

Влияние М-CSF на экспрессию маркеров прогениторных эндотелиальных клеток в культуре мононуклеаров крови при ишемической болезни сердца

Чумакова С.П.¹, Уразова О.И.^{1,3}, Шипулин В.М.^{1,2}, Гладковская М.В.¹, Андреев С.Л.²,
Невская К.В.¹, Зима А.П.¹, Никулина Е.Л.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

³ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

РЕЗЮМЕ

Цель: оценить характер изменений экспрессии маркеров эндотелиальных прогениторных клеток (VEGFR2, CD34, CD14) и эндотелиоцитов (CD146) в ассоциации с экспрессией панлейкоцитарного маркера CD45 в культуре мононуклеаров крови в присутствии М-CSF у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и здоровых доноров.

Материалы и методы. В исследование вошли 12 больных ИБС со стенокардией напряжения III–V функционального класса и 10 здоровых доноров, у которых утром натощак забирали венозную кровь в количестве 30 мл и стабилизировали гепарином. Мононуклеары крови выделяли на градиенте фиколла 1,077 г/см³ и подвергали иммуномагнитной сепарации с применением антител CD14-MicroBeads и CD34-MicroBead Kit (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Германия). Полученную смешанную по CD14 и CD34 культуру мононуклеаров инкубировали 6 сут в полной питательной среде с добавлением М-CSF 50 нг/мл (Cloud-Clone Corp., США) и без него с полной заменой среды и повторным внесением М-CSF на 3-и сут. Через 6 сут оценивали долю позитивных по CD45, CD14, CD34, VEGFR2, CD146 клеток в культуре с помощью антител CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2-Alexa Fluor 647; CD45-FITC и CD146-PerCP (BD Biosciens, США) методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Показано, что у здоровых доноров доля CD146⁺ клеток в смешанной культуре мононуклеаров крови при добавлении М-CSF превышает их количество в пробе без его внесения при сопоставимых показателях экспрессии маркеров CD45, CD14 и VEGFR2 между контрольной и стимулированной культурами. У больных ИБС численность CD146⁺ и VEGFR2⁺ клеток не изменялась при добавлении М-CSF в культуру мононуклеаров, однако доля CD14⁺ клеток возрастала, а CD45⁺ клеток снижалась относительно контрольной пробы. Количество CD34⁺ клеток было сопоставимым как между контрольной и стимулированной пробами, так и между группами обследованных лиц. При этом у больных ИБС установлено превышение доли VEGFR2⁺ клеток относительно здоровых доноров в контрольной и стимулированной М-CSF пробах, а для CD14⁺ мононуклеаров – только в стимулированной культуре мононуклеаров.

Заключение. Формирование ИБС нарушает реакцию мононуклеаров крови на действие М-CSF, увеличивая число CD14⁺ и уменьшая долю CD45⁺ клеток в культуре при отсутствии стимулирующего влияния на экспрессию маркера CD146 эндотелиальных клеток. При этом М-CSF не влияет на экспрессию маркеров CD34 и VEGFR2 ЭПК как у больных ИБС, так и у здоровых лиц.

Ключевые слова: моноциты, прогениторные эндотелиальные клетки, М-CSF, репарация сосудов, эндотелиоциты, ишемическая болезнь сердца

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20038, <https://rscf.ru/project/22-25-20038/> и средств Администрации Томской области.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследования проведены с разрешения локального этического комитета СибГМУ (протокол № 9299 от 28.11.2022).

Для цитирования: Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Гладковская М.В., Андреев С.Л., Невская К.В., Зима А.П., Никулина Е.Л. Влияние M-CSF на экспрессию маркеров прогениторных эндотелиальных клеток в культуре мононуклеаров крови при ишемической болезни сердца. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(4):156–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-156-163>.

Effect of M-CSF on the expression of endothelial progenitor cell markers in blood mononuclear cell culture in coronary heart disease

Chumakova S.P.¹, Urazova O.I.^{1,3}, Shipulin V.M.^{1,2}, Gladkovskaya M.V.¹, Nevskaya K.V.¹, Andreev S.L.², Zima A.P.¹, Nikulina E.L.¹

¹ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences
111a, Kievskaya Str., 634012, Russian Federation

³ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics (TUSUR)
40, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the nature of changes in the expression of markers of endothelial progenitor cells (VEGFR2, CD34, CD14) and endothelial cells (CD146) in association with the expression of the leukocyte common antigen CD45 in the culture of blood mononuclear cells in the presence of M-CSF in patients with coronary heart disease (CHD) and healthy donors.

Materials and methods. The study included 12 patients with CHD with class III–V angina pectoris and 10 healthy donors, from whom 30 ml of venous blood was taken on an empty stomach in the morning and stabilized with heparin. Blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation (1.077 g / cm³) and subject to immunomagnetic separation using CD14-MicroBeads and CD34-MicroBead Kit (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Germany). The resulting CD14⁺ and CD34⁺ culture of mononuclear cells was incubated for 6 days in a complete nutrient medium with and without M-CSF 50 ng / ml (Cloud-Clone Corp., USA) with complete replacement of the medium and repeated application of M-CSF on day 3. After 6 days, the proportions of CD45⁺, CD14⁺, CD34⁺, VEGFR2⁺, and CD146⁺ cells in the culture were assessed by flow cytometry using CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2-Alexa Fluor 647; CD45-FITC and CD146-PerCP antibodies (BD Biosciences, USA).

