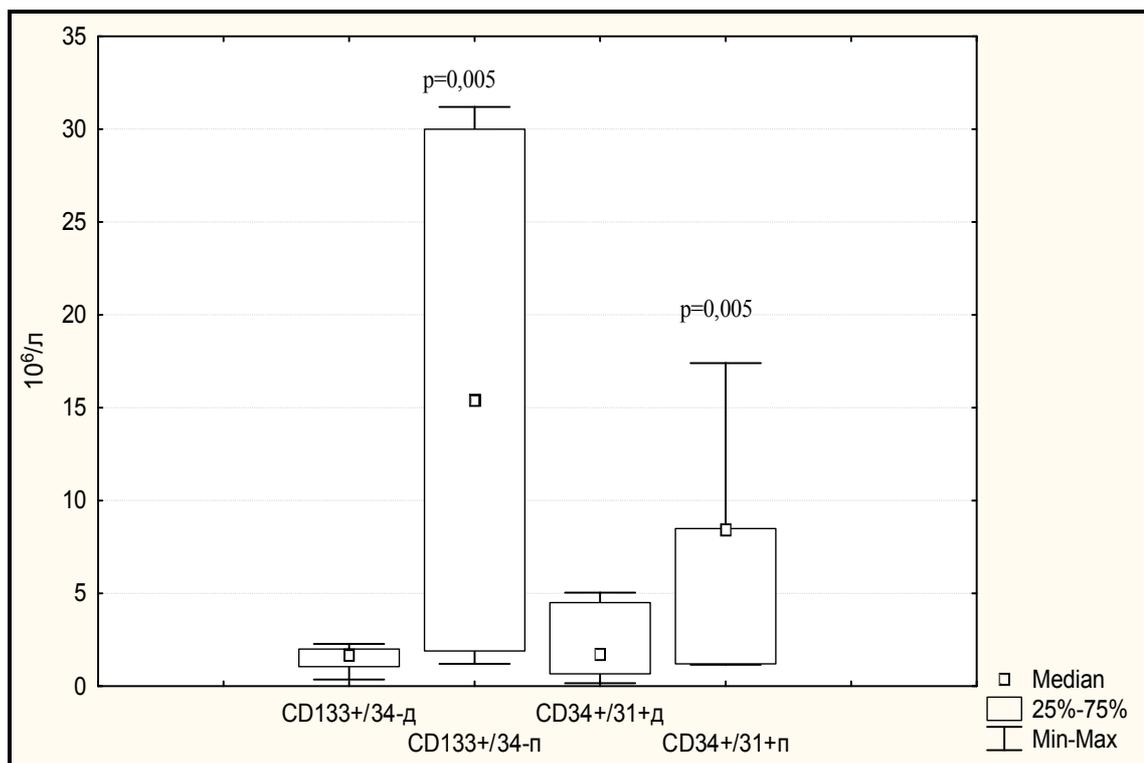


Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – популяции клеток, по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: (д) – до процедуры мобилизации G-CSF; (п) – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 6 – Динамика изменения абсолютного количества ЭПК с фенотипом $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ и $\text{CD34}^+/\text{VEGFR}_2^+$ в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 30)

Помимо этого, отмечено статистически значимое возрастание в периферической крови абсолютного количества ранней в дифференцировочном отношении популяции ЭПК с фенотипом $\text{CD34}^-/\text{CD133}^+$ (с $1,65 \times 10^6/\text{л}$ до $15,40 \times 10^6/\text{л}$) и клеток с фенотипом $\text{CD34}^+/\text{CD31}^+$ (с $1,70 \times 10^6/\text{л}$ до $8,40 \times 10^6/\text{л}$) (рисунок 7).



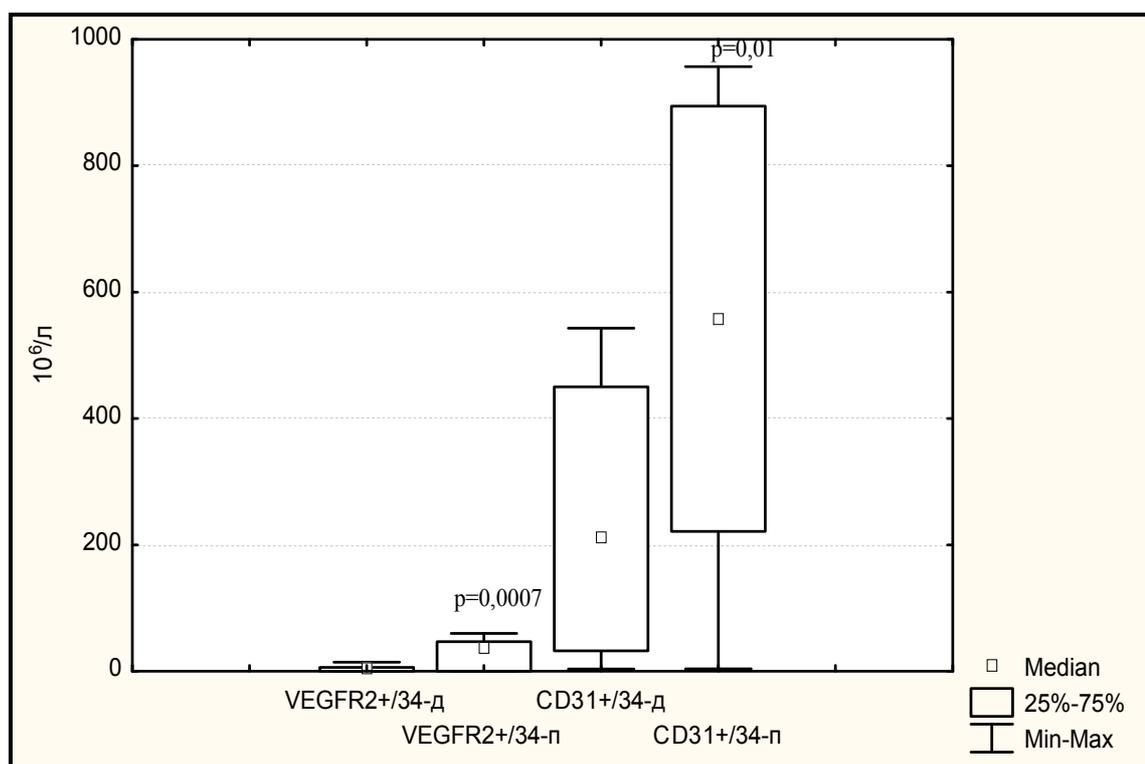
Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – популяции клеток, по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: (д) – до процедуры мобилизации G-CSF; (п) – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 7 – Динамика изменения абсолютного количества $\text{CD34}^-/\text{CD133}^+$ и $\text{CD34}^+/\text{CD31}^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 30)

В ходе мобилизации G-CSF происходит увеличение количества не только ЭПК, но и циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток.

Отмечено статистически значимое увеличение абсолютного количества клеток с фенотипом $\text{CD34}^-/\text{VEGFR}_2^+$ (с $5,25 \times 10^6/\text{л}$ до $43,43 \times 10^6/\text{л}$) и $\text{CD34}^-/\text{CD31}^+$ (с $221,42 \times 10^6/\text{л}$ до $543,52 \times 10^6/\text{л}$) (рисунок 8).



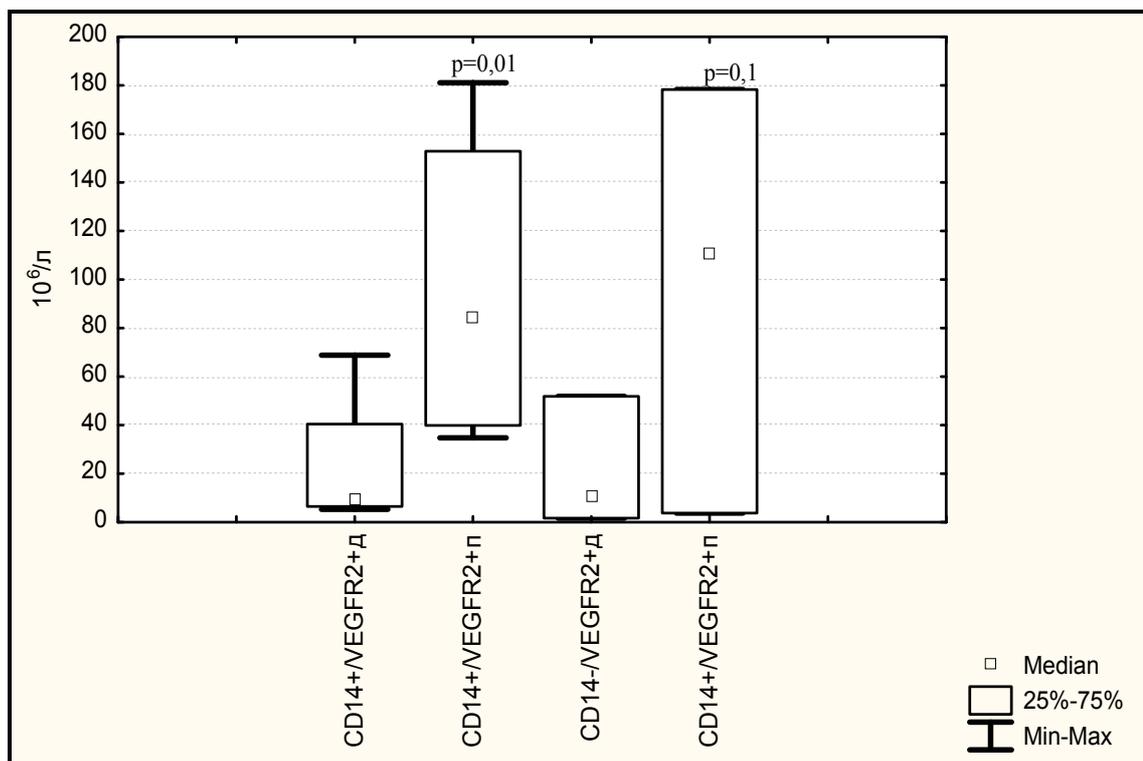
Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – популяции клеток, по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: (д) – до процедуры мобилизации G-CSF; (п) – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 8 – Динамика изменения абсолютного количества $\text{CD34}^-/\text{VEGFR}_2^+$ и $\text{CD34}^-/\text{CD31}^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с XCH (n = 30)

Также показано, что после введение G-CSF пациентам приводит к статистически значимому увеличению в периферической крови абсолютного количества ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $\text{CD14}^+/\text{VEGFR}_2^+$ (с $9,82 \times 10^6/\text{л}$ до $84,83 \times 10^6/\text{л}$) (рисунок 9).

В то же время увеличение количества клеток с фенотипом $\text{CD14}^-/\text{VEGFR}_2^+$ практически в 10 раз (с $10,52 \times 10^6/\text{л}$ до $110,23 \times 10^6/\text{л}$) не является статистически значимым.

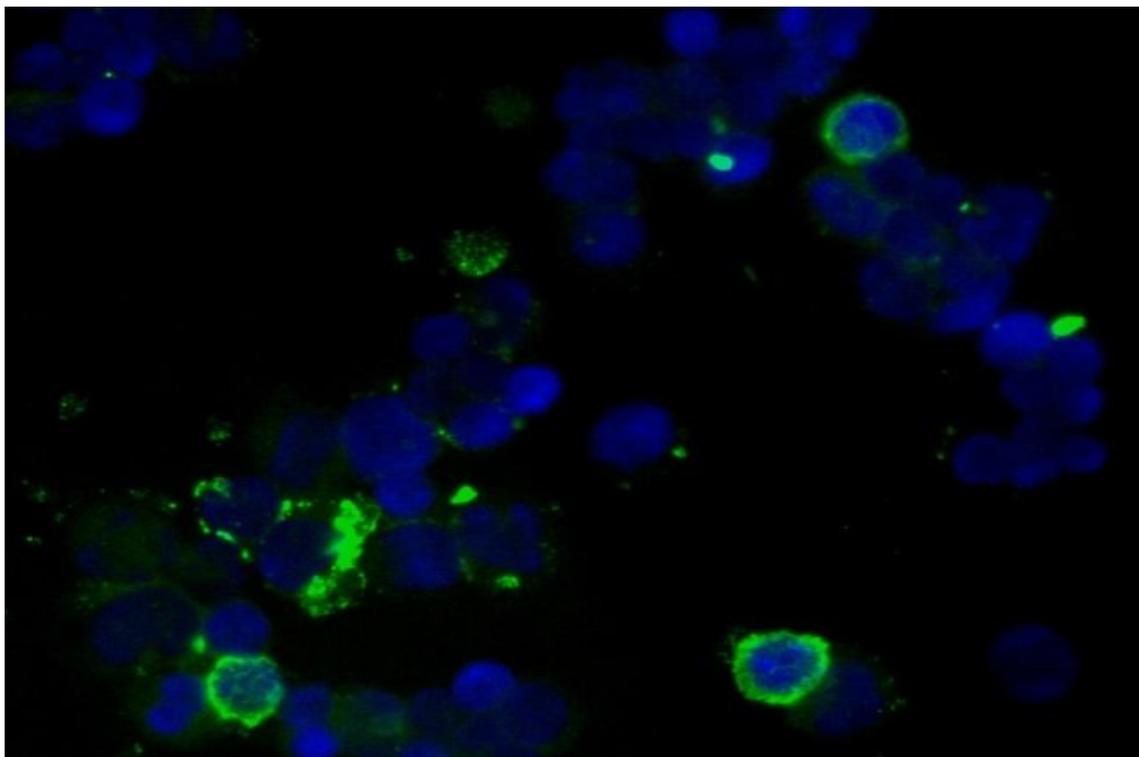


Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – популяции клеток, по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: (д) – до процедуры мобилизации G-CSF; (п) – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 9 – Динамика изменения абсолютного количества $\text{CD14}^+/\text{VEGFR}_2^+$ и $\text{CD14}^-/\text{VEGFR}_2^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 30)

На основании иммуноцитохимического исследования было показано, что CD34 маркер экспрессируется на поверхности клеточной мембраны МНК у пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF (рисунок 10).



Примечание: зеленое свечение – CD34–FITC (маркер ЭПК, меченный изотиоцианатом флуоресцеина); синее свечение – DAPI (краситель для проявления ядер клеток). Увеличение $\times 90$

Рисунок 10 – Иммуноцитохимическая идентификация CD34⁺ клеток мазка концентрата клеток после мобилизации G-CSF, обогащенного выделением на градиенте плотности фиколл/верографина, у пациентов с ХСН

Таким образом, результаты свидетельствуют, что в периферической крови пациентов с ХСН идентифицируются девять типов ЭПК. Введение G-CSF пациентам с ХСН приводит к эффективной мобилизации ЭПК в периферическую кровь, причем ЭПК представлены различными популяциями клеток костномозгового происхождения и моноцитарными ЭПК. Среди циркулирующих эндотелиальных клеток идентифицируются популяции разной степени дифференцировки – от недифференцированных ЭПК до зрелых эндотелиальных клеток.

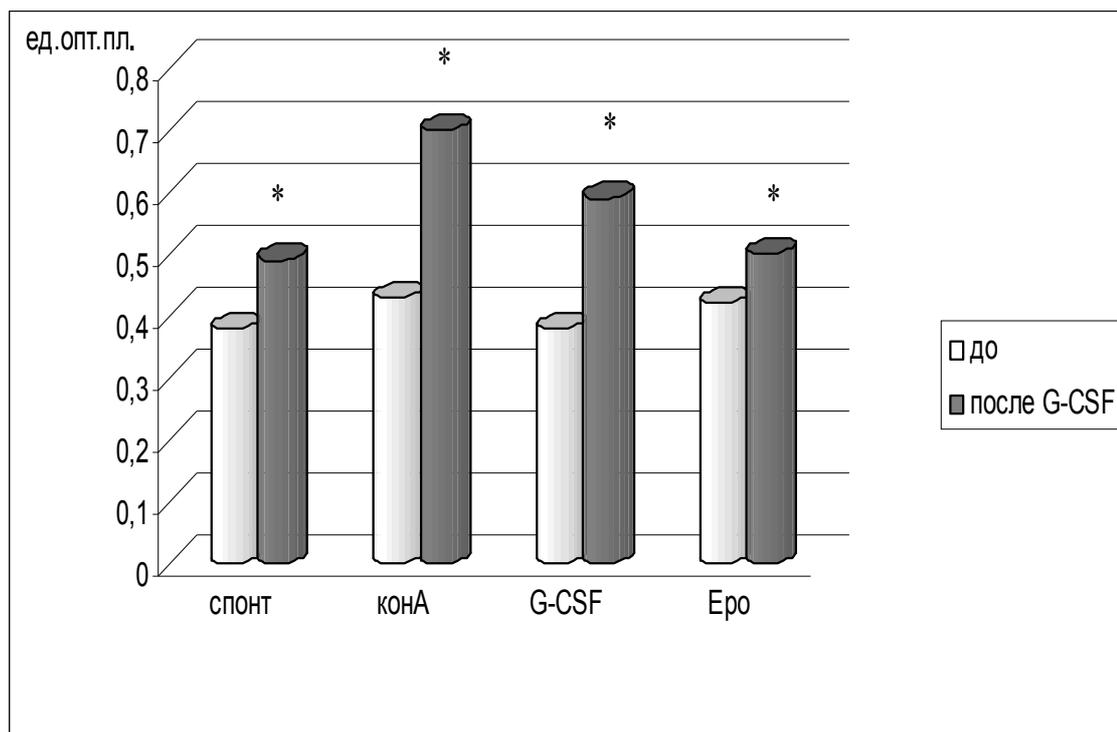
3.3 Исследование функциональной активности мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками

При длительном ишемическом анамнезе происходят изменения не только количественного состава СПК периферической крови, но и их функциональной активности [271]. Основными свойствами клеток, характеризующими их функциональную активность, являются способность к пролиферации, миграции и продукции биологически активных веществ [166; 244].

3.3.1 Изучение пролиферативной активности мононуклеарных клеток в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором

Изучение пролиферативной активности показало, что после процедуры мобилизации G-CSF, как в спонтанных условиях, так и при стимуляции Кон А и цитокинами G-CSF и Еро, происходит увеличение пролиферации МНК по сравнению с показателями до процедуры мобилизации G-CSF ($p < 0,05$) (рисунок 11). Уровень спонтанной пролиферации до мобилизации составил $(0,38 \pm 0,03)$ ед.опт.пл., а после – $(0,49 \pm 0,13)$ ед.опт.пл. При стимуляции Кон А уровень пролиферации составил $(0,43 \pm 0,02)$ ед.опт.пл. и $(0,70 \pm 0,16)$ ед.опт.пл. (до и после мобилизации, соответственно). Добавление при культивировании G-CSF приводило к увеличению уровня пролиферации с $(0,38 \pm 0,04)$ ед. опт. пл. до $(0,59 \pm 0,12)$ ед. опт. пл.; а Еро – с $(0,42 \pm 0,10)$ ед. опт. пл. до $(0,5 \pm 0,15)$ ед. опт. пл. Необходимо отметить, что до введения G-CSF пациентам с целью мобилизации МНК статистически значимо не отвечали увеличением пролиферации на анализируемые стимулы, за исключением Кон А.

Что же касается индекса стимуляции пролиферативной активности МНК, полученных после мобилизации, то при стимуляции митогеном Кон А был отмечен максимальный прирост пролиферирующих клеток (ИС Кон А = $(1,53 \pm 0,64)$ ус. ед.), для G-CSF ИС составил $(1,31 \pm 0,58)$ ус. ед. Стимуляции пролиферации в ответ на Еро не отмечено.



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде средних значений ($M \pm \sigma$);
3. обозначения: спонт – спонтанный уровень пролиферации; Кон А – пролиферация в ответ на Кон А; G-CSF – уровень пролиферации в ответ на добавление G-CSF; Еро – уровень пролиферации в ответ на добавление Еро; до – показатели до проведения процедуры мобилизации; после G-CSF – показатели после проведения процедуры мобилизации;
4. * – достоверность различий по сравнению с показателями до введения G-CSF, $p < 0,05$

Рисунок 11 – Показатели пролиферативной активности МНК концентрата клеток периферической крови пациентов с ХСН в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF (n = 35)

Необходимо отметить, что интенсивность пролиферативного ответа МНК, обогащенных ЭПК, зависела от количества в периферической крови клеток с фенотипом $CD34^+$. Так, в группе пациентов, имевших в периферическом русле крови ЭПК с фенотипом $CD34^+$ свыше 0,4 %, выявлен статистически значимо больший уровень пролиферации МНК как в спонтанных условиях, так и при стимуляции митогеном Кон А и цитокинами G-CSF и Еро, чем при содержании

CD34⁺ клеток менее 0,4 % (таблица 6).

Таблица 6 – Интенсивность пролиферативного ответа МНК концентрата клеток периферической крови пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с учетом относительного количества ЭПК с фенотипом CD34⁺ (n = 35)

Показатели	Спонт	Кон А	G-CSF	Еро
CD34 ⁺ > 0,4 %	0,58 ± 0,10*	0,73 ± 0,03*	0,64 ± 0,16*	0,62 ± 0,01*
CD34 ⁺ < 0,4 %	0,34 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,44 ± 0,13	0,40 ± 0,25

Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде средних значений (M±σ);
3. обозначения: спонт - спонтанный уровень пролиферации; кон А – пролиферация в ответ на Кон А; G-CSF – уровень пролиферации в ответ на добавление G-CSF, Еро – уровень пролиферации в ответ на добавление Еро; до – показатели до проведения процедуры мобилизации; после G-CSF – показатели после проведения процедуры мобилизации (ед. опт. пл.);
4. * – достоверность различий между группами, p < 0,05

Исследование фаз клеточного цикла в популяции CD34-позитивных МНК представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Показатели фаз клеточного цикла популяции клеток с фенотипом CD34⁺, полученных после завершения курса мобилизации G-CSF пациентов с ХСН (n = 26)

Показатели	Аро	G0/G1	S/G2/M
CD34 ⁺	2,6 ± 1,1	87,1 ± 5,0	10,5 ± 4,2
CD34 ⁺ > 0,4 %	3,1 ± 0,9*	85,5 ± 6,2*	11,4 ± 5,7*
CD34 ⁺ < 0,4 %	2,1 ± 1,0	88,7 ± 3,4	9,7 ± 2,5

Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде средних значений (M±σ)
3. обозначения: Аро – процент апоптотических CD34⁺ клеток (ДНК < 2n); G0/G1 (ДНК = 2n) и S/G2/M (ДНК > 2n-4n) – процент CD34⁺ клеток, распределенных по фазам клеточного цикла
4. * – достоверность различий между группами, p < 0,05

Нами показано, что к окончанию мобилизации 10,5 % CD34⁺ клеток активно пролиферируют и находятся S/G2/M фазах клеточного цикла.

Большинство CD34⁺ клеток находятся в состоянии покоя (87,1 % клеток определяются в G0/G1 фазах клеточного цикла). В состоянии апоптоза находится 2,6 % анализируемой популяции.

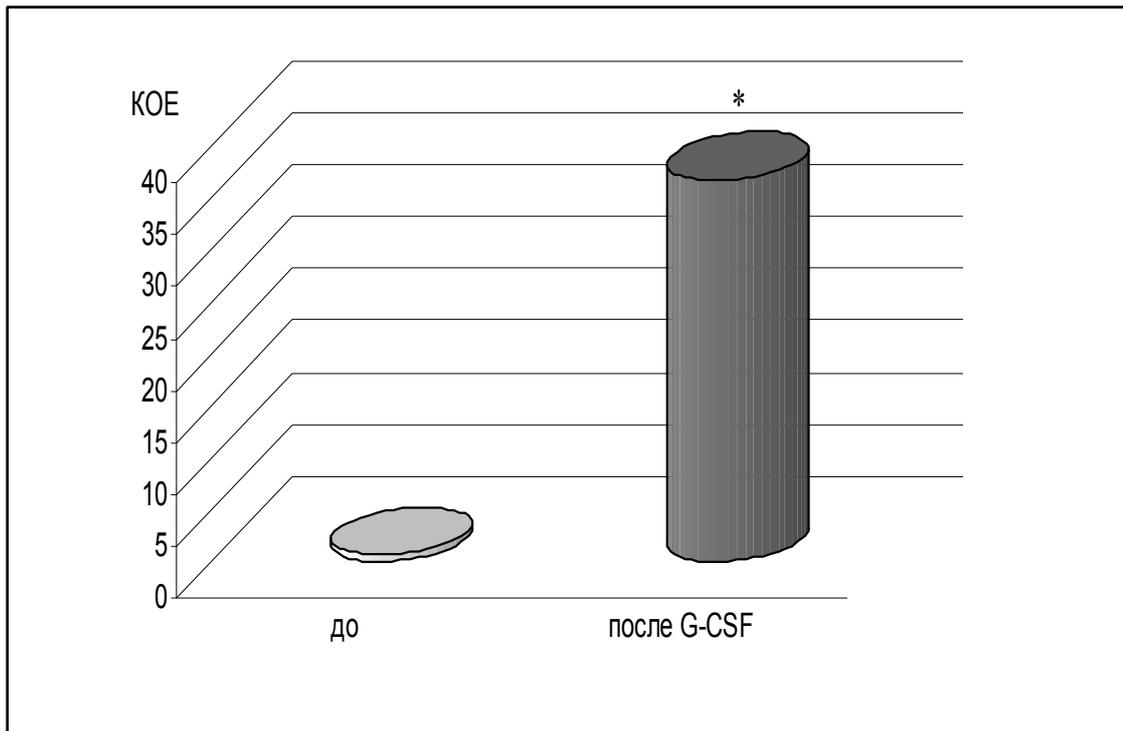
В то же время количество клеток, находящихся в S/G2/M фазах клеточного цикла, выше у тех пациентов, у которых содержание CD34⁺ клеток среди МНК, полученных после мобилизации G-CSF, было более 0,4 %. А количество клеток, находящихся в G0/G1 фазах выше у пациентов с меньшим содержанием CD34⁺ клеток.

Кроме того, пролиферативный потенциал характеризует и увеличение колониобразующей активности МНК при их обогащении ЭПК у пациентов с ХСН после процедуры мобилизации G-CSF (рисунок 12).

Показано, что количество КОЕ, представленных колониями более пятидесяти клеток, увеличивается в 30 раз после мобилизации G-CSF по сравнению с исходными данными до введения G-CSF пациентам с ХСН ($p < 0,01$).

На рисунке 13 представлена микроскопическая картина КОЕ культуры МНК через 14 суток культивирования.

Таким образом, введение G-CSF пациентам с ХСН способствует увеличению пролиферативного потенциала МНК как в спонтанных условиях культивирования, так и при стимуляции митогенами и цитокинами. С увеличением количества CD34⁺ ЭПК возрастает пролиферативная активность МНК, что является косвенным доказательством того, что интенсивность пролиферативного потенциала МНК в некоторой части обеспечена мобилизованными ЭПК.



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде средних значений ($M \pm \sigma$);
3. обозначения: по оси абсцисс – до – до процедуры мобилизации G-CSF; после G-CSF – после процедуры мобилизации G-CSF; по оси ординат – количество колониеобразующих единиц (КОЕ);
4. * – достоверность различий между группами, $p < 0,01$

Рисунок 12 – Количество колониеобразующих единиц МНК до и после завершения процесса мобилизации G-CSF пациентов с ХСН (n = 28)

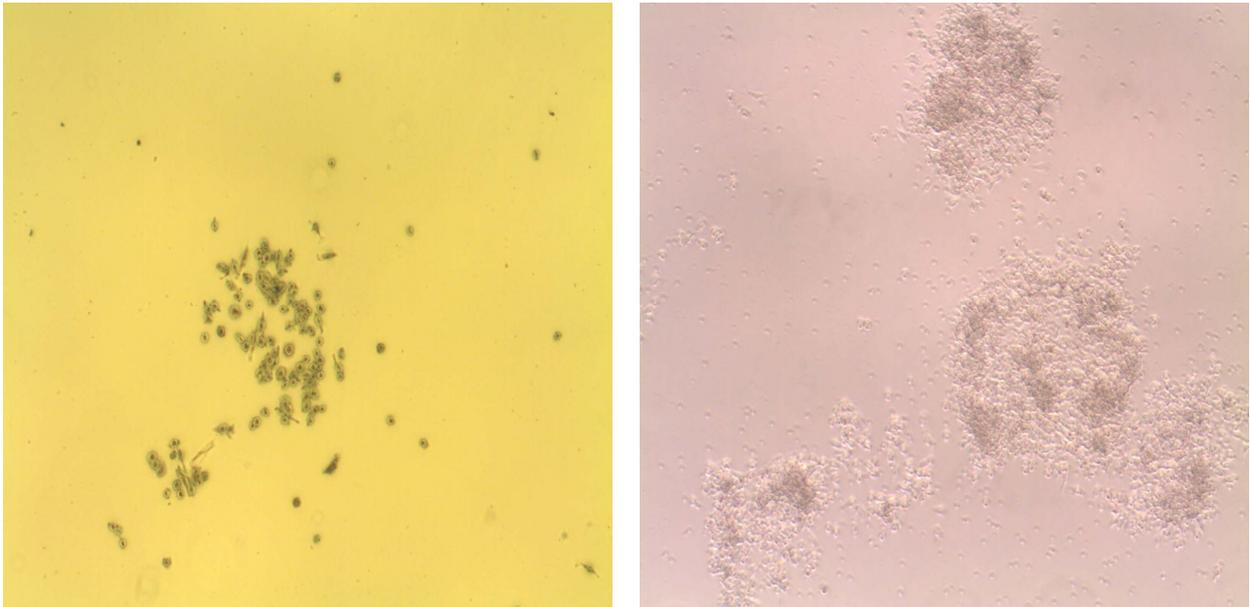


Рисунок 13 – КОЕ МНК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF через 14 суток культивирования (колонии содержат более 50 клеток). Увеличение инвертированного микроскопа 4×10

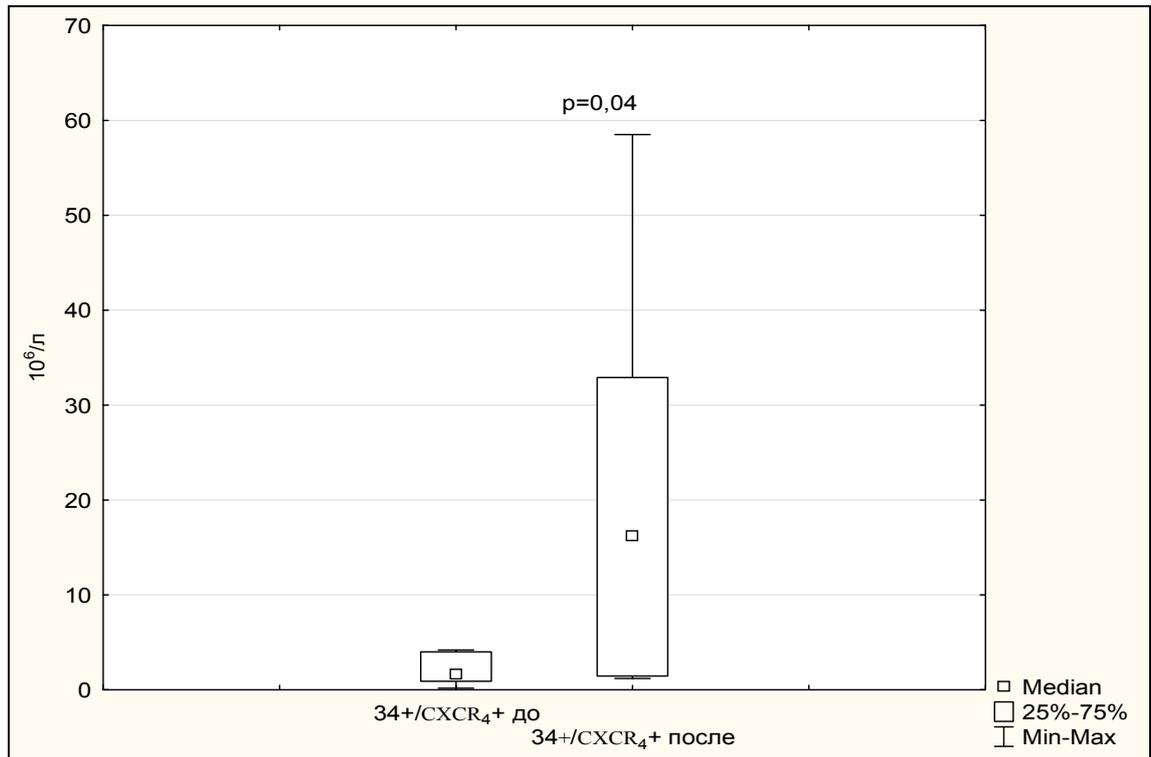
Помимо пролиферации, важным функциональным показателем СПК является способность к миграции.

3.3.2 Изучение экспрессии рецептора хоуминга CXCR₄ на эндотелиальных прогениторных клетках в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором

Миграция СПК в органы и ткани обусловлена ишемическим запросом поврежденной ткани, а основным фактором, способствующим хоумингу ЭПК, является SDF-1. При этом его связь с рецептором CXCR₄ регулирует мобилизацию ЭПК в периферическое русло крови и хоумингу в поврежденные ткани [248].

Было установлено, что абсолютное количество циркулирующих ЭПК с фенотипом CD34⁺, коэкспрессирующих маркер хоуминга CXCR₄, статистически значимо увеличилось после проведения курса мобилизации G-CSF и составило $16,2 \times 10^6/\text{л}$ ($1,4 \times 10^6 - 32,9 \times 10^6$) по сравнению с исходным абсолютным

количеством данных клеток $1,6 \times 10^6/\text{л}$ ($0,9 \times 10^6 - 4,0 \times 10^6$) (рисунок 14).



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – анализируемая популяция клеток; по оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{л}$; обозначения: до – до процедуры мобилизации G-CSF; после – после процедуры мобилизации G-CSF;
4. p – достоверность различия по сравнению с показателями до введения G-CSF

Рисунок 14 – Динамика изменения абсолютного количества $\text{CD34}^+/\text{CXCR4}^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 20)

Таким образом, введение G-CSF пациентам с ХСН увеличивает экспрессию маркера хоуминга CXCR4 на популяции CD34^+ ЭПК, что может определять миграционную активность ЭПК после мобилизации при их введении пациенту.

3.3.3 Цитокиновый профиль мононуклеарных клеток в ходе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором

Известно, что для стимуляции процессов регенерации, а особенно индукции ангиогенеза в ишемизированных и поврежденных тканях, необходимо влияние биологически активных веществ, в том числе цитокинов и ростовых факторов [262].

Активно мигрирующие и пролиферирующие СПК способны оказывать паракринные и аутокринные воздействия.

Поэтому следующим этапом работы стала оценка цитокинпродуцирующей способности МНК в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН.

Было выявлено, что МНК у пациентов с ХСН конститутивно продуцируют регуляторные цитокины и ростовые факторы (таблица 8). Причем, уровень секреции VEGF, IL-8 и TNF- α в спонтанных условиях был наиболее высоким.

Продукция МНК TNF- α , IL-10, IL-8 и Ер α стимулировалась как Т-клеточным митогеном Кон А, так и ЛПС, являющимся митогеном для клеток моноцитарного ряда. Продукция G-CSF и IL-18 МНК увеличилась только при стимуляции Кон А, а VEGF – при стимуляции ЛПС.

После окончания мобилизации МНК, обогащенные ЭПК, уменьшали продукцию двух цитокинов – TNF- α и G-CSF по сравнению с продукцией до процедуры мобилизации G-CSF, но статистически значимо уменьшался только уровень TNF- α . В то же время уровень секреции IL-18, Ер α и VEGF статистически значимо увеличился, а IL-8 и IL-10 остался сохранным после мобилизации G-CSF.

Функциональный же резерв мобилизованных МНК, содержащих ЭПК, в виде ответа на митогенные стимулы, оставался высоким, за исключением продукции VEGF и продукции IL-8 после мобилизации.

