

БИОЛОГИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ «РАННИХ» ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Е.В. Карелкина¹, В.С. Морошкин¹, А.В. Селютин², О.А. Быстрова³, О.М. Моисеева¹

¹ ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им.В.А. Алмазова»

Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² НИИ акушерства и гинекологии имени Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Карелкина Елена Викторовна — старший научный сотрудник НИЛ кардиомиопатий, ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (ФМИЦ им. В.А. Алмазова); *Морошкин Виктор Сергеевич* — доктор медицинских наук ведущий научный сотрудник лаборатории ультразвуковых методов исследования ФМИЦ им. В.А. Алмазова; *Селютин Александр Васильевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ акушерства и гинекологии имени Д.О. Отта РАМН; *Быстрова Ольга Александровна* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела морфологии Института цитологии РАН; *Моисеева Ольга Михайловна* — доктор медицинских наук, заместитель директора Института сердца и сосудов, заведующая научно-исследовательским отделом некоронарогенных заболеваний сердца ФМИЦ им. В.А.Алмазова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: ekarelkina@mail.ru (Карелкина Елена Викторовна).

Резюме

В статье предпринята попытка оценить клиническое значение и патофизиологический смысл исследования клоногенной способности «ранних» эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП) у больных с факторами риска и хронической сердечной недостаточностью (ХСН) различного генеза. Обследовано 36 больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и систолической дисфункцией левого желудочка (фракция выброса по Симпсону < 40 %), 33 пациента с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), 18 пациентов с гипертонической болезнью II стадии, 2 степени и контрольная группа из 19 практически здоровых лиц. Выполнены клиничко-лабораторное обследование и оценка клоногенной способности «ранних» ЭКП по методу J.M. Hill. У пациентов с факторами риска и у больных с ХСН было выявлено снижение колониеобразующей способности «ранних» ЭКП. Низкая пролиферативная активность этих клеток была ассоциирована с увеличением индекса сердечно-сосудистого риска SCORE, гипертрофией и систолической дисфункцией левого желудочка, что указывает на возможность использования данного метода в качестве дополнительного прогностического фактора у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Исследование клоногенной способности «ранних» ЭКП сохраняет свои позиции в качестве важного прогностического биомаркера, отражающего ангиогенный потенциал больного.

Ключевые слова: циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники, гипертоническая болезнь, артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия.

BIOLOGICAL AND CLINICAL RELEVANCE OF EARLY ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS RESEARCH

E.V. Karelkina¹, V.S. Moroshkin¹, A.V. Selutin², O.A. Bistrova³, O.M. Moiseeva¹

¹ Federal Almazov Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

² Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology, Saint-Petersburg, Russia

³ RAS Institute of Cytology, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Federal Almazov Medical Research Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: ekarelkina@mail.ru (Elena V. Karelkina — senior researcher of research laboratory of cardiomyopathies).

Abstract

Endothelial Progenitor Cells (EPC) were first described in 1997 and since that they have been the subject of numerous investigative studies exploring the potential of these cells in the process of cardiovascular damage and repair. Whilst their exact definition and mechanism of action remains unclear, they are directly influenced by different cardiovascular risk factors and have a definite role to play in defining cardiovascular risk. We have studied the proliferative activity of early circulating EPC as well as the number of EPC endothelial colony-forming units (CFU-EC) in a carefully selected groups of patients: 18 with arterial hypertension, 19 — healthy control and 58 with chronic heart failure (36 with ischemic heart disease vs 36 with dilated cardiomyopathy). The study shows reduced CFU-EC as in patients with arterial hypertension and in patients with chronic heart failure. Changing the proliferative abilities of cells is closely related to pathological remodeling of the left ventricle and elevated SCORE index. Study colony-forming ability of early EPC maintains its position as an important prognostic biomarker reflecting the angiogenic potential.

Keywords: circulating endothelial progenitor cells, essential hypertension, dilated cardiomyopathy, ischemic heart disease.

Статья поступила в редакцию 24.03.14 и принята к печати 05.04.14.

Введение

Возросший в последние десятилетия интерес к циркулирующим эндотелиальным клеткам-предшественникам продиктован убедительными доказательствами их роли в поддержании сосудистого гомеостаза и участии в патогенезе большинства сердечно-сосудистых заболеваний. Присутствие в периферической крови клеток-предшественников костномозгового происхождения, обладающих способностью дифференцироваться в эндотелиальные клетки, впервые было продемонстрировано Т. Asahara с соавторами в 1997 году [1]. До этого события процесс образования сосудов в постнатальном периоде долгое время отождествлялся с пролиферацией, миграцией и дедифференцировкой эндотелиальных клеток из уже существующих сосудов. Однако увеличение числа эндотелиальных клеток, находящихся в апоптозе, столь характерное для сердечно-сосудистых заболеваний, является главным лимитирующим фактором в образовании новых сосудов с помощью данного механизма. В работах J.M. Isner, Т. Asahara (1999) и С. Kalka с соавторами (2000) продемонстрирована возможность образования новых сосудов во взрослом организме за счет появления в кровотоке костномозговых клеток-предшественников, которые обладают способностью дифференцироваться в эндотелиальные клетки в зоне ишемии [2, 3]. Дальнейшие исследования этих клеток, получивших название эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП), легли в основу новой концепции постнатального образования сосудов и репарации эндотелия [4, 5]. Несмотря на то, что

