

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

Автореферат диссертации на соискание  
ученой степени доктора медицинских наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, академик РАН **Коненков Владимир Иосифович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Трунов Александр Николаевич**  
(Научный центр клинической и экспериментальной медицины, руководитель лаборатории иммунологии репродукции)

доктор медицинских наук **Обухова Лидия Александровна**  
(Новосибирский государственный университет, профессор кафедры физиологии факультета естественных наук)

доктор медицинских наук, профессор **Акулинин Виктор Александрович**  
(Омская государственная медицинская академия, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии)

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://www.ngmu.ru/dissers/10/0>)

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

А. В. Волков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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) (Losordo D. W. et al., 2011; Motabi I. H. et al., 2012; Mozid A. M. et al., 2013).

ЭПК представляют собой уникальную популяцию клеток, которые, как и эмбриональные ангиобласты, способствуют формированию сосудов в постнатальном периоде как за счет ангиогенеза, так и путем васкулогенеза, когда в ответ на ангиогенные ростовые факторы ЭПК мигрируют из ниши костного мозга в кровеносное русло, циркулируют и трансформируются в тканях в локальные адгезивные ЭПК (Kawamoto A. et al., 2009; Fadini G. et al., 2012; Jiga J. et al., 2013).

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) (Michowitz Y. et al., 2007; Valconi G. et al., 2009; Pelliccia F. et al., 2013).

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 (Kinnaird T. et al., 2004; Kim W. S. et al., 2013). Быстрое развитие клинического эффекта и очень низкое количество интегрированных в зоне повреждения ЭПК предполагает паракринные эффекты этих клеток (Zhang Y. et al., 2009; Kushner E. et al., 2010).

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 (Fuchs S. et al., 2003; Tse H. F. et al., 2007; Losordo D. W. et al., 2011; Quyuumi A. A. et al., 2011).

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 (Bauer J. et al., 1992).

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 моноклеарных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью до и после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.

2. Исследовать функциональную активность моноклеарных 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 моноклеарных 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. hu926.

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 мононуклеарных клеток (МНК) пациентов с ХСН, способность к миграции *in vitro*, установлен спектр секретлируемых 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 CXCR<sub>4</sub> на CD34<sup>+</sup> 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- $\alpha$ , 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, EPO, VEGF, TNF- $\alpha$  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); 4-м 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); 10-й Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии» (Новосибирск, 2011); 7-х научных чтениях, посвященных памяти академика РАМН Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, 2011); 4-й Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2011); 3-й Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); 5-м 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); Международной конференции «Vascular biology, materials and engineering esvs spring meeting» (Frankfurt am Main, 2013); 11-й Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2013); 5-й Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013); 1-м Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013); расширенном семинаре ФГБУ НИИКЭЛ 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.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве объектов исследования выступали: МНК периферической

крови пациентов ИБС с III-IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности; клетки эндотелиальной линии человека EA. hу926.

Исследование проведено у 77 пациентов, страдающих ИБС, с III-IV функциональным классом ХСН (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. Длительность заболевания ИБС составила  $(7,94 \pm 5,86)$  лет, количество перенесенных ИМ –  $1,59 \pm 0,77$ . Пациенты проходили обследование и плановое хирургическое лечение в институте патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина.

Рекомбинантный человеческий G-CSF (Grasalva, Израиль) вводился подкожно в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки общим количеством пять инъекций. На шестые сутки пациентам проводилась процедура аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови (Haemonetics MCS<sup>+</sup>, США). МНК выделяли на градиенте плотности фиколла/верографина ( $\rho = 1,078$  г/л).

Фенотип ЭПК исследовали на проточном цитометре FACSCantoII с использованием моноклональных антител меченых FITC и PE к CD34, CD45, CD133, VEGFR<sub>2</sub>, CD31, CD14 (Becton Dickinson, США). Экспрессию CXCR<sub>4</sub> изучали на CD34<sup>+</sup> клетках с использованием меченных APC антител.

Интенсивность пролиферативного потенциала МНК крови исследовали в триплетах ( $2 \times 10^5$  клеток/лунка) в спонтанном и стимулированном тестах (5 мкг/мл Конканавалина А – Кон А, США), в присутствии G-CSF (50 Ед/мл; Grasalva, Израиль) и Еро (33 Ед/мл; Рекормон, США) на спектрофотометре (Stat Fax 2100, США) по включению клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США) и преобразования его в формазан митохондриальными дегидрогеназами. Значения выражали в условных единицах оптической плотности (ед. опт. пл.).

Колониеобразующую активность определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ), сформированных в полутвердой среде MethoCult (Stemcell Technologies, США) через 14 дней культивирования.

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 10 % FCS (Биолот, Россия) в обработанных фибронектином (Sigma-Aldrich, США) и желатином (Мосхимфармпрепараты, Россия) флаконах, в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержания CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. После удаления неприлипших клеток ЭПК культивировали 8 суток для получения культуры «ранних» ЭПК, 16 суток – для «поздних» ЭПК.

Культивирование клеток эндотелиальной линии человека EA. hu926 проводили в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % FCS в концентрации  $1,7 \times 10^5$ /мл при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержания CO<sub>2</sub> до образования конфлюэнтного монослоя. Для клеток линии EA. hu926 характерно сохранение основных морфофункциональных свойств, присущих клетками эндотелия макрососудов (Рисунок 1).

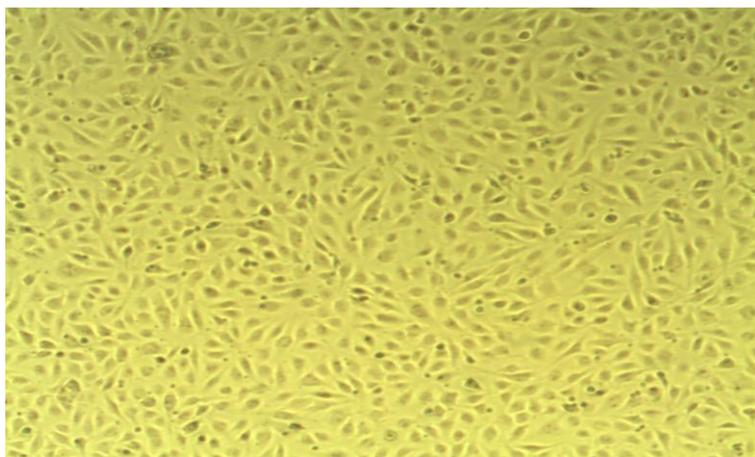


Рисунок 1 – Культура эндотелиальной линии EA. hu926

Для получения кондиционных сред (КС) ЭПК пациентов после мобилизации и клетки EA. hu926 инкубировали 72 часа в среде с 1 % FCS. Надосадок фильтровали через шприцевые насадки с диаметром пор 0,22 мкм

(TPP, Швейцария), разливали по аликвотам и хранили при минус 70 °С.

Пролиферативную активность клеток EA.hy926 изучали на аппарате xCELLigence System (Roche, США). Система измеряет электрический импеданс, создаваемый микроэлектродами, встроенными на дне планшетов, что предоставляет количественную информацию о статусе клеток в значении клеточного индекса (КИ). Оценивали уровень пролиферативной активности культур ЭПК при добавлении: G-CSF (300 мкг/мл), VEGF (BioVision, США; 10 нг/мл), EPO (33,4 МЕ/мл) и 30 % от общего объема лунки КС от клеток EA.hy926; клеток EA.hy926 – при добавлении EPO или 30 % от общего объема лунки КС от культур ЭПК. Измерения производились в автоматическом режиме.