Таблица 8 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после завершения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 35)

Цитокины (Ме; LQ-HQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной Кон А	уровень секреции, стимулированной ЛПС	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной Кон А	уровень секреции, стимулированной ЛПС
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	420,4 (172–1376)	644,3 (405–900)	33,0 (23–85) p = 0,0003	278,3 (188–738) p = 0,59	240,3 (130–370) p = 0,14
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	570,6 (101–746)	534,7 (345–694)	72,1 (22–102) p = 0,72	484,6 (101–748) p = 0,47	680,3 (102–119) p = 0,75
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	58,1 (50–64)	39,2 (36–40)	103,2 (67–135) p = 0,034	197,3 (102–374) p = 0,017	147,2 (102–256) p = 0,0004
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	1550,3 (147–4450)	1425,0 (120–4000)	735,7 (103–822) p = 0,31	740,2 (420–4805) p = 0,09	735,1 (350–4065) p = 0,14
Еро, МЕ/мл	27,2 (17,8–101)	215,7 (161–277)	234,8 (171–240)	102,2 (36–306) p = 0,008	213,5 (130–289) p = 0,67	162,5 (129–223) p = 0,63
G-CSF, пг/мл	13,1 (10–101)	135,5 (127–165)	16,1 (15–18)	11,0 (10–30) p = 0,3	967,4 (769–1010) p = 0,0007	940,3 (763–3332) p = 0,0007
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	293,5 (256–300)	448,4 (432–458)	298,1 (113–340) p = 0,03	300,2 (287–339) p = 0,56	386,7 (211–470) p = 0,09
Примечание – p – достоверность различий по сравнению с показателями продукции цитокинов до введения G-CSF.						

Таким образом, обогащение периферической крови эндотелиальными прогениторными клетками у пациентов с ХСН приводит к увеличению секреции мононуклеарными клетками цитокинов с проангиогенной активностью – IL-18, Еро и VEGF и возрастанию функционального резерва продукции МНК G-CSF. Мобилизация ЭПК G-CSF ведет к снижению секреции МНК провоспалительного цитокина TNF- α .

Аутокринные и межклеточные паракринные взаимодействия во многом определяют функциональное состояние клеток. Поэтому следующим логичным этапом исследования явилось изучение влияния внешних цитокиновых стимулов на секреторную активность МНК пациентов с ХСН до введения и по окончании введения G-CSF.

3.3.4 Влияние цитокиновых стимулов на уровень биологически активных веществ мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками

В качестве стимулятора культуры МНК до введения G-CSF пациентам и культуры МНК, обогащенной ЭПК, использовали G-CSF и Еро. В экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что данные цитокины обладают проангиогенными свойствами [137; 170; 334; 371].

В таблице 9 показано, что добавление в культуру МНК *in vitro*, полученную до процедуры мобилизации у пациентов, ростового фактора G-CSF приводит к статистически значимому увеличению продукции IL-10, IL-18, IL-8 и Еро и снижению уровня VEGF.

После мобилизации добавление G-CSF в культуру МНК статистически значимо стимулирует секрецию трех цитокинов – TNF- α , IL-10 и IL-18.

Уровень секреции VEGF остается неизменным.

Добавление Еро в культуру МНК *in vitro*, полученную до мобилизации G-CSF, также, как культивирование МНК с G-CSF, приводит к повышению секреции МНК трех цитокинов – IL-10, IL-18 и IL-8. Уровень секреции G-CSF и

VEGF остается неизменным (таблица 10).

Надо отметить, что добавление Еро к культивируемым МНК, обогащенным ЭПК путем мобилизации, приводит к увеличению продукции всех анализируемых цитокинов.

Необходимо подчеркнуть, что только Еро увеличивает секрецию VEGF в культуре, стимулированную введением G-CSF пациентам.

Также показано, что и G-CSF, и Еро стимулируют сниженную продукцию TNF- α после мобилизации. Из данных литературы известно, что TNF- α , являясь провоспалительным цитокином, обладает и ангиогенными свойствами [96].

Индекс стимуляции секреторной активности МНК, полученных до мобилизации, был наиболее высоким для IL-10, IL-18, IL-8 при стимулировании как G-CSF, так и Еро. После мобилизации оба стимула G-CSF и Еро обладали максимальной стимулирующей активностью в отношении TNF- α и IL-10, а Еро – и G-CSF.

Таким образом, добавление G-CSF в культуру МНК пациентов после мобилизации статистически значимо стимулирует продукцию трех цитокинов – TNF- α , IL-10 и IL-18, а культивирование МНК с Еро увеличивает продукцию еще IL-8, G-CSF и VEGF.

Полученные данные свидетельствуют о паракринных взаимодействиях, и о возможном аутокринном влиянии указанных цитокинов, продуцируемых обогащенными эндотелиальными прогениторными клетками МНК.

Данный тезис подтверждают результаты корреляционного анализа уровня конститутивной спонтанной секреции анализируемых цитокинов и уровня тех цитокинов, стимуляция которых G-CSF и Еро была статистически достоверна.

При анализе результатов учитывали критическое значение коэффициента корреляции, которое при выборке объемом 35 объектов исследования составляет 0,364.

Таблица 9 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после мобилизации G-CSF, стимулированных G-CSF, у пациентов с ХСН (n = 35)

Цитокины (Me; LQ-HQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной G-CSF	ИС	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной G-CSF	ИС
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	80,5 (55–110) p = 0,09	0,8	33,0 (23–85)	425,5 (208–888) p = 0,0004	12,8
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	525,2 (338–650) p = 0,01	7,7	72,1 (22–102)	1294,3 (990–1520) p = 0,004	17,9
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	181,2 (167–198) p = 0,009	5,4	103,2 (67–135)	235,4 (113–274) p = 0,02	2,2
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	3115,4 (2980–3345) p = 0,008	4,2	735,7 (103–822)	1729,7 (357–3586) p = 0,18	2,3
Еро, МЕ/мл	27,2 (18–101)	90,3 (80–101) p = 0,009	3,0	102,2 (35–306)	176,5 (132–201) p = 0,9	1,7
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	172,9 (156–180) p = 0,009	0,7	298,1 (113–340)	298,3 (240,5–389) p = 1,0	1,0
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде медианных (Me) и квартильных значений (LQ – UQ); 3. p – достоверность различий по сравнению с показателями спонтанной продукции цитокинов и ростовых факторов						

Таблица 10 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после мобилизации G-CSF, стимулированных EPO, у пациентов с ХСН (n = 35)

Цитокины (Me; LQ-UQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной EPO	ИС	уровень спонтанной секреции	уровень секреции, стимулированной EPO	ИС
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	100,2 (99–101) p = 0,09	1,0	33,0 (23–85)	990,3 (792–1298) p = 0,0004	30,1
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	294,5 (189–300) p = 0,006	4,3	72,1 (22–102)	895,4 (790–1190) p = 0,001	12,4
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	399,4 (212–415) p = 0,04	12,1	103,2 (67–135)	190,5 (104–228) p = 0,039	1,8
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	3840,7 (2890–4160) p = 0,009	5,2	735,7 (103–822)	1578,8 (348–3100) p = 0,008	2,1
G-CSF, пг/мл	13,1 (10–101)	8,5 (7–10) p = 0,06	0,6	11,0 (10–30)	865,5 (586–3660) P = 0,0004	78,6
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	253,4 (219–270) p = 0,06	1,0	298,1 (113–340)	327,0 (278–492) p = 0,03	1,1
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде медианных (Me) и квартильных значений (LQ – UQ); 3. p – достоверность различий по сравнению с показателями спонтанной продукции цитокинов и ростовых факторов						

Таблица 11 демонстрирует прямую и сильную корреляционную связь между уровнем спонтанной продукции IL-10 и уровнем G-CSF-стимулированной продукции IL-18.

Таблица 11 – Корреляционные связи между спонтанной продукцией цитокинов и цитокинов, стимулированных *in vitro* G-CSF, у пациентов с ХСН (n=35)

Стимуля- ция G-CSF	Спонтанная продукция						
	TNF- α	IL-10	IL-18	IL-8	Еро	G-CSF	VEGF
TNF- α	R = 0,01 p = 0,96	R = 0,49 p = 0,18	R = - 0,19 p = 0,6	R = 0,50 p = 0,17	R = 0,43 p = 0,2	R = 0,35 p = 0,3	R = 0,18 p = 0,6
IL-10	R = - 0,63 p = 0,06	R = - 0,25 p = 0,5	R = - 0,08 p = 0,8	R = 0,18 p = 0,6	R = - 0,18 p = 0,6	R = - 0,18 p = 0,6	R = 0,81 p = 0,6
IL-18	R = 0,13 p = 0,7	R = 0,75 p = 0,02	R = 0,33 p = 0,3	R = 0,13 p = 0,7	R = - 0,46 p = 0,2	R = 0,10 p = 0,7	R = 0,05 p = 0,89
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. R – коэффициент корреляции Спирмена, p – достоверность корреляции							

Имеется положительная корреляционная средней степени связь между спонтанной продукцией IL-18 и Еро-стимулированной продукцией IL-10, и обратная зависимость спонтанного уровня IL-8 и стимулированного уровня продукции IL-18 (таблица 12).

Из анализа корреляционных связей при стимуляции G-CSF и Еро были исключены соответствующие цитокины по причине добавления их в культуральную среду.

При сравнительном исследовании влияния G-CSF и Еро на уровень продукции цитокинов имеется только положительная корреляционная связь между уровнем G-CSF-стимулированной и Еро-стимулированной продукцией TNF- α (R = 0,66; p = 0,04).

Таблица 12 – Корреляционные связи между спонтанной продукцией цитокинов и стимулированной *in vitro* Еро у пациентов с ХСН (n = 35)

Стиму- ляция Еро	Спонтанная продукция						
	TNF- α	IL-10	IL-18	IL-8	Еро	G-CSF	VEGF
TNF- α	R = 0,26 p = 0,48	R = 0,05 p = 0,89	R = - 0,36 p = 0,3	R = 0,16 p = 0,6	R = 0,43 p = 0,2	R = 0,57 p = 0,1	R = - 0,28 p = 0,46
IL-10	R = 0,08 p = 0,8	R = 0,08 p = 0,9	R = 0,65 p = 0,045	R = - 0,23 p = 0,54	R = 0,58 p = 0,09	R = 0,4 p = 0,2	R = - 0,55 p = 0,12
IL-18	R = - 0,25 p = 0,5	R = - 0,19 p = 0,6	R = - 0,08 p = 0,9	R = - 0,76 p = 0,01	R = 0,26 p = 0,48	R = - 0,54 p = 0,13	R = 0,36 p = 0,33
IL-8	R = - 0,16 p = 0,6	R = 0,32 p = 0,3	R = 0,17 p = 0,6	R = 0,68 p = 0,05	R = - 0,30 p = 0,4	R = - 0,05 p = 0,8	R = 0,43 p = 0,24
G-CSF	R = - 0,08 p = 0,8	R = 0,12 p = 0,7	R = - 0,18 p = 0,6	R = 0,51 p = 0,15	R = - 0,09 p = 0,8	R = 0,12 p = 0,7	R = 0,10 p = 0,7
VEGF	R = - 0,49 p = 0,17	R = 0,10 p = 0,7	R = 0,11 p = 0,7	R = 0,47 p = 0,1	R = - 0,16 p = 0,6	R = - 0,09 p = 0,8	R = 0,30 p = 0,4
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции							

Полученные результаты свидетельствуют, что ростовые факторы и цитокины, секретируемые обогащенными ЭПК мононуклеарными клетками периферической крови, обладая паракринным потенциалом, способны осуществлять и аутокринное действие, контролируя секрецию клетками биологически активных веществ. Причем цитокины, секретируемые МНК, взаимовлияют на продукцию их клетками, и это влияние носит разнонаправленный характер.

Таким образом, установлено, что МНК, обогащенные ЭПК, у пациентов с ХСН 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.

Из данных литературы известно, что функциональная активность ЭПК зависит от их фенотипа, поэтому закономерным стало изучение взаимовлияния уровня продукции цитокинов и количества различных популяций ЭПК пациентов с ХСН в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF [88].

3.4. Изучение взаимосвязей количества циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток, мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, с продукцией цитокинов и ростовых факторов

Данное исследование прежде всего направлено на выяснение доли участия различных популяций ЭПК в продукцию цитокинов при мобилизации G-CSF. При анализе результатов учитывали критическое значение коэффициента корреляции, которое при выборке объемом 35 объектов исследования составляет 0,364.

Результаты корреляционного исследования взаимосвязи абсолютного количества различных популяций циркулирующих ЭПК и конститутивного уровня цитокинов в кондиционных средах при культивировании МНК после мобилизации G-CSF представлены в таблице 13 (приводятся данные тех популяций ЭПК, которые показали наличие корреляционных связей с анализируемыми цитокинами).

Была установлена положительная сильная корреляционная связь между количеством ЭПК с фенотипом $CD34^-/CD133^+$ и продукцией TNF- α ($R = 0,73$; $p = 0,02$). Между продукцией IL-18 и количеством в крови ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^-$ и ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ также имеется прямая и сильная зависимость ($R = 0,70$; $p = 0,03$ и $R = 0,82$; $p = 0,01$; соответственно).

Продукция Epo имела положительную корреляционную связь с количеством ЭПК с фенотипом $CD34^-/VEGFR_2^+$. Кроме этого, установлено наличие взаимосвязи количества ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ с продукцией VEGF, которая носила прямой и сильный характер. Также имеется положительная корреляционная связь количества ЭПК с фенотипом $CD34^-/CD31^+$ и продукции

IL-10 ($R = 0,90$; $p = 0,03$). Сопоставление уровня секреции G-CSF и IL-8 и количества популяций ЭПК не выявило статистически значимых корреляционных связей.

Таблица 13 – Корреляционные связи между количеством ЭПК в периферической крови и уровнем продукции цитокинов и ростовых факторов после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН ($n = 35$)

Количество ЭПК в периферической крови после мобилизации G-CSF ($10^6/л$)	Уровень продукции (пг/мл)				
	TNF- α	IL-10	IL-18	Еро (МЕ/мл)	VEGF
CD34 ⁻ /CD133 ⁺	$R = 0,73$ $p = 0,02$	$R = 0,16$ $p = 0,67$	$R = -0,17$ $p = 0,65$	$R = 0,24$ $p = 0,51$	$R = 0,24$ $p = 0,51$
CD34 ⁺ /VEGFR ₂ ⁻	$R = 0,25$ $p = 0,51$	$R = 0,22$ $p = 0,55$	$R = 0,70$ $p = 0,03$	$R = 0,30$ $p = 0,4$	$R = 0,05$ $p = 0,89$
CD34 ⁺ /VEGFR ₂ ⁺	$R = 0,41$ $p = 0,3$	$R = 0,32$ $p = 0,44$	$R = 0,82$ $p = 0,01$	$R = -0,40$ $p = 0,3$	$R = -0,30$ $p = 0,42$
CD34 ⁻ /VEGFR ₂ ⁺	$R = 0,42$ $p = 0,7$	$R = -0,42$ $p = 0,29$	$R = 0,10$ $p = 0,19$	$R = 0,86$ $p = 0,005$	$R = -0,21$ $p = 0,58$
CD34 ⁺ /CD31 ⁺	$R = -0,32$ $p = 0,62$	$R = 0,87$ $p = 0,1$	$R = 0,53$ $p = 0,39$	$R = -0,72$ $p = 0,18$	$R = 0,90$ $p = 0,03$
CD34 ⁻ /CD31 ⁺	$R = -0,10$ $p = 0,87$	$R = 0,95$ $p = 0,03$	$R = 0,64$ $p = 0,28$	$R = 0,63$ $p = 0,28$	$R = 0,70$ $p = 0,28$
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. R - коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции					

Таким образом, выявленные корреляционные связи позволяют предположить, что циркулирующие клетки с фенотипом «незрелых» ЭПК (CD34⁻/CD133⁺), более зрелые ЭПК (CD34⁺/VEGFR₂⁻, CD34⁺/VEGFR₂⁺, CD34⁺/CD31⁺) и циркулирующие эндотелиальные клетки (CD34⁻/VEGFR₂⁺, CD34⁻/CD31⁺) принимают активное участие в продукции цитокинов, обладающих

выраженной проангиогенной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 3

Проведенный анализ результатов исследования морфофункциональных свойств циркулирующих ЭПК у пациентов с хронической сердечной недостаточностью дает основание утверждать, что введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора пациентам с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности приводит к экспансии гранулоцитов, тем самым способствуя мобилизации из костного мозга в периферическое русло крови различных популяций разной степени дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток.

В периферической крови у пациентов с ХСН идентифицируется девять популяций ЭПК с фенотипом $CD34^+$, $CD34^+/CD133^+$, $CD34^+/VEGFR_2^+$, $CD133^+/CD34^-$, $CD34^+/CD31^+$, $VEGFR_2^+/CD34^-$, $CD31^+/CD34^-$, $CD14^+/VEGFR_2^+$, $VEGFR_2^+/CD14^-$.

Мононуклеарные клетки периферической крови, обогащенные ЭПК, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью обладают высокой функциональной активностью – пролиферативным и миграционным потенциалом, продуцируют широкий спектр цитокинов. Обогащение периферической крови ЭПК у пациентов с хронической сердечной недостаточностью приводит к увеличению секреции МНК цитокинов с проангиогенной активностью – IL-18, Еро и VEGF, и снижению провоспалительного цитокина TNF- α . Мобилизация ведет к возрастанию функционального резерва продукции проангиогенных цитокинов. Уровень секреции TNF- α , IL-10, IL-18, Еро и G-CSF увеличивается на митогенные стимулы КонА и ЛПС, и цитокиновые стимулы G-CSF и Еро.

Количество циркулирующих клеток с фенотипом $CD34^-/CD133^+$, $CD34^+/VEGFR_2^-$, $CD34^+/VEGFR_2^+$, $CD34^+/CD31^+$, $CD34^-/VEGFR_2^+$, $CD34^-/CD31^+$ находится в прямой корреляционной связи с концентрацией цитокинов в кондиционной среде при культивировании МНК после мобилизации G-CSF –

TNF- α , IL-10, IL-18, Ero и VEGF, что предполагает вовлеченность данных популяций клеток в продукцию биологически активных веществ.

ГЛАВА 4 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПОСЛЕ МОБИЛИЗАЦИИ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ

4.1 Оценка пролиферативных и морфологических свойств эндотелиальных прогениторных клеток, выращенных *in vitro*

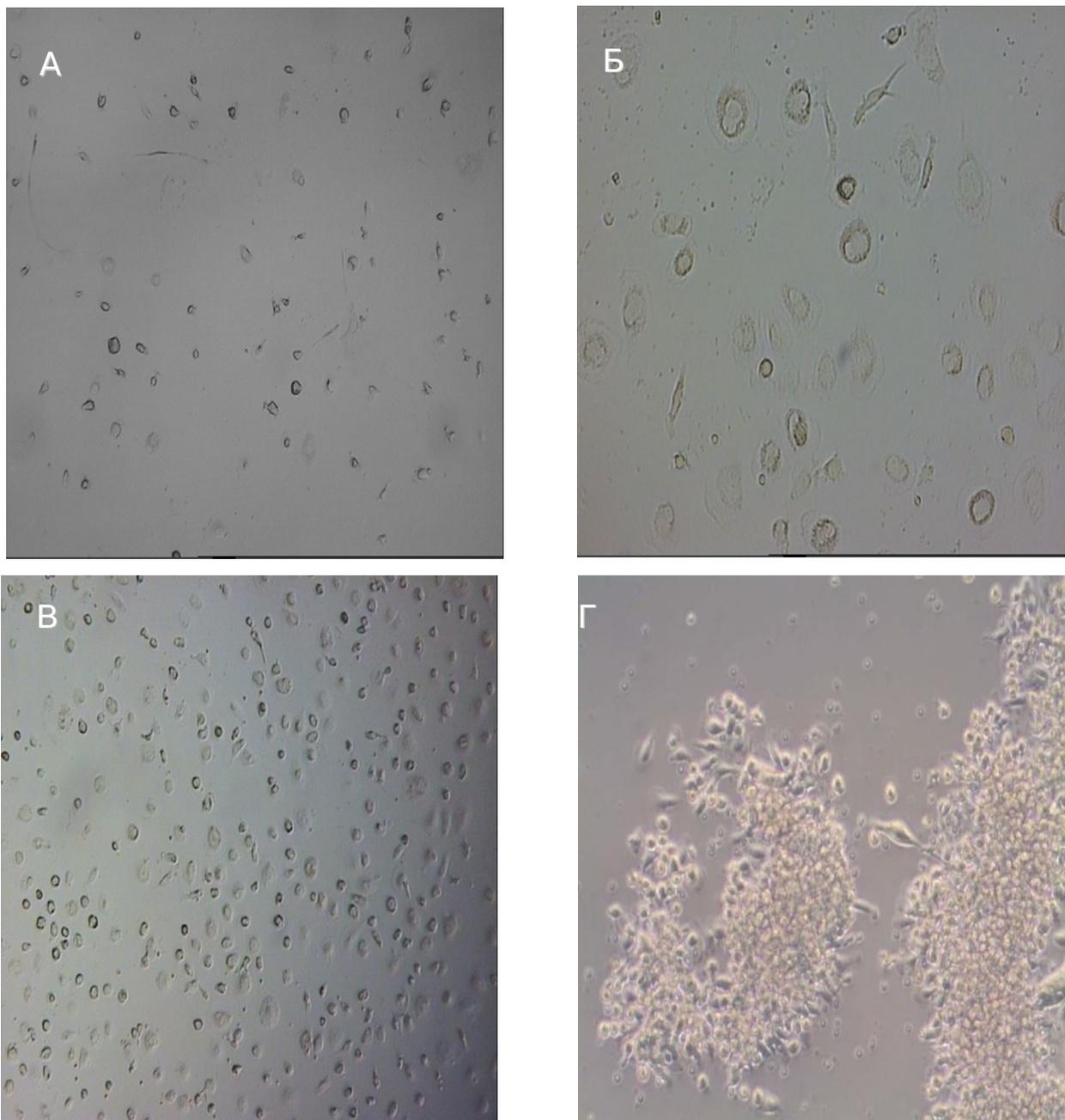
Циркулирующие ЭПК при миграции их в ткани становятся тканевыми ЭПК, способствуют развитию сосудов, влияя на различные этапы ангиогенеза [263].

В ряде работ показано, что культивирование МНК периферической крови в специальных условиях способствует появлению в клеточной культуре различных типов ЭПК [90; 130; 305], дифференцировка в которые определяется микроокружением [264]. В то же время способность СПК дифференцироваться в ЭПК зависит от возраста человека и наличия хронических заболеваний [128; 200].

Поэтому представлялось важным изучить способность МНК периферической крови, с учетом предшествующего длительного гипоксического стресса клетками организма в ходе заболевания у пациентов с ХСН, образовывать ЭПК *in vitro*.

Нами показано, что МНК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF способны, с учетом предобработки культуральных флаконов адгезионными белками внеклеточного матрикса фибронектином и желатином, дифференцироваться в те или иные типы ЭПК.

Установлено, что до 10 дня культивирования МНК как на фибронектине, так и на желатине, адгезировали к поверхности флакона (рисунок 15 А, Б), и к 12-му дню формировали монослой, преимущественно состоящий из мелких округлых и слабо пролиферирующих клеток (рисунок 15 В). Кроме этого к 14-м суткам было отмечено появление кластеров ЭПК (рисунок 15 Г).

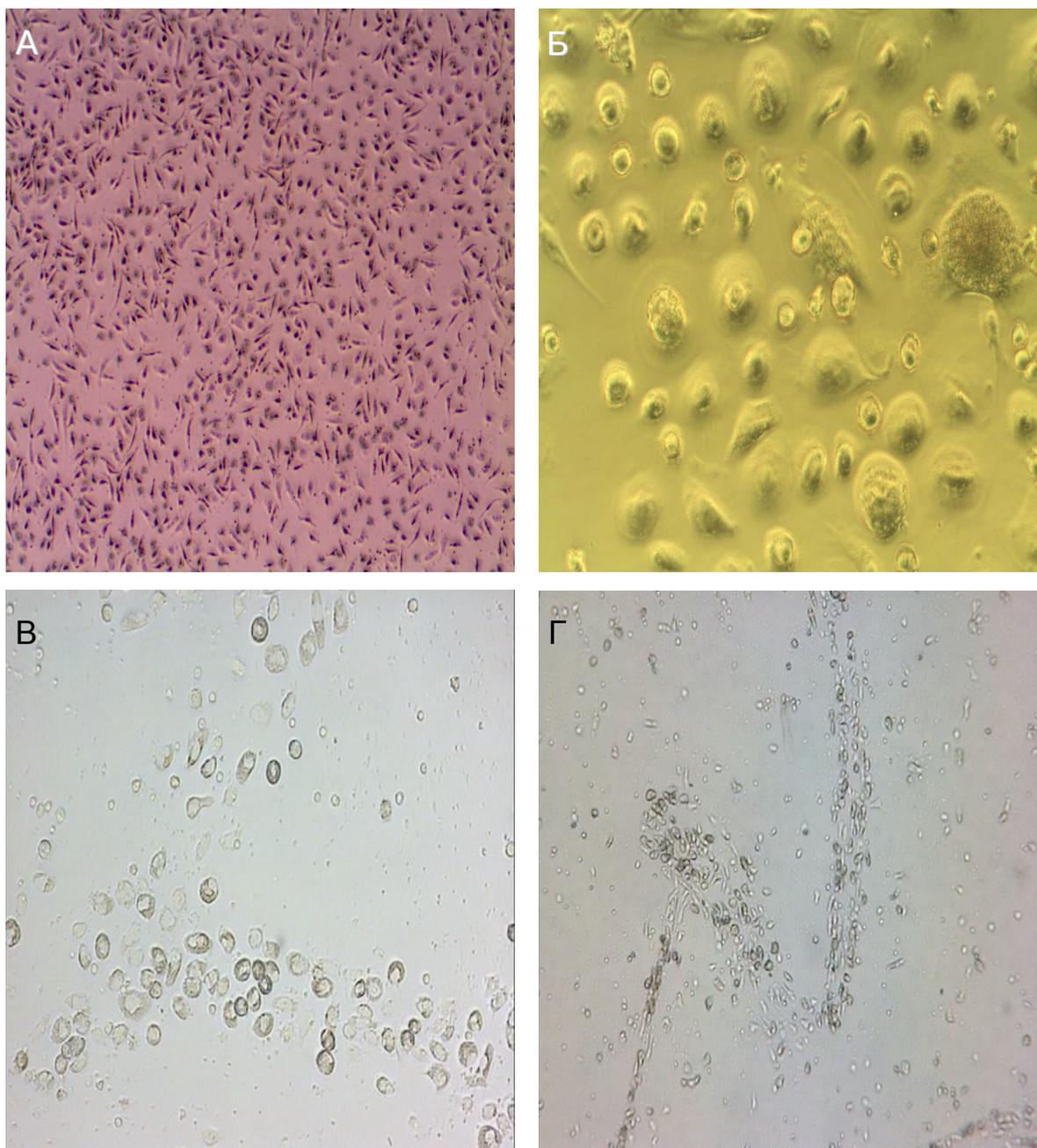


Примечания:

1. представлены фотографии культур ЭПК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с инвертированного микроскопа;

2. А, Б – адгезия округлых клеток на 5-е сутки культивирования (увеличение 4×10 ; 10×10); В – монослой клеток на 12-е сутки культивирования (увеличение 4×10); Г – кластеры ЭПК (увеличение 10×10)

Рисунок 15 – Морфология адгезировавшей фракции культуры МНК, полученных у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (n = 6)



Примечания:

1. представлены фотографии культур ЭПК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с инвертированного микроскопа;

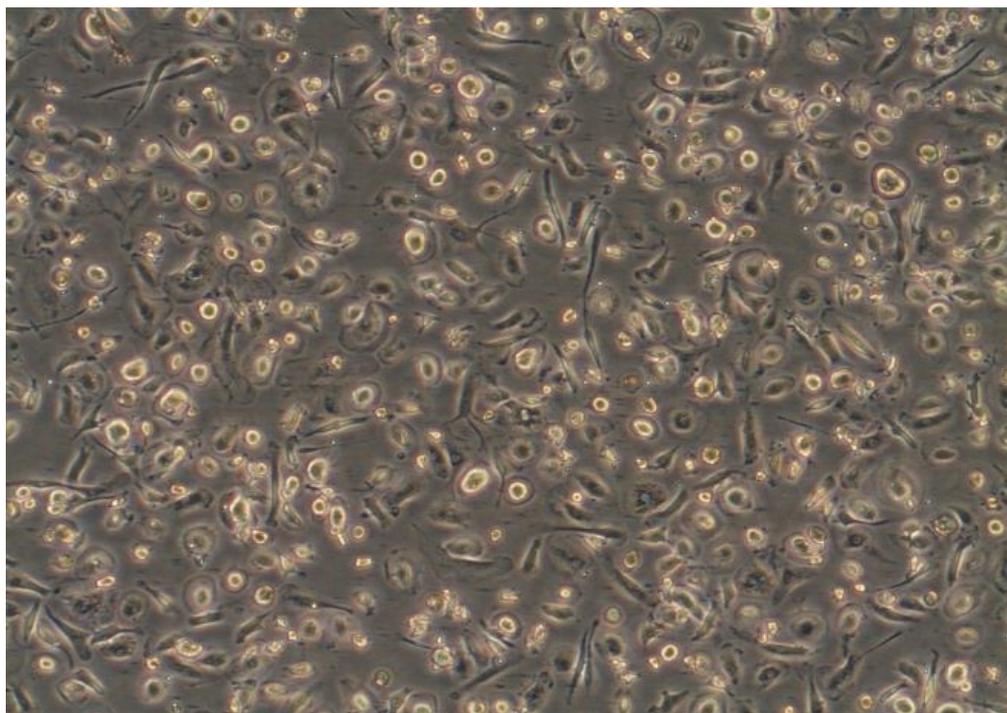
2. А, Б – активно пролиферирующие ЭПК на 21-е сутки культивирования (увеличение 4×10 ; 10×10); В, Г – выстраивание ЭПК в линии и формирование тубулоподобных структур на 21-е сутки (увеличение 10×10 ; 4×10)

Рисунок 16 – Морфология пролиферирующей фракции культуры МНК, полученных у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (n = 6)

Как видно из рисунка 16 , ЭПК приобретали веретенообразную форму, и, как правило, клетки выстраивались в первичные сосудистые тубулоподобные структуры на 21-е сутки культивирования, что свидетельствует о способности данных клеток к сосудообразованию.

На данном этапе культивирования МНК отмечается увеличение плотности клеток, что свидетельствует об активном высоком пролиферативном потенциале данных клеток (рисунок 16 А, Б).

При дальнейшем культивировании (до 40 суток) ЭПК сохраняли высокий пролиферативный потенциал. В эти сроки ЭПК претерпевали морфологические изменения, становились распластанными и приобретали вид «глыбчатой мостовой», что является морфологической характеристикой принадлежности такого типа клеток к «сосудоформирующим» ЭПК (рисунок 17).



Примечание – Представлены фотографии культур ЭПК пациентов с инвертированного микроскопа. Увеличение 10×10

Рисунок 17 – Морфология культуры ЭПК пациентов с ХСН на 27-е сутки культивирования *in vitro*

Таким образом, МНК периферической крови пациентов с ХСН по завершении курса мобилизации G-CSF при культивировании на белках внеклеточного матрикса дифференцируются в ЭПК.

Известно, что одним из свойств ЭПК является продукция ими ряда биологически активных веществ, которые способны оказывать не только аутокринное влияние на функциональный потенциал самих клеток-продуцентов, но и паракринный эффект на другие клетки организма [338].

4.2 Исследование функциональной активности культуры эндотелиальных прогениторных клеток

4.2.1 Исследование уровня продукции цитокинов, ростовых факторов и метаболитов оксида азота эндотелиальными прогениторными клетками на белках внеклеточного матрикса

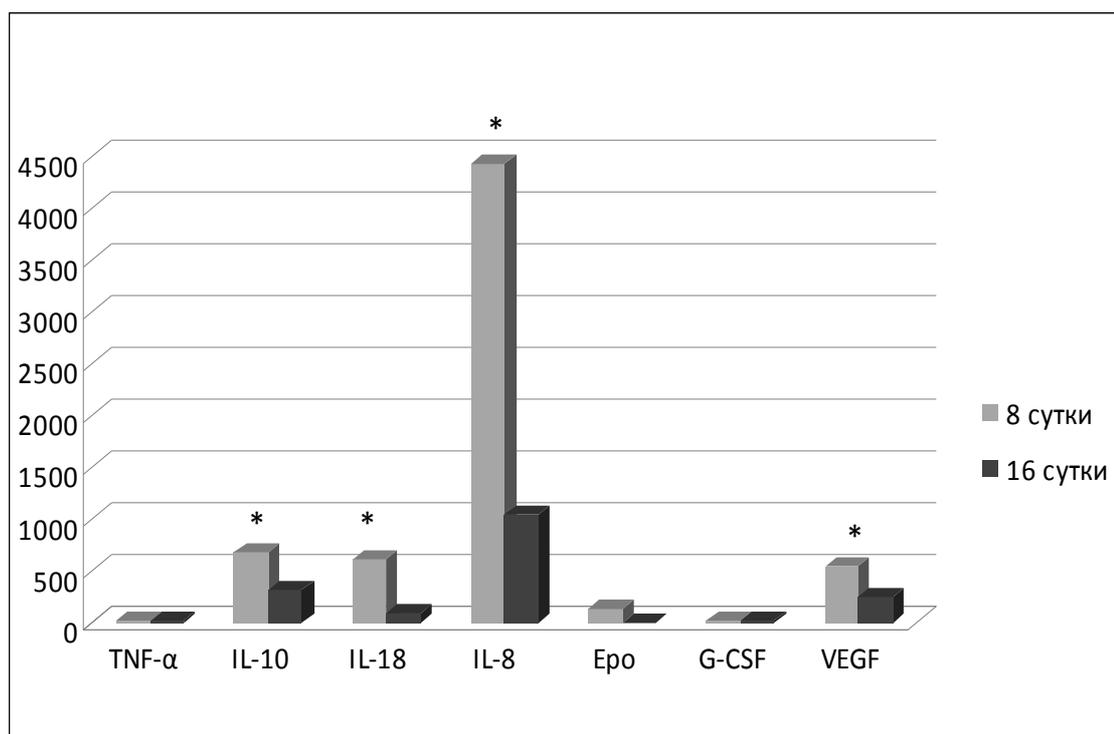
Исследования ряда авторов показали, что два вида ЭПК («ранние» и «поздние») различаются не только морфологически, но и функционально, в частности по продукции цитокинов и ростовых факторов, и тем самым вносят различный вклад в развитие сосудистой сети [87; 148; 338].

В связи с этим следующим этапом работы стало изучение продукции цитокинов и ростовых факторов культурой ЭПК, полученной после мобилизации G-CSF от пациентов с ХСН, в ранние и поздние сроки культивирования, и на разных адгезионных белках – фибронектине и желатине.

Показано, что ЭПК в разные сроки культивирования в культуре продуцируют анализируемые цитокины и ростовые факторы.

На рисунке 18 представлено, что ЭПК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF к 8-м суткам культивирования на фибронектине, когда культура представлена «ранними» ЭПК, продуцируют широкий спектр цитокинов и ростовых факторов – TNF- α (10 пг/мл), IL-10 (668 пг/мл), IL-18 (612 пг/мл), IL-8 (4442 пг/мл), EPO (132 МЕ/мл), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (536 пг/мл).