в целом эта концепция получила широкое признание, точное определение подлинности ЭКП — чрезвычайно сложная задача ввиду отсутствия специфических маркеров и фенотипического разнообразия этих клеток [6]. Поэтому термин «ЭКП» объединяет чрезвычайно гетерогенную популяцию, к которой относят частично дифференцированные стволовые клетки различного происхождения: гемопоэтические, мезенхимные и резидентные клетки сосудистой стенки, имеющие общий ангиогенный потенциал, но не всегда обладающие способностью дифференцироваться в функционально активные эндотелиальные клетки [7, 8]. Долгое время в клинических исследованиях для оценки пролиферативной активности циркулирующих ЭКП использовался метод J.M. Hill, с помощью которого удалось доказать, что снижение клоногенной способности «ранних» ЭКП ассоциировано с увеличением риска развития целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний и событий [9, 10]. Вместе с тем в последние годы получены убедительные доказательства, что к «ранним» ЭКП относится популяция моноцитов и лимфоцитов, которые под влиянием специфических индукторов приобретают «эндотелиальные» маркеры и ангиогенные свойства [11, 12].

Какое клиническое значение и какой патофизиологический смысл заложены в исследовании клоногенной способности «ранних» ЭКП у больных с факторами риска и хронической сердечной недостаточностью (ХСН) различного генеза? На этот вопрос мы попытались ответить в настоящей работе.

Материалы и методы

Обследовано 36 больных с документированной ишемической болезнью сердца (ИБС) и систолической дисфункцией левого желудочка (фракция выброса по Симпсону < 40 %). Диагноз ИБС подтвержден на основании перенесенного инфаркта миокарда с патологическим зубцом Q или зафиксированного повышения маркеров повреждения миокарда, а также по данным коронарографического исследования. У 33 пациентов после исключения ИБС и активного миокардита диагностирована дилатационная кардиомиопатия (ДКМП). В качестве группы сравнения обследовано 18 пациентов с гипертонической болезнью II стадии, 2 степени (ВНОК, 2008), не имевших целевого уровня артериального давления (АД) и не получавших ингибиторов АПФ или антагонистов ангиотензиновых рецепторов в качестве антигипертензивной терапии. Все пациенты имели синусовый ритм, стабильное клиническое состояние в отношении симптомов ХСН и неизменную терапию в течение не менее чем 4 недель до включения в исследование. Контрольную группу составили 19 практически

здоровых лиц. Клинико-демографическая характеристика обследованных пациентов представлена в Таблице 1.

Всем пациентам выполнялось стандартное эхокардиографическое обследование на аппарате Philips iE33 (США) с расчетом массы миокарда левого желудочка (ММЛЖ) по формуле R. Devereux [13]. Ультразвуковое исследование плечевой артерии и дуплексное сканирование общих сонных артерий проводили на ультразвуковом аппарате Vivid 7 Pro (GE, США). Эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) плечевой артерии оценивали в ходе пробы с реактивной гиперемией по методу, предложенному D. Celermajer в модификации Y. Hirooka [14, 15]. Признаком эндотелиальной дисфункции считали расширение плечевой артерии менее 10 % [16].

Концентрацию общего холестерина, холестерина на липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) и триглицеридов в сыворотке крови определяли энзиматическим методом на биохимическом анализаторе Hitachi 902 с помощью реактивов

Таблица 1

КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

| | Больные АГ М ± σ n = 18 | ИБС М ± σ n = 36 | ДКМП М ± σ n = 33 | Контроль М ± σ n = 19 |
|--|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Возраст, лет | 56,2 ± 13,8** | 53,8 ± 7,0** | 44,7 ± 12,4 | 40,8 ± 7,8 |
| Пол (м/ж) | 11/7 | 31/5 | 25/8 | 13/6 |
| Индекс массы тела, кг/м ² | 28,8 ± 6,1† | 28,8 ± 5,0* | 27,6 ± 5,4 | 25,2 ± 2,8 |
| Курение, % | 22 | 72* | 55 | 50 |
| АГ, % | 100** | 72** | 24* | 0 |
| Давность АГ, лет | 6,9 (2;10)** | 7,9 (0; 12)** | 0,8 (0; 3) | 0 |
| Терапия: ИАПФ или АРА, % | — | 100 | 100 | |
| Статины, % | — | 86** | 26 | |
| Ультразвуковое исследование сердца и сосудов | | | | |
| ЛП, см | 3,83 ± 0,22 | 4,87 ± 0,55** | 4,93 ± 0,78** | 3,57 ± 0,33 |
| КДР ЛЖ, см | 5,02 ± 0,40 | 6,86 ± 0,52** | 6,83 ± 0,86** | 4,91 ± 0,44 |
| ОТС ЛЖ | 0,504 ± 0,048** | 0,289 ± 0,067* | 0,288 ± 0,064* | 0,359 ± 0,047 |
| ФВ по Симпсону, % | 63,1 ± 2,7 | 30,1 ± 7,6** | 28,4 ± 8,4** | 69,5 ± 5,6 |
| ИММЛЖ, г/м ² | 160,3 ± 38,3** | 181,1 ± 39,8** | 180,1 ± 48,1** | 91,8 ± 10, |
| Величина ЭЗВД, % | 10,3 ± 4,5 | 8,9 ± 2,9* | 10,1 ± 2,0† | 12,3 ± 3,9* |
| Толщина КИМ общих сонных артерий, мм | 0,741 ± 0,060** | 0,812 ± 0,087** | 0,733 ± 0,110** | 0,595 ± 0,044 |

Достоверность различий по сравнению с контролем: † — $p < 0,05$; * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,001$.