Уровень продукции цитокинов изучали в КС от 72-часовых культур МНК в спонтанном и стимулированных тестах (5 мкг/мл Кон А; 10 мкг/мл ЛПС; 50 Ед/мл G-CSF; 33 Ед/мл EPO); культур ЭПК, полученных после мобилизации, и клеточной линии EA.hy926. Содержание в КС TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-18, VEGF, EPO и G-CSF определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест».

По изменению электрического импеданса на аппарате xCELLigence System в двухуровневых камерах оценивали миграционную активность культуры ЭПК и клеток линии EA.hy926. Изучали влияние на миграционный потенциал культур ЭПК 30 % от общего объема лунки КС от клеток EA.hy926; на миграционный потенциал клеток EA.hy926 – EPO, VEGF, TNF- $\alpha$  (Sigma-Aldrich, США; 5 нг/мл) и 30 % от общего объема лунки КС от культур ЭПК. Миграцию клеток EA.hy926 изучали методом десквамации монослоя с помощью прибора Cell-IQ (CM Technologies Ltd., Финляндия), который сочетает условия долгосрочной инкубации клеток с получением изображений методом фазового контраста в режиме реального времени. Клетки EA.hy926 культивировались в 6-луночных планшетах (Costar, Cambridge, MA) до 80–90 % слияния в среде, содержащей 1 % FCS. Образованный конфлюэнтный слой клеток десквамировали в виде вертикальной линии, далее культивировали в среде, содержащей 5 % FCS (контроль) и с 30 % КС от культуры ЭПК.

Для исследования продукции стойких метаболитов оксида азота ЭПК пациентов и клетки EA. hу926 культивировали 48 часов, затем добавляли реактив Грисса (1 % сульфаниламида и 0,1 % N-1-(нафтил) этилендиамина дигидрохлорида в 2,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), инкубировали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

Пациентам интрамиокардиально под контролем навигационной системы NOGA XR в 10 точках вводили МНК периферической крови после мобилизации по  $1,5 \times 10^8$ /мл в объеме 2 мл. Эффективность интрамиокардиального введения 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.

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  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Морфофункциональные свойства циркулирующих СПК у пациентов с ХСН при мобилизации G-CSF.** Известно, что введение G-CSF условно здоровым лицам ведет к увеличению количества лейкоцитов в периферической крови, обусловленное в основном разрастанием гранулоцитарного ростка кроветворения (Anderlini P. et al., 2008; Motabi I.H. et al., 2012). Первоочередная

задача исследования состояла в оценке способности введения G-CSF в дозе 3,3–5,0 мкг/кг приводить к увеличению количества нейтрофилов в периферической крови у пациентов с ХСН как первичного показателя эффективности мобилизации СПК. Показано, что введение G-CSF пациентам приводит к увеличению количества лейкоцитов и гранулоцитов в периферической крови (в 4,9 раз и 6,8 раз, соответственно) к 6-м суткам мобилизации и не влияет на другие ростки кроветворения.

Ранее 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, к увеличению количества ЭПК в периферической крови (Hill J.M. et al., 2005; Elsheikh E. et al., 2005; Schulz C. et al., 2009). Данные же о количестве различных популяций ЭПК у пациентов с ХСН являются противоречивыми, а эффект мобилизации ЭПК при введении G-CSF практически не исследован (Honold J. et al., 2012). 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.

Показано наличие 9 популяций ЭПК в периферической крови (Таблица 1). Причем, CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> клетки являются самой ранней в дифференцировочном отношении популяцией ЭПК – так называемые «незрелые» ЭПК. Клетки, экспрессирующие CD34/CD133, CD34 маркеры, являются «более зрелыми» популяциями ЭПК. Коэкспрессия маркера зрелых эндотелиальных клеток VEGFR<sub>2</sub> или CD31 к CD34 маркеру стволовых клеток позволяет определить еще две популяции зрелых ЭПК – CD34<sup>+</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> клетки. Утрата экспрессии маркера стволовых клеток CD34 на этих двух популяциях клеток характеризует эндотелиальные циркулирующие клетки, представленные фенотипами CD34<sup>-</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> и CD14<sup>-</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>. Также выявлены ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом CD14<sup>+</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>.

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<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> и CD34<sup>-</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>, а также ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом CD14<sup>+</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>.

Таблица 1 – 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 <sup>+</sup>	0,01 (0,01–0,07)	0,42 (0,25–0,64); p = 0,000024
CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup>	0,01 (0,01–0,01)	0,02 (0,01–0,04); p = 0,01
CD34 <sup>-</sup> /CD133 <sup>+</sup>	0,10 (0,05–0,10)	0,40 (0,05–0,60); p = 0,0039
CD34 <sup>+</sup> /VEGFR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0,01 (0,01–0,02)	0,09 (0,08–0,10); p = 0,004
CD34 <sup>-</sup> /VEGFR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0,27 (0,17–0,60)	0,95 (0,85–1,10); p = 0,004
CD34 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	0,10 (0,05–0,28)	0,28 (0,04–0,30); p = 0,02
CD34 <sup>-</sup> /CD31 <sup>+</sup>	15,90 (12,30–30,00)	18,00 (13,00–32,00); p = 0,04
CD14 <sup>-</sup> /VEGFR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0,61 (0,41–2,42)	2,90 (1,35–5,35); p = 0,06
CD14 <sup>+</sup> /VEGFR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0,70 (0,10–3,90)	3,80 (0,13–6,30); p = 0,003

Примечание. Данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75 % квартильных значений (LQ – UQ); n – количество наблюдений; p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF

Введение G-CSF приводит к мобилизации из костного мозга всех анализируемых популяций ЭПК. Выявлено статистически значимое возрастание количества «классических» популяций ЭПК с фенотипом CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup>. Относительное количество CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> клеток увеличилось в 16 раз по сравнению с популяцией клеток CD34<sup>+</sup>/CD133. Из литературы известно, что маркер CD133 характерен для малодифференцированных стволовых клеток (Peichev M. et al., 2000; Khakoo A. et al., 2005; Janic B. et al., 2010). Выявлено увеличение пула циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом CD34<sup>-</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup> в 10 раз по сравнению с количеством CD34<sup>+</sup>/VEGFR<sub>2</sub><sup>+</sup> ЭПК; увеличение количества зрелых

ЭПК с фенотипом  $CD34^+/CD31^+$  и циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток с фенотипом  $CD34^-/CD31^+$  после мобилизации G-CSF. В процессе мобилизации статистически значимо возрастает и количество ЭПК моноцитарного происхождения с фенотипом  $CD14^+/VEGFR_2^+$ .

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, экспрессирующих  $CD34^+, CD133^+, VEGFR_2^+$  маркеры (Hill J. M. et al., 2005; Honold J. et al., 2012).