К 16-м суткам культивирования, когда культура представлена «поздними» ЭПК, продукция большинства цитокинов и ростовых факторов статистически значимо снижается и составляет IL-10 (320 пг/мл; $p = 0,05$), IL-18 (95 пг/мл; $p = 0,003$), IL-8 (1040 пг/мл; $p = 0,003$), Еро (5 МЕ/мл; $p = 0,003$), VEGF (255 пг/мл; $p = 0,004$). В то же время продукция провоспалительного цитокина TNF- α (10 пг/мл) и ростового фактора G-CSF (10 пг/мл) остается на том же уровне.



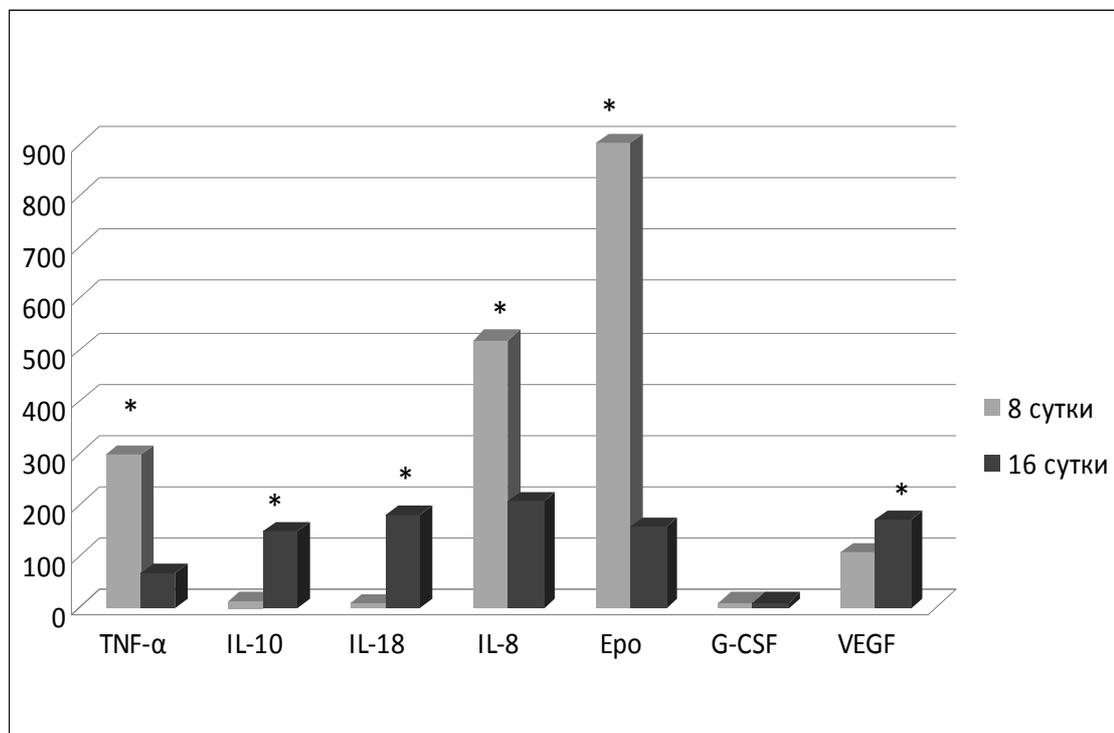
Примечания:

1. n – количество наблюдений
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ)
3. по оси абсцисс – анализируемые цитокины; по оси ординат – концентрации цитокинов в пг/мл (Еро – МЕ/мл)
4. * – достоверность различия параметров на 8-е и 16-е сутки культивирования ЭПК, $p < 0,05$

Рисунок 18 – Концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на фибронектине (n = 8)

Что же касается ЭПК, культивировавшихся на желатиновой основе, то

показано, что к 8-м суткам продукция цитокинов и ростовых факторов ими составила TNF- α (297 пг/мл) и Epo (900 МЕ/мл), что выше по сравнению с культурой ЭПК, культивировавшимися на фибронектине (рисунок 19).



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – анализируемые цитокины; по оси ординат – концентрации цитокинов в пг/мл (Epo – МЕ/мл);
4. * – достоверность различия параметров на 8-е и 16-е сутки культивирования ЭПК, $p < 0,05$

Рисунок 19 – Концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на желатине (n = 8)

В то же время продукция IL-10 (11 пг/мл), IL-18 (7 пг/мл), IL-8 (520 пг/мл), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (107 пг/мл) была снижена по сравнению с продукцией культивировавшихся ЭПК на фибронектине.

Как видно из рисунка 19, с увеличением срока (16-е сутки) культивирования на желатине с появлением в культуре «поздних» ЭПК снижается продукция

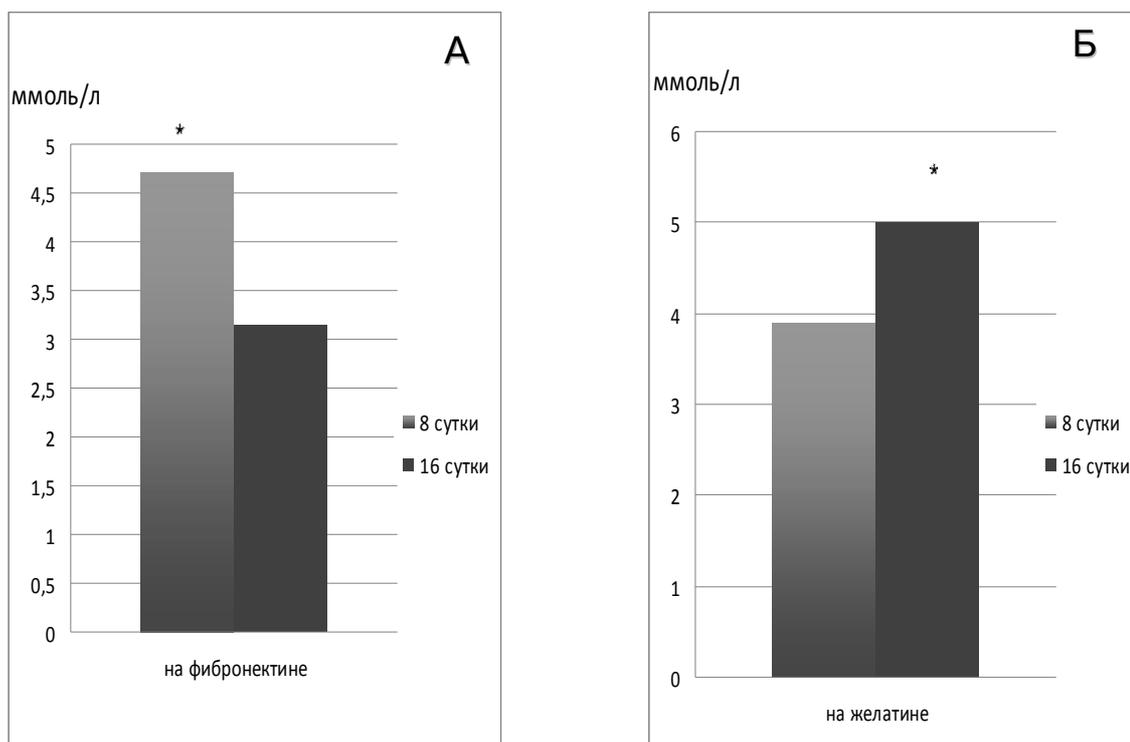
Еро (155 МЕ/мл; $p = 0,004$), TNF- α (66 пг/мл; $p = 0,004$), IL-8 (205 пг/мл; $p = 0,003$). При этом на прежнем уровне сохраняется продукция G-CSF (10 пг/мл), в то же время статистически значимо увеличивается продукция IL-10 (147 пг/мл; $p = 0,01$), IL-18 (178 пг/мл; $p = 0,04$) и VEGF (171 пг/мл; $p = 0,02$) по сравнению с продукцией данных цитокинов и ростовых факторов на 8-е сутки, когда культура представлена «ранними» ЭПК.

Кроме секреции ростовых факторов и цитокинов, эндотелиальные клетки разной степени дифференцировки характеризуются продукцией стойких метаболитов NO – вазодилататора, который повышает проницаемость эндотелия сосудов, что приводит к миграции клеток из кровеносного русла в ткани, тем самым способствуя ангиогенезу [159; 168].

Поэтому следующим этапом работы стала оценка продукции NO «ранними» и «поздними» ЭПК при культивировании (рисунок 20).

Показано, что ЭПК, культивировавшиеся на фибронектине, к 16-м суткам статистически значимо снижают уровень продукции NO (4,7 и 3,1 ммоль/л на 8-е и 16-е сутки культивирования, соответственно) (рисунок 20 А). Что же касается, культуры «поздних» ЭПК, культивированных на желатиновой основе, то для них характерна обратная картина по продукции NO, а именно, статистически значимое увеличение продукции NO в КС на 16-е сутки культивирования по сравнению с 8-ми сутками (3,9 ммоль/л и 5,0 ммоль/л, соответственно), когда культура представлена «ранними» ЭПК ($p < 0,01$) (рисунок 20 Б).

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 [178].



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. * – достоверность различия параметров на 8-е и 16-е сутки культивирования ЭПК, $p = 0,01$

Рисунок 20 – Концентрации стойких метаболитов NO в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на фибронектине и желатине (n = 8)

Таким образом, культивируемые в разные сроки ЭПК пациентов с ХСН секретируют биологически активные вещества, в том числе проангиогенные цитокины и ростовые факторы. Очевидно, что секретируемые «ранними» ЭПК молекулы способствуют пролиферации «поздних» ЭПК. В то же время секретируемые «поздними» ЭПК цитокины необходимы для поддержания пролиферативного потенциала клеток в культуре. Причем белки внеклеточного матрикса влияют на уровень данных биологически активных факторов с учетом различных сроков культивирования.

4.2.2 Корреляционные связи между продукцией цитокинов эндотелиальными прогениторными клетками на фибронектине и желатине

Исследовали взаимовлияние уровня продукции цитокинов и ростовых факторов при культивировании ЭПК на адгезионных белках фибронектине и желатине (таблица 14).

При анализе результатов учитывали критическое значение коэффициента корреляции, которое при выборке объемом 8 объектов исследования составляет 0,738.

Выявлена положительная корреляционная связь между уровнем продукции трех цитокинов – IL-8, EPO и VEGF при культивировании на желатине и этих же цитокинов на фибронектине.

Уровень продукции IL-8 при культивировании на фибронектине находился в прямой корреляционной связи с уровнем продукции на желатине IL-10, IL-18, EPO и VEGF; в отрицательной корреляционной связи с уровнем TNF- α .

Кроме того, имеется корреляционная связь содержания EPO при культивировании ЭПК на фибронектине и уровня TNF- α , IL-10, IL-8, VEGF на желатине, которая имеет в первых двух случаях прямой характер.

Уровень IL-10 на фибронектине положительно коррелирует с уровнем IL-18 на желатине.

Таким образом, белки внеклеточного матрикса фибронектин и желатин оказывают различное влияние на уровень секреторной активности культивируемых ЭПК.

Таблица 14 – Корреляционные связи между продукцией цитокинов ЭПК на фибронектине и желатине (n = 8)

Цитокины		Культивирование ЭПК на желатине						
		TNF- α	IL-10	IL-18	IL-8	Epo	G-CSF	VEGF
Культивирование ЭПК на фибронектине	TNF- α	R = 0,18 p = 0,5	R = 0,03 p = 0,1	R = - 0,38 p = 0,2	R = - 0,25 p = 0,4	R = 0,10 p = 0,7	R = 0,01 p = 0,9	R = - 0,45 p = 0,1
	IL-10	R = - 0,39 p = 0,2	R = 0,55 p = 0,07	R = 0,77 p = 0,005	R = 0,31 p = 0,3	R = - 0,24 p = 0,4	R = 0,53 p = 0,9	R = 0,47 p = 0,1
	IL-18	R = 0,03 p = 0,9	R = - 0,17 p = 0,6	R = 0,30 p = 0,3	R = - 0,12 p = 0,7	R = 0,29 p = 0,3	R = 0,11 p = 0,7	R = 0,11 p = 0,7
	IL-8	R = - 0,75 p = 0,007	R = 0,75 p = 0,03	R = 0,81 p = 0,002	R = 0,78 p = 0,004	R = 0,75 p = 0,01	R = 0,10 p = 0,7	R = 0,87 p = 0,001
	Epo	R = 0,80 p = 0,002	R = 0,75 p = 0,007	R = - 0,56 p = 0,06	R = - 0,90 p = 0,0001	R = 0,90 p = 0,0001	R = 0,02 p = 0,9	R = - 0,80 p = 0,007
	G-CSF	R = 0,02 p = 0,9	R = 0,10 p = 0,8	R = 0,10 p = 0,8	R = 0,01 p = 0,8	R = 0,07 p = 0,9	R = 0,10 p = 0,8	R = 0,10 p = 0,7
	VEGF	R = - 0,34 p = 0,3	R = 0,14 p = 0,7	R = 0,42 p = 0,1	R = 0,47 p = 0,2	R = - 0,35 p = 0,3	R = 0,10 p = 0,8	R = 0,74 p = 0,02
Примечания: 1. n – количество наблюдений 2. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции								

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 4

Проведенный анализ результатов исследования морфофункциональных свойств культивируемых эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью дает основание утверждать, что МНК после мобилизации G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью способны при культивировании дифференцироваться в ЭПК. ЭПК, культивированные в разные сроки, отличаются морфологически и функционально. «Ранние» ЭПК, обладая низким пролиферативным потенциалом, секретируют биологически активные вещества, что зависит от влияния белков внеклеточного матрикса. При культивировании на фибронектине «ранние» ЭПК секретируют более высокий уровень IL-10, IL-18, IL-8, EPO, VEGF и NO, а на желатине – TNF- α , IL-8 и EPO. Проангиогенные факторы, секретируемые культивируемыми в ранние сроки ЭПК пациентов, обеспечивают пролиферацию и образование первичных сосудистых тубулярных структур «поздними» ЭПК. В то же время секретируемые «поздними» ЭПК биологически активные молекулы необходимы для поддержания пролиферативного потенциала клеток в культуре. Очевидно, что разный уровень цитокинов и ростовых факторов при культивировании на различных адгезионных белках говорит о регулируемой роли внеклеточного микроокружения на функциональное состояние ЭПК.

ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОВЛИЯНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И ЗРЕЛЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ EA. hu926

Функциональная активность ЭПК зависит от влияния на них клеток, участвующих в неоваскулогенезе, в том числе эндотелиоцитов [5]. С другой стороны, зрелые эндотелиальные клетки способны оказывать регулирующее влияние на ЭПК. Исследование ангиогенных свойств различных факторов осуществляется с использованием клеточных линий. Поскольку первичные культуры эндотелиальных клеток имеют ограниченный пролиферативный потенциал и отличаются широкой вариабельностью результатов, то перевиваемые клеточные линии стабильно воспроизводят свойства эндотелиальных клеток, что является их существенными преимуществом. Эндотелиальные клетки человека линии EA. hu926 как морфологически, так и функционально отражают свойства зрелых эндотелиальных клеток, что позволяет моделировать взаимодействие недифференцированных ЭПК пациентов с ХСН и зрелых эндотелиальных клеток клеточной линии EA.Hu926 [203].

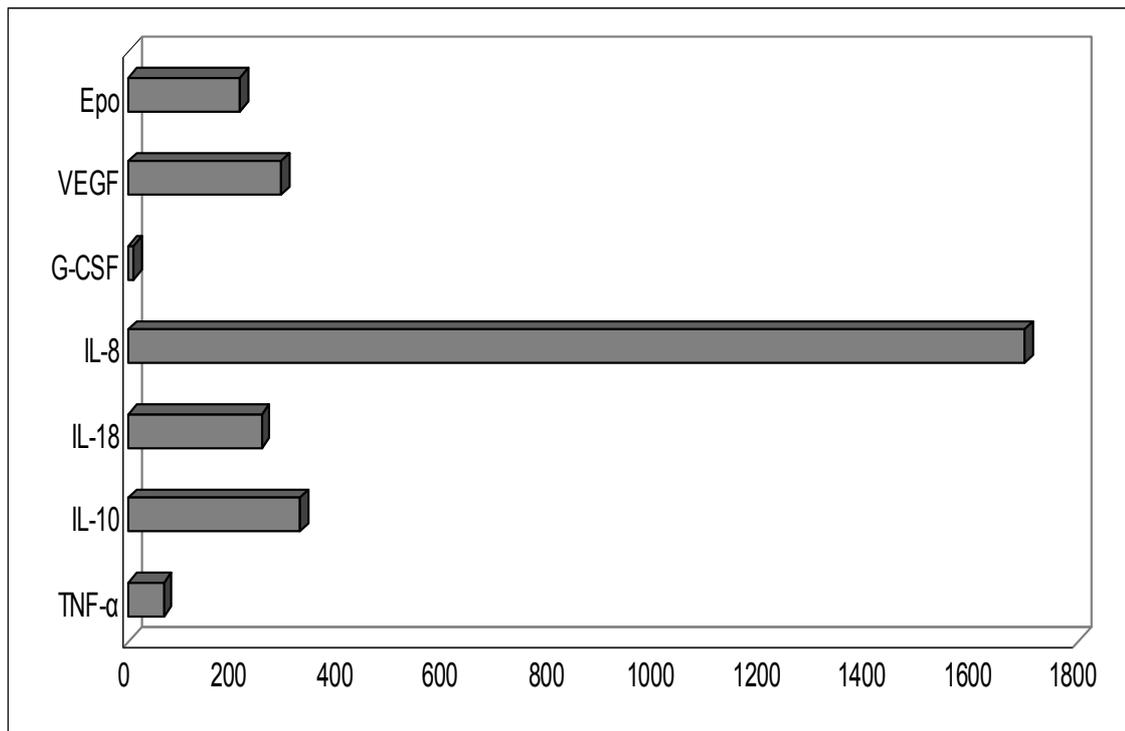
5.1 Исследование уровня цитокинов, ростовых факторов и метаболитов оксида азота в кондиционной среде эндотелиальных прогениторных клеток и клеточной линии EA. hu926

В настоящее время основным механизмом регенеративных/репаративных процессов является паракринный эффект СПК. В то же время взаимодействие СПК и дифференцированных клеток также может осуществляться путем паракринных стимулов.

В ряде работ показано, что при культивировании СПК в кондиционной среде накапливаются различные биологически активные молекулы [87; 147; 214].

Для последующего изучения влияния кондиционных сред на функциональное состояние культивируемых клеток был проанализирован уровень секреции факторов роста, цитокинов и NO культурой недифференцированных (ЭПК пациентов) и зрелых эндотелиальных клеток (эндотелиальная клеточная линия EA.Hy926).

Показано, что КС, полученная при культивировании ЭПК, содержит определенные уровни исследуемых цитокинов (рисунок 21).



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – концентрации цитокинов в пг/мл (Epo – ME/мл); по оси ординат – анализируемые цитокины

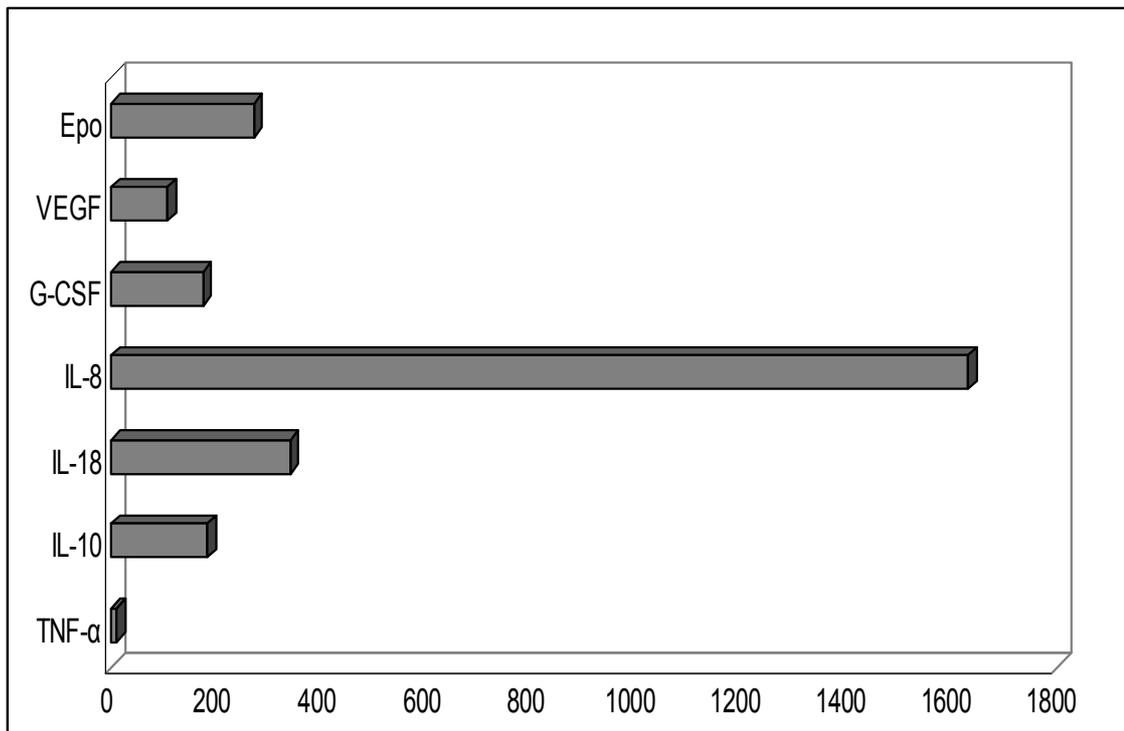
Рисунок 21 – Концентрации цитокинов в кондиционной среде ЭПК пациентов с ХСН (n = 8)

Причем, содержание IL-8 было наиболее высоким и составило 1699,3 пг/мл. Уровень IL-18 (253,9 пг/мл), VEGF (290,5 пг/мл), IL-10 (326,2 пг/мл) и

Еро (212,3 МЕ/мл) находился в среднем числовом диапазоне, несколько ниже было содержание TNF- α (67,1 пг/мл) и G-CSF (10,1 пг/мл).

КС, полученная при культивировании EA. hu926, содержит сопоставимый с КС ЭПК уровень IL-8 (1630,5 пг/мл), Еро (271,6 МЕ/мл), более низкий уровень VEGF (106,6 пг/мл), IL-10 (182,6 пг/мл) и TNF- α (10,9 пг/мл) (рисунок 22).

Содержание IL-18 (339,8 пг/мл) и особенно G-CSF (174,8 пг/мл), является более высоким, чем в КС ЭПК.

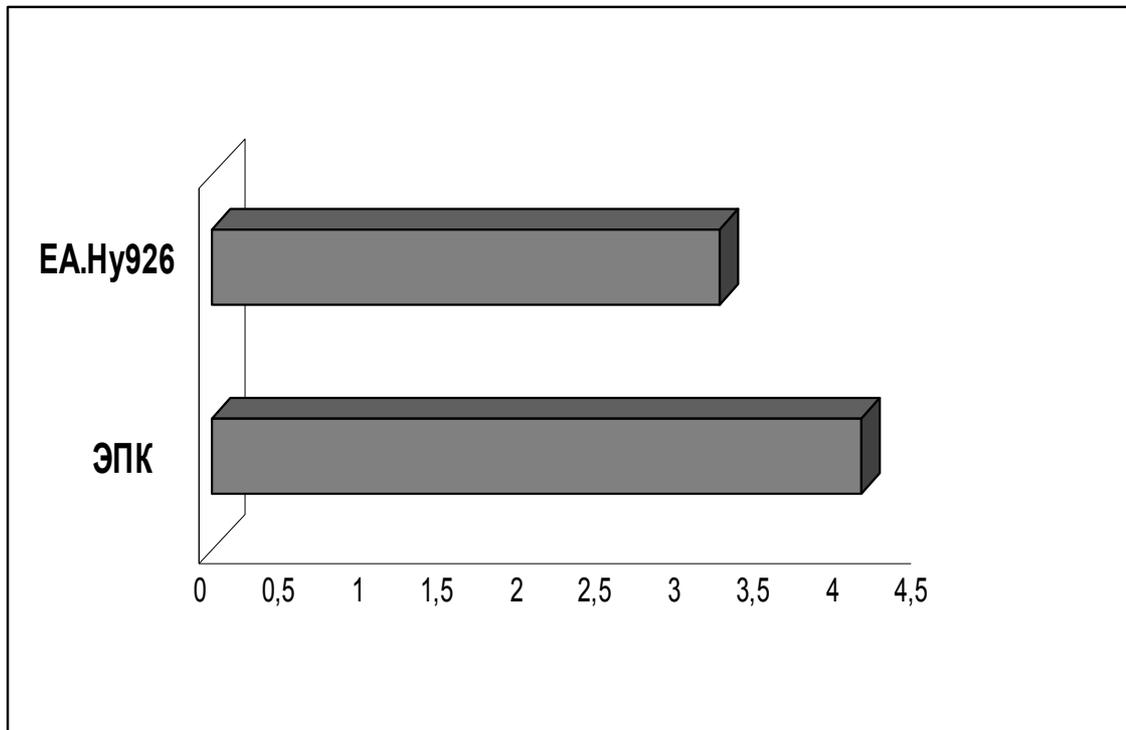


Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс – концентрации цитокинов в пг/мл (Еро – МЕ/мл), по оси ординат – анализируемые цитокины

Рисунок 22 – Концентрации цитокинов в кондиционной среде эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)

Оценка продукции NO ЭПК и EA. hu926 при культивировании показала, что содержание NO в КС ЭПК составляет 4,1 ммоль/мл, а в КС EA. hu926 – 3,2 ммоль/мл (рисунок 23).



Примечания:

1. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
2. по оси абсцисс – концентрации NO в ммоль/мл

Рисунок 23 – Концентрации стойких метаболитов NO в кондиционной среде ЭПК пациентов с ХСН и EA. hu926

Таким образом, культивированные недифференцированные ЭПК пациентов и зрелые эндотелиальные клетки линии EA. hu926 КС секретируют проангиогенные цитокины и ростовые факторы, а также стойкие метаболиты NO, которые накапливаются в кондиционной среде.

5.2 Исследование функциональных свойств эндотелиальных прогениторных клеток при влиянии биологически активных веществ, продуцируемых клетками эндотелиальной линии EA. hu926

Функциональная активность клеток зависит от влияния на них биологически активных веществ, как продуцируемых резидентными клетками в области образования новых сосудов, так и клетками, участвующими в неоваскулогенезе [5].

Поэтому следующим этапом работы стало исследование взаимовлияний биологически активных веществ, секретируемых в культуральную среду ЭПК и клетками эндотелиальной линии EA. hu926, на приборе xCELLigence System в режиме реального времени.

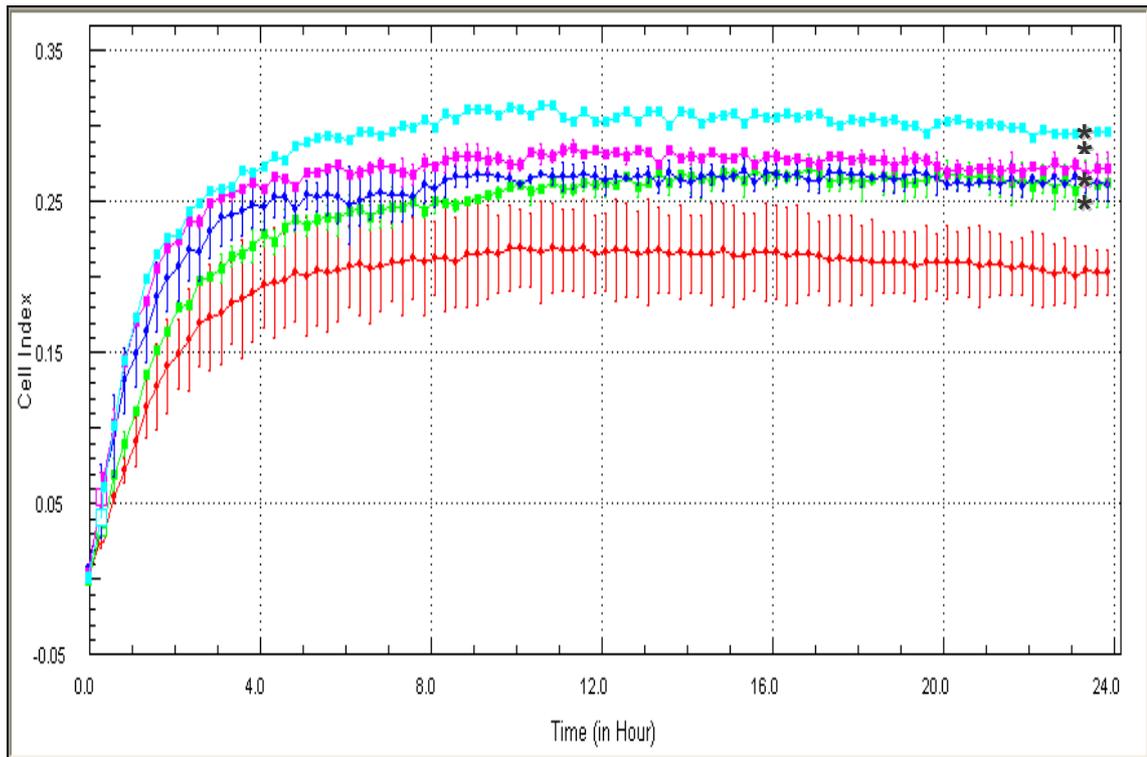
Система xCELLigence измеряет электрический импеданс, создаваемый микроэлектродами, встроенными на дне планшетов. Измерение импеданса предоставляет количественную информацию о статусе клеток, включая число клеток и их выживаемость. Величина электрического импеданса выражается в значении клеточного индекса (КИ).

В лунки вносятся тестируемые вещества (цитокины и КС), снимается значение импеданса, а далее вносятся клетки в питательной среде. В условиях исследования задается общее время сканирования и интервал сканирования, далее все измерения производятся в автоматическом режиме без вмешательства экспериментатора.

Изучали паракринный эффект зрелых эндотелиальных клеток на циркулирующие ЭПК и паракринный эффект циркулирующих ЭПК на зрелые эндотелиальные клетки. Для сравнительного исследования при культивировании использовали цитокины с проангиогенной активностью – VEGF, G-CSF, EPO, TNF- α .

5.2.1 Исследование пролиферативного потенциала эндотелиальных прогениторных клеток под воздействием кондиционной среды клеток эндотелиальной линии EA.hy926

Данные пролиферации культуры ЭПК пациентов с ХСН, полученных из МНК после мобилизации G-CSF, представлены на рисунке 24.



Примечания:

1. красная линия – спонтанная пролиферация; зеленая линия – пролиферация в присутствии VEGF; синяя линия – пролиферация в присутствии G-CSF; розовая линия – пролиферация в присутствии Epo; голубая линия – пролиферация в присутствии КС от эндотелиальной линии EA.hy926;
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах);
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной пролиферацией, ($p < 0,05$)

Рисунок 24 – Показатели пролиферативного потенциала культуры ЭПК, мобилизованных G-CSF, пациентов с ХСН (n = 8)

Показано, что пролиферация культуры ЭПК статистически значимо увеличивалась в присутствии VEGF (КИ=0,22; $p = 0,03$), G-CSF (КИ = 0,24;

$p = 0,03$), Еро (КИ = 0,25; $p = 0,02$) и КС от клеток эндотелиальной линии EA.hy926 (КИ = 0,26; $p = 0,01$), по сравнению со спонтанным пролиферативным потенциалом культуры ЭПК (КИ = 0,19) на 4 часа эксперимента.

На последующих сроках культивирования (24 часа) КС клеток эндотелиальной линии EA.hy926 также оказывал статистически значимый больший эффект на пролиферацию культуры ЭПК по сравнению со спонтанной пролиферацией (КИ = 0,30; $p = 0,02$). Эффект VEGF, Еро и G-CSF на пролиферацию культуры ЭПК был менее выражен по сравнению с эффектом КС EA.hy926 (КИ = 0,26; КИ = 0,28 и КИ = 0,26, соответственно).

Таким образом, КС от клеток EA.hy926 оказывает стимулирующее воздействие на пролиферацию ЭПК пациентов с ХСН, причем уровень стимуляции является более высоким, чем действие таких ангиогенных факторов, как VEGF, G-CSF и Еро.

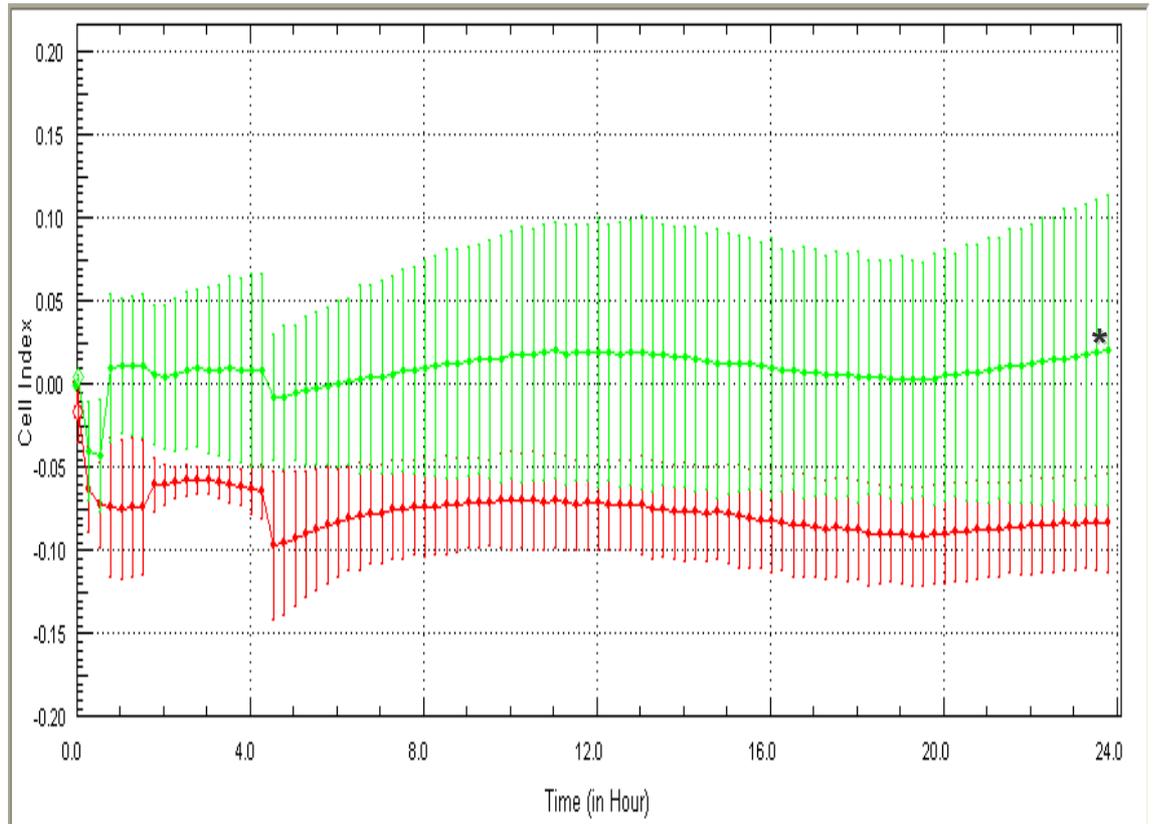
С учетом выявленного влияния факторов, продуцируемых зрелыми эндотелиальными клетками на пролиферативный потенциал ЭПК, возникла необходимость исследовать влияние КС на другой показатель функциональной активности ЭПК – миграцию, как отражения способности клеток достигать очага ишемии и способствовать ангиогенезу в ишемизированном миокарде.

5.2.2 Исследование миграционного потенциала эндотелиальных прогениторных клеток под воздействием кондиционной среды клеток эндотелиальной линии EA.hy926

Нами установлено, что миграционная активность культуры ЭПК в присутствии КС клеток эндотелиальной линии EA.hy926 увеличивается к 4 часу эксперимента (КИ = 0,05; $p = 0,01$) по сравнению со спонтанной активностью ЭПК (КИ = 0,001) (рисунок 25).