Примечание: АГ — артериальная гипертензия, ИАПФ — ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, АРА — антагонисты ангиотензиновых рецепторов, ЛП — левое предсердие, КДР ЛЖ — конечно-диастолический размер левого желудочка, ФВ — фракция выброса, ОТС ЛЖ — относительная толщина стенки левого желудочка, ИММЛЖ — индекс массы миокарда левого желудочка, ЭЗВД — эндотелийзависимая вазодилатация в пробе с реактивной гиперемией, КИМ — комплекс «интима-медиа».

фирмы Roche. Уровень С-реактивного белка (СРБ) определяли ультрачувствительным латексным методом (TINA-QUANT, Roche).

Для оценки пролиферативной активности циркулирующих ЭКП по методу J.M. Hill мононуклеарные лейкоциты получали путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности 1,077 («Histopaque», «Sigma», США) из венозной крови, стабилизированной гепарином (10 ед/мл) [9]. Фракцию мононуклеарных клеток для дальнейших исследований трижды отмывали центрифугированием при 1000 об/мин · 10 мин в 10-кратном объеме 0,1М фосфатного буфера. Полученные клетки в количестве 10⁷ на лунку культивировали в 6-луночной планшете, покрытой желатином, в среде ДМЕМ (knockout™ D-MEM, Invitrogen) с добавлением глутамина, 2 % фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen), 40 мкг/мл гентамицина и ростовых факторов (VEGF, b-FGF, EGF, Sigma, США) из расчета 10 нг/мл. Неприкрепившиеся клетки через 48 часов пересаживали в 35-мм покрытые желатином чашки с плотностью 5 · 10⁶ клеток в 2 мл среды. Пролиферативную активность ЭКП оценивали через 7 дней путем подсчета колониеобразующих единиц в 10 полях зрения в трех параллельных пробах. Результат представлен в виде среднего количества колоний на 1 мм². Принадлежность культивируемых клеток к ЭКП подтверждалась методами проточной цитометрии с использованием моноклональных антител CD34-FITC, VEGFR-2-APC, CD117-PE, CD105-PE,

CD90-FITC, CD45-FITC, CD14-PE-Cy7-A и не-прямой иммунофлюоресценции с использованием первичных антител к эндотелиальной молекуле клеточной адгезии тромбоцитов (CD31, PECAM). В качестве вторых антител брали ослиные анти-мышинные афинноочищенные F(ab')₂ фрагменты, конъюгированные с Cy™₃ (Jackson ImmunoRes. Lab., Inc).

Статистический анализ данных, полученных в ходе исследования, проведен с использованием прикладных статистических программ Statistica for Windows ver. 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Для показателей, имеющих приближенно нормальное распределение, результаты представлены в виде среднего арифметического значения (M), среднеквадратичного отклонения (σ) и количества признаков в группе (n), в остальных случаях — в виде медианы и квартилей. Критерий значимости устанавливался на уровне p < 0,05. Корреляционные связи между парами количественных переменных оценивали, используя непараметрический критерий Спирмена. Для выявления различий между подгруппами по одиночным показателям использовались разные варианты дисперсионного анализа: параметрические (ANOVA) и непараметрические (U-тест по методу Манна и Уитни, H-тест по Крускалу и Уоллису). Для оценки связей между клоногенной способностью «ранних» ЭКП и другими параметрами был применен линейный множественный регрессионный анализ с пошаговым отбором показателей.

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

| | Больные АГ M ± σ n = 18 | ИБС M ± σ n = 36 | ДКМП M ± σ n = 33 | Контроль M ± σ n = 19 |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Биохимические показатели | | | | |
| ОХ, ммоль/л | 5,41 ± 1,05 | 5,24 ± 1,30 | 5,20 ± 1,19 | 5,20 ± 0,88 |
| ТГ, ммоль/л | 1,56 ± 1,15 | 1,78 ± 0,83 | 1,71 ± 0,64 | 1,39 ± 0,58 |
| ХС ЛПНП, ммоль/л | 3,33 ± 0,89 | 3,41 ± 1,15 | 3,32 ± 0,95 | 3,31 ± 0,88 |
| ХС ЛПВП, ммоль/л | 1,48 ± 0,37 | 1,05 ± 0,40* | 1,24 ± 0,40 | 1,41 ± 0,40 |
| СРБ, мг/л | 2,30 (0,43; 3,15) | 5,44 ** (2,16; 8,14) | 4,24 * (2,08; 6,20) | 0,96 (0,40; 1,69) |
| Колониеобразующая способность циркулирующих клеток | | | | |
| КОЕ ЭКП, колоний/мм ² | 1,3* (0,7; 1,8) | 1,3* (0,2; 2,1) | 0,9** (0,2; 1,4) | 2,5 (1,9; 3,5) |

Достоверность различий по сравнению с контролем: * — p < 0,01; ** — p < 0,001.