Анализ абсолютных значений популяций ЭПК у пациентов с ХСН до и после проведения процедуры мобилизации G-CSF выявил статистически значимое увеличение количества ЭПК с фенотипом  $CD34^+$  (с  $0,238 \times 10^6/\text{л}$  до  $18,7 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^+/CD133^+$  (с  $0,23 \times 10^6/\text{л}$  до  $0,96 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^+/VEGFR_2^+$  (с  $0,21 \times 10^6/\text{л}$  до  $3,95 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^-/CD133^+$  (с  $1,65 \times 10^6/\text{л}$  до  $15,40 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^+/CD31^+$  (с  $1,70 \times 10^6/\text{л}$  до  $8,40 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^-/VEGFR_2^+$  (с  $5,25 \times 10^6/\text{л}$  до  $43,4 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD34^-/CD31^+$  (с  $221,4 \times 10^6/\text{л}$  до  $543,0 \times 10^6/\text{л}$ );  $CD14^+/VEGFR_2^+$  (с  $9,8 \times 10^6/\text{л}$  до  $84,8 \times 10^6/\text{л}$ ). На основании иммуноцитохимического исследования было показано, что  $CD34$  маркер экспрессируется на поверхности клеточной мембраны МНК после мобилизации G-CSF.

Таким образом, 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.

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 (Kastrup J. et al., 2006; Balconi G. et al., 2009). Основными свойствами клеток, характеризующими их функциональную активность, являются способность к пролиферации, миграции и продукции

биологически активных веществ (Kinnaird T. et al., 2004; Gneschi M. et al., 2008).

Изучение пролиферативной активности показало, что после мобилизации как в спонтанных условиях, так и при стимуляции Кон А и цитокинами G-CSF и EPO происходит увеличение пролиферации МНК пациентов по сравнению с показателями до мобилизации G-CSF ( $p < 0,05$ ). Интенсивность пролиферативного ответа МНК, обогащенных ЭПК, зависела от количества в периферической крови клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>. В группе пациентов, имевших в периферическом русле крови ЭПК с фенотипом CD34<sup>+</sup> свыше 0,4 %, выявлен статистически значимо больший уровень пролиферации МНК как в спонтанных условиях (на 70 %) так и при стимуляции митогеном Кон А (на 30 %), цитокинами G-CSF (на 45%) и EPO (на 55 %), по сравнению с показателями при содержании CD34<sup>+</sup> клеток менее 0,4 %. Кроме того, вклад мобилизованных ЭПК в пролиферацию подтверждается увеличением колониеобразующей активности МНК после мобилизации G-CSF, что показано в литературе и у здоровых доноров (Anderlini P. et al., 2008). Количество КОЕ увеличивается более чем в 30 раз после мобилизации G-CSF по сравнению с исходными данными до введения G-CSF пациентам ( $p < 0,01$ ).

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<sup>+</sup> ЭПК возрастает пролиферативная активность МНК, что является косвенным доказательством того, что интенсивность пролиферативного потенциала МНК в некоторой части обеспечена мобилизованными ЭПК.

Помимо пролиферации, важным функциональным показателем СПК является способность к миграции. Миграция ЭПК в органы и ткани обусловлена ишемическим запросом поврежденной ткани, а основным фактором, способствующим хоумингу ЭПК, является SDF-1. При этом его связь с рецептором CXCR<sub>4</sub> регулирует мобилизацию ЭПК в периферическое русло крови и хоуминг в поврежденные ткани (Lapidot T. et al., 2005; Sugiyama T. et al.,

2006). Было установлено, что абсолютное количество циркулирующих ЭПК с фенотипом CD34<sup>+</sup>, коэкспрессирующих маркер хоуминга CXCR<sub>4</sub>, увеличилось после проведения 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 количеством данных клеток  $1,6 \times 10^6/\text{л}$  ( $0,9 \times 10^6$ – $4,0 \times 10^6$ ); ( $p = 0,04$ ). Это отражает возросшую способность данной популяции ЭПК к миграции в область ишемизированного миокарда и вероятность встраивания клеток в поврежденный миокард у пациентов. Ранее показано, что CD34<sup>+</sup>/CXCR<sub>4</sub> популяция ЭПК отвечает не только за миграцию клеток, но и является «сосудообразующей» (Chen J. et al., 2012). Имеется прямая корреляция количества CD34<sup>+</sup>/CXCR<sub>4</sub><sup>+</sup> ЭПК с увеличением фракции выброса левого желудочка у пациентов (Wyderka R. et al., 2012).

Однако увеличение количества ЭПК, их пролиферативной активности и способности к хоумингу не гарантируют того, что клетки, достигнув зоны ишемизированного миокарда, смогут образовать новую сосудистую сеть. 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. В настоящее время рассматривается паракринный механизм регенерации поврежденных тканей (Kinnaird T. et al., 2004; Kim W. S. et al., 2013).

Было выявлено, что МНК пациентов с ХСН конститутивно продуцируют регуляторные цитокины и ростовые факторы (Таблица 2). Уровень секреции VEGF, IL-8 и TNF- $\alpha$  в спонтанных условиях был наиболее высоким. Продукция МНК TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-8 и Еро стимулировалась Кон А и ЛПС. Продукция G-CSF и IL-18 увеличилась только при стимуляции Кон А, а VEGF – при стимуляции ЛПС. После окончания мобилизации МНК, обогащенные ЭПК, уменьшали продукцию TNF- $\alpha$  и G-CSF по сравнению с продукцией до мобилизации. Уровень секреции IL-18, Еро и VEGF 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 IL-8 после мобилизации.

Таблица 2 – Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах МНК до и после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН (n=35)

Уровни продукции (Me; LQ-HQ)		Тип продукции				
		Спонтанная	Кон А	ЛПС	G-CSF	Еро
TNF- $\alpha$ , пг/мл	до	102 (100-175)	420 (172-1376)	644 (405-900)	80 (55-110)	100 (99-101)
	после	33 (23-85) p = 0,0003	278 (188-738) p = 0,59	240 (130-370) p = 0,14	425 (208-888) p = 0,002	990 (792-1298) p = 0,0007
IL-10, пг/мл	до	68 (57-101)	571 (101-746)	535 (345-694)	525 (338-650)	294 (189-300)
	после	72 (22-102) p = 0,72	485 (101-748) p = 0,47	680 (102-119) p = 0,75	1294 (990-1520) p = 0,001	895 (790-1190) p = 0,001
IL-18, пг/мл	до	33 (18-102)	58 (50-64)	39 (36-40)	181 (167-198)	399 (212-415)
	после	103 (67-135) p = 0,034	197 (102-374) p = 0,017	147,2 (102-256) p = 0,0004	235 (113-274) p = 0,4	190 (104-227) p = 0,05
IL-8, пг/мл	до	732 (103-965)	1550 (147-4450)	1425 (120-4000)	3115 (2980-3345)	3840 (2890-4160)
	после	735 (103-822,5) p = 0,31	740 (420-4805) p = 0,09	735 (350-4065) p = 0,14	1729 (357-3586) p = 0,17	1578 (348-3100) p = 0,008
Еро, МЕ/мл	до	27 (17-101)	216 (161-277)	235 (171-240)	90 (80-101)	—
	после	102 (35-306,5) p = 0,008	213 (130-289) p = 0,67	162 (129-222) p = 0,63	176,5 (132-201) p = 0,05	—
G-CSF, пг/мл	до	13 (10-101)	135 (127-165)	16 (15-18)	—	8,5 (7-10)
	после	11 (10-30) p = 0,3	967 (769-1010) p = 0,0007	940 (763-3332) p = 0,0007	—	865 (586-3660) p = 0,0007
VEGF, пг/мл	до	256 (102-450)	293 (256-300)	448 (432-458)	172 (156-180)	253 (219-270)
	после	298 (113-340) p = 0,03	300 (287-339) p = 0,56	387 (211-470) p = 0,09	298 (240-389) p = 0,001	327 (278-492) p = 0,03
Примечание. Данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25–75 % квартильных значений (LQ – UQ); n – количество наблюдений; p – достоверность различия параметров до и после мобилизации G-CSF						