Максимального уровня миграционная активность ЭПК достигала к 12 часам эксперимента, а затем приобретала волнообразный характер и снова увеличивалась к 24 часам наблюдения (КИ = 0,07; $p = 0,01$) по сравнению со

спонтанной активностью ЭПК без добавления КС EA. hu926.



Примечания:

1. красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии КС от эндотелиальной линии EA. hu926;
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах);
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией, ($p < 0,05$)

Рисунок 25 – Показатели миграционной активности культуры ЭПК мобилизованных G-CSF пациентов с ХСН (n = 8)

Таким образом, КС клеток эндотелиальной линии EA. hu926 оказывает стимулирующее воздействие на миграцию ЭПК пациентов с ХСН, и это обусловлено биологически активными факторами, содержащимися в КС.

5.3 Исследование влияния секреторных факторов эндотелиальных прогениторных клеток на функциональные свойства клеток эндотелиальной линии EA. hu926

5.3.1 Исследование пролиферативного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hu926 под воздействием кондиционной среды эндотелиальных прогениторных клеток

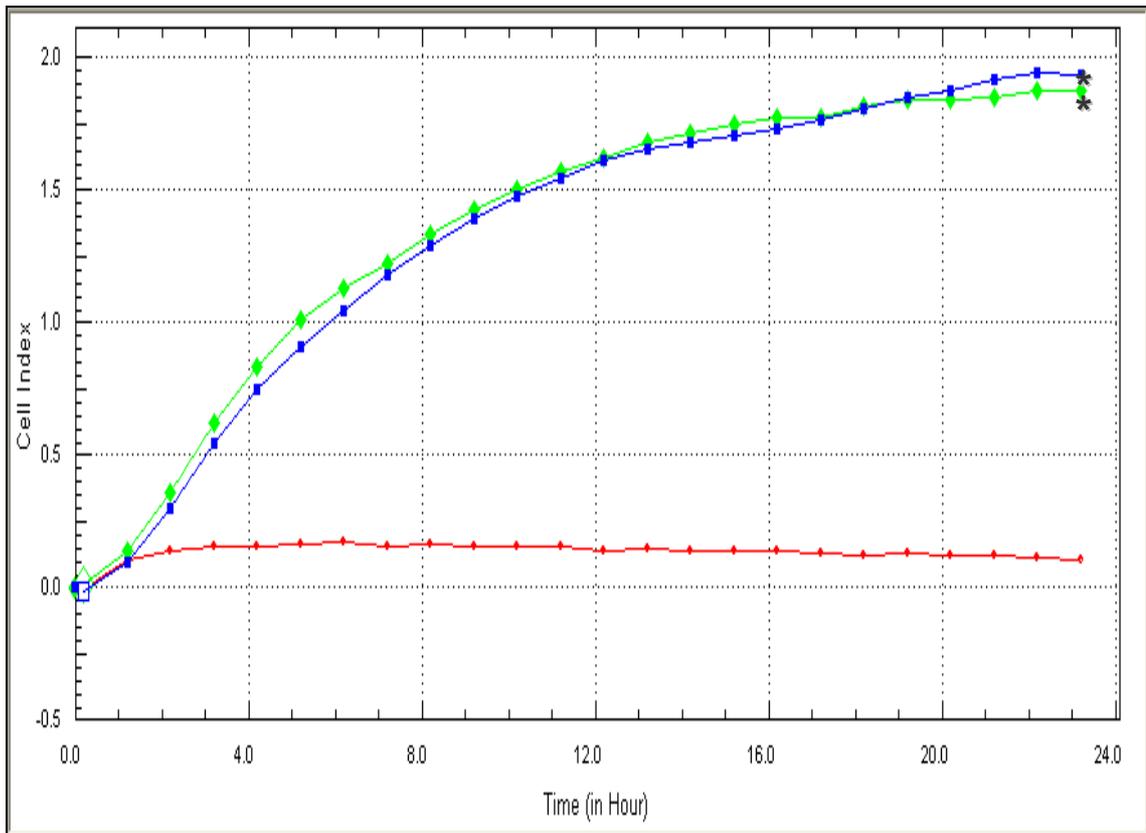
Данные пролиферации культуры эндотелиальной линии EA. hu926 представлены на рисунке 26.

В исследовании эффекта растворимых факторов, продуцируемых культурой ЭПК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF, на пролиферативный потенциал клеток эндотелиальной линии EA. hu926 было выявлено статистически значимое увеличение пролиферации клеток EA. hu926 под влиянием КС от культуры ЭПК (КИ = 0,7; $p = 0,01$) в сравнении со спонтанной интенсивностью пролиферации клеток эндотелиальной линии EA. hu926 уже к 4 часу эксперимента (КИ = 0,1).

Еро оказывал сопоставимое с КС от культуры ЭПК стимулирующее действие на пролиферацию эндотелиальной линии EA. hu926 (КИ = 0,8; $p = 0,02$) в сравнении со спонтанной интенсивностью пролиферации.

В течение последующих сроков культивирования отмечено равнозначное стимулирующее влияние Еро (КИ = 1,7; 1,8) и КС от культуры ЭПК (КИ = 1,7; 1,9) на 12 и 24 часа эксперимента, соответственно.

Таким образом, растворимые биологически активные молекулы, содержащиеся в КС при культивировании ЭПК пациентов, оказывают стимулирующее воздействие на пролиферацию клеток эндотелиальной линии EA. hu926, причем уровень стимуляции пролиферации сопоставим с эффектом Еро.



Примечания:

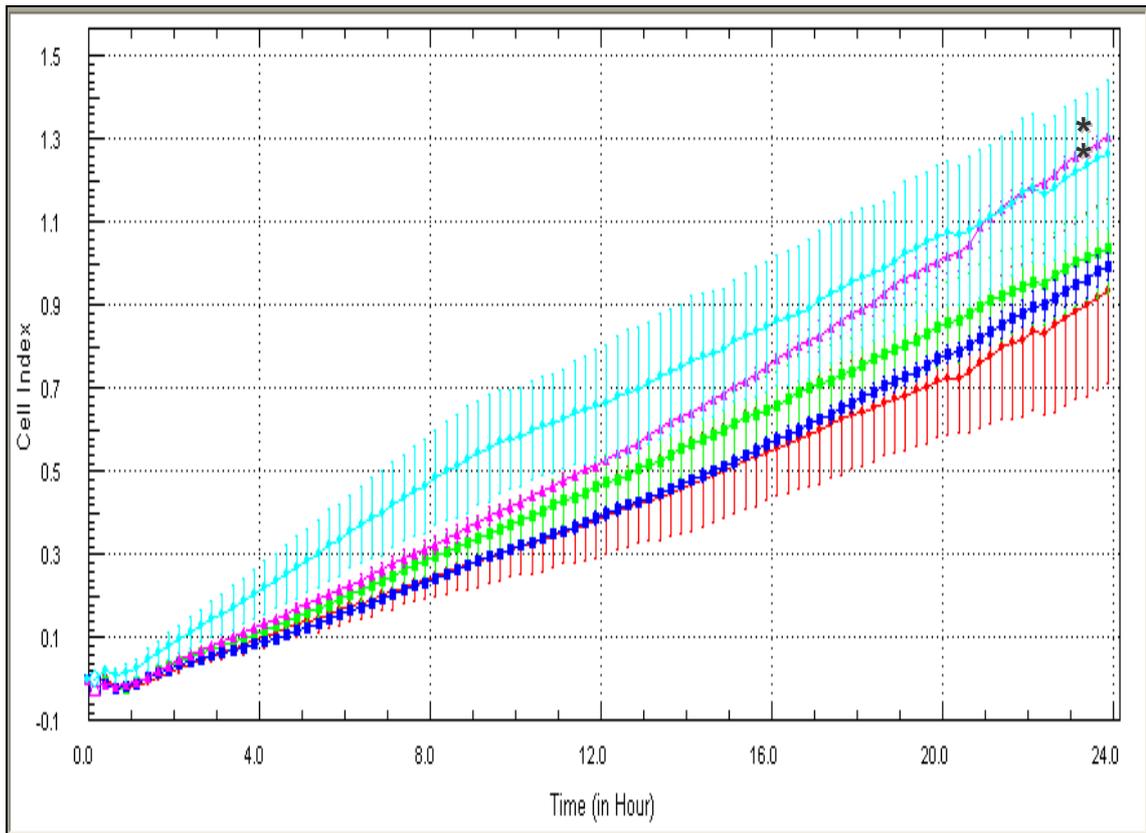
1. красная линия – спонтанная пролиферация; зеленая линия – пролиферации в присутствии EPO; синяя линия – пролиферации в присутствии КС от ЭПК мобилизованных G-CSF;
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах);
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной пролиферацией, ($p < 0,05$)

Рисунок 26 – Показатели пролиферативного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)

5.3.2 Исследование миграционного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hu926 под воздействием кондиционной среды эндотелиальных прогениторных клеток

Как видно из рисунка 27, клетки эндотелиальной линии EA. hu926 к 4 часам эксперимента статистически значимо быстрее мигрировали в присутствии КС от культуры ЭПК (КИ = 0,56; $p = 0,01$) и EPO (КИ = 0,30; $p = 0,01$) по сравнению со спонтанной миграцией клеток EA. hu926 (КИ = 0,26) и в присутствии VEGF

(КИ = 0,27).



Примечания:

1. красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии VEGF; синяя линия – миграция в присутствии TNF- α ; розовая линия – миграция в присутствии Epo; голубая линия – миграция в присутствии КС от ЭПК
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах)
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией, ($p < 0,05$)

Рисунок 27 – Показатели миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA. hy926 (n = 8)

На последующих сроках эксперимента отмечено статистически значимое увеличение миграции клеток EA. hy926 в присутствии КС от ЭПК (КИ = 1,4; $p = 0,01$) и Epo (КИ = 1,30; $p = 0,02$), достигавшее максимального стимулирующего эффекта этих веществ к 24 часам эксперимента.

В то же время, хоть и отмечено стимулирование миграции клеток EA. hy926

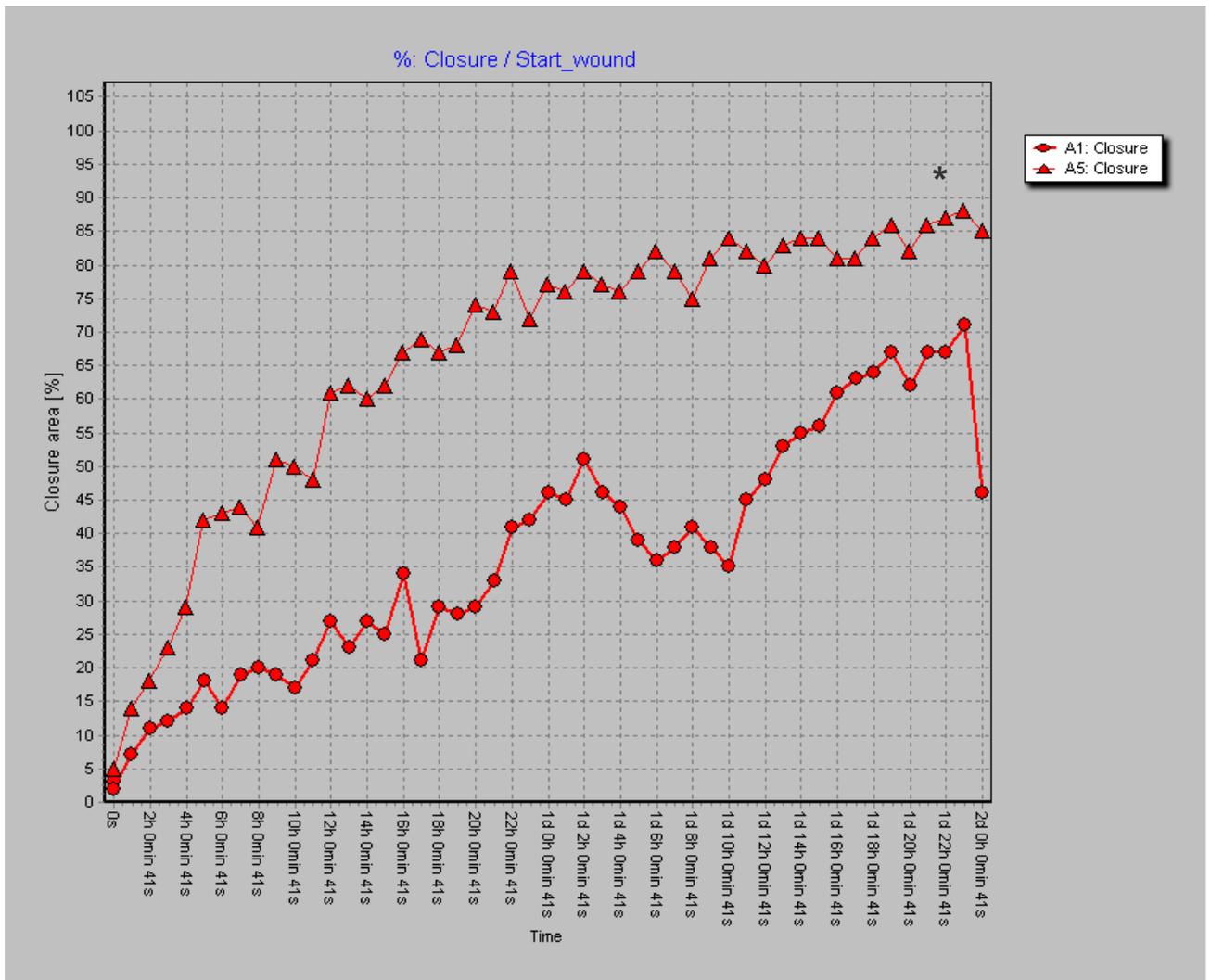
в присутствии VEGF (КИ = 1,0) по сравнению со спонтанной миграционной активностью клеток EA. hu926 (КИ = 0,90), но воздействие VEGF было ниже эффекта КС от ЭПК и Ерo.

Таким образом, растворимые биологически активные молекулы, содержащиеся в КС при культивировании ЭПК, оказывают стимулирующее воздействие на пролиферацию клеток эндотелиальной линии EA. hu926, причем уровень стимуляции сопоставим с Ерo и является более высоким, чем при действии VEGF и TNF- α .

Кроме того, в настоящее время миграционную активность эндотелиальных клеток оценивают в «модели раны» *in vitro* (горизонтальная миграция). Суть метода заключается в изучении перемещения адгезивных клеток вдоль дна луночного планшета из неповрежденной области в зону десквамированного монослоя культуры эндотелиальных клеток или «раны».

Выявлено, что клетки эндотелиальной линии EA. hu926 к 48 часам эксперимента закрывают бесклеточную поверхность до 70 % от исходных значений (рисунок 28). В то же время, площадь закрытия бесклеточной поверхности в присутствии 30 % КС ЭПК достигает 90 %.

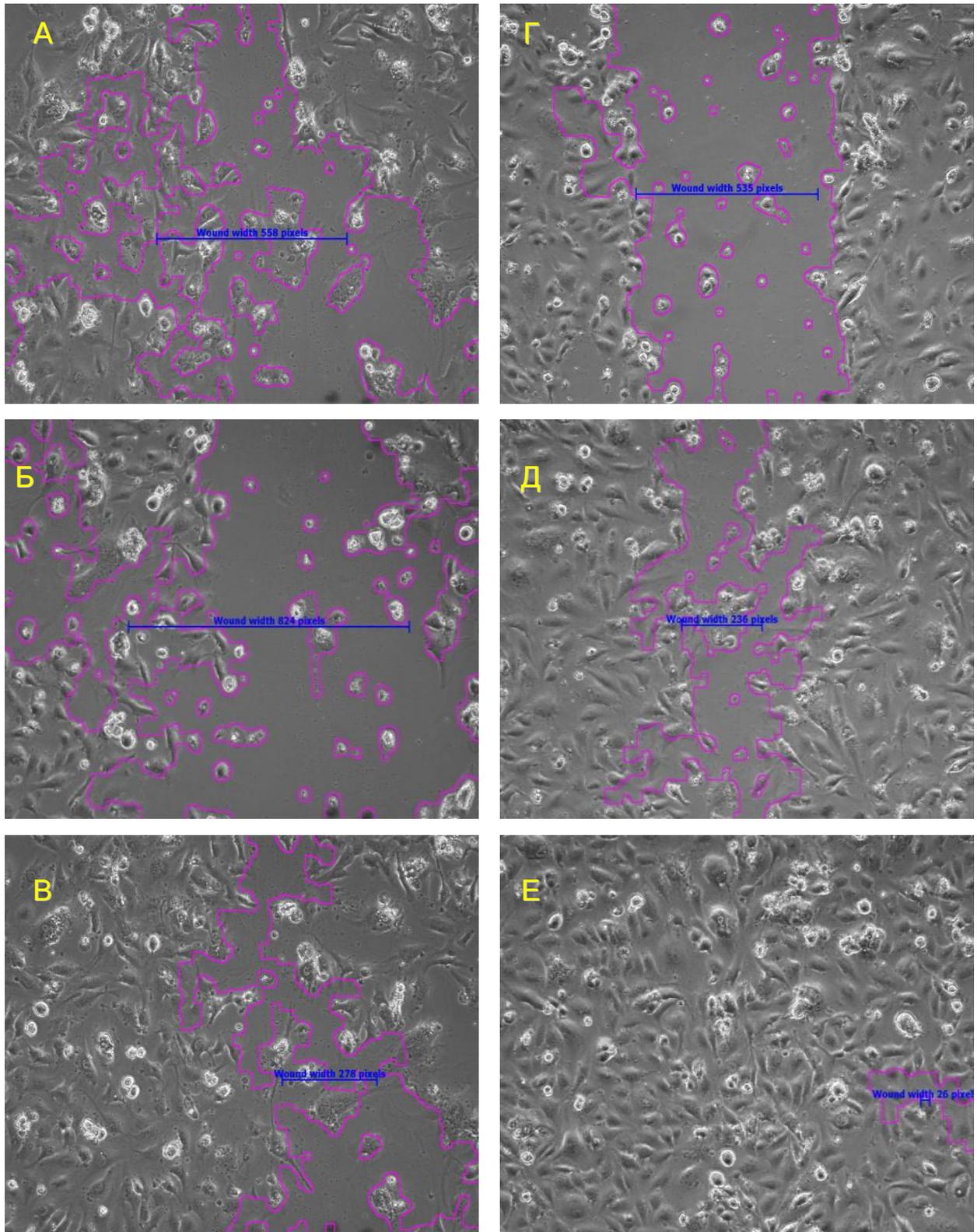
Необходимо отметить, что спонтанная миграция клеток эндотелиальной линии EA. hu926 характеризуется постепенным перемещением клеток в зону повреждения (рисунок 29 А, Б, В). Под действием же КС ЭПК клетки более активно мигрируют в зону повреждения уже в первые часы и к 6 часу эксперимента покрывают до 45 % площади бесклеточной поверхности (рисунок 29 Г, Д, Е).



Примечания:

1. круг – спонтанная миграция; треугольник – миграция в присутствии КС от ЭПК;
2. по оси абсцисс – время (в часах); по оси ординат – площадь закрытия «раневой поверхности»;
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией, ($p < 0,05$)

Рисунок 28 – Показатели горизонтальной миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA. hy926 (n = 8)



Примечание – Спонтанная миграция (А, Б, В); миграция в присутствии КС от ЭПК мобилизованных G-CSF (Г, Д, Е). Увеличение 10×10

Рисунок 29 – Показатели горизонтальной миграционной активности культуры клеток эндотелиальной линии EA.hy926

5.4 Исследование влияния фибронектина на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA. hu926

Из данных литературы известно, что фибронектин оказывает влияние на функциональные свойства не только ЭПК, но и способствует адгезии и миграции зрелых эндотелиальных клеток [312].

В работе проведено изучение миграции клеток EA. hu926 в двух экспериментальных моделях.

Первая модель исследовала миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA. hu926 при их культивировании с фибронектином (рисунок 30).

Было установлено, что VEGF и EPO статистически значимо стимулировали миграционный потенциал EA. hu926 по сравнению со спонтанным уровнем ($p < 0,05$). Так, показано возрастание клеточного индекса с $0,014 \pm 0,001$ до $0,960 \pm 0,020$ и с минус $0,008 \pm 0,002$ до $1,191 \pm 0,031$ (для VEGF и EPO, соответственно).

В то же время наличие VEGF в культуральной среде оказывало статистически значимо меньшее влияние на миграционный потенциал EA. hu926 по сравнению с эффектом EPO на миграцию клеток ($p < 0,01$).

TNF- α также стимулировал миграцию клеток эндотелиальной линии (увеличение КИ с минус $0,001 \pm 0,0001$ до $1,060 \pm 0,11$; КИ на 0 часов и 24 часа эксперимента, соответственно).

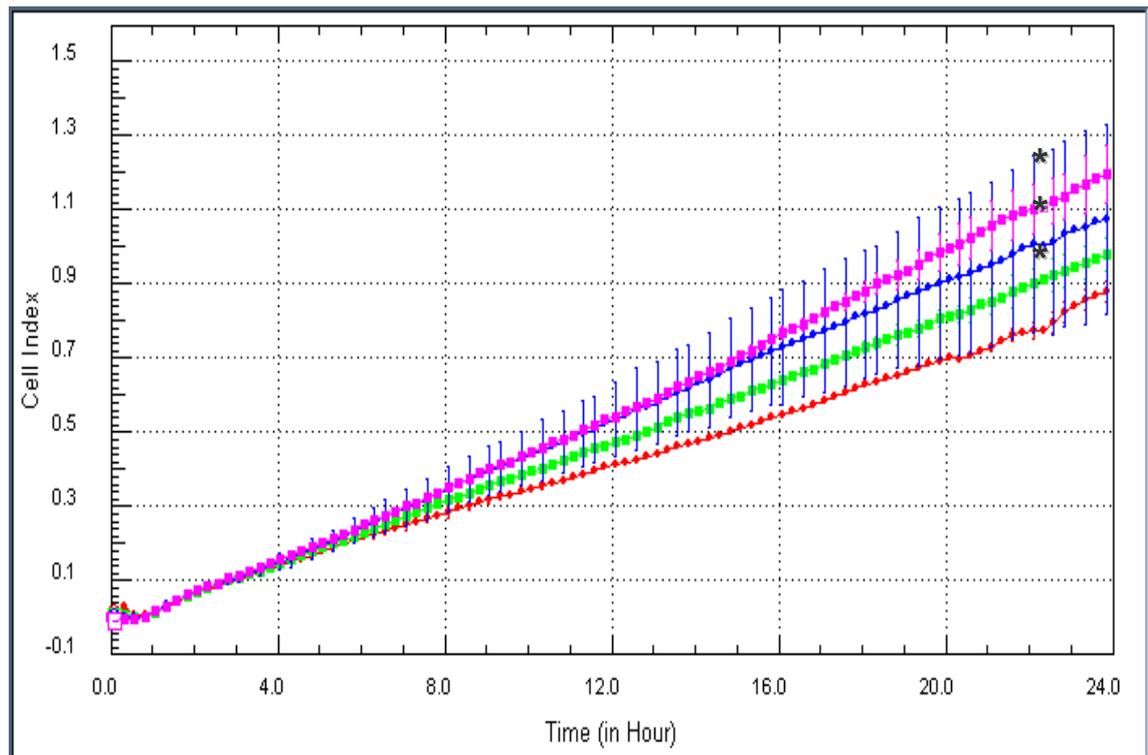
Следует отметить, что на ранних сроках изучения клеточного индекса через 4 часа культивирования EA. hu926 наиболее выраженное стимулирование миграции эндотелиальных клеток было у EPO (КИ = $0,124 \pm 0,002$).

Вторая модель изучала миграцию EA. hu926 в лунки камеры, обработанные фибронектином (рисунок 31).

Преинкубация лунок камеры с фибронектином привела к резкому снижению миграции EA. hu926 из верхней части камеры по направлению к градиенту плотности ростовых факторов, находящихся в нижней части камеры, особенно

для миграции без активационных цитокиновых стимулов в первые часы наблюдения.

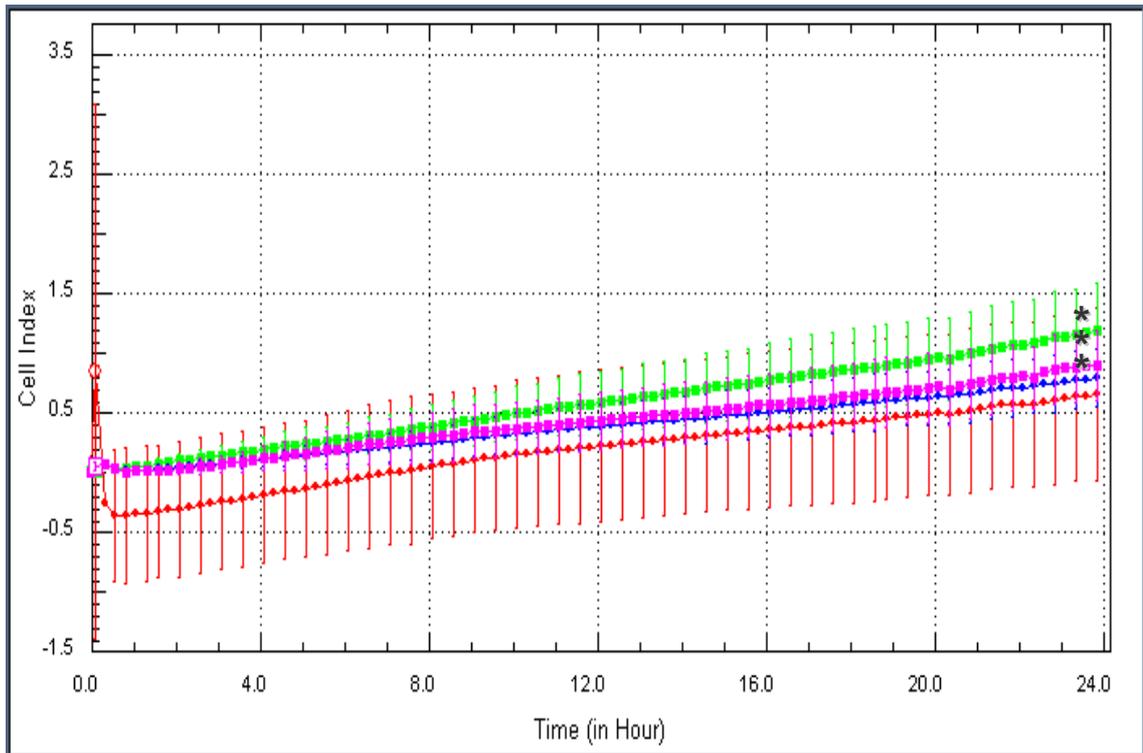
В тоже время отмечено увеличение миграционного потенциала EA. hu926 в лунках, содержащих VEGF (увеличение КИ с $0,036 \pm 0,006$ до $1,170 \pm 0,150$), Eро (увеличение КИ с $0,051 \pm 0,017$ до $0,898 \pm 0,110$) и TNF- α (увеличение КИ с $0,037 \pm 0,005$ до $0,788 \pm 0,105$).



Примечания:

1. красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии VEGF; синяя линия – миграция в присутствии TNF- α ; розовая линия – миграция в присутствии Eро;
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах);
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией, ($p < 0,05$)

Рисунок 30 – Значения миграции клеток эндотелиальной линии EA. hu926 по направлению к градиенту ростовых факторов



Примечания

1. красная линия – спонтанная миграция; зеленая линия – миграция в присутствии VEGF; синяя линия – миграция в присутствии TNF- α ; розовая линия – миграция в присутствии EPO;
2. по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах);
3. * – достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией, ($p < 0,05$)

Рисунок 31 – Значения миграции клеток эндотелиальной линии EA. hu926 по направлению лунок, обработанных фибронектином

Необходимо отметить, что на ранних сроках наблюдения дополнительные стимулы (EPO, TNF- α , VEGF) приводили к незначительному увеличению миграционной активности EA. hu926 по сравнению с показателями миграции без дополнительных стимулов.

Таким образом, миграция клеток эндотелиальной линии EA. hu926 зависела от наличия в культуральной среде не только ростовых факторов, но и фибронектина, гликопротеина, обеспечивающего взаимодействие клеток и их секретируемых медиаторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 5

Проведенный анализ результатов исследования взаимодействия культивируемых эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью и зрелых эндотелиальных клеток клеточной линии EA.hy926 дает основание утверждать, что недифференцированные ЭПК и зрелые эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние на функциональное состояние – пролиферацию и миграцию путем паракринных механизмов. Продукты секреции эндотелиальных прогениторных клеток стимулируют пролиферацию и миграцию клеток эндотелиальной линии EA.hy926, а продуцируемые клетками эндотелиальной линии EA.hy926 биоактивные вещества в свою очередь увеличивают функциональный потенциал ЭПК пациентов с ХСН.

Проангиогенные факторы, накапливающиеся в кондиционной среде при культивировании ЭПК и эндотелиальных клеток, включают в себя ростовые факторы и цитокины – VEGF, EPO, G-CSF, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α . Причем паракринные эффекты секретируемых недифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками факторов сопоставимы со стимулирующим влиянием или превышают действие ангиогенных цитокинов – EPO, TNF- α , VEGF, G-CSF.

ГЛАВА 6 ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ОБОГАЩЕННЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

6.1 Функциональное состояние миокарда после интрамиокардиального введения мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Нами исследована эффективность интрамиокардиального введения МНК после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН через 6 и 12 месяцев после лечения. Надо отметить, что в исследование включены пациенты с тяжелой формой ХСН, не подлежащие прямой реваскуляризации миокарда в виду наличия противопоказаний или неэффективности прямой реваскуляризации с III-IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности. Все пациенты находились на стандартной медикаментозной терапии.

Оценка эффективности интрамиокардиального введения в рамках диссертационного исследования проводилась по ряду функциональных параметров – функциональному классу сердечной недостаточности, фракции выброса левого желудочка, данных сцинтиграфии миокарда и исследования толерантности к физической нагрузке.

Интрамиокардиальное введение обогащенных ЭПК мононуклеарных клеток пациентам с ХСН привело к статистически значимому снижению функционального класса сердечной недостаточности по NYHA ($2,87 \pm 0,29$ до $2,4 \pm 0,66$ через 6 месяцев и $2,38 \pm 0,65$ через 12 месяцев после лечения) (таблица 15). Расстояние, пройденное пациентами во время 6-минутного теста ходьбы, после проведения клеточной терапии значительно возросло с

(235 ± 32) метров до процедуры мобилизации и увеличилось до (288 ± 37) метров во время 12-месячного контроля. Фракция выброса левого желудочка статистически значимо увеличилась практически на 5 % через 6 месяцев после проведения процедуры (с 26,6 ± 5,2 до 31,8 ± 8,7) и через 12 месяцев (31,0 ± 6,1) по сравнению с исходными данными.

Таблица 15 – Изменение показателей функционального состояния миокарда пациентов при интрамиокардиальном введении МНК (n = 56)

Показатели	Класс СН (NYHA)	Тест 6-мин ходьбы, м	ФВЛЖ, %	Перфузия миокарда, балл	
				покой	нагрузка аденозином
До введения	2,87 ± 0,29	235 ± 32	26,6 ± 5,2	30,2 ± 5,6	34,5 ± 5,4
Через 6 мес	2,40 ± 0,66 (p = 0,0002)	282 ± 38 (p = 0,00001)	31,8 ± 8,7 (p = 0,03)	27,2 ± 5,8 (p = 0,002)	27,6 ± 4,9 (p = 0,01)
Через 12 мес	2,38 ± 0,65 (p = 0,0001)	288 ± 37 (p = 0,00001)	31,0 ± 6,1 (p = 0,04)	27,8 ± 5,1 (p = 0,03)	28,1 ± 5,2 (p = 0,01)
Примечания: 1. n – количество наблюдений; 2. данные представлены в виде средних значений (M±σ); 3. p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF					

Анализ данных сцинтиграфии миокарда у пациентов, получивших лечение интрамиокардиальным введением МНК, выявил статистически значимое снижение суммарного индекса гипоперфузии после интрамиокардиального введения МНК, как в покое с (30,2 ± 5,6) баллов до (27,2 ± 5,8) баллов и (27,8 ± 5,1) баллов через 6 и 12 месяцев, соответственно; так и при нагрузке аденозином с (34,5 ± 5,4) баллов до (27,6 ± 4,9) баллов и (28,1 ± 5,2) баллов через 6 и 12 месяцев, соответственно; Снижение дефектов перфузии при нагрузке и в покое свидетельствует об увеличении кровоснабжения миокарда.

Таким образом, интрамиокардиальное введение МНК, мобилизованных

G-CSF, у пациентов с ХСН приводило к повышению толерантности к физической нагрузке и снижению функционального класса сердечной недостаточности, а также возрастанию фракции выброса левого желудочка сердца и улучшению перфузии миокарда.

6.2 Взаимосвязь количества эндотелиальных прогениторных клеток в периферической крови после мобилизации и клинических данных пациентов

Логичным продолжением данного исследования стало изучение влияния клинических данных пациентов с ХСН (возраст, длительность ИБС и количество перенесенных инфарктов) на эффективность мобилизации ЭПК при введении G-CSF (таблица 16).

Таблица 16 – Корреляционные связи между количеством ЭПК в периферической крови при мобилизации G-CSF и клинических данных пациентов (n = 20)

Показатели	Кол. CD34 ⁺		Кол. CD34 ⁺ /CD133 ⁺		Кол. CD34 ⁺ /VEGFR ₂ ⁺	
	до	после	до	после	до	после
Возраст	R = 0,16 p = 0,6	R = 0,08 p = 0,9	R = - 0,70 p = 0,1	R = 0,08 p = 0,8	R = - 0,50 p = 0,3	R = - 0,59 p = 0,3
Длительность ИБС	R = - 0,03 p = 0,8	R = 0,45 p = 0,05	R = - 0,12 p = 0,8	R = 0,65 p = 0,1	R = 0,65 p = 0,1	R = - 0,9 p = 0,03
Количество ИМ	R = - 0,07 p = 0,7	R = - 0,07 p = 0,7	R = - 0,35 p = 0,5	R = - 0,65 p = 0,1	R = - 0,65 p = 0,1	R = 0,7 p = 0,18
Примечания						
1 n – количество наблюдений;						
2 R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции;						
3 обозначения: до – до мобилизации G-CSF; после – после мобилизации G-CSF						

Выявлена только одна корреляционная связь между количеством клеток с фенотипом CD34⁺VEGFR₂⁺ после мобилизации G-CSF и длительностью ишемического анамнеза, которая составила у пациентов от 1 до 17 лет. Связь носит обратный характер.

При анализе результатов учитывали критическое значение коэффициента корреляции, которое при выборке объемом 20 объектов исследования составляет 0,45.

Таким образом, у пациентов с небольшой длительностью ИБС при введении G-CSF наблюдается высокий уровень популяции $CD34^+VEGFR_2^+$ ЭПК в периферической крови. Количество ЭПК после мобилизации не зависит от возраста и количества перенесенных инфарктов.

6.3 Изучение взаимосвязей морфофункциональных свойств обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками аутологичных мононуклеарных клеток с функциональными параметрами пациентов после интрамиокардиального введения

Результаты взаимосвязи количества «классических» популяций ЭПК после мобилизации G-CSF и показателей функциональных свойств ишемизированного миокарда после интрамиокардиального введения (перфузии миокарда и фракции выброса левого желудочка) представлены в таблице 17.

С показателями перфузии миокарда взаимосвязаны две популяции ЭПК – с фенотипом $CD34^+$ и $CD34^+/CD133^+$. Наблюдалась положительная корреляционная сильная связь между количеством клеток с фенотипом $CD34^+$ и улучшением перфузии миокарда, оцененной в покое спустя 6 месяцев после интрамиокардиального введения аутологичных МНК; и между количеством $CD34^+/CD133^+$ клеток и улучшением перфузии миокарда при нагрузке аденозином через 12 месяцев.

