

АНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Джояшвили Н. А.¹, Ефименко А. Ю.¹, Акчурин Р. С.², Ткачук В. А.^{1,2}, Парфенова Е. В.^{1,2}

Цель. Сравнение ангиогенных свойств ММСК жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца и без нее и оценка влияния сопутствующего сахарного диабета 2 типа на эти свойства.

Материал и методы. Для выделения ММСК ЖТ использовали подкожную жировую ткань пациентов контрольной группы (n=19) без сердечно-сосудистых заболеваний и СД2, больных ИБС с СД2 (n=28) и без него (n=32), которую получали при хирургических вмешательствах. Ангиогенную активность ММСК ЖТ оценивали по длине капиллярноподобных структур, образуемых эндотелиальными клетками на матриксе в присутствии кондиционированной среды ММСК ЖТ. Экспрессию генов факторов роста оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для анализа содержания факторов роста в кондиционированной среде ММСК ЖТ использовали иммуноферментный анализ (ELISA).

Результаты. Суммарная длина капиллярноподобных структур, образованных эндотелиальными клетками в присутствии кондиционированной среды ММСК ЖТ больных ИБС, снижена вдвое по сравнению с контрольной группой. При этом различий между группами больных ИБС без СД2 и с сопутствующим СД2 не обнаружено. При анализе содержания про- и антиангиогенных факторов в кондиционированной среде ММСК ЖТ не обнаружено снижения содержания основных ангиогенных факторов при ИБС, напротив, уровень некоторых из них (VEGF, HGF, PlGF) был повышен. В то же время было показано значительное повышение содержания PAI-1 в среде ММСК ЖТ у больных ИБС.

Заключение. Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции ММСК ЖТ больных ИБС снижена по сравнению с этим показателем у пациентов без ИБС. Наличие сопутствующего СД2 существенно не влияет на ангиогенную активность ММСК ЖТ больных ИБС. Сниженная ангиогенная активность ММСК ЖТ может быть обусловлена повышенной продукцией этими клетками PAI-1, который, подавляя активность активаторов плазминогена, может оказывать антиангиогенный эффект. Для проверки этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Российский кардиологический журнал 2013, 5 (103): 27–34

Ключевые слова: ангиогенез, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа, стромальные клетки жировой ткани, паракринная функция.

¹Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, ²ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗСР РФ, Москва, Россия.

Джояшвили Н. А.* – аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины, Ефименко А. Ю. – врач-ординатор кафедры терапии факультета фундаментальной медицины, Акчурин Р. С. – академик РАН и РАМН, руководитель отдела сердечно-сосудистой хирургии, Ткачук В. А. – академик РАН и РАМН, руководитель кафедры биохимии и молекулярной медицины, декан факультета фундаментальной медицины, Парфенова Е. В. – профессор кафедры биохимии и молекулярной медицины.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
n.dzhoyashvili@gmail.com

ММСК ЖТ – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, ИБС – ишемическая болезнь сердца, СД2 – сахарный диабет 2 типа, ИМТ – индекс массы тела, VEGF (vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста, HGF – (hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов, PlGF (placental growth factor) – плацентарный ростовой фактор, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) – ингибитор активатора плазминогена 1, Ang (angiogenin) – ангиогенин, ANG-1 (angiopoietin-1) – ангиопоэтин-1, THBS-1 (thrombospondin 1) – тромбоспондин 1, FGF-2 (fibroblast growth factor 2 (basic)) – основной фактор роста фибробластов, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ, МРТ – магнитно-резонансная томография, иАПФ – ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

Рукопись получена 01.09.2013

Принята к публикации 21.10.2013

Angiogenic properties of adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells in patients with coronary heart disease

Dzhoyashvili N. A.¹, Efimenko A. Yu.¹, Akchurin R. S.², Tkachuk V. A.^{1,2}, Parfenova E. V.^{1,2}

Aim. To compare angiogenic properties of adipose tissue (AT) derived multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) in patients with or without coronary heart disease (CHD) and to investigate potential effects of concomitant Type 2 diabetes mellitus (DM-2) on these properties.

Material and methods. To extract AT MMSC, subcutaneous adipose tissue samples were obtained during a surgical intervention in 19 controls (individuals without cardiovascular disease or DM-2), 28 patients with CHD and DM-2, and 32 CHD patients without DM-2. Angiogenic properties of AT MMSC were assessed by the length of capillary-like structures formed by endothelial cells on Matrigel in the presence of the conditioned AT MMSC medium. Growth factor gene expression was measured using the real-time polymerase chain reaction. Growth factor levels in the conditioned AT MMSC medium were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. In CHD patients, the total length of capillary-like structures, formed by endothelial cells in the presence of the conditioned AT MMSC medium, was twice as low as in controls. However, there was no marked difference between CHD patients with or without DM-2. CHD patients did not demonstrate a reduction in the levels of main angiogenic factors, measured in the conditioned AT MMSC medium. On the

contrary, the levels of some factors (VEGF, HGF, and PlGF) were elevated, as well as the levels of PAI-1.

Conclusion. Angiogenic activity of secretion end-products of AT MMSC was reduced in CHD patients, compared to CHD-free individuals. The presence of concomitant DM-2 did not affect angiogenic properties of AT MMSC in CHD patients. Reduced angiogenic activity of AT MMSC could be due to increased PAI-1 production. PAI-1 suppresses the activity of plasminogen activators and, therefore, may have angiogenic effects. To confirm this hypothesis, further research is needed.