Также в качестве стимулятора культуры МНК использовали G-CSF и Ерo. В экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что данные цитокины обладают проангиогенными свойствами (Westenbrink B.D. et al., 2010; Kojima H. et al., 2011; Hoch M. et al., 2011). Добавление в культуру МНК, полученную до мобилизации G-CSF, приводит к статистически значимому увеличению продукции IL-10, IL-18, IL-8 и Ерo и снижению уровня VEGF. После мобилизации добавление G-CSF стимулирует секрецию TNF- $\alpha$ , IL-10 и IL-18. Уровень секреции VEGF остается неизменным. Добавление Ерo в культуру МНК, полученную до мобилизации G-CSF, приводит к повышению секреции IL-10, IL-18 и IL-8. Уровень секреции G-CSF и VEGF остается неизменным. Очевидно, что ряд цитокинов секретируется преимущественно Т-лимфоцитами, другие – моноцитами. 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 пролиферативную активность МНК, но и секрецию ими биологически активных веществ (Dimmeler S. et al., 2008).

Показано, что имеются корреляционные связи между уровнем спонтанной продукции IL-10 и уровнем G-CSF-стимулированной продукции IL-18 ( $R = 0,75$ ;  $p = 0,02$ ); между спонтанной продукцией IL-18 и Ерo-стимулированной продукцией IL-10 ( $R = 0,65$ ;  $p = 0,045$ ); между спонтанным уровнем IL-8 и Ерo-стимулированным уровнем продукции IL-18 ( $R = -0,76$ ;  $p = 0,01$ ). Полученные результаты свидетельствуют, что ростовые факторы и цитокины, секретируемые обогащенными ЭПК МНК 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, обладают высокой пролиферативной активностью, способны к осуществлению хоуминга и продуцируют широкий спектр цитокинов, в том числе с проангиогенным

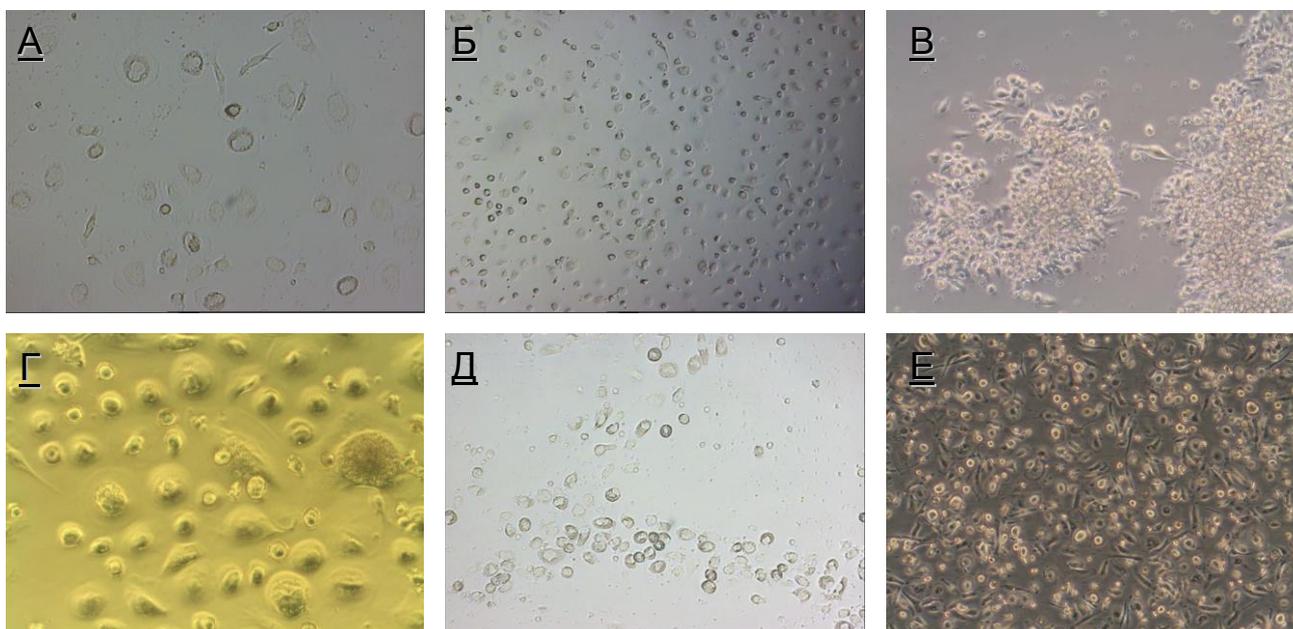
действием, которые могут вносить существенный вклад в аутокринный и паракринный эффекты ЭПК на процессы репарации/регенерации ишемизированной ткани.

Из данных литературы известно, что функциональная активность ЭПК зависит от их фенотипа (Urbich C. et al., 2005; Goon P. K. et al., 2006), поэтому закономерным стало изучение взаимосвязей между уровнями продукции цитокинов и количеством различных популяций ЭПК пациентов с ХСН в ходе проведения процедуры мобилизации G-CSF. Была установлена корреляционная связь между количеством ЭПК с фенотипом  $CD34^-/CD133^+$  и продукцией TNF- $\alpha$  ( $R = 0,73$ ;  $p = 0,02$ ); между продукцией IL-18 и количеством ЭПК с фенотипом  $CD34^+/VEGFR_2^-$  и фенотипом  $CD34^+/VEGFR_2^+$  ( $R = 0,70$ ;  $p = 0,03$  и  $R = 0,82$ ;  $p = 0,01$ ; соответственно). Продукция Epo имела корреляционную связь с количеством ЭПК с фенотипом  $CD34^-/VEGFR_2^+$  ( $R = 0,86$ ;  $p = 0,005$ ); продукция VEGF – с количеством  $CD34^+/CD31^+$  ЭПК; а продукция IL-10 – с количеством ЭПК с фенотипом  $CD34^-/CD31^+$  ( $R = 0,90$ ;  $p = 0,03$ ). Таким образом, выявленные корреляционные связи позволяют предположить, что циркулирующие клетки с фенотипом «незрелых» ЭПК ( $CD34^-/CD133^+$ ), более зрелые ЭПК ( $CD34^+/VEGFR_2^-$ ,  $CD34^+/VEGFR_2^+$ ,  $CD34^+/CD31^+$ ) и циркулирующие эндотелиальные клетки ( $CD34^-/VEGFR_2^+$ ,  $CD34^-/CD31^+$ ) принимают активное участие в продукции цитокинов, обладающих выраженной проангиогенной активностью.