У популяции $CD34^+/CD133^+$ клеток также выявлена прямая сильная взаимосвязь с возрастанием ФВЛЖ через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК периферической крови, обогащенных ЭПК.

У параметров класса сердечной недостаточности и теста толерантности к физической нагрузке достоверных корреляционных связей с количеством ЭПК после мобилизации G-CSF отмечено не было.

Таблица 17 – Корреляционные связи количества ЭПК в периферической крови с функциональными параметрами пациентов (n = 20)

Исследуемые параметры		Количество клеток в периферической крови после мобилизации G-CSF		
		CD34 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /VEGFR ₂ ⁺
ФВЛЖ	через 6 мес	R = 0,12 p = 0,83	R = 0,67 p = 0,018	R = 0,27 p = 0,55
	через 12 мес	R = 0,42 p = 0,14	R = 0,41 p = 0,19	R = 0,19 p = 0,59
Перфузия в покое	через 6 мес	R = 0,76 p = 0,049	R = 0,10 p = 0,83	R = 0,13 p = 0,78
	через 12 мес	R = 0,45 p = 0,31	R = 0,69 p = 0,09	R = 0,41 p = 0,18
Перфузия при нагрузке	через 6 мес	R = -0,18 p = 0,69	R = 0,13 p = 0,80	R = 0,22 p = 0,63
	через 12 мес	R = -0,18 p = 0,67	R = 0,84 p = 0,037	R = 0,14 p = 0,66
Примечания 1 n – количество наблюдений; 2 R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность корреляции				

Далее произведена оценка взаимовлияния секреторного уровня цитокинов МНК, обогащенных ЭПК, и показателей функционального состояния миокарда после интрамиокардиального введения МНК. Надо отметить, что из всех анализируемых цитокинов корреляционные связи выявлены только у эритропоэтина (таблица 18).

Выявлена положительная корреляционная связь между уровнем продукции Еро и улучшением класса сердечной недостаточности через 12 месяцев, возрастанием фракции выброса левого желудочка через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК. Уровень продукции Еро связан с показателями перфузии миокарда, причем наблюдаются корреляционные связи

между Еро и улучшением перфузии в покое через 6 месяцев, и улучшением перфузии при нагрузке аденозином через 12 месяцев наблюдения.

Таблица 18 – Корреляционные связи концентрации Еро в кондиционной среде МНК после мобилизации с функциональными параметрами пациентов с ХСН (n = 20)

Исследуемые параметры		Уровень Еро, МЕ/мл
Класс СН (NYHA)	через 6 месяцев	R = 0,05 p = 0,9
	через 12 месяцев	R = 0,47 p = 0,046
Перфузия в покое	через 6 месяцев	R = 0,59 p = 0,049
	через 12 месяцев	R = 0,19 p = 0,12
Перфузия при нагрузке	через 6 месяцев	R = 0,28 p = 0,49
	через 12 месяцев	R = 0,67 p = 0,03
ФВЛЖ	через 6 месяцев	R = 0,75 p = 0,03
	через 12 месяцев	R = 0,45 p = 0,25
Примечания: 1. n – количество наблюдений 2. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – достоверность коэффициента корреляции		

Таким образом, имеющиеся корреляционные связи между показателями содержания в периферической крови пула клеток с прогениторной активностью, показателями продукции цитокинов МНК, мобилизованными G-CSF у пациентов с ХСН, с функциональными параметрами клинической эффективности при интрамиокардиальном введении МНК указывают на вовлеченность вводимых клеток в процесс регенерации и возможно ангиогенеза в ишемизированном

миокарде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 6

На основе проведенного анализа взаимосвязи параметров морфофункциональных свойств обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками мононуклеаров периферической крови с показателями функционального состояния ишемизированного миокарда пациентов с хронической сердечной недостаточностью можно утверждать, что мононуклеарные клетки периферической крови, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками, путем их мобилизации из костного мозга введением пациентам с хронической сердечной недостаточностью G-CSF, при интрамиокардиальном введении приводят к улучшению функционального состояния ишемизированного миокарда. Различные популяции разной степени дифференцировки ЭПК $CD34^+/CD133^-$, $CD34^+/CD133^+$ и $CD34^+/VEGFR_2^+$ оказывают влияние на функциональные показатели миокарда – перфузию миокарда и фракцию выброса левого желудочка, а секреторный уровень EPO связан с перфузией миокарда, фракцией выброса левого желудочка и с классом сердечной недостаточности в отдаленном периоде наблюдения, что свидетельствует о вовлеченности вводимых клеток в процесс регенерации ишемизированного миокарда.

РЕЗЮМЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таким образом, нами показано, что введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора пациентам с хронической сердечной недостаточностью приводит к эффективной мобилизации различных популяций разной степени дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток в периферическое русло крови, что сопровождается повышением функционального потенциала мононуклеарных клеток – пролиферативной, синтетической активности и способности к миграции.

Эндотелиальные прогениторные клетки пациентов с хронической сердечной недостаточностью, выращенные *in vitro*, обладают высоким пролиферативным потенциалом и в процессе дифференцировки секретируют проангиогенные ростовые факторы и цитокины. На уровень секреции проангиогенных биологически активных факторов в культуре оказывают влияние как сроки культивирования, так и белки внеклеточного матрикса.

Недифференцированные эндотелиальные прогениторные клетки и зрелые эндотелиальные клетки оказывают паракринное взаимовлияние на функциональное состояние друг друга, стимулируя пролиферацию и миграцию. Паракринные эффекты действия проангиогенных биологически активных факторов, секретируемых недифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками, сопоставимы со стимулирующим влиянием ангиогенных цитокинов.

Обогащение мононуклеарных клеток эндотелиальными прогениторными клетками в процессе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором приводит к улучшению функционального состояния ишемизированного миокарда пациентов после интрамиокардиального введения. Различные популяции разной степени дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью путем паракринных и аутокринных ангиогенных воздействий оказывают влияние на функциональные показатели миокарда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная биология и биология СПК является одной из самых активно развивающихся областей науки и в настоящее время по праву считается базисом регенеративной медицины. Развитие нового научного направления – регенеративной медицины напрямую связано с широким внедрением в клиническую практику методов клеточной терапии при лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний. Необходимость разработки новых подходов лечения сердечно-сосудистой патологии диктуется низкой эффективностью современных фармакологических и хирургических способов лечения и распространенностью ХСН, которая является одной из главных причин заболеваемости и смертности [10; 56].

Применяемые на сегодня методы лечения ХСН не способны восстанавливать структуру миокарда, а результатом лечения является достижение ремиссии. Прогрессирование же заболевания приводит к рефрактерности к «традиционной» терапии. На поздних стадиях единственно эффективным методом лечения остается пересадка сердца, однако возможности применения трансплантации сердца ограничены дефицитом донорских органов и жесткими критериями подбора. Поэтому в настоящее время существует потребность в разработке и внедрении альтернативных методов лечения ХСН [13; 31; 250].

Одним из новых направлений стимуляции репаративных процессов в ишемизированных органах является терапевтический ангиогенез. Для стимуляции ангиогенеза при ишемических заболеваниях используются такие подходы, как применение ангиогенных факторов роста в виде рекомбинантных белков или генетических конструкций, так и введение СПК [3; 11; 12; 18; 151; 327].

Однако перенос генов ангиогенных факторов (VEGF, FGF, HGF) не приводит к длительному клиническому эффекту. Очевидно, что одной из главных причин этого является участие в процессе ангиогенеза не одного или двух факторов, а комплекса ростовых факторов [231; 232].

Неоангиогенез представляет собой многоступенчатый процесс, причем с

участием не только зрелых эндотелиальных клеток, но и недифференцированных ЭПК и их секретируемых медиаторов [20; 148; 210].

Накопленные же знания о функциональных свойствах ЭПК позволили начать исследования механизмов их функционирования в экспериментальных моделях ишемических заболеваний, а полученные результаты научных исследований внедрять в клиническую практику [382].

В ряде экспериментальных исследований показано, что ЭПК эффективно стимулируют ангиогенез и васкулогенез, приводя к репарации сосудов ишемизированной ткани [84; 179; 328; 351].

Нами ранее проведено исследование по изучению ангиогенеза при внутримышечном введении МНК периферической крови после мобилизации G-CSF у мышей с ишемией нижних конечностей.

Оценка кровотока ишемизированной нижней конечности методом лазерной доплеровской флоуметрии показала увеличение микроциркуляции и восстановление кровотока через 14 суток после введения клеток.

Механизмом действия введенных мобилизованных СПК является стимуляция неонгиогенеза в местах введения клеток, что не сопровождается деструкцией и фиброзом мышечных волокон. Данные морфологического исследования представлены на рисунках 32, 33.

Более того, ЭПК (как костного мозга, так и мобилизованные в периферическую кровь) показали свою эффективность в лечении пациентов с ИБС и при облитерирующем атеросклерозе нижних конечностей [20; 26; 31; 108; 148; 199].

Основной упор в клинических исследованиях при оценке эффективности трансплантируемых СПК ставится на изучение фенотипа вводимых клеток, редко дополнительно исследуется миграция и идентифицируются введенные клетки в органах и тканях. В экспериментальных же работах более широко изучаются функциональные свойства различных популяций СПК – пролиферативный потенциал, миграционная и секреторная активность [14; 259; 359].

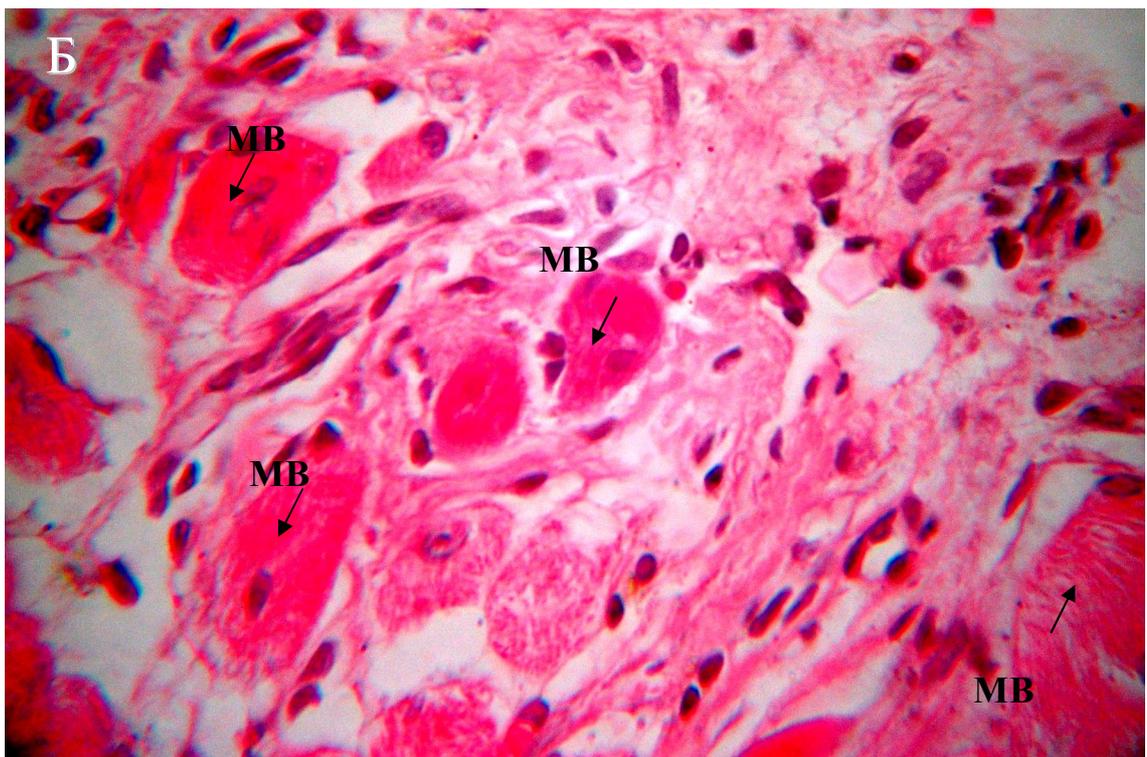
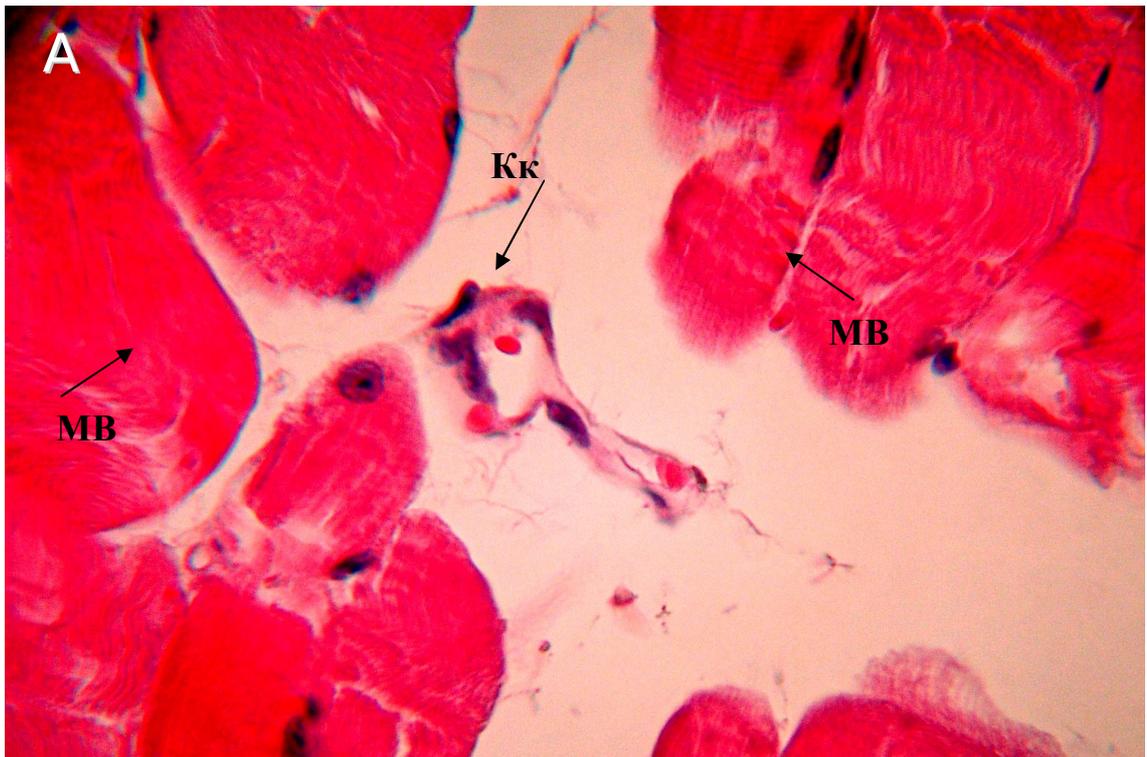


Рисунок 32 – А) Мышечные волокна голени интактной конечности (увеличение 10x40); Б) Деструкция мышечных волокон голени (модель ишемии). Увеличение 10×40. Обозначения: МВ – мышечные волокна; Кк – кровеносный капилляр

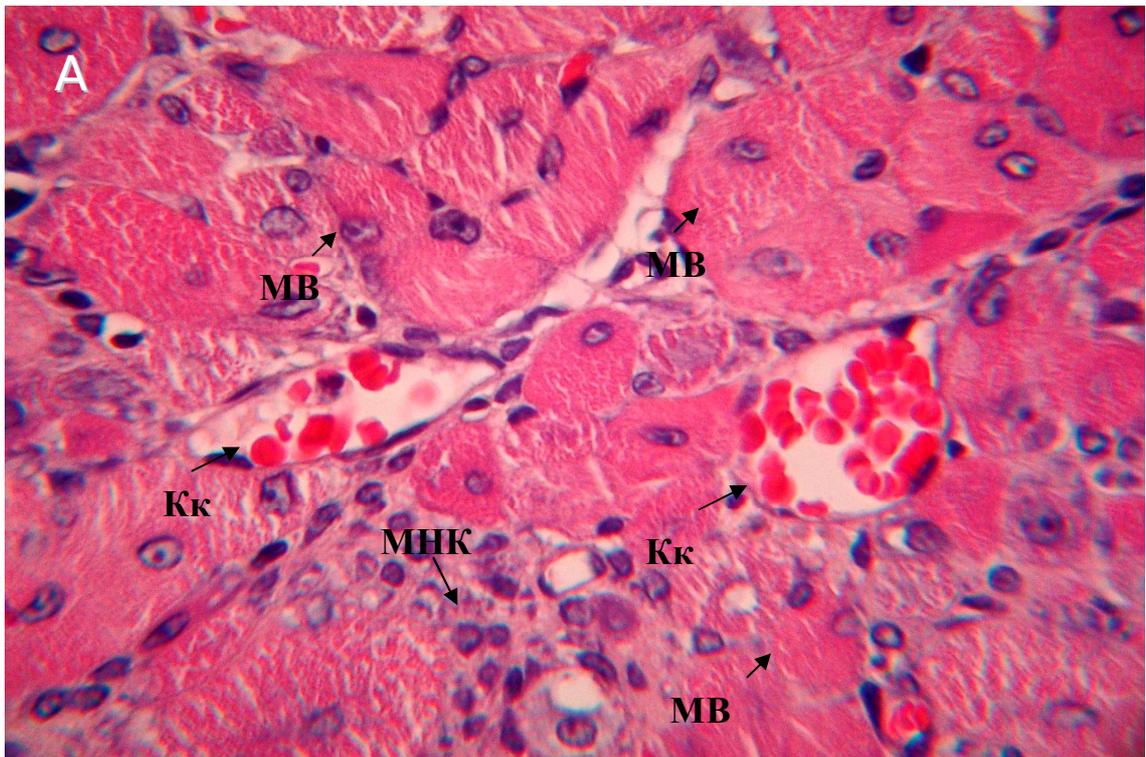


Рисунок 33 – Неоангиогенез между фрагментами мышечных волокон голени и скопления мононуклеарных клеток. А) – увеличение 10×40 ; Б) – увеличение 10×90 . Обозначения: MB – мышечные волокна; Кк – кровеносный капилляр; МНК – мононуклеарные клетки

Однако редко в одной работе проводится сочетание исследования фенотипа СПК и их функциональных свойств. В большинстве экспериментальных работ, посвященных изучению ЭПК, дается фенотипическая характеристика клеток, изучается способность к хоумингу, проводится анализ экспрессии генов, либо оценивается эффективность репарации ишемизированной ткани при введении ЭПК.

При этом недостаточно полно изучен спектр продуцируемых ЭПК цитокинов и ростовых факторов, пролиферативная активность ЭПК у пациентов с ХСН. Не исследованы аутокринные и паракринные механизмы взаимовлияния недифференцированных ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток. Кроме того, практически не исследованы связи морфофункциональных показателей клеток, применяемых для введения в организм, и показателей функционального состояния миокарда после введения.

В рамках одной работы мы объединили подходы морфологического, фенотипического анализа, и оценки функциональных свойств циркулирующих и полученных при культивировании *in vitro* ЭПК пациентов с ХСН при интрамиокардиальном введении [3; 16; 29; 30; 32].

Обычно ЭПК выделяют из костного мозга или альтернативным вариантом путем мобилизации ЭПК в периферическое русло крови [8; 48; 223].

Выбор G-CSF основывался на данных исследований, показавших его малую токсичность и быстрое обогащение периферической крови СПК [335].

Известно, что G-CSF вызывает мобилизацию СПК, в том числе и ЭПК, из костного мозга в периферическое русло крови, что облегчает процедуру забора клеток [292].

Само введение G-CSF в экспериментальных моделях ишемии миокарда приводило к положительной динамике – уменьшению размера инфаркта миокарда, снижению апоптоза кардиомиоцитов, но не способствовало репарации сосудов [270].

Однако результаты клинических испытаний у пациентов с сердечно-сосудистой патологией не позволяют сделать однозначный вывод о клинической эффективности применения G-CSF путем последовательных инъекций.

Поэтому в проводимом нами исследовании использовался подход сочетания мобилизации СПК с последующим локальным интрамиокардиальным введением МНК при их обогащении ЭПК [3; 118; 151].

Необходимо отметить, что в исследовании использовались аутологичные клетки, что имеет преимущество перед другими источниками их получения, так как собственные клетки не являются иммуногенными, а также снижен риск контаминации микроорганизмами.

По данным литературы известно, что введение G-CSF условно здоровым лицам ведет к увеличению количества лейкоцитов в периферической крови, обусловленное в основном разрастанием гранулоцитарного ростка кроветворения [22; 48; 265].

Эффективность мобилизации зависит как от дозы и режима введения G-CSF, так и от возраста и наличия заболеваний [137; 265; 280; 282].

Тем не менее, по данным различных авторов, как у здоровых людей, так и у пациентов, частота сниженной мобилизации регистрируется от 5 % до 40 % случаев [37].

Поэтому первоочередная задача нашего исследования состояла в оценке способности G-CSF при введении в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки приводить к мобилизации СПК, в том числе ЭПК. Данная доза была определена на основании анализа результатов ряда исследователей в связи с минимизированием активирования других ростков кроветворения [48; 104].

На самом деле, нами также показано, что при таком введении G-CSF приводит к экспансии нейтрофилов и существенно не влияет на количество моноцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и СОЭ [30]. На 6-е сутки после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН отмечено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов в периферической крови до $(31,25 \pm 6,03) \times 10^9/\text{л}$, что на 30 % меньше уровней у условно здоровых лиц. Скорее

всего, это можно объяснить как более молодым возрастом доноров, так и наличием ишемического поражения миокарда у пациентов.

Следует отметить, что спустя 6 месяцев показатели периферической крови пациентов с ХСН, получивших курс мобилизации G-CSF, пришли к исходным значениям, что сопоставимо с аналогичными данными у условно здоровых лиц [48].

Эффекты G-CSF на клетки кроветворной системы включают и стимуляцию миграции, пролиферации и дифференцировки СПК, в том числе ЭПК [48].

Из данных литературы известно, что в периферической крови здоровых доноров циркулирует небольшое количество ЭПК, а применение G-CSF приводит к их мобилизации из костного мозга в периферическую кровь [280; 282].

В то же время наличие длительного ишемического анамнеза с тяжелой прогрессирующей сердечной недостаточностью, принятие некоторых фармакологических препаратов (бета-блокаторы, аспирин, нитраты) может существенно ограничивать мобилизацию и оказывать влияние на свойства ЭПК [108; 154].

Для идентификации циркулирующих в периферической крови ЭПК авторы в основном используют классическую триаду маркеров: CD34, CD133 как маркеры стволовых клеток, и VEGFR₂, как маркер эндотелиальных клеток [63; 130].

Однако в ряде работ показано, что в ангиогенезе участвуют не только ЭПК костномозгового происхождения, но и моноцитарного, характеризующиеся экспрессией маркера CD14. Кроме того, альтернативой VEGFR₂ служит маркер CD31, который экспрессируется на зрелых эндотелиальных клетках [105; 277; 280; 310].

Сочетания экспрессии этих маркеров фенотипически характеризуют различные популяции циркулирующих в периферической крови ЭПК, находящихся на разных стадиях дифференцировки [187].

Нами идентифицировано девять типов ЭПК у пациентов с ХСН по анализу сочетания экспрессии различных CD маркеров. Необходимо отметить, что такого

полного анализа циркулирующих ЭПК, как в базальных условиях, так и при мобилизации G-CSF при ХСН, в литературе не представлено. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о низком содержании «классических» популяций ЭПК у пациентов с ХСН [164; 282].

У пациентов с ХСН до проведения процедуры мобилизации G-CSF нами отмечено наличие незначительного количества ЭПК, за исключением циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом $CD34^-/CD31^+$ и $CD34^-/VEGFR_2^+$, $CD14^-/VEGFR_2^+$, а также ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$. Клетки с фенотипом $CD34^+/CD133^+$, в силу того факта, что маркер CD133 характерен для менее «зрелых» стволовых клеток, составляют пул более «ранних» ЭПК, чем клетки с фенотипом $CD34^+$ [145; 191; 234].

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что из костного мозга в ответ на длительный ишемический запрос, обусловленный наличием ИБС, в периферическое русло мобилизуется меньшее количество ЭПК по сравнению с острым ишемическим поражением при инфаркте, что демонстрируют различные авторы. А в силу возраста пациентов и сопутствующих заболеваний у циркулирующих ЭПК снижена функциональная активность, что не может обеспечить репарацию ишемизированного миокарда [303; 306; 350].

После проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН в периферическом русле происходит резкое возрастание процентного содержания всех исследуемых популяций ЭПК, что подтверждает эффективность G-CSF как мобилизующего фактора прогениторных клеток.

Необходимо отметить, что по данным литературы у пациентов с ХСН выявлено меньшее количество ЭПК в периферической крови как до, так и после проведения процедуры мобилизации G-CSF, по сравнению со здоровыми донорами [164; 303]. В частности, у здоровых доноров отмечается возрастание пула ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD133^+$ – с $(0,12 \pm 0,04) \%$ до $(2,65 \pm 0,42) \%$. В то же время отмечено, что ЭПК, экспрессирующие одновременно три маркера $CD34^+/CD133^+/VEGFR_2^+$, циркулируют в ничтожно малых количествах (около

0,002 % от общего количества МНК) [145].

Аналогичная картина количественных изменений популяций ЭПК у пациентов с ХСН после завершения курса мобилизации G-CSF выглядит при перерасчете относительных значений в абсолютные количественные показатели.

Нами выявлено увеличение количества ЭПК с фенотипом $CD34^+$ с $0,238 \times 10^6/\text{л}$ до $18,7 \times 10^6/\text{л}$, которое подтверждается данными иммуноцитохимического анализа, указывающего на экспрессию данной молекулы на поверхности клеток. Помимо этого, отмечено возрастание популяции «незрелых» ЭПК с фенотипом $CD34^-/CD133^+$ (с $1,65 \times 10^6/\text{л}$ до $15,4 \times 10^6/\text{л}$). Из данных литературы известно, что клетки с фенотипом $CD34^-/CD133^+$ можно отнести к пулу «незрелых» ЭПК, дающих начало дифференцировки в $CD34^+$ ЭПК [191]. Также отмечено возрастание количества классических популяций ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD133^+$ (с $0,23 \times 10^6/\text{л}$ до $0,96 \times 10^6/\text{л}$) и ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ (с $0,205 \times 10^6/\text{л}$ до $3,95 \times 10^6/\text{л}$). ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ относятся к более зрелой популяции ЭПК, так как экспрессия поверхностной молекулы $VEGFR_2$ характерна для зрелых эндотелиальных клеток. Кроме того, доказана способность ЭПК с фенотипом $CD34^+/VEGFR_2^+$ дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [80; 368]. Отмечено и увеличение пула более зрелых ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ (с $1,7 \times 10^6/\text{л}$ до $8,4 \times 10^6/\text{л}$), зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом $CD34^-/VEGFR_2^+$ (с $5,25 \times 10^6/\text{л}$ до $43,4 \times 10^6/\text{л}$) и $CD34^-/CD31^+$ (с $221,4 \times 10^6/\text{л}$ до $543,0 \times 10^6/\text{л}$) и ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом $CD14^+/VEGFR_2^+$ (с $9,8 \times 10^6/\text{л}$ до $84,8 \times 10^6/\text{л}$) после завершения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН.

Результаты исследований не противоречат имеющимся литературным данным об увеличении абсолютного количества «классических» ЭПК в периферической крови пациентов с ХСН по завершении курса мобилизации G-CSF [162; 164; 282].

Необходимо добавить, что мобилизация ЭПК проходит у пациентов с различной степенью эффективности, и, следовательно, содержание отдельных

популяций ЭПК находится в широких пределах.

Пациенты, подвергшиеся процедуре мобилизации G-CSF, по возрасту попадают в старшую возрастную группу (средний возраст составляет 57 лет), также имеют длительный период ишемии миокарда, и у большинства из них в анамнезе было до 5 инфарктов миокарда.

При анализе взаимосвязи ЭПК с возрастом пациентов и ишемическим анамнезом нами выявлена обратная корреляционная связь между количеством ЭПК с фенотипом $CD34^+VEGFR_2^+$ после мобилизации G-CSF и длительностью ишемического анамнеза. Таким образом, у пациентов с небольшой длительностью ИБС при введении G-CSF наблюдается более высокий уровень $CD34^+VEGFR_2^+$ ЭПК в периферической крови. Количество ЭПК после мобилизации не зависит от возраста и количества перенесенных инфарктов.

Однако ранее нами показано, что у более молодых пациентов (моложе 50 лет), с меньшим количеством перенесенных ИМ (не более одного эпизода) и длительным ишемическим анамнезом (более десяти лет) после курса мобилизации G-CSF наблюдается наибольший выход $CD34^+$ ЭПК в периферическую кровь [32]. Полученные нами данные не противоречат имеющимся в литературе данным о том, что длительный ишемический анамнез и количество эпизодов инфаркта могут приводить к истощению пула СПК клеток в костном мозге [154].

Таким образом, согласно вышеприведенным данным у пациентов с ХСН введение G-CSF способствует выходу в периферическое русло крови ЭПК, находящихся на различных этапах дифференцировки, а также стимулируется выработка ЭПК из альтернативного источника возобновления дефицита ЭПК – моноцитов.

На основании результатов исследования и имеющихся данных литературы можно предположить, что дифференцировка и созревание ЭПК может происходить по следующему пути:

1) $CD133^+/CD34^-$ («незрелые» предшественники ЭПК) → $CD34^+$ (общая клетка для ГСК/ЭПК) → $CD34^+/CD133^+$ («ранние» ЭПК) →

$CD34^+/CD133^+/VEGFR_2^+ \rightarrow CD34^+/CD133^-/VEGFR_2^+/-/CD31^+/-$ («зрелые» ЭПК) $\rightarrow CD34^-/CD133^-/CD31^+/VEGFR_2^+ \rightarrow$ эндотелиальная клетка;

2) альтернативный путь созревания ЭПК из моноцитов: $CD34^+$ (общая клетка для ГСК/ЭПК) $\rightarrow CD14^+ \rightarrow CD14^+/VEGFR_2^+ \rightarrow CD14^-/VEGFR_2^+ \rightarrow$ эндотелиальная клетка.

Но не всегда количество клеток является гарантией проявления ими своих функциональных свойств, а при длительном ишемическом анамнезе происходят нарушения не только количественного состава ЭПК периферической крови, но и их функциональной активности [243].

Оценка пролиферации является первым, подчас основным критерием характеристики функционального состояния клеток. Количественная же оценка пролиферации МНК в спланированных экспериментальных условиях может служить мерой их реактивности на тот или иной внешний стимул.

Нами показано, во-первых, что пролиферация МНК, выделенных из крови пациентов после введения им G-CSF, выше по сравнению с исходными показателями до мобилизации. Во-вторых, митоген Кон А и ростовой фактор G-CSF значительно стимулируют пролиферацию МНК после мобилизации. Полученные данные, с одной стороны, говорят об активации Т-лимфоцитов в ответ на Т-клеточный митоген.

С другой стороны, клетки с фенотипом $CD34^+$ вносят определенный вклад в повышение пролиферативной активности МНК, что может служить косвенным доказательством того, что интенсивность пролиферативного потенциала в некоторой части обеспечена ЭПК, мобилизованными G-CSF из костного мозга пациентов [29].

Однако полученные результаты касаются пациентов с ХСН и не всегда согласуются с данными литературы, которые представлены анализом пролиферативных свойств клеток периферической крови у здоровых доноров. Так, в литературе показано, что после введения G-CSF уменьшается пролиферативный потенциал $CD4^+$ Т-лимфоцитов в ответ на аллоантигены [176]. Это может быть связано с большей дозой вводимого G-CSF (16 мг/кг веса) и

проведением исследования у здоровых доноров, а с другой стороны – с активацией Т-регуляторных клеток.

Исследование фаз клеточного цикла в популяции CD34-позитивных МНК показало, что к окончанию мобилизации 10,5 % клеток активно пролиферируют [29]. Следовательно, большинство клеток с фенотипом CD34⁺ находятся в стадии покоя, и при дополнительном внешнем цитокиновом или антигенном стимуле способны вступать в фазу синтеза и митоза клеточного цикла, что согласуется с данными литературы [166]. Так показано, что у здоровых доноров после введения G-CSF происходит увеличение количества CD34⁺ клеток до 4 % [99].

Кроме того, пролиферативная активность и вклад мобилизованных ЭПК в пролиферацию подтверждается увеличением колониеобразующей активности МНК после мобилизации G-CSF, что показано в литературе и у здоровых доноров [48].

Известно, что способность к хоумингу является одной из функциональных характеристик активности ЭПК. Фактором, способствующим хоумингу ЭПК, является SDF-1. Связь сигнализирующей молекулы SDF-1 с его рецептором CXCR₄ является важным механизмом в нише костного мозга, который регулирует мобилизацию и миграцию прогениторных клеток в периферическое русло [238].

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 $1,6 \times 10^6/\text{л}$ до $1,06 \times 10^6/\text{л}$). Это отражает возросшую способность данной популяции ЭПК к миграции в область ишемизированного миокарда и вероятность встраивания клеток в поврежденный миокард у данных пациентов.

Полученные нами данные согласуются с недавно проведенным исследованием, в котором показана прямая корреляция количества ЭПК с фенотипом CD34⁺/CXCR₄⁺ с увеличением фракции выброса левого желудочка у пациентов с острым инфарктом. Данная связь определяется сразу после лечения и сохраняется через год наблюдения [260]. Кроме того, Chen J. et al. показано, что именно эта популяция ЭПК отвечает не только за миграцию клеток, но и является

«сосудообразующей». Введение $CD34^+/CXCR_4^+$ клеток в периинфарктную зону при экспериментальной ишемии способствует неоангиогенезу, а *in vitro* увеличивает миграцию эндотелиальных клеток и ведет к образованию первичных сосудистых тубулярных структур [364]. Полученные данные свидетельствуют об участии данной популяции ЭПК в регенерации ишемизированного миокарда.

Активно пролиферирующие клетки после мобилизации, по сути мононуклеарные клетки периферической крови, обогащенные прогениторными клетками, могут репарировать миокард при их введении, дифференцируясь в эндотелиальные клетки и кардиомиоциты.

Но для дифференцировки вводимых клеток требуется время, да и процент приживания СПК и образования кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток дискутируется в литературе [77; 250; 269; 281; 285; 354].

В настоящее время паракринный механизм действия рассматривается более вероятным, поскольку цитокины и ростовые факторы являются сильным пусковым механизмом в регенерации поврежденных тканей и органов [166; 340].

Цитокины продуцируются клетками как конститутивно, так и при активировании внешними стимулами, и являются регуляторами межклеточных взаимодействий, определяют выживаемость, рост, дифференцировку и функциональную активацию клеток.

Нами показано, что МНК, обогащенные ЭПК, у пациентов с ХСН продуцируют широкий спектр цитокинов с провоспалительным и противовоспалительным действием, ростовых факторов – $TNF-\alpha$, IL-8, IL-10, IL-18, EPO, G-CSF и VEGF. Данные цитокины по данным литературы обладают и проангиогенным действием [95; 136; 215; 293; 336; 352; 376].

При этом в ходе мобилизации G-CSF выявлено изменение их уровней продукции – снижение продукции цитокина с провоспалительным действием $TNF-\alpha$, увеличение продукции IL-18, EPO, VEGF и сохранность уровня продукции IL-10, IL-8, G-CSF. Функциональный же резерв мобилизованных МНК, содержащих ЭПК, в виде ответа на митогенные стимулы, оставался высоким.