Russ J Cardiol 2013, 5 (103): 27–34

Key words: angiogenesis, coronary heart disease, Type 2 diabetes mellitus, adipose tissue-derived stromal cells, paracrine function.

¹Fundamental Medicine Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University,

²Russian Cardiology Scientific and Clinical Complex, Moscow, Russia.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во всем мире, несмотря на использование новых медикаментозных, хирургических и эндоваскулярных методов лечения [1]. В последнее время прогресс в области лечения этих заболеваний связывают с методами клеточной терапии. Перспективным источником для клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний ишемического генеза признаны мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) благодаря их способности стимулировать васкуляризацию ишемизированных тканей *in vivo* [2]. Считается, что их влияние на рост кровеносных сосудов в основном обусловлено паракринными эффектами — способностью секретировать широкий спектр факторов роста, цитокинов и хемокинов, протеаз, белков внеклеточного матрикса [3]. ММСК могут быть выделены из костного мозга и жировой ткани, а также из пуповинной крови, эндометрия, пульпы зуба и периферической крови. Жировая ткань как источник ММСК ЖТ для клеточной терапии считается наиболее перспективной, так как может быть получена в большом количестве в ходе малоинвазивных хирургических процедур. Терапевтическая эффективность этих клеток изучена во многих экспериментах на клинически релевантных моделях патологий у животных [2]. Сегодня известны результаты нескольких клинических испытаний (APOLLO, PRECISE, MyStromalCell Trial), где была показана возможность лечения острой и хронической ИБС с помощью внутрикоронарного введения ММСК ЖТ [4–6]. Однако эффективность лечения ишемии тканей после трансплантации аутологичных ММСК ЖТ, как и других аутологичных ММСК, недостаточно высокая. В значительной мере это может быть обусловлено негативным влиянием патологии и возраста пациентов на паракринную функцию и ангиогенные свойства этих клеток, что изучено недостаточно. Исследование молекулярных механизмов снижения терапевтических свойств прогениторных клеток необходимо для разработки эффективных способов их предтрансплантационной подготовки, направленной на увеличение их терапевтической эффективности. Данная работа посвящена исследованию ангиогенной активности продуктов секреции ММСК ЖТ пациентов с ИБС, оценке уровня экспрессии генов и концентрации в кондиционированной среде ММСК ЖТ наиболее значимых факторов, регулирующих ангиогенез. В рамках работы мы также проанализировали влияние СД2 на ангиогенные свойства ММСК ЖТ, полученных от больных с ИБС.

Материал и методы

Этический аспект. Работа была выполнена в соответствии со стандартами надлежащей клинической

практики (Good Clinical Practice). Все пациенты, включенные в исследование, подписывали информированное согласие на передачу образцов подкожной жировой ткани, остающихся после хирургических операций, а также обработку клинических данных истории болезни. Все исследования, связанные с образцами ткани, выполнялись на основании разрешения Этического комитета ФГУ РКНПК МЗ и СР РФ.

Пациенты. Всего в исследование было включено 79 пациентов, у которых в ходе хирургической операции забирали подкожную жировую ткань объемом от 1 до 5 мл. В контрольную группу вошли 19 пациентов, оперированных по поводу эндопротезирования бедренного или коленного сустава (ГКБ № 31) и общей хирургической патологии (паховая грыжа) (ГКБ № 29). Группу больных с ИБС составили 60 пациентов со стенозирующим коронарным атеросклерозом, которым проводилось аортокоронарное шунтирование в отделе сердечно-сосудистой хирургии Института клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова ФГБУ РКНПК МЗ РФ (руководитель отдела — академик Р. С. Акчурин). Для оценки влияния сахарного диабета 2 типа (СД2) на ангиогенный потенциал ММСК ЖТ группу ИБС разделили на группы ИБС без сахарного диабета 2 типа (ИБС без СД2, $n=32$) и ИБС с сопутствующим СД2 (ИБС+СД2, $n=28$).

Критериями исключения для всех групп считали аутоиммунную патологию, острые или хронические воспалительные заболевания, гематологические заболевания, острые нарушения мозгового кровообращения или черепно-мозговые травмы в предшествующие 12 месяцев, инфаркт миокарда в предшествующие 6 месяцев, анемию (гемоглобин <10 г/дл), злокачественные новообразования, в том числе в анамнезе, и длительную гормональную и антибактериальную терапию. Контрольную группу составили пациенты без документированной сердечно-сосудистой патологии, включая инфаркт миокарда, миокардит в анамнезе, стенокардию, сердечную недостаточность и нарушение ритма сердца и без нарушений липидного (гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия) и углеводного (нарушение толерантности к глюкозе, сахарный диабет) обмена.

Анализ клинических данных. Индекс массы тела рассчитывали как отношение массы тела к квадрату роста ($\text{кг}/\text{м}^2$). Массу тела считали нормальной при ИМТ менее 25, избыточной — при ИМТ ≥ 25 и <30 , и ожирение диагностировали при ИМТ ≥ 30 .

Степень выраженности клинических признаков ИБС оценивали согласно критериям стенокардии Канадской ассоциации кардиологов на основании степени ограничений дневной активности и величины пороговой нагрузки, вызывающей приступ стенокардии.

Всем пациентам с ИБС выполнялось стандартное обследование, которое проводится перед аорто-коронарным шунтированием, включающее в себя лабораторные исследования, коронаровентрикулографию, эхокардиографию, а в ряде случаев — нагрузочные тесты и МРТ сердца.