**Морфофункциональные свойства культивируемых ЭПК пациентов с ХСН при мобилизации G-CSF.** Циркулирующие ЭПК при миграции их в ткани становятся тканевыми ЭПК, способствуют развитию сосудов, влияя на различные этапы ангиогенеза (Medina R. J. et al., 2010). В ряде работ показано, что культивирование МНК периферической крови в специальных условиях способствует появлению в клеточной культуре различных типов ЭПК, дифференцировка в которые определяется микроокружением (Timmermans F. et al., 2009; Morin KT. et al., 2013). В то же время способность СПК дифференцироваться в ЭПК зависит от возраста и наличия хронических

заболеваний (Werner N. et al., 2007; Keymel S. et al., 2008). 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 фибронектином и желатином, дифференцироваться в те или иные типы ЭПК. Установлено, что МНК адгезировали к поверхности флакона и к 12-му дню формировали монослой, преимущественно состоящий из мелких округлых и слабо пролиферирующих клеток, а к 14-м суткам – колонии и кластеры ЭПК (Рисунок 2 – А, Б, В). При дальнейшем культивировании ЭПК приобретали веретенообразную форму, культура имела вид «глыбчатой мостовой». Затем ЭПК выстраивались в первичные сосудистые тубулоподобные структуры (Рисунок 2 – Г, Д, Е), что является морфологической характеристикой ЭПК.

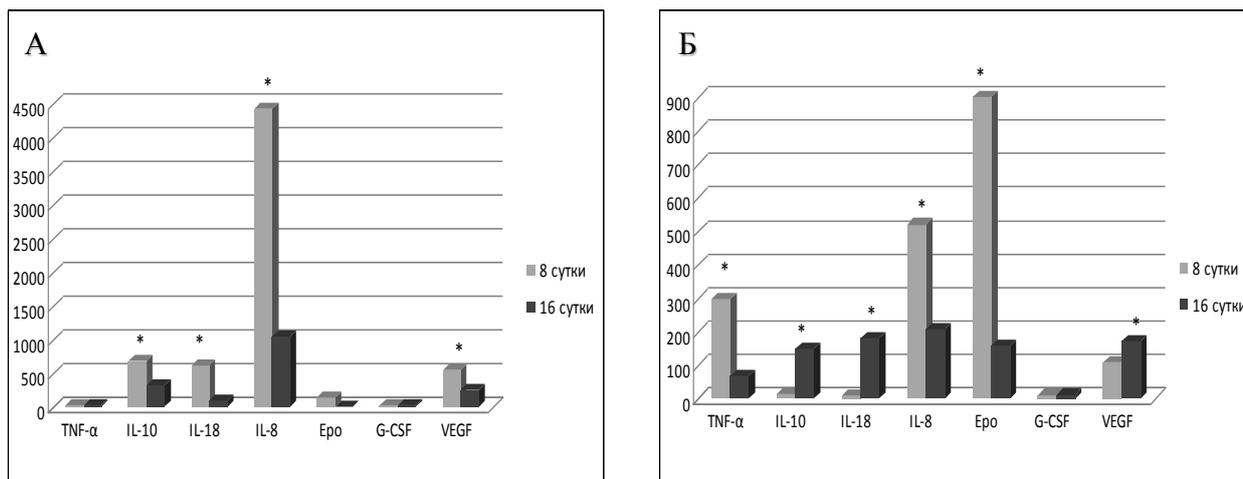


Примечание – А – адгезия округлых клеток на 5-е сутки культивирования; Б – монослой клеток на 12-е сутки; В – кластеры ЭПК; Г – активно пролиферирующие ЭПК; Д – выстраивание ЭПК в линии и формирование тубулоподобных структур на 21-е сутки; Е – морфология ЭПК на 27-е сутки культивирования. Увеличение инвертированного микроскопа 10 × 10

Рисунок 2 – Морфология адгезировавшей фракции культуры МНК, полученных у пациентов с ХСН после курса мобилизации G-CSF (n = 6)

Исследования ряда авторов показали, что «ранние» и «поздние» ЭПК 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 (Hur J. et al., 2004; Fadini G.P. et al., 2012).

Показано, что ЭПК пациентов с ХСН в культуре на разных адгезионных белках и сроках культивирования продуцируют ряд цитокинов и ростовых факторов (Рисунок 3 – А, Б).



Примечания: \* – достоверность различия параметров на 8-е и 16-е сутки культивирования ЭПК  $p < 0,05$ ; А – на фибронектине, Б – на желатине; n – количество наблюдений; по оси абсцисс – анализируемые цитокины; по оси ординат – концентрации цитокинов в пг/мл (Epo – МЕ/мл)

Рисунок 3 – Уровни продукции цитокинов и ростовых факторов ЭПК в разные сроки культивирования (n = 8)

ЭПК к 8-м суткам культивирования на фибронектине продуцируют 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 снижается и составляет IL-10 (320 пг/мл;  $p = 0,05$ ), IL-18 (95 пг/мл;  $p = 0,003$ ), IL-8 (1040 пг/мл;  $p = 0,003$ ), Epo (5 МЕ/мл;  $p = 0,003$ ), VEGF (255 пг/мл;  $p = 0,004$ ). Продукция TNF-α (10 пг/мл) и G-CSF (10 пг/мл) остается на том же уровне. К 8-м суткам культивирования на желатине уровень продукции TNF-α составил 297 пг/мл, а Epo – 900 МЕ/мл, что

выше, чем на фибронектине. Уровень IL-10 (11 пг/мл), IL-18 (7 пг/мл), IL-8 (520 пг/мл), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (107 пг/мл) был снижен по сравнению с продукцией на фибронектине. С увеличением срока (16-е сутки) культивирования на желатине снижается продукция EPO (155 МЕ/мл;  $p = 0,004$ ), TNF- $\alpha$  (66 пг/мл;  $p = 0,004$ ), IL-8 (205 пг/мл;  $p = 0,003$ ). На прежнем уровне сохраняется продукция G-CSF (10 пг/мл), 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 на 8-е сутки культивирования.