Примечание: ОХ — общий холестерин, ТГ — триглицериды, ХС ЛПНП — холестерин липопротеидов низкой плотности, ХС ЛПВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, СРБ — С-реактивный белок.

Результаты

Пациенты с ИБС и факторами риска, включенные в исследование, были старше пациентов контрольной группы и группы ДКМП (Табл. 1). При анализе основных факторов риска пациенты трех основных групп не различались по уровню общего холестерина, триглицеридов и ХС ЛПВП. Исключение составляли пациенты ИБС с систолической дисфункцией левого желудочка, у которых отмечено снижение уровня ХС ЛПВП. Существенных различий по тяжести клинических проявлений хронической сердечной недостаточности (ХСН) и эхокардиографическим показателям между пациентами с ИБС и ДКМП не выявлено. Отмечено повышение уровня СРБ у больных с ХСН как ишемического, так и неишемического генеза.

Исследование клоногенной способности «ранних» ЭКП по методу J.M. Hill выявило уменьшение числа колониеобразующих единиц у больных с факторами риска и у больных с ХСН (Табл. 2). Наибольшее снижение клоногенной способности отмечено в группе больных с ДКМП. Установлено, что возраст обследованных пациентов оказывал негативное влияние на пролиферативную активность «ранних» ЭКП (Рис. 1). Не выявлено взаимосвязи между клоногенной способностью «ранних» ЭКП и липидным профилем обследованных, что, вероятно, связано с отсутствием существенных различий в показателях липидограммы между основными и контрольной группами. Вместе с тем установлена отрицательная корреляционная связь между числом колониеобразующих единиц и таким интегральным показателем, как индекс сердечно-сосудистого риска SCORE у больных с АГ ($r = -0,458$; $p < 0,006$), а также положительная корреляционная связь

с концентрацией ХС ЛПВП в сыворотке крови у больных ИБС ($r = 0,286$; $p < 0,05$). Наряду с выше перечисленными факторами на пролиферативную активность «ранних» ЭКП у больных с ХСН негативное влияние оказывал уровень СРБ (Рис. 2). При анализе 24 клинико-лабораторных и инструментальных показателей установлено, что наибольшее влияние на изменение числа колониеобразующих единиц оказывали такие эхокардиографические параметры, как фракция выброса и относительная толщина стенки левого желудочка:

КОЕ ЭКП = $1,074 + 0,538 * \text{ФВ}$ по Симпсону — $0,313 * \text{ОТС}$, $F = 6,48$; $p = 0,003$.

Вероятно, поэтому низкая пролиферативная активность ЭКП была ассоциирована со снижением актуальной выживаемости пациентов с ХСН по данным модели Seattle Heart Failure ($r = 0,350$; $p = 0,003$). Помимо гипертрофии левого желудочка и клинических проявлений ХСН клоногенная способность «ранних» ЭКП у больных с ХСН и пациентов с факторами риска тесно связана с такими независимыми предикторами сердечно-сосудистых осложнений, какими являются толщина комплекса интима-медиа сонных артерий ($\beta = -0,290$; $p = 0,006$) и величина ЭЗВД плечевой артерии ($\beta = 0,297$; $p = 0,003$).

При исследовании культуры «ранних» ЭКП выявлено, что клетки имеют $CD34^+CD133^+VEGFR-2^+$ и $CD34-CD133^+VEGFR-2^-$ -фенотип. Кроме того, они обладают способностью экспрессировать рецептор к SDF-1 ростовому фактору ($CD117^+$), регулирующий процесс миграции и мобилизации гемопоэтических прогениторных клеток. На принадлежность культивируемых клеток к ЭКП мезенхимального происхождения указывала экспрессия поверхност-

Рисунок 1. Влияние возраста на колониеобразующую способность «ранних» эндотелиальных клеток-предшественников по методу J.M. Hill

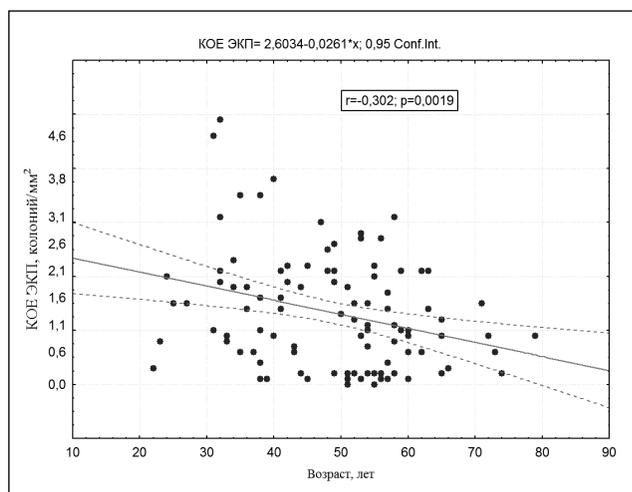


Рисунок 2. Корреляционная связь между уровнем С-реактивного белка и колониеобразующей способностью «ранних» эндотелиальных клеток-предшественников по методу J.M. Hill