Выделение и культивирование ММСК ЖТ. Для выделения ММСК ЖТ использовали небольшие фрагменты подкожной жировой ткани, которые получали во время абдоминальных операций, операций по поводу травм, эндопротезирования крупных суставов и при выделении большой подкожной вены в ходе аорто-коронарного шунтирования.

Образцы подкожной жировой ткани (1–5 мл) предварительно измельчали и затем подвергали ферментативной обработке с помощью растворов коллагеназы I (200 Ед/мл, Worthington Biochemical, США) и диспазы (40 Ед/мл, Sigma, США) при постоянном встряхивании в течение 30–40 мин при 37°C. Далее ткань центрифугировали при 200g в течение 10 мин. Верхний надосадочный слой удаляли, эритроциты, находящиеся в осадке, лизировали. Осадок пропускали через ситечко (BD Falcon Cell Strainer, 100 mkm,

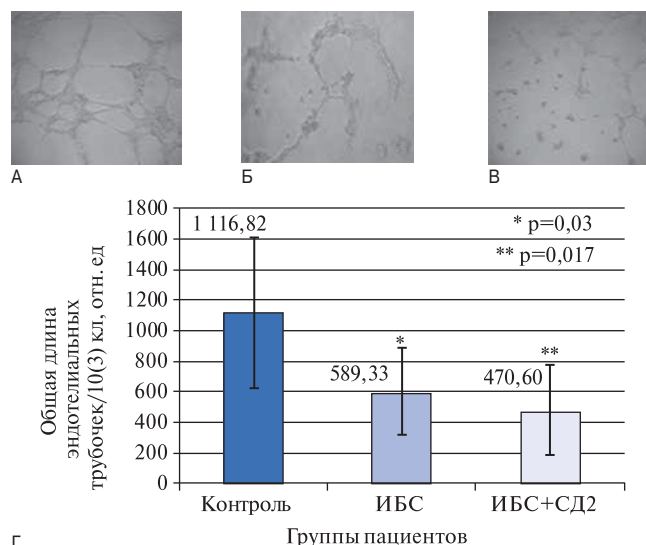


Рис. 1. Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции ММСК ЖТ.

Примечания: А-В – микрофотографии капилляроподобных структур, формируемых эндотелиальными клетками EA.hy 926 в присутствии кондиционированной среды от ММСК-ЖТ; Г – суммарная длина капилляроподобных структур в контрольной группе, группе ИБС и группе ИБС+СД2.

Данные приведены в виде медиана (25-ый, 75-ый процентиля), р – критерий значимости.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов

Клинические признаки	Группы пациентов			
	Контроль	ИБС	ИБС+СД2	р
Количество пациентов	19	32	28	
Возраст	56,7±12,3	62,3±8,6	61,0±8,2	НЗ
Пол, мужчины, n (%)	5 (26, 3 %)	29 (90,6 %)	17 (60,7 %)	<0,05
Функциональный класс стабильной стенокардии, n (%)	Отс	II FC-8 (25 %),	II FC-5 (18 %),	НЗ
		III FC-13 (41 %),	III FC-9 (32 %),	
		IV FC-11 (34 %)	IV FC-14 (50 %)	
ИМ в анамнезе, n (%)	Отс	20 (63 %)	18 (64 %)	НЗ
Степень поражения коронарного русла, n (%)	Н/О	2КА-6 (18, 8 %)	2КА-5 (17, 9 %)	НЗ
		3КА-26 (81,3 %)	3КА-23 (82,1 %)	
Фракция выброса (%)	57,8±1,8	55±9,8	58±9,2	НЗ
Артериальная гипертензия, n (%)	3 (16 %)	27 (84 %)	24 (86 %)	<0,05
Ожирение, n (%)	12 (63 %)	20 (63 %)	19 (68 %)	НЗ
ИМТ, кг/м ²	28,6±3,7	30,6±0,8	28,14±1,07	НЗ
Общий белок (г/л), (N=64-83)	68,7±1,9	69,4±1,6	72,1±3,2	НЗ
Глюкоза (ммоль/л), (N=3,5-5,8)	5,46±2,2	5,4±3,2	10,1±4,1	0,023
Триглицериды (ммоль/л) (N=0,5-2,3)	1,7±1,3	2,1±1,1	1,9±0,9	НЗ
Общий холестерин (ммоль/л) (N=3,5-5,2)	4,4±0,4	4,5±0,4	4,9±0,9	НЗ
Мочевина (ммоль/л) (N=1,7- 8,3)	5,9±0,8	6,2±0,5	9,02±1,5	НЗ
Креатинин (мкмоль/л) (N= 44-106)	68,8±9,5	66,6±7,5	139,8±23,2	<0,01
Медикаментозная терапия до хирургической операции				
β-блокаторы, n (%)	Отс	27(84 %)	23 (82 %)	НЗ
Антиагрегантные препараты, n (%)	Отс	32(100 %)	28(100 %)	НЗ
Статины, n (%)	Отс	28(88 %)	25(89 %)	НЗ
Ингибиторы АПФ, n (%)	Отс	20(63 %)	18(64 %)	НЗ
Блокаторы кальциевых каналов, n (%)	Отс	13(41 %)	12(43 %)	НЗ
Нитраты, n (%)	Отс	23(72 %)	21(75 %)	НЗ

Примечание: n – количество пациентов, НЗ – не значимо, Н/О – не определено, Отс – отсутствует. Данные в таблице представлены как среднее значение ± SD, р – критерий значимости.