Нами показано, что стимуляция МНК Т-клеточным митогеном Кон А

приводит к увеличению секреции в культуральную среду анализируемых цитокинов, за исключением VEGF и IL-8 после мобилизации. Стимуляция же ЛПС, являющимся митогеном для клеток моноцитарного ряда у человека, не увеличивает продукцию МНК IL-8 после мобилизации и IL-18 и G-CSF до мобилизации.

Очевидно, что ряд цитокинов секретируется преимущественно Т-лимфоцитами, другие – моноцитами, которые накапливаются в культуральной среде в течение 72 часов.

Кроме того, из данных литературы следует, что введение G-CSF приводит к мобилизации в периферическую кровь кроме гемопоэтических и эндотелиальных СПК и ММСК, что может повышать не только функциональную пролиферативную активность МНК, но и секрецию ими цитокинов и ростовых факторов [108].

Полученные результаты по продукции TNF- α при культивировании МНК согласуются с данными литературы, которые показали снижение после мобилизации продукции TNF- α и увеличение IL-10 ЛПС-стимулированными МНК и моноцитами здоровых доноров [176]. В то же время, в экспериментальных работах есть данные о неизменном уровне TNF- α [169; 337]. В отношении других цитокинов в литературе показано, что при мобилизации у здоровых доноров возрастает уровень IL-8 в 29 раз в сыворотке, что коррелирует с количеством CD34⁺ клеток и количеством КОЕ [48].

Такие противоречивые результаты, очевидно, связаны с рядом факторов – определением уровня цитокинов в сыворотке крови, а не при культивировании МНК; включением в исследование доноров; разными условиями культивирования МНК.

Спектры биологических активностей цитокинов в значительной степени перекрываются, стимулируя процессы репарации более чем одним цитокином. Кроме того, цитокины обладают полифункциональным действием. Основными продуцентами цитокинов являются зрелые дифференцированные клетки иммунной системы. Также показано, что различные популяции клеток костного

мозга способны продуцировать ростовые проангиогенные факторы. Очевидно, что ЭПК после мобилизации вносят определенный вклад в уровни секреторной активности МНК.

На самом деле, уровень продукции пяти цитокинов – TNF- α , IL-18, EPO, VEGF, IL-10 был тесно связан с количеством различных популяций ЭПК после мобилизации G-CSF. Так, выявлена высокая и прямая сопряженность количества ранних в дифференцировочном отношении анализируемых ЭПК с фенотипом CD34⁻/CD133⁺, CD34⁺/VEGFR₂⁻, CD34⁺/VEGFR₂⁺, CD34⁺/CD31⁺ с уровнем продукции TNF- α , IL-18 и VEGF. А популяции зрелых ЭПК с фенотипом CD34⁻/VEGFR₂⁺, CD34⁻/CD31⁺ положительно коррелировали с уровнем продукции IL-10, EPO и VEGF.

Сравнить полученные результаты корреляционного исследования с данными литературы не представляется возможным в связи с их отсутствием. Есть только единичные исследования уровня циркулирующих ЭПК и уровня цитокинов в сыворотке, данные которых противоречивы. Некоторые авторы не показывают взаимосвязи сывороточных уровней VEGF и GM-CSF и количества CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ ЭПК, в других исследованиях уровень VEGF напрямую коррелирует с количеством ЭПК [206; 252].

Таким образом, выявленные корреляционные связи позволяют предположить, что циркулирующие разной степени дифференцировки ЭПК принимают активное участие в продукции цитокинов, обладающих выраженной проангиогенной активностью.

Цитокины действуют на клетки различными путями: аутокринно – на клетку, синтезирующую и секретирующую данный цитокин; паракринно – на клетки, расположенные вблизи клетки-продуцента. Аутокринные и межклеточные паракринные цитокиновые взаимодействия во многом определяют функциональное состояние клеток. В то же время, цитокины способны оказывать влияние на клетки путем изменения экспрессии рецептора или служить индуктором синтеза клетками других цитокинов. В ответ на активационный сигнал может происходить синтез клетками одновременно нескольких цитокинов,

участвующих в формировании цитокиновой сети. Биологические эффекты в тканях и на уровне организма зависят от присутствия и концентрации других цитокинов с синергичным или противоположным действием.

Из данных литературы следует, что ЭПК, также как и макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, продуцируют VEGF, который является одним из важнейших факторов, регулирующих ангиогенез [338; 352]. В физиологических условиях продукция VEGF слабо выражена. Индукторами секреции VEGF могут выступать различные цитокины и ростовые факторы, в том числе IL-18, G-CSF, EPO, IL-10 [159; 168; 213; 216; 240]. VEGF, как и G-CSF, стимулирует пролиферацию и миграцию ЭПК из костного мозга, ингибирует апоптоз и поддерживает ангиогенный потенциал зрелых эндотелиальных клеток. G-CSF также стимулирует продукцию NO, что повышает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [159; 334]. IL-18 обладает проангиогенным действием, поскольку индуцирует миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* и способствует формированию сосудов как *in vitro*, так и *in vivo* [212]. IL-8 продуцируется только в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами, такими, как TNF и IL-1 β , способствует хоумингу ЭПК в ишемизированные ткани и усиливает эффект G-CSF при мобилизации [279]. EPO обладает проангиогенным действием, схожим с VEGF и FGF [136; 205; 304]. Показано, что кратковременное культивирование ЭПК с EPO значительно стимулирует их пролиферацию, миграцию и образование первичной тубулярной сосудистой сети, приводит к увеличению плотности капилляров при экспериментальной ишемии [300]. TNF- α воздействует на различные звенья ангиогенеза, индуцируя миграцию эндотелиальных клеток, образование первичных сосудистых структур, стимулирует продукцию MMP в эндотелии [367]. Показано, что TNF- α индуцирует гены других цитокинов с проангиогенными свойствами – IL6 и IL8 [95]. В свою очередь IL-10 способствует снижению воспалительной реакции в зоне ишемии и оказывает кардиопротективное действие на функцию миокарда [214].

Нами тоже выявлены определенные цитокиновые взаимодействия в

культуре МНК *in vitro*. Если до мобилизации G-CSF и EPO увеличивают продукцию IL-10, IL-18, IL-8 и EPO, то после мобилизации G-CSF стимулирует секрецию трех цитокинов – TNF- α , IL-10 и IL-18, а EPO увеличивает продукцию всех анализируемых цитокинов. Только EPO увеличивает секрецию VEGF в культуре, стимулированную введением G-CSF пациентам.

Наличие прямой корреляционной связи между уровнем спонтанной продукции IL-10 и уровнем G-CSF-стимулированной продукцией IL-18, между спонтанной продукцией IL-18 и EPO-стимулированной продукцией IL-10, и обратной зависимости спонтанного уровня IL-8 и стимулированного уровня IL-18, между уровнем G-CSF-стимулированной и EPO-стимулированной продукцией TNF- α , свидетельствует о том, что ростовые факторы и цитокины, секретируемые обогащенными ЭПК мононуклеарными клетками периферической крови, обладая паракринным потенциалом, способны осуществлять и аутокринное действие, контролируя секрецию клетками биологически активных веществ.

Таким образом, комплексные многоуровневые паракринные и аутокринные взаимоотношения, выявленные в культуре, могут предполагать наличие биологических эффектов в тканях и на уровне организма при введении СПК пациентам, что также может зависеть от присутствия в организме других цитокинов с синергичным или противоположным действием.

ЭПК мигрируют из ниши костного мозга в кровеносное русло, циркулируют и трансформируются в тканях в локальные адгезивные тканевые ЭПК [64; 263]. Адгезия и трансмиграция являются составной частью хоуминга ЭПК в ткани с активным ангиогенезом и в зону ишемии.

В ряде исследований показано, что дифференцировку ЭПК проводят при культивировании МНК периферической крови в специальной эндотелиальной среде, содержащей факторы роста, на обработанном белками внеклеточного матрикса культуральном пластике.

Циркулирующие в периферической крови ЭПК здоровых доноров способны дифференцироваться *in vitro* в два типа ЭПК («ранние» и «поздние») [90; 130; 305].

В связи с этим необходимо было исследовать способность МНК пациентов с ХСН при их обогащении ЭПК путем мобилизации образовывать культуры эндотелиальных клеток *in vitro*, как отражение функционального состояния циркулирующих ЭПК.

Известно, что внеклеточный матрикс не только обеспечивает механическую поддержку клеток, но и регулирует функциональные свойства контактирующих с ним клеток – пролиферацию, миграцию, дифференцировку [62; 66; 256].

Для выделения и культивирования ЭПК используют фибриллярные белки внеклеточного матрикса, основными из которых являются фибронектин, коллаген и желатин (гидролизированный коллаген) [40; 184].

Нами было показано, что МНК, обогащенные ЭПК, от пациентов с ХСН способны дифференцироваться и давать начало культурам «ранних» и «поздних» эндотелиальных клеток. Причем, невысокая пролиферативная активность показана для «ранних» клеток, а при культивировании свыше 14 дней образуются «поздние» ЭПК, что сопровождается формированием кластеров и активной пролиферацией клеток. Морфологически «ранние» и «поздние» ЭПК также различались.

Необходимо отметить, что культивирование на различных белках – фибронектине и желатине не влияло на пролиферативную активность ЭПК, что согласуется с данными литературы [90; 130; 148; 305].

Как известно, «ранние» и «поздние» ЭПК вносят различный вклад в ангиогенез, различаются не только морфологически, но и функционально [87; 148; 191]. «Ранние» ЭПК участвуют в регенерации эндотелиальных клеток путем паракринных механизмов, а «поздние» способны напрямую участвовать в ангиогенезе. Поэтому необходимо было исследовать особенности функционирования ЭПК у пациентов с ХСН, изучая спектр продукции цитокинов и ростовых факторов при культивировании.

Показано, что ЭПК при культивировании как на фибронектине, так и на желатине, продуцируют широкий и схожий спектр цитокинов и ростовых факторов – TNF- α , IL-10, IL-18, IL-8, EPO, G-CSF, VEGF. Однако уровень

продукции зависит от сроков культивирования и влияния белков внеклеточного матрикса. В целом на фибронектине уровень продукции анализируемых цитокинов выше в ранние сроки культивирования. На желатине «поздние» ЭПК больше секретируют IL-10, IL-18 и VEGF. Полученные результаты не противоречат данным литературы, в которых культивирование на желатине сопровождается увеличением продукции «поздними» ЭПК IL-18 и главного стимулятора ангиогенеза VEGF [305]. Также показано, что «ранние» ЭПК непосредственно напрямую не участвуют в формировании сосудистой сети, а обладают паракринным действием, продуцируя высокий уровень проангиогенных пептидов, таких как VEGF, HFG, G-CSF, IL-8, IL-17 [42; 310; 338].

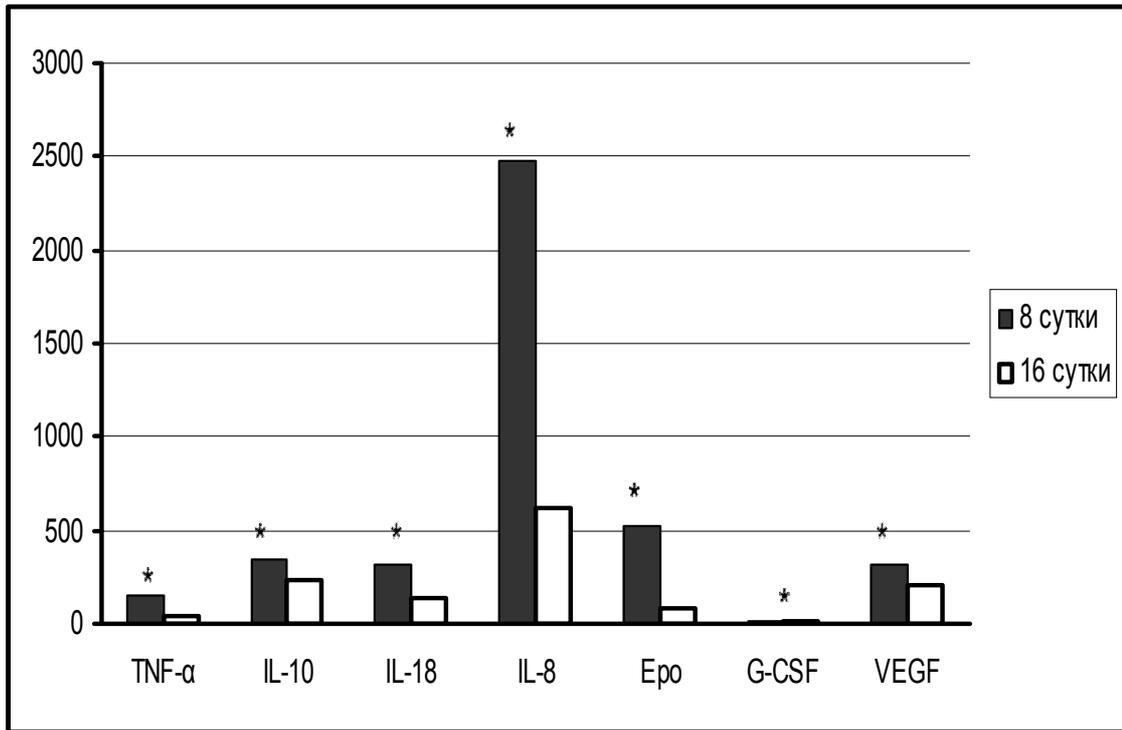
Некоторые авторы считают, что «ранние» ЭПК в основном представлены на фибронектине, тогда как «поздние» лучше формируются на коллагене или желатине [312]. При таких условиях культивирования «поздние» больше секретируют IL-8, который обеспечивает хоуминг ЭПК и образование сосудистых структур.

При анализе кумулятивного показателя уровня цитокинов, суммируя данные на фибронектине и желатине, нами показано, что уровень всех анализируемых цитокинов выше при культивировании в ранние сроки (рисунок 34).

Известно, что ЭПК и эндотелиальные клетки способны продуцировать NO, который регулирует тонус сосудистой стенки, участвует в пролиферации и миграции клеток [178].

Нами показано, что ЭПК, культивировавшиеся на фибронектине, с увеличением срока культивирования статистически значимо снижают уровень продукции NO, в то время как для ЭПК, культивированных на желатине, характерно увеличение уровня продукции NO к 16-м суткам.

Молекулярные свойства NO способствуют быстрой сигнализации между соседними клеточными элементами, а направленность действия зависит от типов клеток-мишеней и от физиологического состояния клеток-эффекторов, экспрессирующих различные изоформы eNOS.



Примечания:

1. n – количество наблюдений;
2. данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений (LQ – UQ);
3. по оси абсцисс - анализируемые цитокины; по оси ординат - концентрации цитокинов в пг/мл (Epo – ME/мл);
4. * – достоверность различия параметров на 8-е и 16-е сутки культивирования ЭПК, $p < 0,05$

Рисунок 34 – Результаты исследования концентраций цитокинов и ростовых факторов ЭПК, культивированных в разные сроки (n=16)

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, что не противоречит данным литературы [178].

Следовательно, культуры ЭПК способны к продукции схожего спектра биологически активных веществ, но уровни продукции их клетками различаются. Это является существенным для проявления их функциональных свойств. «Ранние» ЭПК выступают как клетки-продуценты биологически активных веществ с целью обеспечения быстрой пролиферации и дифференцировки ЭПК в

«поздние» эндотелиальные клетки. В отличие от ранних, «поздние» ЭПК не обладают паракринным действием, секретируют необходимый для самоподдержания и созревания ЭПК в полноценные эндотелиальные клетки уровень ростовых факторов. «Ранние» и «поздние» ЭПК способствуют неангиогенезу за счет синергичного взаимодействия между собой, обеспечивая сосудобразование и перфузию в ишемизированной ткани [341].

Внеклеточный матрикс не только регулирует функциональные свойства ЭПК, но и влияет на пролиферацию, миграцию, дифференцировку зрелых эндотелиальных клеток [62; 66; 256].

Нами проведено изучение миграции клеток EA. hu926 в экспериментальных моделях, по нашему мнению, отражающих эффекты фибронектина на эндотелиальные клетки *in vivo*. Первая модель напоминает поведение эндотелиальных клеток, прикрепившихся в месте повреждения эндотелиальной выстилки сосудов. Вторая модель схожа с поведением эндотелиальных клеток, мигрирующих в межклеточном пространстве в направлении дефектов стенки сосудов или же в область роста новых сосудистых структур (фибронектин вносился в нижнюю камеру лунки, тем самым создавался градиент вещества, в направлении которого мигрируют клетки эндотелиальной линии EA. hu926).

Было установлено, что VEGF, TNF- α и EPO стимулировали миграционный потенциал EA. hu926 при их культивировании с фибронектином. Выявленное снижение миграционной активности EA. hu926 при преинкубации лунок с фибронектином в начальные часы исследования объясняется наличием рецептора к фибронектину, обуславливающего адгезию к нему. Не исключено, что фибронектин адсорбировался не только на нижней поверхности мембраны верхней части камеры, но и проник на верхнюю поверхность, таким образом некоторая часть клеток могла прикрепиться в верхней части камеры к фибронектину и не мигрировать в направлении градиента ростовых факторов, находящихся в нижней части камеры. Это косвенно подтверждается тем фактом, что при добавлении дополнительных ростовых факторов часть клеток мигрирует по направлению к градиенту стимуляторов миграции эндотелиальных клеток.

Полученные результаты исследования миграции на клеточном анализаторе позволили выявить изменения динамики миграции клеток под влиянием различных моделей экспериментальных исследований, что очень важно на ранних сроках эксперимента.

Таким образом, миграция эндотелиальных клеток зависит от белков внеклеточного окружения, которые способствуют взаимодействию клеток в межклеточном пространстве, тем самым обеспечивая процессы неоангиогенеза.

Функциональная активность ЭПК зависит также от влияния на них биологически активных веществ, продуцируемых клетками, участвующими в неоваскулогенезе [5; 21]. Зрелые эндотелиальные клетки способны оказывать регулирующее влияние на ЭПК путем паракринных механизмов.

Нами показано, что эндотелиальные клетки EA.hy926 секретируют и накапливают в кондиционной среде цитокины, ростовые факторы и метаболиты NO, что не противоречит данным литературы [5]. Однако уровень некоторых секретируемых метаболитов зрелыми эндотелиальными клетками и недифференцированными ЭПК при одинаковых условиях культивирования различается. Так, в кондиционной среде эндотелиальных клеток ниже содержание VEGF, IL-10 и TNF- α , и выше IL-18 и особенно G-CSF. Полученная при культивировании EA.hy926 КС содержит сопоставимый с КС ЭПК уровень IL-8, EPO и NO.

Сравнительного исследования секреторных факторов зрелых и недифференцированных эндотелиальных клеток в литературе не представлено, за исключением IL-1 β , уровень которого в КС CD34⁺ ЭПК выше, чем в КС зрелых эндотелиальных клеток [194].

Рядом авторов показан секретом зрелых эндотелиальных клеток, включающий множество факторов роста, хемокинов и цитокинов – GM-CSF, G-CSF, M-CSF, PDGF, VEGF, FGF, IL-3, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 [47].

Показано, что на клетках эндотелиальной линии EA.hy926 имеются рецепторы к EPO. Можно предполагать, что IL-18 и G-CSF более необходимы для

миграции зрелых эндотелиальных клеток, а ЭПК путем продукции VEGF, IL-10 и TNF- α обеспечивают паракринные эффекты, влияя на различные этапы образования сосудов [170; 212; 376]. Необходимо отметить, что секреция эндотелиальными клетками различных медиаторов необходима и для поддержания функциональной активности в культуре.

Моделируя паракринные взаимоотношения зрелых и недифференцированных эндотелиальных клеток, мы изучали влияние растворимых факторов, содержащихся в КС ЭПК и EA. hu926, друг на друга. Функциональные свойства клеток оценивались по двум параметрам – пролиферативному потенциалу и миграционной активности методом изучения клеточного индекса на приборе xCELLigence System в режиме реального времени. Для сравнительного исследования при культивировании использовали цитокины, влияющие на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток – VEGF, G-CSF, EPO и TNF- α . Миграция культур ЭПК *in vitro* под влиянием ряда цитокинов имитирует процесс миграции *in vivo* [5; 80].

Нами показано, что пролиферация и миграция культуры ЭПК значительно увеличивалась в присутствии КС от клеток эндотелиальной линии EA. hu926. Причем КС оказывал более сильный эффект на пролиферацию, чем VEGF, G-CSF и EPO. Необходимо отметить, что стимулирующий эффект анализируемых факторов проявлялся уже через 4 часа наблюдения, чего ранее другими исследователями показано не было. Факт такой ранней пролиферации и миграции еще раз подчеркивает связь быстрого эффекта при введении ЭПК в организм с паракринными механизмами действия клеток.

Таким образом, столь высокое паракринное влияние клеток эндотелиальной линии EA. hu926 объясняется комплексным содержанием биологически активных веществ в КС, что перекликается с данными литературы [116]. С другой стороны, растворимые продукты ЭПК также увеличивают пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток EA. hu926, что сравнимо с действием EPO. Полученные результаты согласуются с данными литературы, показавшими, что КС ЭПК способствует ангиогенезу *in vitro*, мобилизации CD34⁺ ЭПК из костного мозга и

хомингу в места ишемии [117; 120]. Так, в работе, опубликованной в 2014 году, показано, что КС, полученная при культивировании «ранних» ЭПК здоровых доноров, содержит EGF, FGF, тромбopoэтин, PDGF, VEGF и VEGF-D. Добавление КС ЭПК к эндотелиальным клеткам приводит к их активации – пролиферации и образованию тубулярных сосудистых структур [353].

Важно отметить, что стимулирующее влияние КС от культуры ЭПК на миграцию клеток эндотелиальной линии человека EA. hu926 определено и в других экспериментальных условиях – модели десквамированного слоя эндотелия («раны»).

Нами показано, что скорость заживления раневой поверхности под воздействием КС от культуры ЭПК в 1,5 раза превышала спонтанную миграцию клеток эндотелиальной линии человека EA. hu926.

Полученные результаты согласуются с полученными Di Santo S. и коллегами данными. Авторы показали, что КС, полученная при культивировании «ранних» ЭПК здоровых доноров, в 2 раза быстрее способствует горизонтальной миграции эндотелиальных клеток в модели «раны» *in vitro* [353].

Таким образом, было установлено взаимовлияние по паракринному механизму ЭПК от пациентов с ХСН и зрелых эндотелиальных клеток линии EA. hu926, что свидетельствует о способности ЭПК стимулировать резидентные эндотелиальные клетки к ангиогенезу, в свою очередь зрелые эндотелиальные клетки способны поддерживать и стимулировать ЭПК к васкулогенезу.

В рамках исследований, направленных на определение паракринных сигналов, большое внимание обычно уделяется факторам роста и цитокинам. Результаты ряда работ свидетельствуют о том, что паракринные факторы могут действовать синергично. В то же время кондиционная среда при культивировании ЭПК содержит не только белки. Среди различных молекул, которые идентифицируются в кондиционной среде, представлены соединения клеточного метаболизма – цитрат, АТФ, эйкозаноиды, которые также могут способствовать ангиогенезу непосредственно или путем воздействия на цитокины и факторы роста [288].

Паракринные ангиогенные и цитопротективные эффекты ЭПК не являются уникальной особенностью этих клеток. На самом деле, данные литературы свидетельствуют, что КС ЭСК, ММСК способствует росту сосудов, миграции и пролиферации эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов [324].

МНК периферической крови без фармакологической активации также способны оказывать влияние на ангиогенез. Интерес вызывает опубликованная работа изучения КС, полученной при культивировании МНК. Авторы показали, что лиофилизированная КС способствует пролиферации эндотелиальных клеток и образованию сосудистых структур в матригеле. Кроме того, обработка клеток кожи КС приводит к индукции нескольких сигнальных путей, участвующих в клеточной миграции, пролиферации и выживании [325].

Анализ последних данных литературы свидетельствует о том, что регенеративные свойства ЭПК не ограничиваются их участием в ангиогенезе кровеносных сосудов.

Показано, что ЭПК могут стимулировать лимфангиогенез не только при лимфедеме, но и при других заболеваниях [356]. Учитывая роль лимфатической системы сердца при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [2] необходимо изучение функциональных особенностей СПК, участвующих в лимфангиогенезе.

Нами показано, что введение G-CSF пациентам с ХСН приводит к выходу в периферическую кровь лимфатических ЭПК, идентифицированных по экспрессии маркеров лимфангиогенеза – количество LYVE-1-позитивных клеток увеличивается после мобилизации G-CSF и составляет 2,1 %. Полученные данные согласуются с литературой, где показано, что G-CSF индуцирует миграцию, пролиферацию и образование сосудистых структур лимфатическими эндотелиальными клетками *in vitro*, а VEGF-C может способствовать дифференцировке CD34⁺CD133⁺ ЭПК в лимфатические эндотелиальные клетки, экспрессирующие маркеры LYVE-1, Prox-1, VEGFR₃ [83; 172]. В настоящее время мы продолжаем исследование фенотипических и функциональных свойств лимфатических ЭПК.

Регенеративные свойства ЭПК не только направлены на стимуляцию

ангиогенеза. В ряде клинических исследований продемонстрировано улучшение функциональных показателей миокарда после введения ЭПК. Предполагается, что ЭПК помимо улучшения перфузии миокарда могут регенерировать мышцу сердца, дифференцируясь в кардиомиоциты. Кроме того, ЭПК способствуют уменьшению апоптоза поврежденных кардиомиоцитов и стимулируют эндогенные стволовые клетки сердца. На самом деле, есть убедительные доказательства того, что дифференцировка и включение ЭПК в сосуды составляют лишь малую часть механизмов действия ЭПК, а паракринные сигналы играют ключевую роль в процессах репарации поврежденных тканей миокарда [288]. Секретция кардиотрофических факторов ЭПК позволяет регулировать постинфарктное ремоделирование. Так, в работах показано, что КС ЭПК при интракоронарном введении в экспериментальной модели инфаркта повышает количество кардиомиоцитов, а в экспериментах *in vitro* увеличивает их пролиферацию [301].

Анализируя взаимосвязь показателей функционального состояния миокарда после интрамиокардиального введения мобилизованных G-CSF МНК, количества ЭПК и цитокинов при культивировании МНК, были выявлены некоторые корреляционные связи.

Популяция ЭПК с фенотипом $CD34^+$ прямо коррелирует с улучшением перфузии миокарда в покое спустя 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК. Количество $CD34^+/CD133^+$ клеток, более ранних в дифференцировочном отношении, сопряжено с улучшением перфузии миокарда при функциональной нагрузке через 12 месяцев, и с ФВЛЖ через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК. Между количеством более поздних ЭПК, экспрессирующих $CD34^+/VEGFR_2^+$, и функциональными параметрами сердечной мышцы пациентов с ХСН каких-либо взаимосвязей не обнаружено.

Изучая корреляционные связи между уровнем цитокинов, секретируемых МНК после мобилизации, и показателями функционального состояния миокарда, было выявлено, что только E_{ro} находится во взаимозависимости с перфузией миокарда, ФВЛЖ и классом СН. На самом деле, это закономерно, поскольку

проангиогенное действие Еро схоже с VEGF, а рецептор к Еро экспрессируется как на эндотелиальных клетках, так и на кардиомиоцитах. Кроме того, Еро влияет на ангиогенез путем стимуляции кардиомиоцитов к секреции VEGF [137; 334], обладает антиапоптотическим действием [135].

Очевидно, что небольшая выборка исследований и разброс между показателями уровня секреции цитокинов не позволил выявить закономерности корреляционных связей для других факторов.

Однако ранее нами было показано, что TNF- α , GM-CSF, как и Еро, в группе пациентов с улучшением перфузии секретируются достоверно в большем количестве по сравнению с группой с ухудшением перфузии [3].

Таким образом, улучшение перфузии миокарда вероятно связано с участием ЭПК в ангиогенезе, причем более ранние предшественники CD34⁺/CD133⁺ способствуют неангиогенезу в поздние сроки наблюдения (12 месяцев), возможно, посредством васкулогенеза, а CD34⁺ ЭПК оказывают влияние на репарацию в ранние сроки наблюдения (6 месяцев), стимулируя эндотелиальные клетки к эндотелиогенезу. Очевидно, что популяция CD34⁺/CD133⁺ ЭПК причастна к процессам репарации поврежденного миокарда. На самом деле, эта гипотеза подтверждается результатами некоторых исследований дифференцировки ЭПК *in vitro* в кардиомиоциты [108].

По данным литературы при проведении клинических исследований приводятся в лучшем случае сведения о фенотипе вводимых клеток, но чаще всего анализируются клинические и функциональные данные пациентов в динамике проводимой клеточной терапии. В опубликованном недавно мета-анализе имеются лишь сведения о взаимодействии количества CD34⁺ клеток и улучшения ФВЛЖ [332], а также отрицательная корреляционная связь между количеством ЭПК и классом СН по NYHA у пациентов с ХСН [89].

Таким образом, очевидно, что популяции ЭПК в периферической крови после мобилизации G-CSF могут воздействовать на различные звенья репарации ишемизированного миокарда. Имеющиеся корреляционные связи между содержанием в периферической крови пула прогениторных клеток и секрецией

цитокинов после интрамиокардиального введения с функциональными параметрами миокарда указывают на вовлеченность вводимых клеток в процесс регенерации.

Полученные результаты согласуются с данными о том, что СПК костного мозга и периферической крови, введенные интракоронарно и интрамиокардиально, способствуют улучшению кровоснабжения миокарда.

Таким образом, растворимые факторы, высвобождаемые клетками трансплантата, играют ключевую роль в восстановительных подходах клеточной трансплантации и, вероятно, объясняют очевидный парадокс регенерации тканей с незначительным приживлением трансплантированных СПК.

Результаты исследования и анализ данных литературы позволили схематически представить паракринные межклеточные взаимодействия недифференцированных циркулирующих и тканевых ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток (схема 1).

Развитие новой сосудистой сети – результат избирательного взаимодействия различных популяций клеток, которое реализуется с участием паракринных сигналов.

Эндотелиальные клетки различной степени зрелости, как и лимфоциты, моноциты, мезенхимальные клетки, путем продукции проангиогенных молекул способствуют ангиогенезу, регулируя пролиферацию, миграцию клеток и образование новой сосудистой сети.

Ангиогенные сигналы одних популяций клеток могут активировать другие популяции клеток, в том числе и эндотелиальных, стимулируя их пролиферацию и продукцию цитокинов. Сигналы микроокружения способствуют пролиферации и направленной миграции клеток.

Таким образом, ЭПК и продукты их секреции способны стимулировать ангиогенез, модулировать воспаление и имеют потенциал для улучшения функционального состояния ишемизированного миокарда.

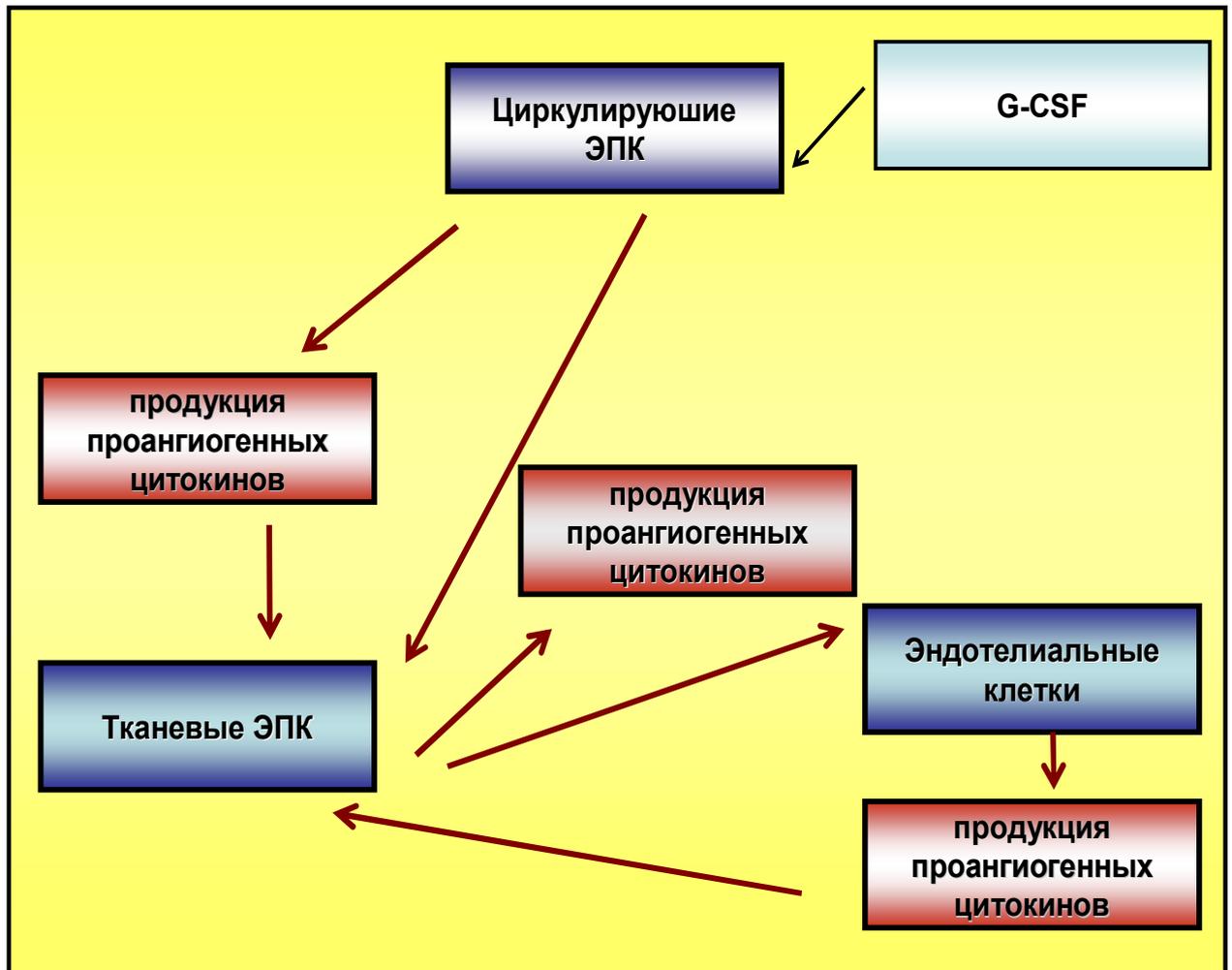


Схема 1 – Схема паракринных взаимодействий циркулирующих ЭПК, тканевых ЭПК и эндотелиальных клеток

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность ЭПК стимулировать ангиогенез делает эти клетки привлекательными для стимуляции репаративных процессов в ишемизированном миокарде у пациентов с ХСН. На основании вышеизложенного можно утверждать, что периферическая кровь является доступным источником аутологичных СПК, а фармакологическая мобилизация СПК из костного мозга в периферическое русло крови введением G-CSF является эффективной процедурой у пациентов с ХСН.

Введение G-CSF приводит к увеличению количества ЭПК костномозгового происхождения, представленных популяциями клеток различной степени зрелости, ЭПК моноцитарного происхождения, и повышению количества циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток. Обогащение периферической крови ЭПК сопровождается повышением функционального потенциала мононуклеарных клеток – пролиферативной, синтетической активности и способности к миграции. Секретируемые МНК цитокины с проангиогенной активностью способны оказывать аутокринно-паракринную регуляцию функционального состояния клеточных популяций, вовлеченных в продукцию биологически активных веществ.

Мобилизованные G-CSF ЭПК *in vitro* дают начало росту двум типам ЭПК («ранним» и «поздним»), отличающихся между собой не только по морфологическим и пролиферативным свойствам, но и различной цитокинпродуцирующей активностью. Полученные *in vitro* из МНК ЭПК при культивировании также способны оказывать паракринное действие путем секреции проангиогенных ростовых факторов и цитокинов. Секретируемые ЭПК медиаторы поддерживают пролиферацию клеток в культуре и способствуют образованию первичных тубулярных сосудистых структур на различных белках внеклеточного матрикса, который оказывает влияние на уровень секретруемых медиаторов.