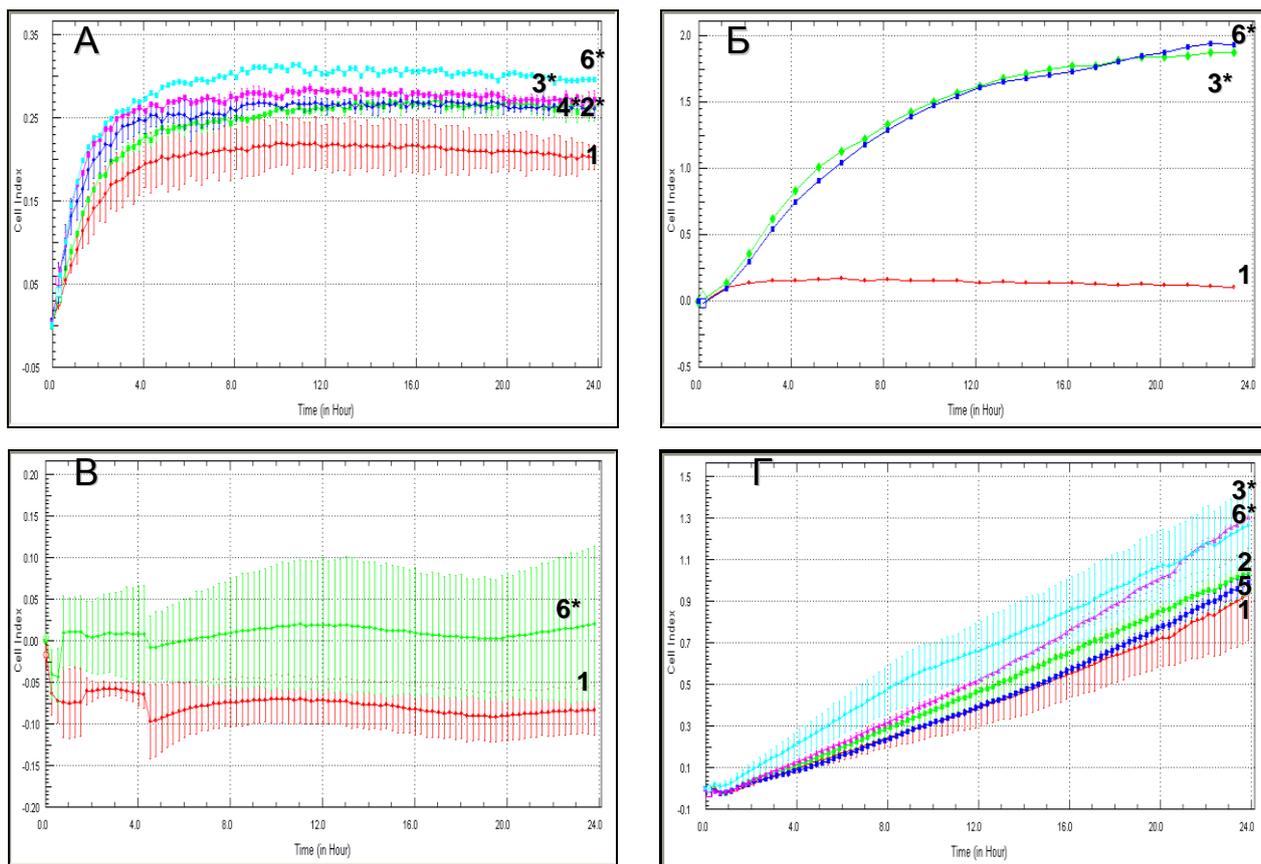
Кроме секреции цитокинов, эндотелиальные клетки характеризуются продукцией стойких метаболитов NO – вазодилатора, который повышает проницаемость эндотелия сосудов, что приводит к миграции клеток из кровеносного русла в ткани, тем самым способствуя ангиогенезу. ЭПК на фибронектине, к 16-м суткам снижают уровень продукции NO (4,7 и 3,1 ммоль/л на 8-е и 16-е сутки культивирования, соответственно). На желатине продукция NO увеличивается на 16-е сутки культивирования по сравнению с 8-ми сутками (3,9 ммоль/л и 5,0 ммоль/л, соответственно;  $p < 0,01$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что на желатине культура в большей степени представлена «поздними» ЭПК, которые лучше мигрируют в ткани и напрямую участвуют в ангиогенезе (Hamed S. et al., 2011).

Полученные данные согласуются с данными литературы о том, что растущие в ранние и поздние сроки ЭПК отличаются пролиферативным потенциалом и цитокинпродуцирующей активностью (Sieveking D.P. et al., 2008). «Ранние» ЭПК напрямую не участвуют в формировании сосудистой сети, а обладают паракринным действием, продуцируя высокий уровень проангиогенных пептидов, таких как VEGF, G-CSF, IL-8 и др. Эти клетки являются циркулирующими ангиогенными клетками. В отличие от них «поздние» ЭПК не обладают паракринным действием, секретируют необходимый для самоподдержания уровень ростовых факторов, но обладают высокой пролиферативной активностью, формируют первичные сосудистые структуры *in vitro*. «Ранние» и «поздние» ЭПК способствуют неоангиогенезу за

счет синергичного взаимодействия, обеспечивая сосудобразование и перфузию в ишемизированной ткани (Yoon C.H. et al., 2005).

**Изучение взаимовлияния культивируемых ЭПК пациентов с ХСН и зрелых эндотелиальных клеток клеточной линии EA.hy926.** Функциональная активность ЭПК зависит от влияния на них клеток, участвующих в неоваскулогенезе, в том числе эндотелиоцитов. С другой стороны, зрелые эндотелиальные клетки способны оказывать регулирующее влияние на ЭПК. Поэтому мы изучали паракринные взаимовлияния биологически активных веществ, секретируемых ЭПК пациентов и клеток эндотелиальной линии EA.hy926. Для сравнительного исследования использовали цитокины с проангиогенной активностью – VEGF, G-CSF, EPO, TNF- $\alpha$ . Показано, что пролиферация культуры ЭПК увеличивалась в присутствии КС от клеток EA.hy926 (КИ = 0,30;  $p = 0,02$ ), VEGF (КИ = 0,26;  $p = 0,03$ ), G-CSF (КИ = 0,26;  $p = 0,03$ ), EPO (КИ = 0,28;  $p = 0,02$ ) по сравнению со спонтанным пролиферативным потенциалом культуры ЭПК (КИ = 0,19), через 24 часа культивирования (Рисунок 3 А). С другой стороны, КС от культуры ЭПК увеличивал пролиферацию клеток EA.hy926 (КИ = 1,9;  $p = 0,01$ ) в сравнении со спонтанным уровнем (КИ = 0,1). EPO оказывал сопоставимое с КС стимулирующее действие (КИ = 1,8;  $p = 0,02$ ) (Рисунок 3 Б). Миграция культуры ЭПК в присутствии КС клеток EA.hy926 увеличивалась к 24 часам наблюдения (КИ = 0,07;  $p = 0,01$ ) по сравнению со спонтанной активностью ЭПК (КИ = 0,001) (рисунок 3 В). С другой стороны, клетки линии EA.hy926 быстрее мигрировали в присутствии КС от культуры ЭПК (КИ = 1,4;  $p = 0,01$ ) и EPO (КИ = 1,3;  $p = 0,01$ ) по сравнению со спонтанной миграцией EA.hy926 (КИ = 0,9). В то же время стимулирование миграции клеток EA.hy926 в присутствии VEGF и TNF- $\alpha$  не обнаружено.

В модели горизонтальной миграции выявлено, что клетки эндотелиальной линии EA.hy926 к 48 часам эксперимента закрывают бесклеточную поверхность до 70 % от исходных значений. Площадь закрытия поверхности в присутствии КС от ЭПК пациентов с ХСН достигает 90 %.



Примечание: А – пролиферация ЭПК; Б – пролиферация EA. hu926; В – миграция ЭПК; Г – миграция EA. hu926; по оси ординат – клеточный индекс; по оси абсцисс – время (в часах); 1 – спонтанный уровень, 2 – в присутствии VEGF, 3 – в присутствии EPO, 4 – в присутствии G-CSF, 5 – в присутствии TNF- $\alpha$ , 6 – в присутствии KC; \*– достоверность различий по сравнению со спонтанной миграцией ( $p < 0,05$ )

Рисунок 3 – Показатели пролиферативного и миграционного потенциала культуры ЭПК пациентов с ХСН и клеток линии EA. hu926 ( $n = 8$ )

Полученные результаты согласуются с данными литературы, показавшими, что KC ЭПК способствует ангиогенезу *in vitro* (Baker C. D. et al., 2013; Bhang S. H. et al., 2014; Di Santo S. et al., 2014).