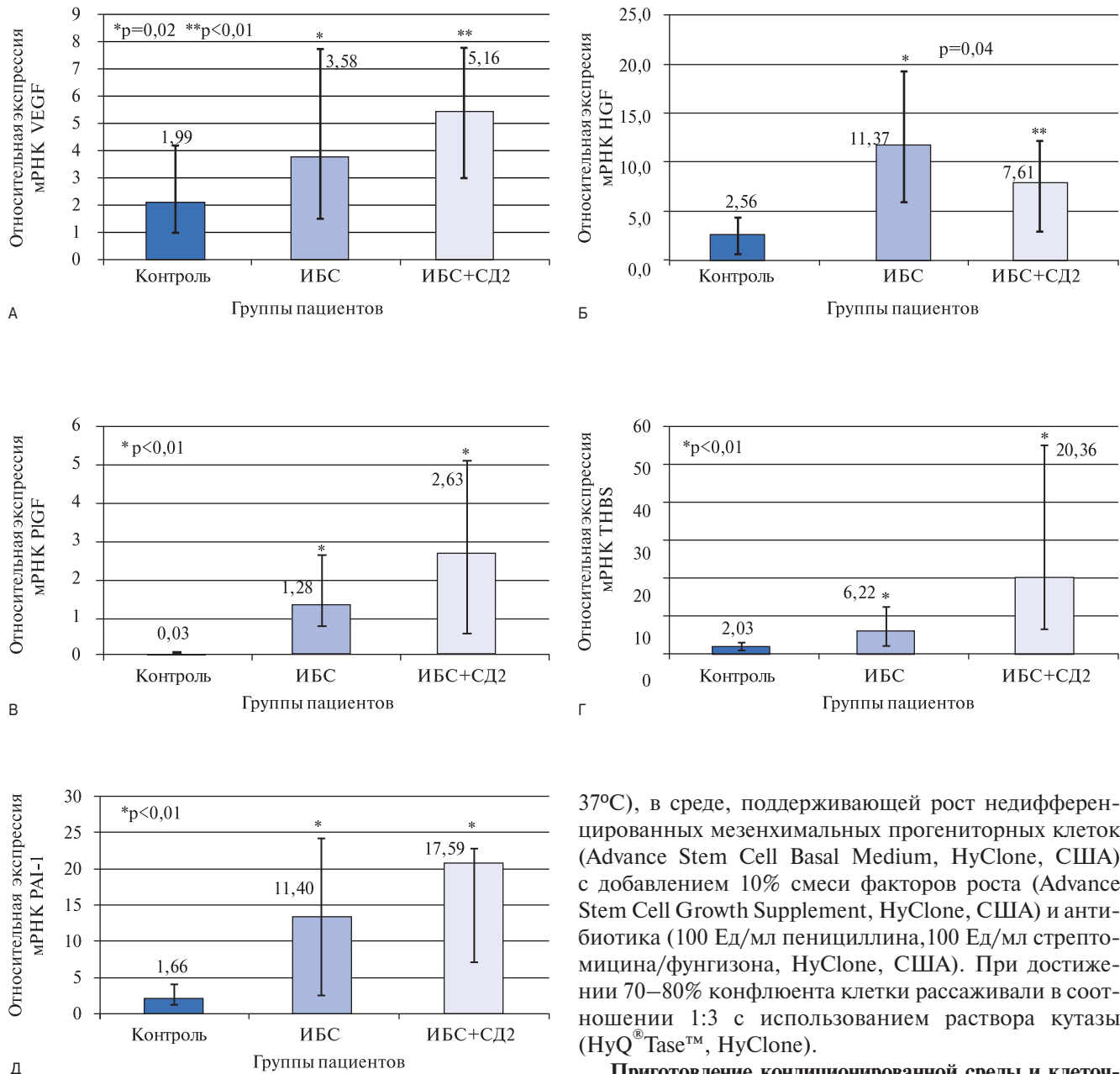


Рис. 2. Содержание мрнк факторов, регулирующих ангиогенез, в ММСК ЖТ.
Примечания: экспрессию мРНК ростовых факторов VEGF (А), HGF (Б), PIGF (В), THBS-1 (Г) и PAI-1 (Д) определяли методом ПЦР в реальном времени. Для анализа полученных данных использовали метод дельта St. Для нормирования к ДНК в пробах использовали гены «домашнего хозяйства» GAPDH и β -actin. Данные приведены в виде медиана (25-ый, 75-ый процентиля), p – критерий значимости.

США) и вновь центрифугировали при 200g в течение 10 мин. Осадок смешивали со средой культивирования и высаживали на чашки Петри в концентрации 5×10^4 клеток/см³. Выход клеток составлял $4-7 \times 10^4$ прикрепившихся клеток на 1 мл ткани. Клетки инкубировали на стандартном пластике (Corning Costar, США) в CO₂ — инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха,

37°C), в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных прогениторных клеток (Advance Stem Cell Basal Medium, HyClone, США) с добавлением 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, HyClone, США) и антибиотика (100 Ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина/фунгизона, HyClone, США). При достижении 70–80% конfluence клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием раствора кутазы (HyQ® Tase™, HyClone).

Приготовление кондиционированной среды и клеточного осадка ММСК ЖТ. Для получения кондиционированной среды ММСК ЖТ 2-го пассажа промывали 3 раза водно-солевым буферным раствором ФСБ (Пан-Эко, Россия) и культивировали в течение 48 часов в среде роста без сыворотки. Затем среду собирали, центрифугировали при 200g в течение 10 мин. Открепление ММСК ЖТ от пластика проводили с помощью раствора кутазы. Осадок клеток промывали ФСБ. Подсушенный осадок клеток и аликвоты среды замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при –70°C.