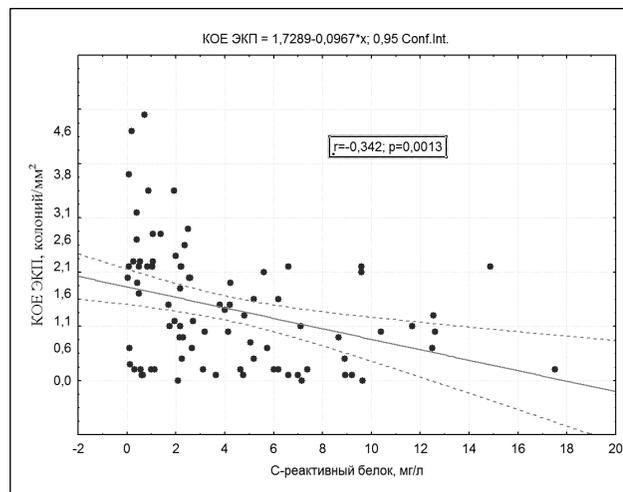
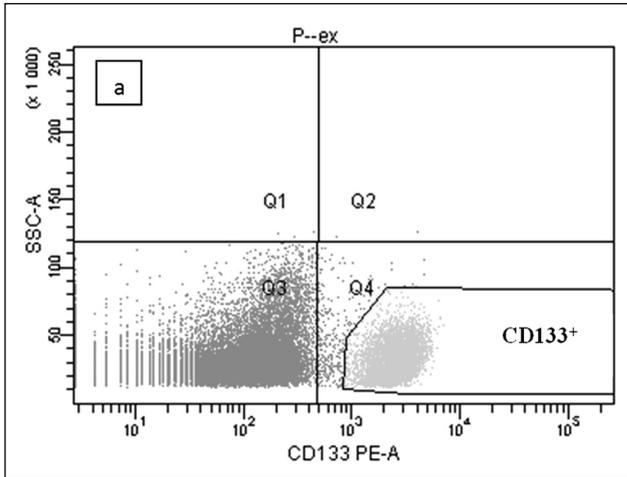
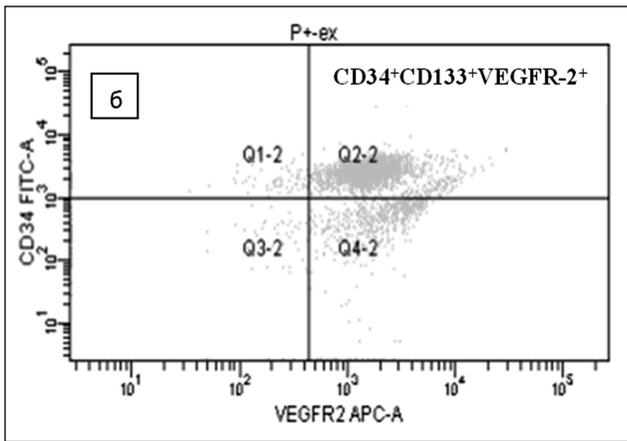


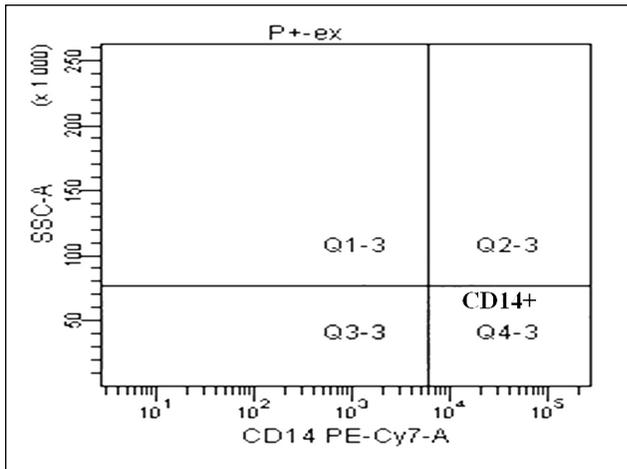
Рисунок 3. Фенотипическая характеристика клеток в культуре методом проточной цитометрии



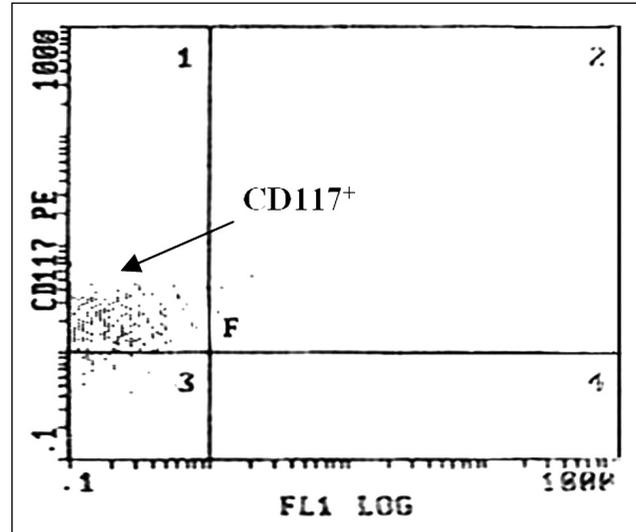
а — пул CD133⁺-клеток.