Эндотелиальные клетки различной степени дифференцировки также оказывают взаимовлияние на функциональное состояние друг друга путем

паракринных механизмов. Продукты секреции недифференцированных ЭПК стимулируют пролиферацию и миграцию зрелых эндотелиальных клеток линии EA.hy926, а продуцируемые клетками EA.hy926 биоактивные молекулы в свою очередь увеличивают функциональный потенциал ЭПК. Паракринные эффекты действия секретируемых факторов сопоставимы со стимулирующим влиянием ангиогенных цитокинов.

С учетом спектра продукции цитокинов и ростовых факторов циркулирующими и культивируемыми ЭПК, оказывающими стимулирующее влияние на пролиферативный и миграционный потенциал «зрелых» эндотелиальных клеток путем паракринного эффекта, ЭПК, полученные в ходе мобилизации G-CSF, могут быть с успехом использованы в клеточной терапии ишемических заболеваний миокарда человека. Интрамиокардиальное введение обогащенных ЭПК мононуклеаров периферической крови приводит к улучшению функционального состояния ишемизированного миокарда у пациентов с ХСН, опосредованное популяциями ЭПК и секретируемыми проангиогенными медиаторами.

В настоящее время клеточная терапия включает в себя введение не только СПК различных типов, но и активную стимуляцию ангиогенеза и мобилизации СПК путем введения ростовых факторов. Культуральная среда, содержащая продукты секреции как циркулирующих, так и культивируемых ЭПК в виде комплекса цитокинов и ростовых факторов, может служить альтернативой всем известным факторам стимуляции репаративных процессов. Использование в качестве источника аутологичных ЭПК периферической крови обладает явными технологическими преимуществами перед другими источниками их получения.

ВЫВОДЫ

1. Введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора пациентам с хронической сердечной недостаточностью приводит к увеличению количества клеток с фенотипом $CD34^+$, $CD34^+/CD133^+$, $CD34^+/VEGFR_2^+$, $CD133^+/CD34^-$, $CD34^+/CD31^+$, $VEGFR_2^+/CD34^-$, $CD31^+/CD34^-$, $CD14^+/VEGFR_2^+$, $VEGFR_2^+/CD14^-$, что свидетельствует о выходе в периферическое русло крови разных по происхождению эндотелиальных прогениторных клеток, находящихся на различных этапах дифференцировки.

2. Мобилизация гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с хронической сердечной недостаточностью приводит к увеличению функционального потенциала мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, и способности к миграции, поскольку после курса мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором происходит увеличение пролиферации мононуклеарных клеток на различные стимулы (митоген Кон А, цитокины G-CSF и Еро), количества колониеобразующих единиц и экспрессии рецептора хоуминга $CXCR_4$ по сравнению с исходными показателями до курса мобилизации.

3. Обогащение периферической крови эндотелиальными прогениторными клетками у пациентов с хронической сердечной недостаточностью приводит к увеличению секреции мононуклеарными клетками цитокинов с проангиогенной активностью – IL-18, Еро и VEGF, и снижению уровня провоспалительного цитокина TNF- α . Мобилизация ведет к возрастанию функционального резерва продукции проангиогенных цитокинов, поскольку уровень секреции TNF- α , IL-10, IL-18, Еро и G-CSF увеличивается на митогенные стимулы Кон А и ЛПС, и цитокиновые стимулы G-CSF и Еро.

4. Количество циркулирующих клеток с фенотипом $CD34^-/CD133^+$, $CD34^+/VEGFR_2^-$, $CD34^+/VEGFR_2^+$, $CD34^+/CD31^+$, $CD34^-/VEGFR_2^+$, $CD34^-/CD31^+$ находится в прямой корреляционной связи с уровнем секретируемых цитокинов – TNF- α , IL-10, IL-18, Еро и VEGF, что свидетельствует о взаимовлиянии разной

степени дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток и проангиогенных цитокинов, и вовлеченности данных клеток в продукцию биологически активных веществ.

5. Эндотелиальные прогениторные клетки пациентов с хронической сердечной недостаточностью после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором *in vitro* с увеличением срока культивирования имеют различный пролиферативный потенциал и различаются морфологически, что позволяет условно разделить их на популяции «ранних» и «поздних» эндотелиальных прогениторных клеток. Клетки, культивируемые в ранние сроки, имеют удлиненную форму и слабо пролиферируют, а увеличение сроков культивирования приводит к образованию веретенообразными клетками кластеров и первичных сосудистых тубулярных структур.

6. Культивируемые в разные сроки эндотелиальные прогениторные клетки пациентов секретируют различный уровень биологически активных веществ – проангиогенных цитокинов, ростовых факторов и оксида азота, что зависит от влияния белков внеклеточного матрикса. При культивировании на фибронектине «ранние» эндотелиальные прогениторные клетки секретируют более высокий уровень IL-10, IL-18, IL-8, EPO, VEGF и NO, а на желатине – TNF- α , IL-8 и EPO.

7. Эндотелиальные прогениторные клетки и зрелые эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние на функциональное состояние друг друга, стимулируя пролиферативный и миграционный потенциал путем паракринных механизмов. Продукты секреции эндотелиальных прогениторных клеток стимулируют пролиферацию и миграцию клеток эндотелиальной линии EA.hy926, а продуцируемые клетками эндотелиальной линии EA.hy926 биоактивные вещества в свою очередь увеличивают функциональный потенциал эндотелиальных прогениторных клеток. Паракринные эффекты действия секретируемых недифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками факторов сопоставимы со стимулирующим влиянием ангиогенных цитокинов.

8. Морфофункциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором взаимосвязаны с показателями функционального состояния миокарда после интрамиокардиального введения. Количество циркулирующих клеток с фенотипом $CD34^+/CD133^-$, $CD34^+/CD133^+$ и $CD34^+/VEGFR_2^+$ находится в прямой корреляционной связи с перфузией миокарда и фракцией выброса левого желудочка, а секреторный уровень Ero – с перфузией миокарда, фракцией выброса левого желудочка и с классом сердечной недостаточности через 6 и 12 месяцев наблюдения, что свидетельствует о вовлеченности вводимых клеток в процесс регенерации ишемизированного миокарда.

9. Эндотелиальные прогениторные клетки, полученные в ходе мобилизации введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора пациентам с хронической сердечной недостаточностью, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, обусловленную нахождением на разных этапах дифференцировки, характеризующуюся высокой пролиферативной, миграционной и цитокинпродуцирующей активностью, наличием аутокринно-паракринного эффекта регуляции функционального состояния клеточных популяций.

10. Аутологичные мононуклеары, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками, потенциально могут использоваться для стимуляции ангиогенеза и регенерации ишемизированного миокарда у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод получения из периферической крови пациента суспензии МНК, в значительной степени обогащенной различными субпопуляциями ЭПК, состоящий в 5-кратном введении лекарственной формы G-CSF в дозе 3,3–5,0 мкг на 1 кг веса человека, аппаратном цитаферезе по программе PBSC и центрифугировании на градиенте плотности фиколл/верографин, является наиболее эффективным и приемлимым в клинических исследованиях.
2. Для получения девяти субпопуляций ЭПК человека, различающихся по экспрессии различных мембранных маркеров (CD34, CD133, VEGFR₂, CD31, CD14) наиболее пригодна методика культивирования клеточной суспензии МНК в эндотелиальной среде с добавлением 10 % FSC и 2 мМ L-глутамин в культуральных флаконах, поверхность которых предобработана фибронектином и желатином в концентрации 1×10 млн/мл во влажной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 48 часов с последующим удалением неприлипших клеток и докультивированием в течение 8–16 суток.
3. Кондиционные среды, полученные при культивировании ЭПК, содержат большое количество биологически активных веществ, оказывающих выраженное воздействие на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальной клеточной линии, и могут быть использованы в качестве фидерных сред и источников для исследования содержащихся в них цитокинов и ростовых факторов в культуральных исследованиях.
4. Параметры морфофункциональных свойств ЭПК тесно коррелируют с функциональным состоянием миокарда при ХСН и могут быть использованы в качестве дополнительных лабораторных критериев оценки его состояния.
5. Полученные данные о способности ЭПК при интрамиокардиальном введении улучшать перфузию миокарда и снижать степень выраженности ХСН позволяют рассматривать этот подход в качестве альтернативного при толерантности пациента к лекарственной терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГСК	– гемопоэтическая стволовая клетка
ЗФР	– забуференный физраствор
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
ИМ	– инфаркт миокарда
ИПК	– индуцированная плюрипотентная клетка
ИС	– индекс стимуляции
КИ	– клеточный индекс
ККМ	– клетки костного мозга
КОЕ	– колониеобразующая единица
Кон А	– конканавалин А
КС	– кондиционная среда
ЛПС	– липополисахарид
ММП	– матриксная металлопротеиназа
ММСК	– мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка
МНК	– моноклеарные клетки
МТТ	– 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
ППС	– полная посадочная среда
СПК	– стволовая/прогениторная клетка
ФВЛЖ	– фракция выброса левого желудочка
ХСН	– хроническая сердечная недостаточность
ЭПК	– эндотелиальная прогениторная клетка
ЭСК	– эмбриональная стволовая клетка
CD	– кластер дифференцировки
CXCR ₄	– хемокиновый рецептор 4 типа к SDF-1
eNOS	– эндотелиальная синтаза оксида азота
Еpo	– эритропоэтин
FCS	– fetalная телячья сыворотка
FGF	– фактор роста фибробластов

FITC	– флюоресцеинизотиоцианат
G-CSF	– гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HGF	– фактор роста гепатоцитов
HIF-1	– индуцированный гипоксией фактор-1
IGF-1	– инсулиновый фактор роста
IL	– интерлейкин
LDL	– липопротеины низкой плотности
MCP	– белок хемоаттрактант моноцитов
NO	– оксид азота
NYHA	– функциональная классификация хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской ассоциации кардиологов
PDGF	– фактор роста тромбоцитов
PE	– фикоэритрин
PSGL-1	– P-селектин лиганд гликопротеин-1
SDF-1	– стромальный фактор роста-1
SCF-1	– фактор стволовых клеток-1
TGF- β	– трансформирующий фактор роста- β
TNF- α	– фактор некроза опухоли - α
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR	– рецептор к фактору роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические свойства эндотелиальных клеток-предшественниц и их репаративный потенциал для клеточной терапии / А. А. Кескинов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III. – № 4. – С. 36–40.
2. Бородин, Ю. И. Лимфатический дренаж сердца. Морфофункциональный аспект / Ю. И. Бородин // Вестник лимфологии. – 2013. – № 4. – С. 4–10.
3. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью / В. И. Коненков [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI. – № 3. – С. 71–76.
4. Влияние трансплантации мононуклеаров красного костного мозга на ангиогенез у крыс / Т. Х. Фатхудинов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 132–135.
5. Влияние эндотелиальных клеток, преинкубированных с цитокинами, на фенотип и функциональную активность клеток моноцитоподобной линии thp1 / Э. А. Старикова [и др.] // Медицинская Иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 5–6. – С. 495–502.
6. Гистологическая техника: учебное пособие. / В. В. Семченко [и др.]. – Ом.: Омская областная типография. – 2006. – 209с.
7. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц – М: Практика. – 1999. – 459с.
8. Дыгай, А. М. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты / А. М. Дыгай, В. В. Жданов – М.: Издательство РАМН. – 2010. – 138с.
9. Еремеева, М. В. Возможности применения стволовых клеток и клеток-предшественников для стимуляции ревазуляризации и регенерации

органов / М. В. Еремеева // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 1. – С. 86–93.

10. Истинная распространенность ХСН в европейской части российской федерации (исследование эпоха, госпитальный этап) / Ю. Н. Беленков [и др.] // Журнал сердечная недостаточность. – 2011. – Т. 12. – № 2. – С. 63–68.

11. Клеточная кардиомиопластика в хирургическом лечении больных с ишемической болезнью сердца и постинфарктным кардиосклерозом: результат 3-летнего наблюдения / И. Л. Буховец [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – № 4. – С. 51–58.

12. Клеточная терапия патологии миокарда / А. Б. Белевитин [и др.] // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2010. – Т. 2. – № 10. – С. 194–200.

13. Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы / Т. Н. Кочегура [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V. – № 2. – С. 11–18.

14. Направление миграции моноклеаров костного мозга при интракоронарном трансвентрикулярном введении / Т. Х. Фатхудинов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – № 4. – С. 222–228.

15. Отдалённые результаты использования моноклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга в комплексном хирургическом лечении больных с пороками клапанов сердца / В. В. Давыденко [и др.] // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2011. – Т. 170. – № 5. – С. 49–53.

16. Оценка эффекта проангиогенных факторов на пролиферативную и миграционную активность клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 / А. П. Лыков [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 33. – № 4. – С. 23–29.

17. Оценка эффективности применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора для лечения экспериментальной деструкции миокарда мышей / С. А. Афанасьев [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 1. – С. 23–26.

18. Парфенова, Е. В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы / Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук // Кардиологический вестник. – 2007. – № 2. – С. 2–10.
19. Первый опыт применения стволовых клеток костного мозга для регенерационной терапии ишемической болезни сердца / Л.А. Бокерия [и др.] // Кардиология. – 2004. – Т. 44. – № 9. – С. 16–22.
20. Плотников, Е. Ю. Стволовые клетки в регенеративной терапии сердечных заболеваний: роль межклеточных взаимодействий /Е. Ю. Плотников, Д. Б. Зоров, Г. Т. Сухих // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV. – № 1. – С. 43–49.
21. Повещенко, О. В. Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // Успехи физиологических наук. – 2012. – № 3. – С. 48–61.
22. Покровская, О. С. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор: механизмы мобилизации гемопоэтических стволовых клеток периферической крови и системные эффекты применения / О. С. Покровская // Терапевтический архив. – 2007. – № 7. – С. 83–87.
23. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва // Медиасфера., М. – 2002. – 312с.
24. Репарация миокарда при трансплантации моноклеарных клеток костного мозга / Ю. П. Байкова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 203–210.
25. Роль эндотелиальных прогениторных клеток при атеросклерозе / А. Е. Семенова [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 3. – С. 14–24.
26. Руда, М. М. Предшественники эндотелиальных клеток: роль в восстановлении функции эндотелия и перспективы терапевтического применения / М. М. Руда, Е. В. Парфенова, Ю. А. Карпов // Кардиология. – 2008. – № 1. – С. 66–73.

27. Румянцев, С. А. Механизмы мобилизации гемопоэтических предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором / С. А. Румянцев, Д. Н. Балашов, А. Г. Румянцев // Современная онкология. – 2010. – № 3. – С. 84–88.
28. Стимуляция ангиогенеза внутримышечной имплантацией клеток мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга при ишемии конечностей крысы / П. М. Ларионов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 211–215.
29. Функциональная характеристика мононуклеаров периферической крови после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / О. В. Повещенко [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2014. – № 1. – С. 26–31.
30. Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью / В. И. Коненков [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 1. – С. 9–13.
31. Эффективность клеточной терапии с использованием аутологичных мононуклеаров костного мозга в комплексном лечении больных ишемической болезнью сердца / В. М. Седов [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т. 7. – № 1. – С. 112–116.
32. Эффективность мобилизации CD34+ прогениторных клеток препаратом G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью / И. И. Ким [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2012. – № 1. – С. 75–78.
33. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей / К. А. Талицкий [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011 – Т. VI. – № 3 – С. 89–98.
34. A dosing study of bone marrow mononuclear cells for transendocardial injection in a pig model of chronic ischemic heart disease / G. V. Silva [et al.] // Tex. Heart Inst. J. – 2011. – Vol. 38. – P. 219–224.

35. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature / H. Jin [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 652–662.
36. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy / U. Fischer-Rasokat [et al.] // *Circ. Heart Fail.* – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 417–423.
37. A randomized study comparing chemotherapy followed by G-CSF alone or in combination with GM-CSF for mobilization of peripheral blood stem cells in patients with non-Hodgkin's lymphomas / C. Hosing [et al.] // *J. Blood Med.* – 2010. – Vol. 1. – P. 49–55.
38. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice / Y. Hu [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113, № 7. – P. 1258–1265.
39. Adams, G. B. A niche opportunity for stem cell therapeutics / G. B. Adams, D. T. Scadden // *Gene Ther.* – 2008. – Vol. 15. – P. 96–99.
40. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation / K. Rubina [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2039–2050.
41. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells / O. M. Tepper [et al.] // *Blood.* – 2005. – Vol. 105. – P. 1068–1077.
42. Ageing and endothelial progenitor cell release of proangiogenic cytokines / E. Kushner [et al.] // *Age Ageing.* – 2010. – Vol. 39. – P. 268–272.
43. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells / T. Umemura [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 21. – P. 1203–1209.

44. Aicher, A. The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche / A. Aicher, O. Kollet, C. Heeschen // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 796–803.
45. Allen, P. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks / P. Allen, J. Melero-Martin, J. Bischoff // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2011. – Vol. 5. – P. 74–86.
46. AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates / A. Larochelle [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – P. 3772–3778.
47. An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells [Electronic resource] / J. Mai [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 61. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=23965413>. – Загл. с экрана.
48. Anderlini, P. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges / P. Anderlini, R. E. Champlin // *Blood.* – 2008. – Vol. 111. – P. 1767–1772.
49. Angiogenesis related gene expression profiles of EA.hy926 cells induced by irbesartan: a possible novel therapeutic approach / C. Ma [et al.] // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 2012. – Vol. 125. – P. 1369–1375.
50. Angiogenic and angiostatic chemokines in idiopathic pulmonary fibrosis and granulomatous lung disease / A. Cui [et al.] // *Respiration.* – 2010. – Vol. 80, № 5. – P. 372–378.
51. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis / L. J. Nissen [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 2766–2777.
52. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2 / R. Cao [et al.] // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 604–613.

53. Angiotensin II promotes NO production, inhibits apoptosis and enhances adhesion potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cells / T. Yin [et al.] // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 792–799.
54. Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up / K. Lunde [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 51. – P. 674–676.
55. Antiapoptotic effects of Phe140Asn, a novel human granulocyte colony-stimulating factor mutant in H9c2 rat cardiomyocytes / H. K. Chung [et al.] // *BMB Rep.* – 2012. – Vol. 45, № 12. – P. 742–747.
56. Anti-endothelial cell antibodies are associated with peripheral arterial disease and markers of endothelial dysfunction and inflammation / C. Varela [et al.] // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2011. – Vol. 13. – P. 463–467.
57. Aoki, M. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device / M. Aoki, M. Yasutake, T. Murohara // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22. – P. 994–1002.
58. Aranda, E. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line / E. Aranda, G. I. Owen // *Biol. Res.* – 2009. – Vol. 42, № 3. – P. 377–389.
59. Askari, A. T. Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration / A. T. Askari, M. S. Penn // *Discov. Med.* – 2003. – Vol. 3. – P. 46–47.
60. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review / E. Martin-Rendon [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1807–1818.
61. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial / S. Janssens [et al.] // *Lancet.* – 2006. – Vol. 367. – P. 113–121.

62. Avraamides, C. J. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis / C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, J. A. Varner // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8 – P. 604–617.
63. Barber, C. L. The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications / C. L. Barber, M. L. Iruela-Arispe // *Pediatr. Res.* – 2006. – Vol. 59. – P. 26–32.
64. Basile, D. P. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells / D.P. Basile, M.C. Yoder // *J. Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 229. – P. 10–16.
65. Beneficial effects of statins in patients with non-ischemic heart failure / U. Laufs [et al.] // *Z. Kardiol.* – 2004. – Vol. 93. – P. 103–108.
66. Bergmeier, W. Extracellular Matrix Proteins in Hemostasis and Thrombosis [Electronic resource] / W. Bergmeier, R. O. Hynes // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=21937733>. – Загл. с экрана.
67. Bioluminescence imaging of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction / W. Su [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 1052. – P. 203–215.
68. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells / E. Rohde [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 357–367.
69. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells / S. Fujiyama [et al.] // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93, № 10. – P. 980–989.
70. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization / T. Asahara [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85. – P. 221–228.
71. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature / T. Ziegelhoeffer [et al.] // *Circ. Res.* – 2004. – Vol. 94. – P. 230–238.

72. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia / J. P. Duong [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2008. – Vol. 21, № 7. – P. 837–846.
73. Boneberg, E. M. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1 β release via suppressed processing of proIL-1 β , whereas TNF- α release is inhibited on the level of proTNF- α formation / E. M. Boneberg, T. Hartung // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32. – P. 1717–1725.
74. Boudreau, N. J. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression and function during angiogenesis / N. J. Boudreau, J. A. Varner // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 4862–4868.
75. Brat, D. J. The role of Interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis / D. J. Brat, A. C. Bellail, E. G. Van Meir // *Neuro-oncol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 122–133.
76. Brunner, S. Stem cell mobilisation for myocardial repair / S. Brunner, M. G. Engelmann, W. M. Franz // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2008. – Vol. 8, № 11. – P. 1675–1690.
77. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines / S. Fazel [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, № 7. – P. 1865–1877.
78. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine / P. Carmeliet // *Nature.* – 2005. – Vol. 438. – P. 932–936.
79. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in nooption patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study / S. Fuchs [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2003. – Vol. 41, № 10. – P. 1721–1724.
80. CD34-/CD133+/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities / E. B. Friedrich [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98, № 3. – P. e20–e25.
81. CD34⁺ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure / M. Valgimigli [et al.] // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110. – P. 1209–1212.

82. CD34⁺ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow [Electronic resource] / J. Yang [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – P. e20219. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21655289>. – Загл. с экрана.
83. CD34⁺ VEGFR-3⁺ progenitor cells have a potential to differentiate towards lymphatic endothelial cells / Y. Z. Tan [et al.] // J. Cell Mol. Med. – 2014. – Vol. 18. – P. 422–433.
84. CD34⁺ cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent / A. A. Quyyumi [et al.] // Am. Heart J. – 2011. – Vol. 161. – P. 98–105.
85. Cell and Gene Therapy Approaches for Cardiac Vascularization / L. Melly [et al.] // Cells. – 2012. – Vol. 1. – P. 961–975.
86. Ceradini, D. J. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue / D. J. Ceradini, G. C. Gurtner // Trends Cardiovasc. Med. – 2005. – Vol. 15. – P. 57–63.
87. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis / J. Hur [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2004. – Vol. 24, № 2. – P. 288–293.
88. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer / P. K. Goon [et al.] // Neoplasia. – 2006. – Vol. 8. – P. 79–88.
89. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure / Y. Michowitz [et al.] // Heart. – 2007. – Vol. 93. – P. 1046–1050.
90. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk / J. M. Hil [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348. – P. 593–600.
91. Circulating Progenitor and Mature Endothelial Cells in Deep Vein Thrombosis / A. M. Alessio [et al.] // Int. J. Med. Sci. – 2013. – Vol. 10, № 12. – P. 1746–1754.

92. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice / Q. Xu [et al.] // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. e76–e86.
93. C-Kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart / Y. Tallini [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 1808–1813.
94. Comparison between Culture Conditions Improving Growth and Differentiation of Blood and Bone Marrow Cells Committed to the Endothelial Cell Lineage / C. Muscari [et al.] // *Biol. Proced. Online.* – 2010. – Vol. 12. – P. 902–9035.
95. Computational gene network analysis reveals TNF-induced angiogenesis [Electronic resource] / K. Ogami R [et al.] // *BMC Syst. Biol.* – 2012. – Vol. 6. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23281897> – Загл. с экрана.
96. Critical Role of TNF- α -Induced Macrophage VEGF and iNOS Production in the Experimental Corneal Neovascularization / P. Lu [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – P. 7 3516–3526.
97. Critser, P. J. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair / P. J. Critser, M. C. Yoder // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2010. – Vol. 15, № 1. – P. 68–72.
98. CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction / K. Jujo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 11008–11013.
99. Cycling status of CD34+ cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor / R. M. Lemoli [et al.] // *Blood.* – 1997. – Vol. 15. – P. 1189–1196.
100. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries / D. Kong [et al.] // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110. – P. 2039–2046.
101. Darbepoetin improves endothelial function and increases circulating endothelial progenitor cell number in patients with coronary artery disease / C. Mueller [et al.] // *Heart.* – 2011. – Vol. 97. – P. 1474–1478.

102. De Waal, R. M. Sprouting angiogenesis versus co-option in tumor Angiogenesis / R. M. De Waal, W. P. Leenders // *EXS*. – 2005. – Vol. – P. 65–76.
103. Demetri, G. D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor / G. D. Demetri, J. D. Griffin // *Blood*. – 1991. – Vol. 78. – P. 2791–2808.
104. Development of a new G-CSF product based on biosimilarity assessment / P. Gascon [et al.] // *Ann. Onc.* – 2010. – V. 21, № 7. – P. 1419 – 1429.
105. Differential Healing Activities of CD34+ and CD14+ Endothelial Cell Progenitors / O. Award [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 758–769.
106. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow / S. C. Pitchford [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 4. – P. 62–72.
107. Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease / Z. Li [et al.] // *Circulation*. – 2007. – Vol. 116. – P. I46–I54.
108. Dimmeler, S. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy / S. Dimmeler, A. Leri // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 102, № 11. – P. 1319–1330.
109. Dual action of TGF-beta induces vascular growth in vivo through recruitment of angiogenic VEGF-producing hematopoietic effector cells / S. Fang [et al.] // *Angiogenesis*. – 2012. – Vol. 15, № 3. – P. 511–519.
110. Duda, D. G. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells / D. G. Duda, D. Fukumura, R. K. Jain // *Trends Mol. Med.* – 2004. – Vol. 10, № 4. – P. 143–145.
111. Effect of filgrastim administration for steady-state mobilization of peripheral blood stem cells / S. Hashimoto [et al.] // *Therapeutic Apheresis*. – 2002. – Vol. 6. – P. 431–436.
112. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on endothelial progenitor cell for coronary artery lesion in Kawasaki disease mice model / Z. Chen [et al.] // *Zhonghua Er. Ke. Za. Zhi*. – 2012. – Vol. 10. – P. 788–792.

113. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers / W. Kim [et al.] // *Circ. J.* – 2006. – Vol. 70. – P. 1052–1057.
114. Effect of low doses of red wine and pure resveratrol on circulating endothelial progenitor cells / M. L. Balestrieri [et al.] // *J. Biochem.* – 2008. – Vol. 143, № 2. – P. 179–186.
115. Effect of mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease / Y. Wang [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2005. – Vol. 100. – P. 477–483.
116. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells / J. Komorowski [et al.] // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78. – P. 2558–2563.
117. Efficacious and Clinically Relevant Conditioned Medium of Human Adipose-derived Stem Cells for Therapeutic Angiogenesis / S. H. Bhang [et al.] // *Mol. Ther.* – 2014. – Vol. 22. – P. 862–872.
118. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study / E. Pokushalov [et al.] // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* – 2010. – Vol. 2. – P. 160–168.
119. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation / J. R. Crosby [et al.] // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, № 9. – P. 728–730.
120. Endothelial colony-forming cell conditioned media promote angiogenesis in vitro and prevent pulmonary hypertension in experimental bronchopulmonary dysplasia / C. D. Baker [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2013. – Vol. 305. – P. L73–81.
121. Endothelial differentiation and vasculogenesis induced by three-dimensional adipose-derived stem cells / I. S. Park [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2013. – Vol. 296. – P. 168–177.

122. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease / P. Zhang [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2011. – Vol. 20. – P. 977–988.
123. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes / T. Thum [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 666–674.
124. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors / F. Timmermans [et al.] // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1572–1579.
125. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies / J. A. Mund [et al.] // *Cytherapy.* – 2009. – Vol. 11. – P. 103–113.
126. Endothelial progenitor cells as factors in neovascularization and endothelial repair / S. Capobianco [et al.] // *World J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 2, № 12. – P. 411–420.
127. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin / H. Ito [et al.] // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 5875–5877.
128. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease / N. Werner [et al.] // *Basic. Res. Cardiol.* – 2007. – Vol. 102. – P. 565–571.
129. Endothelial progenitor cells predict long-term prognosis in patients with stable angina treated with percutaneous coronary intervention: five-year follow-up of the PROCREATION study / F. Pelliccia [et al.] // *Circ. J.* – 2013. – Vol. 77. – P. 1728–1735.
130. Endothelial progenitor cells: identity defined? / F. Timmermans [et al.] // *J. Cell Mol.* – 2009. – Vol. 13. – P. 87–102.
131. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease / S. Sen [et al.] // *Clin. Sci.* – 2011. – Vol. 120. – P. 263–283.
132. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells / Y. Hu [et al.] // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – P. 3122–3127.

133. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes / P. B. Fernandez [et al.] // *Differentiation*. – 2000. – Vol. 65. – P. 287–300.
134. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart / B. Zhou [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 454. – P. 109–113.
135. Erythropoietin activates mitochondrial biogenesis and couples red cell mass to mitochondrial mass in the heart / M. S. Carraway [et al.] // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 106. – P. 1722–1730.
136. Erythropoietin and growth factors exhibit differential angiogenic potential in mouse heart / O. Pagonopoulou [et al.] // *In Vivo*. – 2008. – Vol. 22. – P. 587–591.
137. Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies / M. Hoch [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 9. – P. 131–143.
138. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells / F.H. Bahlmann [et al.] // *Blood*. – 2004, № 3. – Vol. 103. – P. 921–926.
139. Evaluation of mobilized peripheral blood CD34(+) cells from patients with severe coronary artery disease as a source of endothelial progenitor cells / A. C. Zubair [et al.] // *Cytotherapy*. – 2010. – Vol. 12. – P. 178–189.
140. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells / Q. Shi [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 362–367.
141. Ex vivo-expanded bone marrow CD34(+) for acute myocardial infarction treatment: In vitro and in vivo studies / M. Gunetti [et al.] // *Cytotherapy*. – 2011. – Vol. 13, № 9. – P. 1140–1152.
142. Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial / O Schlager [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2011. – Vol. 217. – P. 240–248.
143. Expression of the erythropoietin receptor in human heart / R. Depping [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2005. – Vol. 130, № 3. – P. 877–878.
144. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs / R. Li [et al.] // *J. Orthop. Trauma*. – 2012. – Vol. 26. – P. 689–692.

145. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors / M. Peichev [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – P. 952–958.
146. Expression profile of IL-8 and growth factors in breast cancer cells and adipose-derived stem cells (ASCs) isolated from breast carcinoma / M. Razmkhah [et al.] // *Cell Immunol.* – 2010. – Vol. 5. – P. 80–85.
147. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro / A. Burlacu [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22, № 4. – P. 643–653.
148. Fadini, G. P. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use / G. P. Fadini, D. Losordo, S. Dimmeler // *Circ. Res.* – 2012. – Vol. 110, № 4. – P. 624–637.
149. Fang, D. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy / D. Fang, H. Xiao-qin // *Chin. Med. J.* – 2010. – Vol. 123, № 17. – P. 2454–2460.
150. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization / S. Tsunoda [et al.] // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98. – P. 541–548.
151. Five-year results of intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in patients with myocardial infarction / H. J. Kang [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33. – P. 3062–3071.
152. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman, Y. Shing // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 10931–10934.
153. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells / J. Tillmanns [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – Vol. 105. – P. 1668–1673.
154. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells / A. Leone [et al.] // *European Heart Journal.* – 2009. – Vol. 30. – P. 890–899.

155. Fuentes, T. Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure / T. Fuentes, M. Kearns-Jonker // *Stem Cells Cloning*. – 2013. – Vol. 6. – P. 1–12.
156. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation / J. Feygin [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 3. – P. H1772–H1780.
157. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury / S. Xue [et al.] // *Luo. J. Neurosci. Lett.* – 2010. – Vol. 473. – P. 186–191.
158. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischaemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis / E. Deindl [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 7. – P. 956–958.
159. G-CSF exerts dual effects on endothelial cells—opposing actions of direct eNOS induction versus indirect CRP elevation / K. W. Park [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2008. – Vol. 45. – P. 670–678.
160. G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: Final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial / M. G. Engelmann [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 144, № 3. – P. 399–404.
161. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4 / I. Petit [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 687–694.
162. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes / M. Harada [et al.] // *Nat. Med.* – 2005. – Vol. 11. – P. 305–311.
163. G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function / Y. Nawa [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2000. – Vol. 25. – P. 1035–1040.
164. G-CSF stimulation and coronary reinfusion of mobilized circulating mononuclear proangiogenic cells in patients with chronic ischemic heart disease: five-year results of the TOPCARE-G-CSF trial / J. Honold [et al.] // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 21. – P. 2325–2337.

165. Generation of functional endothelial-like cells from adult mouse germline-derived pluripotent stem cells / J. Kim [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 443. – P. 700–705.
166. Gnecci, M. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy / M. Gnecci, Z. Zhang, A. Ni // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 1204–1219.
167. Granulocyte colony stimulating factor attenuates inflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [Electronic resource] / E. Pollari [et al.] // *J. Neuroinflammation.* – 2011. – Vol. 28 Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21711557>. – Загл. с экрана.
168. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway / K. Ueda [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. e108–e113.
169. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice / T. Yoshioka [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 70. – P. 61–69.
170. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphologic protective effect in oxygen-induced retinopathy / H. Kojima [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 1091–1100.
171. Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK / B. Fusté [et al.] // *Haematologica.* – 2004. – Vol. 89, № 5. – P. 578–585.
172. Granulocyte colony-stimulating factor induces in vitro lymphangiogenesis / A. S. Lee [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 436. – P. 565–570.
173. Granulocyte colony-stimulating factor produces a decrease in IFN γ and increase in IL-4 when administrated to healthy donors / O. Rodríguez-Cortés [et al.] // *J. Clin. Apher.* – 2010. – Vol. 25. – P. 181–187.

174. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils / Y. Ohki [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 2005–2007.

175. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / A. Abdel-Latif [et al.] // *Am. Heart J.* – 2008. – Vol. 156. – P. 216–226.

176. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance / S. Rutella [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 7085–7091.

177. Gupta, R. Cell therapy for critical limb ischemia: moving forward one step at a time / R. Gupta, D. W. Losordo // *Circ. Cardiovasc. Interv.* – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 2–5.

178. Hamed, S. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2 / S. Hamed, B. Brenner, A. Roguin // *Cardiovasc. Res.* – 2011. – Vol. 91, № 1. – P. 9–15.

179. Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+ cells / R. Botta [et al.] // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, № 12. – P. 1392–1394.

180. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow / J. P. Levesque [et al.] // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – P. 1954–1965.

181. Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease / R. Morishita [et al.] // *Endocr. J.* – 2002. – Vol. 49. – P. 273–284.

182. Heterogeneity of the Tumor Vasculature / J. A. Nagy [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2010. – Vol. 36. – P. 321–331.

183. HGF attenuates thrombin-induced endothelial permeability by Tiam1-mediated activation of the Rac pathway and by Tiam1/Rac-dependent inhibition of the Rho pathway / A. A. Birukova [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – Vol. 21. – P. 2776–2786.

184. Hielscher, A. C. Engineering approaches for investigating tumor angiogenesis: exploiting the role of the extracellular matrix / A. C. Hielscher, S. Gerecht // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – P. 6089–6096.
185. Hirschi, K. K. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells / K. K. Hirschi, D. A. Ingram, M. C. Yoder // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1584–1595.
186. Horowitz, A. Regulation of VEGF signaling by membrane traffic / A. Horowitz, H. R. Seerapu // *Cell Signal.* – 2012. – Vol. 24. – P. 1810–1820.
187. Hristov, M. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance / M. Hristov, C. Weber // *J. Cell. Mol. Med.* – 2004. – Vol. 8. – P. 498–508.
188. Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications / B. R. Sousa [et al.] // *Cytometry A.* – 2014. – Vol. 85. – P. 43–77.
189. Human CD34⁺/KDR⁺ Cells Are Generated From Circulating CD34⁺ Cells After Immobilization on Activated Platelets / H. C. de Boer [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 408–415.
190. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors / J Case [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1109–1118.
191. Human cord blood-derived AC133⁺ progenitor cells preserve endothelial progenitor characteristics after long term in vitro expansion [Electronic resource] / B. Janic [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – P. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=20161785>. – Загл. с экрана.
192. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair / S. M. Watt [et al.] // *J. R. Soc. Interface.* – 2010. – Vol. 7. – P. S731–S751.
193. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism / M. Wang [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. R880–R884.