Морфологическая и иммунофенотипическая характеристика ММСК ЖТ. ММСК ЖТ 2-го пассажа открепляли от пластика с помощью раствора Версена (Пан-Эко, Россия). Клетки окрашивали антителами против CD14 (eBioscience, кат. № 14–0141–81), CD34 (BD Pharmingen, кат. № 555824), CD45 (BD Pharmingen,

кат. № 340953), CD73 (BD Pharmingen, кат. № 550257), CD90 (BD Pharmingen, кат. № 555597), CD105 (BD Pharmingen, кат. № 560819), NG2 (Chemicon, кат. № ab5320) и PDGFRB (BD Pharmingen, кат. № 558821), конъюгированными с различными флуорохромами. Анализ проводили с помощью проточного цитометра FACS Calibur (Becton Dickinson, США).

Дифференцировка. Для анализа способности к адипогенной и остеогенной дифференцировке ММСЖ культивировали в индукционных средах, используя наборы реагентов (Invitrogen, США), согласно методике, приложенной к набору. В качестве отрицательного контроля использовали ММСЖ того же донора, культивируемые в обычной среде роста.

Пролиферативная способность ММСЖ. Для анализа пролиферативной активности ММСЖ 1-го пассажа окрашивали 25мкМ раствором карбоксилфлуоресцеин диацетата сукцинимидильного эфира (CFSE, Molecular Probes, США). После окраски клетки культивировали в течение 5 дней, затем оценивали процентное содержание активно и слабо пролиферирующих клеток по степени снижения содержания CFSE относительно исходного уровня с помощью проточного цитометра FACS Calibur (Becton Dickinson, США).

Анализ экспрессии генов в ММСЖ. Содержание мРНК исследуемых факторов, участвующих в регуляции ангиогенеза, проводили методом ПЦР в реальном времени. Для этого из клеток выделяли мРНК при помощи набора реагентов RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) и на матрице РНК строили кДНК, используя набор Fermentas Reverse Transcription Reagents (Fermentas, Литва). Далее проводили ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (Евроген, Россия) в амплификаторе BIO-RAD iQ5 Multicolor Real-time PCR detection system (Bio-rad, США). Данные для каждого образца нормировали по экспрессии генов β -actin и GAPDH.

Анализ содержания факторов роста, участвующих в ангиогенезе, в кондиционированной среде. Содержание эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), плацентарного фактора роста (PlGF), ангиогенина (Ang), фактора роста гепатоцитов (HGF), ангиопоэтина-1 (ANG-1), тромбоспондина (THBS1), ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) в среде культивирования ММСЖ оценивали с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа (ELISA, R&D Systems, США). Уровень поглощения раствора в лунках определяли при длине волны 450 нм с коррективкой при 620 нм. Полученные значения концентрации исследуемого белка в образцах кондиционированных сред нормировали на количество клеток.

Формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на матрикеле. Ангиогенную активность суммарных продуктов

секреции ММСЖ оценивали с помощью методики формирования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на матрикеле, обедненном ростовыми факторами (Growth factors reduced Matrigel, BD Biosciences, США). Для этого клетки линии EA.hy 926 высаживали в 96 луночный планшет из расчета 10 тыс. клеток на лунку и культивировали в кондиционированной среде ММСЖ в течение 18 часов. Суммарную длину капилляроподобных структур в лунке измеряли в десяти случайно выбранных полях зрения. Подсчет выполняли на изображениях, полученных при использовании объектива микроскопа $\times 10$, с помощью программы MetaMorph 5.0 (Universal Imaging, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета Статистика 8.0. Результаты представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD) или как медиана (25-й и 75-й процентиля). При подтверждении нормальности распределения признака методами Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилсона для сравнения двух независимых групп использовали t-критерий Стьюдента. С той же целью для анализа данных в малочисленных выборках и ненормальных распределений использовали U-критерий Манна-Уитни. Множественное сравнение проводили с помощью метода ANOVA при нормальном распределении признака, в остальных случаях использовали метод Краскел-Уоллиса. Корреляционный анализ проводили с использованием метода Пирсона для нормального распределенных выборок, в остальных случаях использовали метод Спирмена. Для оценки тесноты связи по значению коэффициента корреляции использовали шкалу Чеддока. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Данные в тексте, таблице и на графиках представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD) или как медиана (25-й и 75-й процентиля).

Результаты

Анализ клинических данных пациентов

Клинические данные пациентов представлены в таблице 1. Средний возраст в контрольной группе составил $56,7 \pm 12,3$ лет, в группе ИБС без СД2 — $62,3 \pm 8,6$ лет и в группе ИБС+СД2 — $61,0 \pm 8,2$ лет. Все пациенты с ИБС получали стандартную медикаментозную терапию для лечения ИБС (бета-блокаторы, иАПФ, блокаторы кальциевых каналов, статины, антиагреганты, нитраты, диуретики). Все пациенты с СД2 получали пероральные антидиабетические препараты (49%) либо инъекции инсулина (23%), остальные пациенты (28%) находились на антидиабетической диете. Пациенты контрольной группы не получали медикаментозную тера-