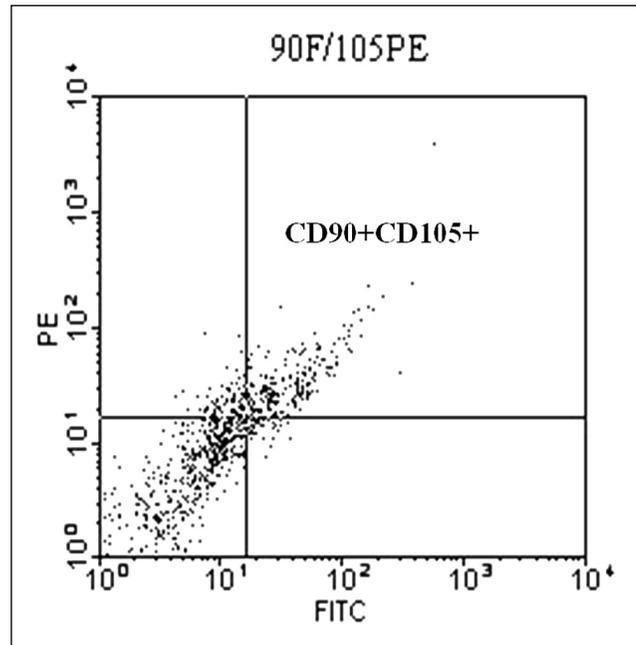
б :
 Q₁₋₂ — пул CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁻-клеток;
 Q₂₋₂ — пул CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺-клеток;
 Q₃₋₂ — пул CD34⁻CD133⁺VEGFR-2⁻-клеток;
 Q₄₋₂ — пул CD34⁻CD133⁺VEGFR-2⁺-клеток.



в — Q₄₋₃ — пул клеток моноцитарно-макрофагального происхождения CD14⁺.



д — пул CD117⁺-клеток.



г — пул клеток мезенхимального происхождения (CD90⁺CD105⁺).

ного белка из семейства иммуноглобулинов (CD90⁺) и белка эндоглина (CD105⁺). Обращало на себя внимание присутствие в культуре клеток моноцитарного происхождения, о чем свидетельствовала экспрессия маркера моноцитарно-макрофагального ряда CD14 (Рис. 3). Кроме того, культивируемые клетки экспрессировали традиционные эндотелиальные маркеры: адгезионные молекулы PECAM (CD31) и VE-кадгерин (CD144), а также фактор фон Виллебранда (Рис. 4).

Обсуждение

Для идентификации ЭКП большинство исследователей используют маркеры гемопоэтических ство-

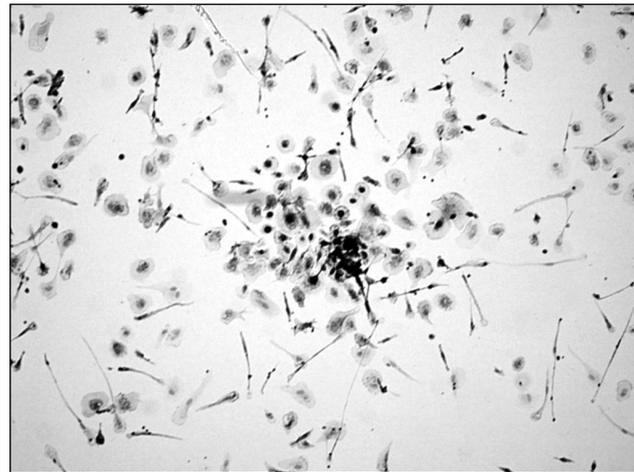
ловых клеток CD34 и CD133, а также специфические эндотелиальные маркеры, среди которых наибольшее значение имеет выявление рецепторов 2 типа к сосудистому ростовому фактору (VEGFR-2) [17]. Вместе с тем, существует мнение, что CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺-клетки относятся не к популяции ЭКП, а к ранним гемопоэтическим стволовым клеткам [18]. В пользу этой точки зрения говорит и тот факт, что циркулирующие ЭКП, в отличие от дифференцированных эндотелиальных клеток, не секретируют оксид азота в ответ на стимуляцию ацетилхолином и сосудистым ростовым фактором VEGF [19].

Ввиду отсутствия специфических маркеров для характеристики циркулирующих ЭКП широко применяются культуральные методы, позволяющие с помощью экзогенных ростовых факторов индуцировать появление эндотелиальных фенотипов, свойственных ранним и/или поздним клеткам-предшественникам. Ранние ЭКП, имеющие веретеноподобную морфологию в культуре, обладают способностью к захвату ацетилированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и экспрессируют антигены, характерные для эндотелиальных клеток: молекулы адгезии CD31, эндоглин CD105 и кадгерин CD144 [2]. Вышеперечисленными свойствами могут обладать и клетки моноцитарного ряда, которые в процессе культивирования фенотипически неотличимы от эндотелиальных клеток. Ряд авторов считают, что именно благодаря присутствию моноцитов и их предшественников «ранние» ЭКП приобретают колониобразующую способность *in vitro* [20]. Однако моноциты не только фенотипически напоминают ЭКП. Существует гипотеза, что среди клеток моноцитарного ряда имеется особая популяция так называемых циркулирующих ангиогенных клеток, которые играют важную роль в регуляции сосудистого гомеостаза и инициируют неоангиогенез при повреждении, в условиях ишемии и ремоделирования тканей [21]. По данным проточной цитометрии популяция моноцитов периферической крови, экспрессирующих VEGFR-2, не столь многочисленна: всего 2 % от CD14⁺ мононуклеарных клеток, но именно с ее участием связывают процессы неоангиогенеза в экспериментальных моделях повреждения тканей *in vivo* [22].