Results. It was shown that in healthy donors, the proportion of CD146⁺ cells in the co-culture of blood mononuclear cells with M-CSF exceeded their number in the sample without it, with comparable expression rates of CD45, CD14, and VEGFR2 markers between the control and stimulated cultures. In CHD patients, the number of CD146⁺ and VEGFR2⁺ cells did not change when M-CSF was added to the mononuclear cell culture; however, the proportion of CD14⁺ cells increased and the proportion of CD45⁺ cells decreased compared to the control sample. The number of CD34⁺ cells was comparable both between control and stimulated samples, and between the groups of examined individuals. At the same time, in patients with CHD, an increased proportion of VEGFR2⁺ cells was found in the control and stimulated samples compared to healthy individuals, while an increased proportion of CD14⁺ cells was detected only in the stimulated culture.

Conclusion. The development of CHD disrupts the response of blood mononuclear cells to the effect of M-CSF, increasing the number of CD14⁺ and reducing the proportion of CD45⁺ cells in the culture in the absence of

stimulating effects on the expression of endothelial cell marker CD146. At the same time, M-CSF does not affect the expression of CD34 and VEGFR2 in endothelial progenitor cells both in patients with CHD and in healthy individuals.

Keywords: endothelial progenitor cells, monocytes, M-CSF, vascular repair, endothelial cells, coronary heart disease

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-20038, <https://rscf.ru/project/22-25-20038/> and funds of the Tomsk Regional Administration.

Conformity with the principles of ethics. All individuals signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 9299 of 28.11.2022).

For citation: Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M., Gladkovskaya M.V., Nevskaya K.V., Andreev S.L., Zima A.P., Nikulina E.L. Effect of M-CSF on the expression of endothelial progenitor cell markers in blood mononuclear cell culture in coronary heart disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(4):156–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-156-163>.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания в течение многих десятилетий продолжают оставаться основной причиной смерти населения во многих странах мира [1, 2]. Исследования патогенеза сосудистой патологии часто сводятся к изучению вазомоторной эндотелиальной дисфункции сосудов [3, 4], однако ангиогенная ее форма, включающая нарушение ангиогенеза и репаративных процессов в сосудах [5], мало изучается.

При атеросклерозе, лежащем в основе ишемической болезни сердца (ИБС), моноциты могут играть и негативную, и протективную роль. С одной стороны, макрофаги бляшки, поддерживая хроническое воспаление, пролонгируют альтерацию сосудов с помощью матриксных металлопротеиназ (ММП) [1, 6, 7] и способствуют васкуляризации атеромы, что увеличивает риск кровоизлияний в бляшку с последующей ее дестабилизацией [3, 8]. С другой стороны, являясь клетками, содержащими популяцию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) [9], моноциты могут участвовать в индукции ангиогенеза, который необходим для формирования коллатерального кровотока и репарации поврежденных сосудов, что имеет защитно-приспособительное значение при ИБС.

Реализуют ангиогенез ранние и поздние ЭПК, которые имеют, соответственно, моноцитарный VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и немоноцитарный VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁻ иммунофенотипы [2, 9]. Ранние ЭПК паракринным образом стимулируют выживаемость зрелых эндотелиоцитов, могут приобретать их маркеры, но имеют ограниченную пролифератив-

ную активность; поздние ЭПК обладают высокой пролиферативной активностью и способны активно дифференцироваться в эндотелиоциты [2, 9]. Известно, что циркулирующие ЭПК можно выделить из мононуклеаров периферической крови. Более того, показано, что при культивировании моноцитов в присутствии фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) они трансформируются в промежуточный фенотип клеток и далее дифференцируются в эндотелиоциты, утрачивая панлейкоцитарный маркер CD45 [10]. Также продемонстрирована способность других ростовых факторов стимулировать ангиогенез. Так, культивирование клеток костного мозга с колониестимулирующим фактором гранулоцитов (G-CSF) и макрофагов (M-CSF) увеличивало экспрессию эндотелиальных маркеров CD31 и CD146 [11], а культивирование ЭПК из выделенных из крови моноцитов с колониестимулирующим фактором гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) увеличивало их пролиферативную активность [12]. Учитывая вышеизложенные факты, можно предположить, что моноциты крови (CD14⁺), обогащенные гемопоэтическими стволовыми (CD34⁺) клетками [2], могут модулировать свой фенотип под воздействием различных стимулов. Поскольку ранние ЭПК являются моноцитарными клетками, то, возможно, что культивирование смешанной культуры моноцитов (CD14⁺) и гемопоэтических стволовых клеток (CD34⁺) в присутствии M-CSF способно повлиять на экспрессию маркеров, характерных для ЭПК.