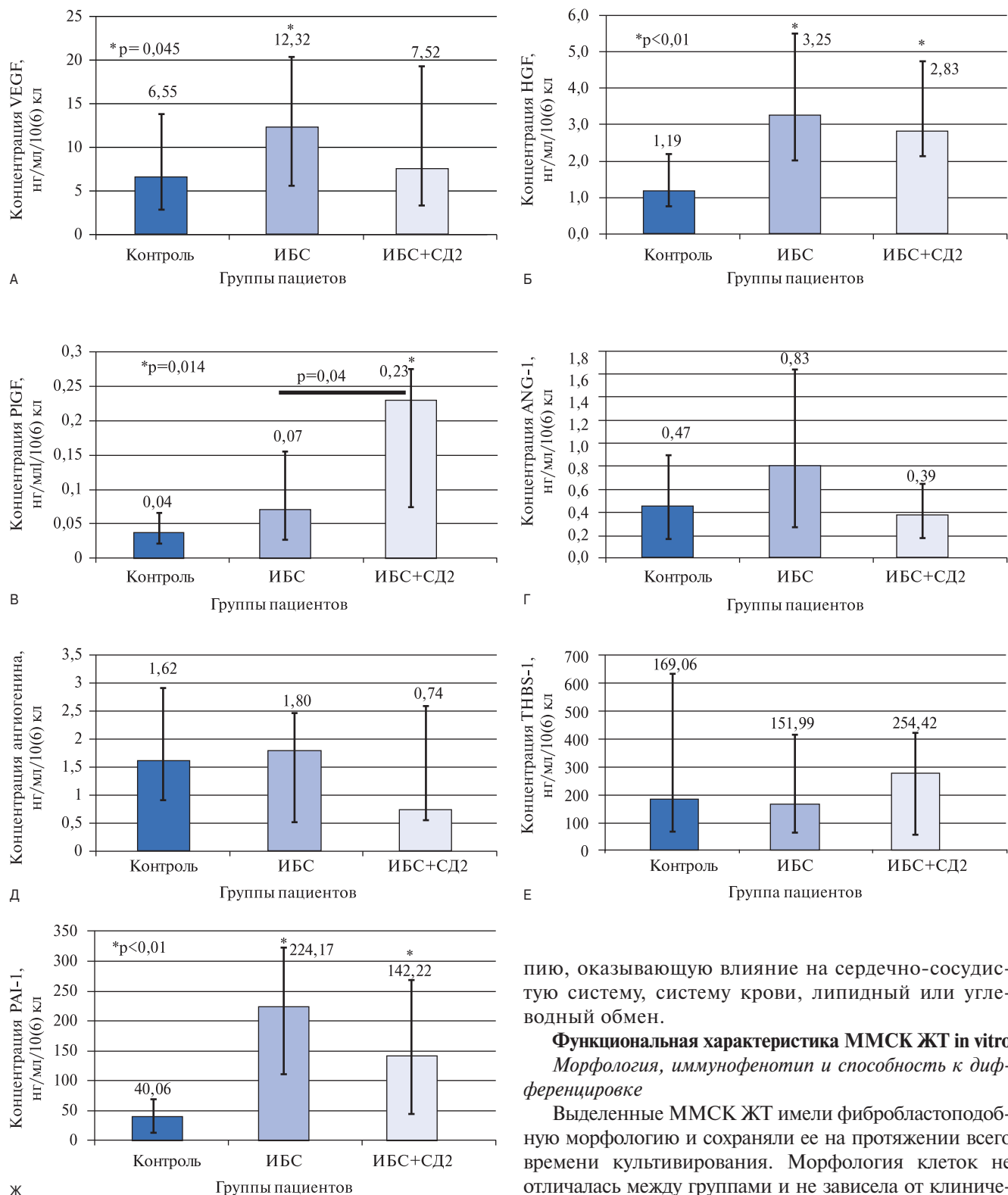


Рис. 3. Содержание ангиогенных факторов в кондиционированной среде ММСК ЖТ.

Примечания: содержание факторов VEGF (А), HGF (Б), PlGF (В), Ang-1 (Г), ангиогенина (Д), THBS-1 (Е) и PAI-1 (Ж) определено методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Данные приведены в виде медианы (25-ый, 75-ый перцентили), p – критерий значимости.

пию, оказывающую влияние на сердечно-сосудистую систему, систему крови, липидный или углеводный обмен.

Функциональная характеристика ММСК ЖТ in vitro

Морфология, иммунофенотип и способность к дифференцировке

Выделенные ММСК ЖТ имели фибробластоподобную морфологию и сохраняли ее на протяжении всего времени культивирования. Морфология клеток не отличалась между группами и не зависела от клинической характеристики донора. По результатам проточной цитофлуориметрии, все ММСК ЖТ в значительном количестве экспрессировали на своей поверхности мезенхимальные маркеры CD73 (>85%), CD90 (>95%) и CD105 (>95%) и не экспрессировали или экспрессировали в малом количестве CD14 (<10%), CD19 (<10%), CD34 (<5%), CD45 (<1%), CD79 (<10%). ММСК ЖТ

также экспрессировали перицитарные маркеры NG2 (>99%) и PDGFRB (>80%). При этом доля указанных маркеров была одинаковой во всех группах. Под действием индукционных сред ММСК ЖТ всех пациентов дифференцировались в адипогенном и остеогенном направлении (данные не представлены). Эти характеристики соответствуют определению мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, предложенному Международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy Statement).

Пролиферативная активность

Для оценки влияния патологии на пролиферативную активность ММСК ЖТ, мы использовали прижизненный флуоресцентный краситель CFSE, количество которого в ходе каждого клеточного деления уменьшается вдвое. С помощью проточной цитофлуориметрии измеряли, какое число клеток соответствует определенному количеству делений за 5 дней. Анализ данных показал отсутствие статистически значимой разницы между разными группами пациентов.