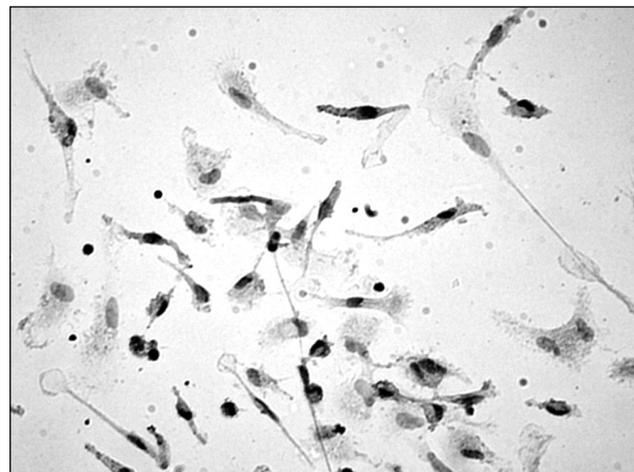
Наряду с гемопоэтическими клетками-предшественниками ангиогенным потенциалом обладают представленные в незначительном количестве в периферической крови мезенхимные стволовые клетки, экспрессирующие CD90 и CD105, и резидентные сосудистые клетки, экспрессирующие CD117, CD34, CD133, VEGFR-2 [23, 24].

Таким образом, популяция ангиогенных клеток-предшественников чрезвычайно гетерогенна, и фе-

Рисунок 4. Идентификация эндотелиального фенотипа клеток в культуре (световая микроскопия 400х, LSAB2, DAKO)



а — непряная иммуноцитохимия с помощью антител к CD31.



б — непряная иммуноцитохимия с помощью антител к VE-кадгерину.



в — непряная иммуноцитохимия с помощью антител к фактору фон Виллебранда.

нотип этих клеток во многом определяется спецификой микроокружения и пластическими свойствами самих клеток [25]. Независимо от того, способны ли клетки-предшественники дифференцироваться в эндотелиальные клетки, они принимают участие в регуляции процессов неоангиогенеза и репарации эндотелия опосредованно через продукцию проангиогенных цито- и хемокинов [26, 27]. Вероятно, поэтому клоногенная способность воспалительных и иммунных клеток, к которым в последнее время относят «ранние» ЭКП, обладает ценной прогностической информацией в отношении риска развития сердечно-сосудистых осложнений [28].

Среди факторов, определяющих снижение клоногенной способности «ранних» ЭКП, как и среди факторов увеличения риска развития сердечно-сосудистых событий наибольшее значение по данным настоящего исследования имел возраст обследованных пациентов. Теория старения является основной теорией, объясняющей снижение репарационного потенциала у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. У истоков этой теории стояли L. Hayflick и P.S. Moorhead, впервые описавшие данный феномен при культивировании клеток *in vitro* [29]. В соответствии с этой теорией преждевременное старение клеток является альтернативным апоптозу состоянием, возникающим под влиянием повреждающих факторов, нарушающих структуру теломеров и вызывающих хромосомную нестабильность клетки [30]. По мнению авторов данной теории, более низкий уровень стрессиндуцирующих факторов, среди которых у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями следует назвать ангиотензин II и окисленные ЛПНП, вызывает не программируемую гибель клеток (апоптоз), а их преждевременное старение. Напротив, ХС ЛПВП могут защищать циркулирующие стволовые клетки от преждевременного старения за счет усиления продукции оксида азота и повышения теломеразной активности [31].

Наряду с возрастом, снижение числа колониеобразующих единиц «ранних» ЭКП у больных с ХСН ассоциировано с повышением уровня СРБ в сыворотке крови. Последний рассматривается в качестве дополнительного фактора риска развития сердечно-сосудистых осложнений [32]. Нельзя исключить, что одним из механизмов реализации этого фактора риска является нарушение процессов постнатального ангиогенеза, так как в исследованиях *in vitro* показано негативное влияние СРБ на жизнеспособность, дифференцировку и пролиферативную активность ЭКП [33, 34].

Низкая пролиферативная активность «ранних» ЭКП, выявленная в настоящем исследовании, была

ассоциирована с увеличением индекса сердечно-сосудистого риска SCORE, гипертрофией и систолической дисфункцией левого желудочка, что указывает на возможность использования данного метода в качестве дополнительного прогностического фактора у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и согласуется с ранее полученными данными клинического исследования С.К. Kissel с соавторами [35].

Подтверждением того, что колониеобразующая способность «ранних» ЭКП может отражать репаративный потенциал ангиогенных популяций ЭКП, служит выявленная в настоящем исследовании положительная корреляционная связь между числом колоний и величиной ЭЗВД плечевой артерии, а также отрицательная корреляционная связь с толщиной комплекса «интима-медиа» сонных артерий.

Подводя итог многочисленным клинико-экспериментальным исследованиям, следует заключить, что предложенный в 2003 году метод J.M. Hill не дает представления об истинном характере циркулирующих ангиогенных клеток-предшественников. Вместе с тем, исследование клоногенной способности «ранних» ЭКП сохраняет свои позиции в качестве важного прогностического биомаркера, отражающего ангиогенный потенциал больного.