Таким образом, недифференцированные ЭПК и зрелые эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние на функциональное состояние друг друга – пролиферацию и миграцию путем паракринных механизмов. Продукты секреции ЭПК стимулируют пролиферацию и миграцию клеток эндотелиальной линии EA. hu926, а продуцируемые EA. hu926 биоактивные вещества в свою очередь увеличивают функциональный потенциал ЭПК пациентов с ХСН.

**Взаимосвязь параметров морфофункциональных свойств обогащенных ЭПК мононуклеаров периферической крови с показателями функционального состояния миокарда пациентов с ХСН.** Показано, что 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. С показателями перфузии миокарда взаимосвязаны две популяции ЭПК – с фенотипом CD34<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. Выявлена корреляционная связь между количеством клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup> и улучшением перфузии миокарда, оцененной в покое спустя 6 месяцев после интрамиокардиального введения аутологичных МНК ( $R = 0,76$ ;  $p = 0,049$ ); между количеством CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> клеток и улучшением перфузии миокарда при нагрузке аденозином через 12 месяцев ( $R = 0,84$ ;  $p = 0,037$ ). У популяции CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> клеток также выявлена взаимосвязь с возрастанием ФВЛЖ через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК, обогащенных ЭПК ( $R = 0,67$ ;  $p = 0,018$ ). Выявлена положительная корреляционная связь между уровнем продукции Eро и улучшением класса сердечной недостаточности через 12 месяцев ( $R = 0,47$ ;  $p = 0,046$ ), и возрастанием фракции выброса левого желудочка через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК ( $R = 0,75$ ;  $p = 0,03$ ). Уровень продукции Eро связан с показателями перфузии миокарда, причем наблюдаются корреляционные связи между Eро и улучшением перфузии в покое через 6 месяцев ( $R = 0,59$ ;  $p = 0,049$ ), и улучшением перфузии при нагрузке аденозином через 12 месяцев наблюдения ( $R = 0,67$ ;  $p = 0,03$ ). 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.

Таким образом, 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. Таким образом, и циркулирующие ЭПК, и ЭПК, выращенные *in vitro*, можно использовать для трансплантации пациентам с ХСН в целях регенерации поврежденного миокарда.

## 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- $\alpha$ . Мобилизация ведет к возрастанию функционального резерва продукции проангиогенных цитокинов, поскольку уровень секреции TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$ , 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 удлинённую 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- $\alpha$ , 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  $Epo$  – 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 приемлемым в клинических исследованиях.

2. Для получения девяти субпопуляций ЭПК человека, различающихся по экспрессии различных мембранных маркеров (CD34, CD133, VEGFR<sub>2</sub>, 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  $1 \times 10^6$  млн/мл во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / **О. В. Повещенко**, А. П. Колесников, И. И. Ким, Е. В. Ульянов, А. Н. Мозжерина, Е. В. Янкайте, А. О. Соловьева, Т. В. Гертер, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // **Бюллетень СО РАМН.** – 2008. – № 5 (133). – С. 90–95.

2. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной

недостаточностью / В. И. Коненков, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, Н. А. Гульева, В. В. Бернвальд, А. В. Шевченко, О. В. Голованова, Е. В. Янкайте, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов // **Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.** – 2011. – Т. 6. – № 3. – С. 71–75.

3. Изучение динамики миграционной активности клеток костного мозга в условиях сингенной трансплантации *in vivo* у мышей СВА / А. О. Соловьева, А. Ф. Повещенко, А. В. Шевченко, **О. В. Повещенко**, В. И. Коненков // **Бюллетень ВСНЦ ЭЧ СО РАМН.** – 2011. – № 3(79). – С. 221–225.

4. **Повещенко, О. В.** Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // **Успехи современной биологии.** – 2012. – Т. 132. – № 1. – С. 69–76.

5. Эффективность мобилизации CD 34+ прогениторных клеток препаратом G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью / И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, В. И. Коненков, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, Н. А. Бондаренко, А. Ф. Повещенко, Д. С. Сергеевичев, А. М. Караськов // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2012. – № 1 – С. 75–78.

6. Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью / В. И. Коненков, Е. А. Покушалов, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, А. Б. Романов, Н. А. Гульева, В. В. Бернвальд, А. О. Соловьева, Е. В. Янкайте, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2012. – № 1. – С. 9–13.

7. Влияние криоконсервирования на количество эндотелиальных прогениторных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца / Н. А. Бондаренко, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Д. В. Хабаров, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. Ф. Повещенко,

В. И. Коненков // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2012. – № 4 – С. 18–20.

8. IL-10 и TNF- $\alpha$  после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца / **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Н. А. Бондаренко, Д. В. Хабаров, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2012. – № 4. – С. 148–149.

9. **Повещенко, О. В.** Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // **Успехи физиологических наук.** – 2012. – Т. 43, № 3. – С. 48–61.

10. Изучение миграции трансплантированных клеток костного мозга в ткань сердца / А. О. Соловьева, **О. В. Повещенко**, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков, А. М. Караськов // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2012. – № 3 – С. 75–78.

11. Оценка эффекта проангиогенных факторов на пролиферативную и миграционную активность клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 / А. П. Лыков, **О. В. Повещенко**, Н. А. Бондаренко, А. Ф. Повещенко, И. И. Ким, Т. В. Миллер, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, В. И. Коненков // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.** – 2013. – Т. 33. – № 4. – С. 23–29.

12. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы в разные сроки после трансплантации *in vivo* у мышей СВА / А. О. Соловьева, А. Ф. Повещенко, **О. В. Повещенко**, К. Э. Зубарева, Т. В. Миллер, В. И. Коненков // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.** – 2013. – Т. 33. – № 4. – С. 35–41.

13. Современные достижения в создании методов изучения миграции стволовых клеток / А.Ф.Повещенко, **О.В.Повещенко**, В.И.Коненков // **Вестник Российской академии медицинских науки.** – 2013. – № 9. – С. – 46–51

14. Функциональная характеристика мононуклеаров периферической

крови после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, А. Ф. Повещенко, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. М. Караськов, В. И. Коненков // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2014. – № 1 – С. – 26–31.

15. Влияние морфофункциональных свойств мобилизованных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью на эффективность аутологичной интрамиокардиальной клеточной трансплантации / И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, А. Ф. Повещенко, Д. В. Хабаров, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. М. Караськов, В. И. Коненков // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2014. – № 2. – С. 117–123.

16. Влияние секреторных факторов эндотелиальных клеток на пролиферативную и миграционную способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека / А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Ю. В. Никонорова, В. И. Коненков // **Фундаментальные исследования.** – 2014. – № 4–2. – С. 296–301.

17. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки для терапии дисфункции лимбального эпителия / **О. В. Повещенко**, А. Ф. Повещенко, А. П. Лыков, Н. А. Бондаренко, Ю. В. Никонорова, И. Б. Дружинин, В. И. Коненков // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.** – 2014. – Т. 34. – № 3. – С. 48–54.

18. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study / E. Pokushalov, A. Romanov, A. Chernyavsky, P. Larionov, I. Terekhov, S. Artyomenko, **O. Poveshenko**, E. Kliver, N. Shirokova, A. Karaskov, N. Dib // **Journal of Cardiovascular Translational Research.** – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 160–168.

19. **Poveshchenko, O. V.** Endothelial Progenitor Cells And

Neovasculogenesis / O. V. Poveshchenko, A. F. Poveshchenko, V. I. Konenkov. **Biology Bulletin Reviews.** – 2012. – Vol. 2, № 4. – P. 333–339.