Ангиогенные свойства ММСК ЖТ

Оценка ангиогенной активности суммарных продуктов секреции ММСК ЖТ на модели ангиогенеза *in vitro* показала статистически значимое уменьшение длины тубулярных структур, сформированных эндотелиальными клетками в присутствии кондиционированной среды ММСК ЖТ пациентов с ИБС без СД2 ($p=0,03$) и ИБС+СД2 ($p=0,017$) по сравнению с пациентами без ИБС (контрольная группа) (рис. 1).

Однако при анализе экспрессии генов ангиогенных факторов ММСК ЖТ обнаружено увеличение содержания мРНК как про-ангиогенных факторов (VEGF, HGF, PlGF), так и ингибиторов ангиогенеза (PAI-1 и THBS1) в обеих группах больных ИБС по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Анализ содержания продуктов этих генов в кондиционированной среде ММСК ЖТ, отражающий уровень их секреции клетками, показал статистически значимое увеличение концентрации таких ангиогенных факторов, как VEGF и HGF в группе ИБС без СД2 и PlGF и HGF в группе ИБС+СД2 по сравнению с уровнем этих факторов в среде клеток, полученных от пациентов контрольной группы. Содержание ангиогенина, ангиопоэтина-1 и ингибитора ангиогенеза THBS1 в кондиционированной среде ММСК ЖТ пациентов с ИБС и ИБС+СД2 не отличалось от соответствующих показателей в контрольной группе. В то же время было обнаружено значительное увеличение содержания ингибитора ангиогенеза PAI-1 в кондиционированной среде ММСК ЖТ как больных ИБС без СД2, так и больных ИБС с сопутствующим СД2 (рис. 3).

При этом в группе больных ИБС были выявлены прямые сильные корреляционные зависимости между длиной капилляроподобных структур, отражающей ангиогенную активность суммарных продуктов секреции ММСК ЖТ, и их концентрацией в кондициониро-

ванной среде: VEGF ($r=0,80$, $p=0,003$) и HGF ($r=0,69$, $p=0,038$) в группе ИБС без СД2 и HGF ($r=0,8$, $p=0,001$) и ангиогенина ($r=0,76$, $p=0,01$) в группе ИБС+СД2. Во всех трех группах пациентов наблюдали прямую корреляцию между длиной капилляроподобных структур и концентрацией ангиопоэтина-1 в кондиционированной среде: в контрольной группе ($r=0,84$, $p=0,036$), у больных ИБС ($r=0,81$, $p=0,049$) и больных ИБС+СД2 ($r=0,7$, $p=0,028$). При анализе объединенной группы больных ИБС (ИБС без СД2 и ИБС с СД2) выявили прямую корреляционную зависимость между длиной капилляроподобных структур и концентрацией следующих факторов: VEGF ($r=0,47$, $p<0,01$), HGF ($r=0,55$, $p<0,01$) и ангиогенина ($r=0,52$, $p<0,01$).

Обсуждение

Полученные результаты показывают, что паракринная активность ММСК ЖТ, которая обуславливает в значительной мере терапевтическую эффективность этих клеток, изменена у больных ИБС: ангиогенная активность суммарных продуктов секреции ММСК ЖТ снижена вдвое по сравнению с этим показателем у пациентов без ИБС того же возраста. Однако при изучении механизмов этого снижения получены неоднозначные результаты. Так, уровень мРНК и содержание в среде культивирования ММСК ЖТ основных стимуляторов ангиогенеза оказались не только не сниженными при ИБС, но даже повышенными по сравнению с данными, полученными для пациентов без ИБС. Возможным объяснением снижения ангиогенной активности суммарных продуктов секреции может быть повышенная продукция ингибиторов ангиогенеза — таких, как PAI-1, а также, возможно, и других антиангиогенных факторов, которые не были исследованы в данной работе (эндостатина и ангиостатина).

Хорошо известно, что повышение PAI-1 в плазме больных связано с увеличением риска развития ИБС и сахарного диабета [7]. Концентрация PAI-1 в плазме крови коррелирует с выраженностью гипоксии, уровнями провоспалительных цитокинов, глюкозы, триглицеридов и инсулина [8]. Данные о роли PAI-1 в ангиогенезе получены в основном при изучении опухолевого ангиогенеза. Оказалось, что в опухолях PAI-1 может выступать как стимулятор, так и ингибитор ангиогенеза [9]. Роль PAI-1 в компенсаторном ангиогенезе при ишемии тканей изучена недостаточно. Согласно недавним исследованиям, ингибирование PAI-1 в ишемизированных мышцах конечности и миокарде экспериментальных животных ускоряет восстановление их кровоснабжения, стимулирует ангиогенез и повышает продукцию в них VEGF и FGF-2, подавляет апоптоз кардиомиоцитов [10, 11]. Многие лекарственные препараты, снижающие синтез PAI-1, например, статины, стимулируют ангиогенез [12]. С учетом этих данных и полученных нами результатов, мы предполагаем, что снижение