194. Human Umbilical Cord Blood-Derived CD34-Positive Endothelial Progenitor Cells Stimulate Osteoblastic Differentiation of Cultured Human Periosteal-Derived Osteoblasts / J. H. Lee [et al.] // *Tissue Eng. Part. A.* – 2014. – Vol. 20. – P. 940–953.
195. Hynes, R. O. Cell-matrix adhesion in vascular development / R. O. Hynes // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 1. – P. 32–40.
196. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury / N. G. Frangogiannis [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165, № 5. – P. 2798–2808.
197. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis / A. Li [et al.] // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 3369–3376.
198. Immature monocytes from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell collections carry surface-bound IL-10 and have the potential to modulate alloreactivity / A. R. Fraser [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 80, № 4. – P. 862–869.
199. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials / M. J. Lipinski [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 1761–1767.
200. Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening / S. Keymel [et al.] // *Basic. Res. Cardiol.* – 2008. – Vol. 103. – P. 582–586.
201. Improved mobilization of the CD34 (+) and CD133(+) bone marrow-derived circulating progenitor cells by freshly isolated intracoronary bone marrow cell transplantation in patients with ischemic heart disease / R. G. Turan [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2011. – Vol. 20. – P. 1491–1501.
202. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells / S. Wassmann [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99. – P. e74–e83.

203. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins / J. Bauer [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 1992. – Vol. 153, № 3. – P. 437–449.
204. In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries / A. V. Santhanam [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. H781–H786.
205. Increased cardiac adenylyl cyclase expression is associated with increased survival after myocardial infarction / T. Takahashi [et al.] // *Circulation.* – 2006. – Vol. 114. – P. 388–396.
206. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease / N. Rafat [et al.] // *Stroke.* – 2009. – Vol. 40. – P. 432–438.
207. Increasing physical education in high school students: effects on concentration of circulating endothelial progenitor cells / C. Walther [et al.] // *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* – 2008. – Vol. 15. – P. 416–422.
208. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells / J. Yu [et al.] // *Science.* – 2007. – Vol. 318. – P. 1917–1920.
209. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 861–872.
210. Induction of therapeutic neoangiogenesis using in vitro-generated endothelial colony-forming cells: an autologous transplantation model in rat / J. Jiga [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2013. – Vol. 181. – P. 359–368.
211. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation / B. Garmy-Susini [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 1542–1551.
212. Interleukin 18 induces angiogenesis in vitro and in vivo via Src and Jnk kinases / M. A. Amin [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 12. – P. 2204–2212.
213. Interleukin-10 deficiency impairs bone marrow-derived endothelial progenitor cell survival and function in ischemic myocardium / P. Krishnamurthy [et al.] // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109. – P. 1280–1289.

214. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction / J. S. Burchfield [et al.] // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103, № 2. – P. 203–211.

215. Interleukin-10 protects against aging-induced endothelial dysfunction [Electronic resource] / D. A. Kinzenbaw [et al.] // *Physiol. Rep.* – 2013. – Vol. 1. – P. e00149 – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24400151>. – Загл. с экрана.

216. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways / M. A. Amin [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1787–1797.

217. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway / Y. Lai [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2011. – Vol. 7. – P. 782–791.

218. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction / K. Schomig [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2006. – Vol. 27. – P. 1032–1037.

219. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction / C. Valina [et al.] // *Eur Heart J.* – 2007. – Vol. 28. – P. 2667–2677.

220. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial / V. Schächinger [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* – 2009. – Vol. 11. – P. 973–979.

221. Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell

Infusion (MAGIC Cell) 1 trial / H. J. Kang [et al.] // *Am. Heart J.* – 2007. – Vol. 153. – P. 237.e1–237.e8.

222. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34 (+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial / A. Kawamoto [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27. – P. 2857–2864.

223. Intramyocardial, Autologous CD34+ Cell Therapy for Refractory Angina / D. W. Losordo [et al.] // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109. – P. 428–436.

224. Iruela-Arispe, M. L. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation / M. L. Iruela-Arispe, G.E. Davis // *Dev. Cell.* – 2009. – Vol. 16. – P. 222–231.

225. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart / E. Messina [et al.] // *Circ. Res.* – 2004. – Vol. 95. – P. 911–921.

226. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 275. – P. 964–967.

227. Jujo, K. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium / K. Jujo, M. Ii, D.W. Losordo // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2008. – Vol. 45. – P. 530–544.

228. Jung, K. H. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease / K. H. Jung, J. K. Roh // *J. Clin. Neurol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 139–147.

229. Kanda, S. Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt / S. Kanda, Y. Miyata, H. Kanetake // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 4007–4016.

230. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) vIL-6 Promotes Cell Proliferation and Migration by Upregulating DNMT1 via STAT3 Activation [Electronic resource] / J. Wu [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. e93478. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24675762>. – Загл. с экрана.

231. Kastrup, J. Gene therapy and angiogenesis in patients with coronary artery disease / J. Kastrup // *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* – 2010. – Vol. 8. – P. 1127–1138.
232. Kay, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead / M. A. Kay // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – Vol. 12. – P. 316–328.
233. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization / A. Mann [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2001. – Vol. 117. – P. 1382–1390.
234. Khakoo, A. Y. Endothelial progenitor cells / A. Y. Khakoo, T. Finkel // *Annu. Rev. Med.* – 2005. – Vol. 56. – P. 79–101.
235. Kim, S. W. Advances in bone marrow-derived cell therapy: CD31-expressing cells as next generation cardiovascular cell therapy / S. W. Kim, H. Kim, Y. S. Yoon // *Regen. Med.* – 2011. – Vol. 3. – P. 335–349.
236. Kim, W. S. Cardiovascular repair with bone marrow-derived cells / W. S. Kim, S. Lee, Y. S. Yoon // *Blood Res.* – 2013. – Vol. 48. – P. 76–86.
237. Kovacic, J. C. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease / J. C. Kovacic, D. W. Muller, R. M. Graham // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2007. – Vol. 42. – P. 19–33.
238. Lapidot, T. How do stem cells find their way home? / T. Lapidot, A. Dar, O. Kollet // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – P. 1901–1910.
239. Lasala, G. P. Bone marrow-derived stem/progenitor cells: their use in clinical studies for the treatment of myocardial infarction / G. P. Lasala, J. J. Minguell // *Heart Lung. Circ.* – 2009. – Vol. 18. – P. 171–180.
240. Latini, R. Do non-hemopoietic effects of erythropoietin play a beneficial role in heart failure? / R. Latini, M. Brines, F. Fiordaliso // *Heart Fail. Rev.* – 2008. – Vol. 13. – P. 415–423.
241. Le Bousse-Kerdilès, M. C. Primary myelofibrosis and the "bad seeds in bad soil" concept [Electronic resource] / M. C. Le Bousse-Kerdilès // *Fibrogenesis*

Tissue Repair. – 2012. – Vol. 5. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23259918> . – Загл. с экрана.

242. Lerman, A. Endothelial function: cardiac events / A. Lerman, A. M. Zeiher // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111. – P. 363–368.

243. Levels of circulating pro-angiogenic cells predict cardiovascular outcomes in patients with chronic heart failure / G. Balconi [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2009. – Vol. 15. – P. 747–755.

244. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms / T. Kinnaid [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 1543–1549.

245. Long-term benefit of intracardiac delivery of autologous granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized blood CD34+ cells containing cardiac progenitors on regional heart structure and function after myocardial infarct / S. Pasquet [et al.] // *Cytotherapy*. – 2009. – Vol. 11. – P. 1002–1015.

246. Lotti, F. Interleukin 8 and the male genital tract / F. Lotti, M. Maggi // *J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 100. – P. 54–65.

247. Maguire, G. Stem cell therapy without the cells [Electronic resource] / G. Maguire // *Commun Integr. Biol.* – 2013. – Vol. 6. – P. e26631 Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24567776>. – Загл. с экрана.

248. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches / T. Sugiyama [et al.] // *Immunity*. – 2006. – Vol. 25. – P. 977–988.

249. Marcelo, K. L. Regulation of endothelial cell differentiation and specification / K. L. Marcelo, L. C. Goldie, K. K. Hirschi // *Circ. Res.* – 2013. – Vol. 112. – P. 1272–1287.

250. Marrow cell therapies for cardiovascular diseases / C. R. Cogle [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2008. – Vol. 36. – P. 687–694.

251. Maurice, S. Isolation of progenitor cells from cord blood using adhesion matrices / S. Maurice, S. Srouji, E. Livne // *Cytotechnology*. – 2007. – Vol. 54. – P.121–133.

252. Measuring Angiogenic Cytokines, Circulating Endothelial Cells, and Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Blood and Cord Blood: VEGF and CXCL12 Correlate with the Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Blood / J. Smythe [et al.] // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2008. – Vol. 14. – P. 59–67.
253. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium / C. Marin [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2010. – Vol. 93. – P. 267–274.
254. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model / G. V. Silva [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111. – P. 150–156.
255. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential / H. Masuda [et al.] // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109. – P. 20–37.
256. Mettouchi, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis / A. Mettouchi // *Cell Adh. Migr.* – 2012. – Vol. 6. – P. 528–534.
257. Michel, J. B. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators / J. B. Michel // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 2146–2154.
258. Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas / M. R. Machein [et al.] // *Brain Pathol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 582–597.
259. Moazzami, K. Granulocyte colony stimulating factor therapy for acute myocardial infarction [Electronic resource] / K. Moazzami, A. Roohi, B. Moazzami // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2013. – Vol. 5. – P. CD008844 – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23728682> – Загл. с экрана.
260. Mobilization of CD34+CXCR4+ stem/progenitor cells and the parameters of left ventricular function and remodeling in 1-year follow-up of patients with acute myocardial infarction [Electronic resource] / R. Wyderka [et al.] // *Mediators Inflamm.*

– 2012. – Vol. 2012. – P. 564027. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=22547906> – Загл. с экрана.

261. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction / S. Shintani [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103. – P. 2776–2779.

262. Mobilizing endothelial progenitor cells / A. Aicher [et al.] // *Hypertension*. – 2005. – Vol. 45. – P. 321–325.

263. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities / R. J. Medina [et al.] // *BMC Med. Genomics*. – 2010. – Vol. 13. – P. 3–18.

264. Morin, K. T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel / K. T. Morin, R. T. Tranquillo // *Exp. Cell. Res.* – 2013. – Vol. 319. – P. 2409–2417.

265. Motabi, I. H. Advances in stem cell mobilization / I. H. Motabi, J. F. DiPersio // *Blood Reviews*. – 2012. – Vol. 26. – P. 267–278.

266. Muller, W. A. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes / W. A. Muller // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 105. – P. 223–230.

267. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis / P. Vajkoczy [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197. – P. 1755–1765.

268. Murakami, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization / M. Murakami, M. Simons // *Current Opinion in Hematology*. – 2008. – Vol. 15. – P. 215–220.

269. Murry, C. E. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development / C. E. Murry, G. Keller // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 661–680.

270. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration / M. D. Schuster [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. H525–H532.

271. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart

disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy / J. Kastrup [et al.] // Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27. – P.2748–2754.

272. Nagy, J. A. Roles VEGF-A164/165 and PlGF: in angiogenesis and arteriogenesis / J. A. Nagy, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak // Trends in Cardiovascular Medicine. – 2003. – Vol. 13. – P. 169–175.

273. Naldini, A. Role of inflammatory mediators in angiogenesis / A. Naldini, F. Carraro // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. – 2005. – Vol. 4. – P. 3–8.

274. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim / T. Suzuki [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2003. – Vol. 58. – P. 487–492.

275. Nikol, S. Gene therapy of cardiovascular disease / S. Nikol // Curr. Opin. Mol. Ther. – 2008. – Vol. 10. – P. 479–492.

276. No polarization of type 1 or type 2 precursor dendritic cells in peripheral blood stem cell collections of non-hodgkin's lymphoma patients mobilized with cyclophosphamide plus G-CSF, GM-CSF, or GM-CSF followed by G-CSF / Y. Gazitt [et al.] // Stem Cells Dev. – 2006. – Vol. 15. – P. 269–277.

277. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia / A. Aicher [et al.] // Circ. Res. – 2007. – Vol. 100. – P. 581–589.

278. Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury / F. Fiordaliso [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102, № 6. – P. 2046–2051.

279. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation [Electronic resource] / S. Di Santo [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – P. 5643. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=19479066> – Загл. с экрана.

280. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity / E. Elsheikh [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 7. – P. 2347–2355.

281. Orlic, D. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 98. – P. 10344–10349.
282. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease / J. M. Hill [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 46. – P. 1643–1648.
283. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials / S. Fuchs [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – P. 5399–5408.
284. Pacak, C. A. AAV vectors for cardiac gene transfer: experimental tools and clinical opportunities / C. A. Pacak, B. J. Byrne // *Mol. Ther.* – 2011. – Vol. 19. – P. 1582–1590.
285. Pankajakshan, D. In vitro differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells / D. Pankajakshan, V. Kansal, D. K. Agrawal // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2013. – Vol. 7. – P. 911–920.
286. Papayannopoulou, T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization / T. Papayannopoulou // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – P. 1580–1585.
287. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium / H. F. Tse [et al.] // *European Journal of Heart Failure.* – 2007. – Vol. 9. – P. 747–753.
288. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart / M. Mirotsoy [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 50. – P. 280–289.
289. Park, C. Evidence for the hemangioblast / C. Park, Y. D. Ma, K. Choi // *Exp. Hematol.* – 2005. – Vol. 33. – P. 965–970.
290. Passier, R. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart / R. Passier, L. W. van Laake, C. L. Mummery // *Nature.* – 2008. – Vol. 453. – P. 322–329.

291. Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling / S. Patan // *Journal of Neuro-Oncology*. – 2000. – Vol. 50. – P. 1–15.
292. Peripheral blood stem cell mobilisation by granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute and old myocardial infarction for intracoronary cell infusion / S. A. Chang [et al.] // *Heart*. – 2009. – Vol. 16. – P. 1326–1330.
293. Peroxisome proliferator-activated receptor δ activators induce IL-8 expression in nonstimulated endothelial cells in a transcriptional and posttranscriptional manner / M. Meissner [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 33797–33804.
294. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells / A. Schmeisser [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – Vol. 522. – P. 59–74.
295. Pilot Study to Evaluate the Safety and Feasibility of Intracoronary CD133+ and CD133- CD34+ Cell Therapy in Patients With Nonviable Anterior Myocardial Infarction / A. Manginas [et al.] // *Catheter Cardiovasc. Interv.* – 2007. – Vol. 69. – P. 773–781.
296. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / V. Planat- Benard [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 656–663.
297. Plow, E. F. Integrin function in vascular biology: a view from 2013 / E. F. Plow, J. Meller, T. V. Byzova // *Curr. Opin. Hematol.* – 2014. – Vol. 21. – P. 241–247.
298. Poor hematopoietic stem cell mobilizers: a single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma / C. Hosing [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2009. – Vol. 84. – P. 335–337.
299. Pretreatment with Adult Progenitor Cells Improves Recovery and Decreases Native Myocardial Proinflammatory Signaling after Ischemia / M. Wang [et al.] // *Shock*. – 2006. – Vol. 25. – P. 454–459.
300. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptorsubunit and enhances their angiogenic potential / Y. Bennis [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1914–1928.

301. Progenitor cell therapy in a porcine acute myocardial infarction model induces cardiac hypertrophy, mediated by paracrine secretion of cardiogenic factors including TGFbeta1 / B. Doyle [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2008. – Vol. 17. – P. 941–951.
302. Putative endothelial progenitor cells are associated with flow-mediated dilation in refractory hypertensives / A. Oliveras [et al.] // *Blood Press.* – 2008. – Vol. 17. – P. 298–305.
303. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol [Electronic resource] / C. Schmidt-Lucke [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – P. e13790. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21072182> – Загл. с экрана.
304. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling / L. Calvillo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 100, № 8. – P. 4802–4806.
305. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals / M. C. Yoder [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109. – P. 1801–1809.
306. Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment / M. Hristov [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2007. – Vol. 192. – P. 413–420.
307. Regenerative therapy for cardiovascular disease / O. Pfister [et al.] // *Transl. Res.* – 2014. – Vol. 163. – P. 307–320.
308. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin / S. Kim [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 156. – P. 1345–1362.
309. Regulatory Systems in Bone Marrow for Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Mobilization and Homing [Electronic resource] / P. Alvarez [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – P. 312656. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23844360> /. – Загл. с экрана.

310. Rehman, J. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors / J. Rehman, J. Li, C. M. Orschell // *Circulation*. – 2003. – Vol. 5. – P. 1164–1169.
311. Relationship of the percentage of circulating endothelial progenitor cell to the severity of coronary artery disease / M. C. Chen [et al.] // *Heart Vessels*. – 2008. – Vol. 23, № 1. – P. 47–52.
312. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells / Y. Zhang [et al.] // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2009. – Vol. 296. – P. H1675–1682.
313. Rhodes, J. M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold / J. M. Rhodes, M. Simons // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 11. – P. 176–205
314. Ribatti, D. History of research on angiogenesis / D. Ribatti // *Chem Immunol. Allergy*. – 2014. – Vol. 99. – P. 1–14.
315. Richardson, M.R. Endothelial progenitor cells: Quo Vadis? / M. R. Richardson, M. C. Yoder // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – Vol. 50, № 2 – P. 266–272.
316. Rimchala, T. Endothelial cell phenotypic behaviors cluster into dynamic state transition programs modulated by angiogenic and angiostatic cytokines / T. Rimchala, R. D. Kamm, D. A. Lauffenburger // *Integr. Biol. (Camb)*. – 2013. – Vol. 5, № 3 – P. 510–522.
317. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells / E. Chavakis [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, № 1. – P. 63–72.
318. Safety and efficacy of SITAgliptin plus Granulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)-Rationale, design and first interim analysis / H. D. Theiss [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 145. – P. 284–284.

319. Schatteman, G. C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors / G. C. Schatteman, M. Dunnwald, C. Jiao // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. H1–H18.
320. Schatteman, G. C. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors / G. C. Schatteman, O. Awad // *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* – 2004. – Vol. 276. – P. 13–21.
321. Schmidt, A. Endothelial Precursor Cell Migration During Vasculogenesis / A. Schmidt, K. Brixius, W. Bloch // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101. – P. 125–136.
322. Schulz, C. Hematopoietic stem and progenitor cells: their mobilization and homing to bone marrow and peripheral tissue / C. Schulz, U. H. von Andrian, S. Massberg // *Immunol. Res.* – 2009. – Vol. 44. – P. 160–168.
323. Secretion of VEGF-165 has unique characteristics, including shedding from the plasma membrane / M. L. Guzmán-Hernández [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2014. – Vol. 7. – P. 1061–1072.
324. Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study / M. Lichtenauer [et al.] // *Basic Res. Cardiol.* – 2011. – Vol. 106. – P. 1283–1297.
325. Secretome of Peripheral Blood Mononuclear Cells Enhances Wound Healing [Electronic resource] / M. Mildner [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e60103. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23533667>. – Загл. с экрана.
326. Seeger, F. H. Cell-enhancement strategies for the treatment of ischemic heart disease / F. H. Seeger, A. M. Zeiher, S. Dimmeler // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2007. – Vol. 4. – P. S110–S113.
327. Segers, V. F. Stem-cell therapy for cardiac disease / V. F. Segers, R. T. Lee // *Nature.* – 2008. – Vol. 451. – P. 937–942.
328. Sekiguchi, H. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and

ischemia / H. Sekiguchi, M. Ii, D. W. Losordo // *J. Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 219. – P. 235–242.

329. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure / C. K. Kissel [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 49. – P. 2341–2349.

330. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line / H. Wang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 1817–1823.

331. Short- and long-term effects of erythropoietin treatment on endothelial progenitor cell levels in patients with cardiorenal syndrome / K. E. Jie [et al.] // *Heart.* – 2011. – Vol. 97. – P. 60–65.

332. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials / H. Zimmet [et al.] // *Eur. J. Heart. Fail.* – 2012. – Vol. 14. – P. 91–105.

333. Silvestre, J. S. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications / J. S. Silvestre, D. M. Smadja, B. I. Lévy // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol. 93. – P. 1743–1802.

334. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice / K. Ueda [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120. – P. 2016–2029.

335. Stem cell mobilization / M. H. Cottler-Fox [et al.] // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2003. – Vol. 1. – P. 419–437.

336. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: A meta-analysis / D. Zohnhofer [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 51. – P. 1429–1437.

337. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma / G. R. Hill [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, № 5 – P. 819–828.

338. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay / D. P. Sieveking [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 51. – P. 660–668.

339. Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis / X. Hu [et al.] // *Circulation.* – 2007. – Vol. 116. – P. 654–663.

340. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects / P. R. Crisostomo [et al.] // *Surgery.* – 2008. – Vol. 143. – P. 577–581.

341. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells / C. H. Yoon [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1618–1627.

342. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction / M. M. Zaruba [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2009. – Vol. 4. – P. 313–323.

343. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy / N. Kränkel [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 129, № 1 – P 62–81.

344. ten Dijke, P. Extracellular control of TGF-beta signalling in vascular development and disease / P. ten Dijke, H. M. Arthur // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 857–869.

345. Testa, U. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine / U. Testa, G. Pannitteri, G. L. Condorelli // *J. Cardiovasc. Med.* – 2008. – Vol. 9. , № 9 – P. 1190–1221.

346. The angiogenic gene profile of circulating endothelial progenitor cells from ischemic stroke patients / M. Navarro-Sobrino [et al.] // *Vasc. Cell.* – 2013. – Vol. 5. – P. 3–18.

347. The effects of age, disease state, and granulocyte colony-stimulating factor on progenitor cell count and function in patients undergoing cell therapy for cardiac disease / A. M. Mozid [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22, № 2 – P. 216–223.

348. The Effects of G-CSF on Proliferation of Mouse Myocardial Microvascular Endothelial Cells / J. Li [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12. – P. 1306–1315.

349. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling [Electronic resource] / C. Stockmann [et al.] // *Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4:69. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24782982> – Загл. с экрана.

350. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease / H. Guven [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – Vol. 48, № 8. – P. 1579–1587.

351. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing / S. Balaji [et al.] // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – Vol. 2, № 6. – P. 283–295.

352. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis / A. S. Jaipersad [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – Vol. 63, № 1 – P. 1–11.

353. The Secretome of Endothelial Progenitor Cells Promotes Brain Endothelial Cell Activity through PI3-Kinase and MAP-Kinase [Electronic resource] / S. Di Santo [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. 95731. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24755675> – Загл. с экрана.

354. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial / E. Tateishi-Yuyama [et al.] // *Lancet*. – 2002. – Vol. 360. – P. 427–435.

355. Therapeutic angiogenesis using naked DNA expressing two isoforms of the hepatocyte growth factor in a porcine acute myocardial infarction model / K. R. Cho [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2008. – Vol. 34, № 4. – P. 857–863.

356. Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells [Electronic resource] / Y. Shimizu [et al.] // *J. Am. Heart Assoc.* – 2012. – Vol. 4 – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23130156> – Загл. с экрана.

357. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia / K. Lenk [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2005. – Vol. 26. – P. 1903–1909.

358. Thomas, J. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor / J. Thomas, F. Liu, D. C. Link // *Curr. Opin. Hematol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 183–189.

359. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells / X. Wu [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – H480–H487.

360. To, W. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair [Electronic resource] / W. S. To, K. S. Midwood // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2011. – Vol. 4. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=21923916> – Загл. с экрана.

361. Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration / K. Grote [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, № 12. – P. 2543–2552.

362. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells / R. D. Galiano [et al.] // *American Journal of Pathology.* – 2004. – Vol. 164, № 6. – P. 1935–1947.

363. Transforming growth factor Beta regulates proliferation and invasion of rat placental cell lines / L. Lafontaine [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 84. – P. 553–559.

364. Transfusion of CXCR4-primed endothelial progenitor cells reduces cerebral ischemic damage and promotes repair in db/db diabetic mice [Electronic resource] / J. Chen [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e50105. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23185548>. – Загл. с экрана.

365. Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium

SPECT / N. Döbert [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2004. – Vol. 31, № 8. – P. 1146–1151.

366. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy / D. M. Leistner [et al.] // *Clin. Res. Cardiol.* – 2011. – Vol. 100. – P. 925–934.

367. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: a community study / S. M. Dunlay [et al.] // *Circulation.* – 2008. – Vol. 118, № 6. – P. 625–631.

368. Urbich, C. Endothelial progenitor cells functional characterization / C. Urbich, S. Dimmeler. // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2004. – Vol. 14. – P. 318–322.

369. Urotensin II Induces Interleukin 8 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells [Electronic resource] / C. Y. Lee [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. e90278. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24587311>. – Загл. с экрана.

370. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects / C. Kalka [et al.] // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86. – P. 1198–1202.

371. Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure / B. D. Westenbrink [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 87. – P. 30–39.

372. Vascular progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks in vivo / L. S. Ferreira [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101, № 3. – P. 286–294.

373. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis / E. Zengin [et al.] // *Development.* – 2006. – Vol. 133. – P. 1543–1551.

374. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats / Y. Li [et al.] // *Journal of Clinical Investigation.* – 2008. – Vol. 118. – P. 913–923.

375. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells / D. A. Ingram [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 7. – P. 2783–2786.
376. Volin, M. V. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis / M. V. Volin, A. E. Koch // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2011. – Vol. 31. – P. 745–751.
377. Wang, X. Vascular endothelial cell development and underlying mechanisms / X. Wang, J. W. Xiong // *Yi Chuan*. – 2012. – Vol. 34. – P. 1114–1122.
378. Ward, M. R. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives / M. R. Ward, D. J. Stewart, M. J. Kutryk // *Catheter Cardiovasc. Interv.* – 2007. – Vol. 70. – P. 983–998.
379. Waugh, D. J. The interleukin-8 pathway in cancer / D. J. Waugh, C. Wilson // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 6735–6741.
380. Wong, V. W. Vasculogenic Cytokines in Wound Healing [Electronic resource] / V. W. Wong, J. D. Crawford // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23555076> – Загл. с экрана.
381. Yin, T. The stem cell niches in bone / T. Yin, L. Li // *J. Clin. Invest.* – 2006. – V. 116. – P. 1195–1201.
382. Zampetaki, A. Vascular repair by endothelial progenitor cells / A. Zampetaki, J. Kirton, Q. Xu // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 78. – P. 413–421.
383. Zhan, K. Role of vascular endothelial progenitor cells in construction of new vascular loop / K. Zhan, L. Bai, J. Xu // *Microvasc. Res.* – 2013. – Vol. 90. – P. 1–11.
384. Zhao, W. PI3K-dependent ERK is involved in GM-CSF-mediated activation of progenitor cells in a neovascularization model / W. Zhao, X. H. Yang // *South African Journal of Science*. – 2010. – Vol. 106. – P. 81–95.
385. Zhu, W. Z. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells / W. Z. Zhu, B. Van Biber, M. A. Laflamme // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 767. – P. 419–431.

386. Zonneveld, A. J. Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension / A. J. Zonneveld, T. J. Rabelink // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2006. – Vol.15. – P. 167–172.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Культура эндотелиальной линии EA. hu926..... С. 64
2. Рисунок 2 – Результаты исследования количества лейкоцитов и нейтрофилов в процессе мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН..... С. 73
3. Рисунок 3 – Морфология мазка концентрата клеток крови после мобилизации G-CSF, обогащенного выделением на градиенте плотности фиколл/верографина у пациентов с ХСН. Увеличение $\times 90$ С. 74
4. Рисунок 4 – Двухпараметрические гистограммы распределения ЭПК, полученные в результате цитофлюориметрического исследования МНК периферической крови при мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН..... С. 79
5. Рисунок 5 – Динамика изменения абсолютного количества ЭПК с фенотипом $CD34^+$ в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН ($n = 30$)..... С. 82
6. Рисунок 6 – Динамика изменения абсолютного количества ЭПК с фенотипом $CD34^+/CD133^+$ и $CD34^+/VEGFR_2^+$ в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН ($n = 30$)..... С.83
7. Рисунок 7 – Динамика изменения абсолютного количества $CD34^-/CD133^+$ и $CD34^+/CD31^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН ($n = 30$)... С. 84
8. Рисунок 8 – Динамика изменения абсолютного количества $CD34^-/VEGFR_2^+$ и $CD34^-/CD31^+$ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН ($n = 30$)... С. 85
9. Рисунок 9 – Динамика изменения абсолютного количества $CD14^+/VEGFR_2^+$ и $CD14^-/VEGFR_2^+$ клеток в ходе проведения

- процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 30)... С. 86
10. Рисунок 10 – Иммуноцитохимическая идентификация CD34⁺ клеток мазка концентрата клеток после мобилизации G-CSF, обогащенного выделением на градиенте плотности фиколл/верографина, у пациентов с ХСН..... С. 87
11. Рисунок 11 – Показатели пролиферативной активности МНК концентрата клеток периферической крови пациентов с ХСН в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF (n = 35).... С. 89
12. Рисунок 12 – Количество колониеобразующих единиц МНК до и после завершения процесса мобилизации G-CSF пациентов с ХСН (n = 28)..... С. 92
13. Рисунок 13 – КОЕ МНК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF через 14 суток культивирования (колонии содержат более 50 клеток). Увеличение инвертированного микроскопа 4×10 С. 93
14. Рисунок 14 – Динамика изменения абсолютного количества CD34⁺/CXCR₄⁺ клеток в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 20)..... С. 94
15. Рисунок 15 – Морфология адгезировавшей фракции культуры МНК, полученных у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (n = 6)..... С. 108
16. Рисунок 16 – Морфология пролиферирующей фракции культуры МНК, полученных у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (n = 6)..... С. 109
17. Рисунок 17 – Морфология культуры ЭПК пациентов с ХСН на 27-е сутки культивирования *in vitro*..... С. 110
18. Рисунок 18 – Концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на фибронектине (n = 8)..... С. 112
19. Рисунок 19 – Концентрации цитокинов и ростовых факторов

- в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на желатине (n = 8)..... С. 113
20. Рисунок 20 – Концентрации стойких метаболитов NO в кондиционной среде ЭПК на 8-е и 16-е сутки культивирования на фибронектине и желатине (n = 8)..... С. 115
21. Рисунок 21 – Концентрации цитокинов в кондиционной среде ЭПК пациентов с ХСН (n = 8)..... С. 120
22. Рисунок 22 – Концентрации цитокинов в кондиционной среде эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)..... С. 121
23. Рисунок 23 – Концентрации стойких метаболитов NO в кондиционной среде ЭПК пациентов с ХСН и EA. hu926..... С. 122
24. Рисунок 24 – Показатели пролиферативного потенциала культуры ЭПК, мобилизованных G-CSF, пациентов с ХСН (n = 8)..... С. 124
25. Рисунок 25 – Показатели миграционной активности культуры ЭПК мобилизованных G-CSF пациентов с ХСН (n = 8)..... С. 126
26. Рисунок 26 – Показатели пролиферативного потенциала клеток эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)..... С. 128
27. Рисунок 27 – Показатели миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)..... С. 129
28. Рисунок 28 – Показатели горизонтальной миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA. hu926 (n = 8)... С. 131
29. Рисунок 29 – Показатели горизонтальной миграционной активности культуры клеток эндотелиальной линии EA. hu926..... С. 132
30. Рисунок 30 – Значения миграции клеток эндотелиальной линии EA. hu926 по направлению к градиенту ростовых факторов..... С. 134
31. Рисунок 31 – Значения миграции клеток эндотелиальной линии EA. hu926 по направлению лунок, обработанных

- фибронектином..... С. 135
32. Рисунок 32 – А) Мышечные волокна голени интактной конечности (увеличение 10x40); Б) Деструкция мышечных волокон голени (модель ишемии). Увеличение 10×40. Обозначения: МВ – мышечные волокна; Кк – кровеносный капилляр..... С. 147
33. Рисунок 33 – Неоангиогенез между фрагментами мышечных волокон голени и скопления моноклеарных клеток. А) – увеличение 10×40; Б) – увеличение 10×90. Обозначения: МВ – мышечные волокна; Кк – кровеносный капилляр; МНК – моноклеарные клетки..... С. 148
34. Рисунок 34 – Результаты исследования концентраций цитокинов и ростовых факторов ЭПК, культивированных в разные сроки (n=16)..... С. 164
35. Схема 1 – Схема паракринных взаимодействий циркулирующих ЭПК, тканевых ЭПК и эндотелиальных клеток..... С. 173
36. Таблица 1 – Характеристика пациентов с ХСН..... С. 60
37. Таблица 2 – Корреляционные связи между количеством выделенных МНК из аферезного продукта и клиническими показателями пациентов с ХСН (n = 72)..... С. 71
38. Таблица 3 – Динамика изменения абсолютных и относительных значений показателей общего анализа крови у пациентов с ХСН на фоне мобилизации G-CSF (n = 58)..... С. 72
39. Таблица 4 – Количество основных популяций МНК периферической крови у пациентов с ХСН на фоне мобилизации G-CSF (n = 26)..... С. 75
40. Таблица 5 – Относительное количество ЭПК у пациентов с ХСН (n = 30)..... С. 77
41. Таблица 6 – Интенсивность пролиферативного ответа МНК

- концентрата клеток периферической крови пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с учетом относительного количества ЭПК с фенотипом CD34⁺ (n = 35)..... С. 90
42. Таблица 7 – Показатели фаз клеточного цикла популяции клеток с фенотипом CD34⁺, полученных после завершения курса мобилизации G-CSF пациентов с ХСН (n = 26)..... С. 90
43. Таблица 8 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после завершения процедуры мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 35)..... С. 96
44. Таблица 9 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после мобилизации G-CSF, стимулированных G-CSF, у пациентов с ХСН (n = 35)..... С. 99
45. Таблица 10 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после мобилизации G-CSF, стимулированных EPO, у пациентов с ХСН (n = 35)..... С. 100
46. Таблица 11 – Корреляционные связи между спонтанной продукцией цитокинов и цитокинов, стимулированных *in vitro* G-CSF, у пациентов с ХСН (n=35)..... С. 101
47. Таблица 12 – Корреляционные связи между спонтанной продукцией цитокинов и стимулированной *in vitro* EPO у пациентов с ХСН (n = 35)..... С. 102
48. Таблица 13 – Корреляционные связи между количеством ЭПК в периферической крови и уровнем продукции цитокинов и ростовых факторов после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n = 35)..... С. 104
49. Таблица 14 – Корреляционные связи между продукцией цитокинов ЭПК на фибронектине и желатине (n = 8)..... С. 117

50. Таблица 15 – Изменение показателей функционального состояния миокарда пациентов при интрамиокардиальном введении МНК (n = 56)..... С. 138
51. Таблица 16 – Корреляционные связи между количеством ЭПК в периферической крови при мобилизации G-CSF и клинических данных пациентов (n = 20)..... С. 139
52. Таблица 17 – Корреляционные связи количества ЭПК в периферической крови с функциональными параметрами пациентов (n = 20)..... С. 141
53. Таблица 18 – Корреляционные связи концентрации Ер₀ в кондиционной среде МНК после мобилизации с функциональными параметрами пациентов с ХСН (n = 20)..... С. 142