20. Клеточные лимфотропные технологии реабилитации пациентов с хронической сердечной недостаточностью / **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, Н. А. Бондаренко, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов, В. И. Коненков // В сборнике: Профилактическая и восстановительная медицина: материалы научных советов ЦЭЭР – Новосибирск. – 2012. – С. 43–58.

21. Иммунофенотипический анализ аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови больных ИБС до и после мобилизации стволовых клеток из костного мозга / И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, А. П. Колесников, А. Н. Мозжерина, Е. В. Ульянов, Е. В. Янкайте, Т. В. Гертер, Д. В. Хабаров, А. Б. Романов, Е. А. Покушалов, В. И. Коненков // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: материалы международной конференции. – Новосибирск, 2008. – С. 173–174.

22. Влияние мобилизации на фенотипические и функциональные характеристики клеток у больных ИБС / **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Д. В. Хабаров, Е. А. Комбанцев, А. Б. Романов, Е. А. Покушалов, В. И. Коненков // Актуальные вопросы донорского и персонального хранения стволовых клеток: материалы международного симпозиума // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV. – № 3. – С. 14.

23. Функциональная характеристика мононуклеарных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным ростовым фактором / Е. В. Янкайте, И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, Д. В. Хабаров, А. Б. Романов, Е. А. Покушалов, В. И. Коненков // Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования: материалы Всероссийской научной школы-конференции для молодежи. – Москва, 2009. – С. 85–86.

24. Эффективность интрамиокардиальной трансплантации аутогенных стволовых у пациентов с ишемической болезнью сердца / **О. В. Повещенко**,

А. Ф. Повещенко, И. И. Ким, Е. В. Янкайте, Д. В. Хабаров, А. А. Смагин, Е. А. Комбанцев, А. Б. Романов, Е. А. Покушалов, В. И. Коненков // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: материалы IV всероссийского симпозиума. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 177–178.

25. Возможности аутологичной клеточной терапии ишемической сердечной недостаточности / Н. А. Гульева, И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, В. В. Бернвальд, А. Ф. Повещенко, А. П. Колесников, Е. В. Янкайте, Д. В. Хабаров, Е. А. Комбанцев, А. А. Смагин, А. Б. Романов, Е. А. Покушалов, В. И. Коненков // Стволовые клетки и регенеративная медицина: материалы Всероссийской научной школы-конференции. – Москва, 2010. – С. 24–25.

26. Эффективность интрамиокардиальной терапии ишемической сердечной недостаточности аутологичными мобилизованными G-CSF клетками периферической крови / В. И. Коненков, **О. В. Повещенко**, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, И. И. Ким, М. А. Королев, Г. А. Хмельницкий, А. Ф. Повещенко, Д. В. Хабаров, А. А. Смагин, А. М. Караськов // Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию Кузбасского кардиологического центра. – Кемерово, 2010. – С. 145–147.

27. Характеристика проангиогенных свойств моноклеарных клеток периферической крови после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациентов с ишемической болезнью сердца / Н. А. Гульева, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, В. В. Бернвальд, Е. В. Янкайте, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // Фундаментальные проблемы лимфологии: материалы X Международной конференции. – Новосибирск, 2011. – С. 125–126.

28. Интрамиокардиальное введение аутологичных прогениторных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, М. С. Любарский, А. Ф. Повещенко, Н. А. Гульева, В. В. Бернвальд, Д. В. Хабаров, М. В. Кочеткова, Е. А. Комбанцев,

А. А. Смагин, А. М. Караськов, В. И. Коненков // Фундаментальные проблемы лимфологии: материалы X Международной конференции. – Новосибирск, 2011. – С. 249–250.

29. Эффективность интрамиокардиального введения аутологичных прогениторных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью / В. И. Коненков, **О. В. Повещенко**, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, И. И. Ким, М. С. Любарский, А. Ф. Повещенко, Н. А. Гульева, В. В. Бернвальд, Д. В. Хабаров, А. А. Смагин, А. М. Караськов // VII научные чтения, посвященные памяти академика РАМН Е. Н. Мешалкина: материалы научно-практической конференции. – Новосибирск, 2011. – С. 213–214.

30. Оценка эффективности внутримышечного введения прогениторных клеток периферической крови у мышей с ишемией нижних конечностей / **О. В. Повещенко**, Н. П. Бгатова, А. Ф. Повещенко, О. В. Казаков, В. В. Асташов, Е. В. Янкайте, И. И. Ким, Н. А. Гульева, В. В. Бернвальд, В. И. Коненков // VII научные чтения, посвященные памяти академика РАМН Е. Н. Мешалкина: материалы научно-практической конференции. – Новосибирск, 2011. – С. 222.

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

32. Возможности стимуляции ангиогенеза прогениторными клетками костного мозга, мобилизованными Г-КСФ в периферическую кровь у пациентов с ишемической болезнью сердца / И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, Н. А. Бондаренко, Д. В. Хабаров, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов В. И. Коненков // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: материалы V Всероссийского

симпозиума с международным участием. – Уфа, 2012. – С. 256–257.

33. Влияние криоконсервации на фенотип прогениторных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором / Н. А. Бондаренко, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, Д. В. Хабаров, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов В. И. Коненков // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием. – Уфа, 2012. – С. 228–229.

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

35. Исследование пролиферации и миграции стволовых/прогениторных клеток, мобилизованных введением Г-КСФ от больных с ишемической болезнью сердца / Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, А. Ф. Повещенко, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, В. И. Коненков // Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: материалы Всероссийской научно практической конференции. – Саратов, 2012. – С. 74–75.

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

37. Фенотипическая характеристика популяций циркулирующих

эндотелиальных клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью при введении G-CSF / **О. В. Повещенко**, Н. А. Бондаренко, И. И. Ким, А. П. Лыков, А. Ф. Повещенко, Е. В. Янкайте, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. М. Караськов, В. И. Коненков // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: материалы XI Международной конференции – Новосибирск, 2013. – С. 254–257.

38. Изучение горизонтальной миграции клеток эндотелиальной линии человека Ea.Hy926 на аппарате Cell-iQ / Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, **О. В. Повещенко**, И. И. Ким, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // I Национальный Конгресс по регенеративной медицине: материалы конгресса – Москва, 2013. – С. 31.

39. Клеточные технологии лечения тяжелой хронической сердечной недостаточности (ХСН), как альтернатива трансплантации сердца / В. И. Коненков, **О. В. Повещенко**, А. М. Караськов, Е. А. Покушалов // 1-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине: материалы конгресса – Москва, 2013. – С. 124.

40. Функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью при мобилизации G-CSF / **О. В. Повещенко**, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, И. И. Ким, А. Ф. Повещенко, А. М. Караськов, В. И. Коненков // I Национальный Конгресс по регенеративной медицине: материалы конгресса – Москва, 2013. – С. 201.

41. Влияние G-CSF на функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью / Н. А. Бондаренко, А. П. Лыков, И. И. Ким, **О. В. Повещенко**, А. Ф. Повещенко, Е. А. Покушалов, А. Б. Романов, А. М. Караськов, В. И. Коненков / Стволовые клетки и регенеративная медицина: материалы V всероссийской научно-практической конференции – Москва, 2013. – С. 10.