ангиогенного потенциала ММСЖТ при ИБС может быть обусловлено повышенной продукцией PAI-1, а, возможно, и других ингибиторов ангиогенеза, которые не исследованы в нашей работе (эндостатина, ангиостатина, регуляторных микроРНК в составе микровезикул, секретируемых ММСЖТ) [13]. Увеличение секреции ангиогенных факторов ММСЖТ при ИБС может быть компенсаторной реакцией на увеличенную продукцию ингибиторов ангиогенеза. Это подтверждается сильными корреляционными связями между содержанием ангиогенных факторов в среде культивирования ММСЖТ и их ангиогенной активностью, измеренной в экспериментах с эндотелиальными клетками. Тем не менее, эта реакция недостаточна, чтобы компенсировать эффекты избыточной продукции PAI-1 и, возможно, других ингибиторов ангиогенеза. Однако эта гипотеза нуждается в проверке, и изучение влияния ингибиторов PAI-1 на ангиогенные свойства ММСЖТ, а также определение продукции других ингибиторов ангиогенеза, являются задачами дальнейших исследований. Ангиогенный потенциал ММСЖТ может быть повышен при их культивировании в условиях гипоксии, которая, согласно нашим данным [14], вызывает координированное изменение экспрессии регуляторов ангиогенеза: повышение экспрессии стимуляторов ангиогенеза и снижение экспрессии ингибиторов ангиогенеза. Кроме того, увеличение ангиогенной активности ММСЖТ возможно при их генетической модификации конструкциями, несущими гены ангиогенных факторов. Ранее мы показали, что модификация ММСЖТ аденоассоциированным вирусом, несущим ген VEGF, позволяет увеличить продукцию VEGF в десятки раз и значительно повысить способность этих клеток стимулировать рост сосудов в ишемизированных тканях при трансплантации [15]. Не исключена возможность, что обработка ММСЖТ ингибиторами PAI-1

будет также способствовать повышению их ангиогенных свойств.

Заключение

Таким образом, в данной работе показано, что ангиогенная активность суммарных продуктов секреции ММСЖТ больных ИБС снижена по сравнению с этим показателем у пациентов без ИБС. Наличие сопутствующего СД2 не влияет существенно на ангиогенную активность ММСЖТ больных ИБС. Сниженная ангиогенная активность ММСЖТ не обусловлена снижением секреции основных ангиогенных факторов, а может быть связана с повышенной продукцией этими клетками PAI-1, который, подавляя активность активаторов плазминогена, может оказывать антиангиогенный эффект. Для проверки этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования. Полученные результаты указывают на необходимость разработки методов предтрансплантационной подготовки ММСЖТ пациентов с ИБС, направленных на повышение ангиогенного потенциала этих клеток.

Благодарности. Научная работа была выполнена при поддержке 7-рамочной программы Европейского Союза (РП7/2007–2013), (SICA-HF) (грант № 241558) и Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (Государственный контракт № 02.527.11.0007), а также гранта РФФИ № 11–04–01850. Выражаем благодарность Г.В. Шаронову за помощь в проведении и анализе результатов экспериментов с использованием проточной цитометрии. Благодарим Е.Е. Старостину, студентку ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова, за помощь в проведении экспериментальной работы.

Литература

- Shalnova S.A., Konradi A.O., Karpov Yu. A., et al. Cardiovascular mortality in 12 Russian Federation regions — participants of the “Cardiovascular disease epidemiology in Russian regions” study. *Russ J Cardiol* 2012; 5 (97):6–11. Russian (Шальнова С. А., Конради А. О., Карпов Ю. А. и др. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании “Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России. Российский кардиологический журнал 2012; 5 (97):6–11).
- Satija N. K., Singh V. K., Verma Y. K., et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 2008; 13 (11–12):4385–402.
- Hong S. J., Traktuev D. O., March K. L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15 (1):86–91.
- Perin E., Fernandez-Aviles F. Freshly adipose-derived stem cells in chronic ischaemia. The PRECISE Trial. Presented at: 7th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovation. Madrid, Spain, 2010.
- Duckers E. Freshly adipose-derived stem cells in acute myocardial infarction. The APOLLO Trial. Presented at: 7th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovation. Madrid, Spain, 2010.
- Qayyum A. A., Haack-Sørensen M., Mathiasen A. B., et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design. *Regen Med* 2012; 7 (3):421–8.
- Juhan-Vague I., Alessi M. C. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1):656–60.
- Asplund-Carlson A., Hamsten A., Wiman B., et al. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity and VLDL triglyceride concentration, insulin levels and insulin sensitivity: studies in randomly selected normo- and hypertriglyceridaemic men. *Diabetologia* 1993; 36 (9):817–25.
- Stefansson S., McMahon G. A., Pettilä E., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des* 2003; 9 (19):1545–64.
- Tashiro Y., Nishida C., Sato-Kusubata K., et al. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood* 2012; 119:6382–93.
- Xiang G., Schuster M. D., Seki T., et al. Downregulated expression of plasminogen activator inhibitor-1 augments myocardial neovascularization and reduces cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46 (3):536–41.
- Dulak J., Loboda A., Jazwa A., et al. Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells. *Endothelium* 2005; 12 (5–6): 233–241.
- Yakovenko E. I., Mamedov M. N. Metabolic effects of statins and clinical manifestations of atherosclerosis. *Russ J Cardiol* 2012; 2 (94):85–9. Russian (Яковенко Е. И., Мамедов М. Н. Влияние метаболических эффектов статинов на клинические проявления атеросклероза. Российский кардиологический журнал 2012; 2 (94):85–9).
- Efimenco A., Starostina E., Kalinina N., et al. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med* 2011; 9:1–10.
- Shevchenko E. K., Makarevich P. I., Tsokolaeva Z. I., et al. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med* 2013; 11:138.