Работа выполнена в ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Литература

1. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative endothelial progenitor cells for angiogenesis // Science. — 1997. — Vol. 275, № 5302. — P. 964N967.
2. Isner J.M., Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization // J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103, № 9. — P. 1231–1236.
3. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, № 7. — P. 3422–3427.
4. Hristov M., Erl W., Weber P.C. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — Vol. 23, № 7. — P. 1185N1189.
5. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology // Cir. Res. — 2004. — Vol. 95, № 4. — P. 343N353.
6. Schatteman G.C., Dunnwald M., Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007. — Vol. 292, № 1. — P. H1–18.

7. *Zampetaki A., Kirton J.P., Xu Q.* Vascular repair by endothelial progenitor cells // *Cardiovasc. Res.* — 2008. — Vol. 78, № 3. — P. 413N421.
8. *Timmermans F., Plum J., Yöder M.C. et al.* Endothelial progenitor cells: identity defined? // *J. Cell Mol. Med.* — 2009. — Vol. 13, № 1. — P. 87N102.
9. *Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P.J. et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 348, № 7. — P. 593N600.
10. *Werner N., Kosiol S., Schiegl T. et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353, № 10. — P. 999N1007.
11. *Rohde E., Bartmann C., Schallmoser K. et al.* Immune Cells Mimic the Morphology of Endothelial Progenitor Colonies In Vitro // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25, № 7. — P. 1746–1752.
12. *Watt S.M., Athanassopoulos A., Harris A.L., Tsaknakis G.* Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair // *J. R. Soc. Interface.* — 2010. — Vol. 7, Supp. 6. — P. S731NS751.
13. *Devereux R.B., Reinchek N.* Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method // *Circulation.* — 1977. — Vol. 55, № 4. — P. 613N618.
14. *Celermajer D.S., Soresen K.E., Gooch V.M. et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis // *Lancet.* — 1992. — Vol. 340, № 8828. — P. 1111–1115.
15. *Hirooka Y., Egashira K., Imaizumi T. et al.* Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1994. — Vol. 24, № 4. — P. 948–955.
16. *Vogel R.A.* Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilatation // *Am. J. Cardiol.* — 2001. — Vol. 88, № 2A. — P. 31EN34E.
17. *Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors // *Blood.* — 2000. — Vol. 95, № 3. — P. 952–958.
18. *Case J., Mead L.E., Bessler W.K. et al.* Human CD34⁺AC133⁺VEGFR-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors // *Exp. Hematol.* — 2007. — Vol. 35, № 7. — P. 1109N1118.
19. *Harratz M., Jiao C., Hanlon H.D. et al.* CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors // *Stem Cells.* — 2001. — Vol. 19, № 4. — P. 304–312.
20. *Rohde E., Malischnik C., Thaler D. et al.* Blood Monocytes Mimic Endothelial Progenitor Cells // *Stem Cells.* — 2006. — Vol. 24, № 2. — P. 357–367.
21. *Hirschi K.K., Ingram D.A., Yoder M.C.* Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2008. — Vol. 28, № 9. — P. 1584N1595.
22. *Elsheikh E., Uzunel M., He Z. et al.* Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity // *Blood.* — 2005. — Vol. 106, № 7. — P. 2347–2355.
23. *Zampetaki A., Kirton J.P., Xu Q.* Vascular repair by endothelial progenitor cells // *Cardiovasc. Res.* — 2008. — Vol. 78, № 3. — P. 413N421.
24. *Watt S.M., Gullo F., van der Garde M. et al.* The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential // *British Medical Bulletin.* — 2013. — Vol. 108. — P. 25–53.
25. *Smith J.N.P., Calvi L.M.* Concise Review: Current Concepts in Bone Marrow Microenvironmental Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells // *Stem Cells.* — 2013. — Vol. 31, № 6. — P. 1044–1050.
26. *Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L.* Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107, № 8. — P. 1164–1169.
27. *Fortini C., Toffoletto B., Fucili A. et al.* Circulating stem cell vary with NYHA stage in heart failure patients // *J. Cell. Mol. Med.* — 2011. — Vol. 15, № 8. — P. 1726N1736.
28. *Siddique A., Shantsila E., Lip G.Y., Varma C.* Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? // *J. Angiogenes. Res.* — 2010. — Feb 22;2:6. [Электронный ресурс] doi: 10.1186/2040-2384-2-6
29. *Hayflick L., Moorhead P.S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* — 1961. — Vol. 25. — P. 585–621.
30. *Chen J., Goligorsky M.S.* Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh’s dilemma // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2006. — Vol. 290, № 5. — P. H1729NH1739.
31. *Pu D.R., Liu L.* HDL slowing down endothelial progenitor cells senescence: a novel anti-atherogenic property of HDL // *Med. Hypotheses.* — 2008. — Vol. 70, № 2. — P. 338N342.
32. *Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K.* Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2009. — Vol. 54, № 23. — P. 2129–2138.
33. *Verma S., Kuliszewski M.A., Shu-Hong Li et al.* C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation and function // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109, № 17. — P. 2058N2067.
34. *Spiel A.O., Mayr F.B., Leitner J.M. et al.* Simvastatin and rosuvastatin mobilize endothelial progenitor cells but do not prevent their acute decrease during systemic inflammation // *Thromb Res.* — 2008. — Vol. 123, № 1. — P. 108N113.
35. *Kissel C.K., Lehmann R., Assmus B. et al.* Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2007. — Vol. 49, № 24. — P. 2341N2349.