Цель исследования: оценить характер изменений экспрессии маркеров эндотелиальных прогениторных клеток (VEGFR2, CD34, CD14) и эндотелиоци-

тов (CD146) в ассоциации с экспрессией панлейкоцитарного маркера CD45 при культивировании смешанной культуры CD14⁺ и CD34⁺ мононуклеаров крови в присутствии M-CSF у больных ишемической болезнью сердца и здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное, контролируемое (случай–контроль), одноцентровое, наблюдательное исследование с декабря 2022 г. по май 2023 г. В исследование вошло 12 больных ИБС (10 мужчин и 2 женщины, средний возраст 62,0 [56,5; 64,0] года) со стенокардией напряжения II–IV функционального класса и недостаточностью кровообращения преимущественно II–III функционального класса по NYHA, имевших инфаркт миокарда в анамнезе и находившихся в стационаре НИИ кардиологии Томского НИМЦ с целью выполнения операции коронарного шунтирования. Больные получали стандартную антиангинальную терапию с применением нитратов пролонгированного действия, β1-адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, а также антиагрегантную терапию с использованием препаратов ацетилсалициловой кислоты или блокаторов P2Y₁₂-рецепторов и гиполипидемическую терапию с назначением статинов. Группу сравнения составили 10 практически здоровых доноров (7 мужчин и 3 женщины, средний возраст 57,5 [48,0; 65,5] лет), не имеющих каких-либо заболеваний сердечно-сосудистой системы и жалоб соответствующего характера.

Критериями исключения больных из исследования считали возраст старше 70 лет, наличие аутоиммунных заболеваний, аллергического процесса в стадии обострения, опухолевого процесса, вирусных гепатитов, сифилиса, ВИЧ-инфекции, анемий, проведение курсов лечения железосодержащими препаратами, эритропоэтиновой или иммуносупрессивной терапии, наличие острых инфекционных заболеваний менее чем за 3 нед до исследования, а также отказ пациента от исследования.

Исследования проводились в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации (1975), и с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 9299 от 28.11.2022).

Материалом исследования служила кровь из кубитальной вены в объеме 30 мл, взятая утром натощак до физической нагрузки, проведения диагностических и лечебных процедур, которую стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл). Мононуклеары крови выделяли методом градиентного центрифугирования с помощью фикола плотностью 1,077 г/см³ (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва). После двукратной отмывки мононуклеаров 0,5%-м PBS (PBS, pH = 7,2) выполняли иммуномагнитную сепарацию с использованием антител CD14 MicroBeads и CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Германия), сепарационных колонок MS (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Германия) и магнита MiniMACS (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Германия) согласно инструкциям производителя. Чистота выделения, т. е. доля CD14⁺ и CD34⁺ клеток в культуре составляла 80–85 % и 5–7% соответственно. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с 0,1%-м трипановым синим (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва), если она составляла не менее 96%, клетки вносили в две лунки 24-луночного планшета по 106 клеток в каждую. Инкубировали 6 сут в условиях 5%-го CO₂ в полной питательной среде (питательная среда RPMI-1640 (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва), эмбриональная телячья сыворотка, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин) с добавлением в одну из лунок 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF человека (CloudClone Corp., США). При этом через 3 сут инкубации производили частичную замену среды и повторное внесение стимулятора в той же дозе. Пробу с рекомбинантным M-CSF считали стимулированной, без M-CSF – контрольной. Через 6 сут клетки снимали с поверхности планшетов с помощью инкубации с 500 мкл 0,05%-го раствора трипсин-ЭДТА (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва) на лунку в течение 5 мин при 37 °C. После отмывки клеток 500 мкл 0,5%-го PBS осадок ресуспендировали и клетки использовали для проточной цитофлуориметрии.

Проточную цитофлуориметрию для определения экспрессии молекул CD45, CD14, CD34, VEGFR2 (KDR; CD309) и CD146 в смешанной культуре мононуклеаров крови выполняли с использованием моноклональных антител при двух сочетаниях меток: CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2(KDR; CD309)-Alexa Fluor 647 и CD45-FITC, CD146-PerCP, VEGFR2(KDR; CD309)-Alexa Fluor 647 согласно инструкциям производителя (BD Biosciens, США), погибшие клетки исключали из анализа с помощью окрашивания DAPI (Wuhan Servicebio Technology Co.Ltd., Китай). Измерения интенсивности флуоресценции проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter International S.A., США), анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExper 2.3 (Beckman Coulter International S.A., США). Границы позитивности свечения меток устанавливали с помощью FMO (флуоресценция минус один флуорохром). Оценивали долю позитивных по каждому маркеру клеток как долю (%) от общего

количества случаев, исключая область мелких объектов (FSC менее 100×10^4).

Статистический анализ данных был выполнен с помощью программы Statistica 10.0. При статистическом описании результатов вычисляли медиану и интерквартильный размах ($Me [Q_1; Q_3]$). С целью сравнительного анализа выборочных данных применяли критерии Манна – Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ контрольной и стимулированной с помощью M-CSF проб смешанной (по CD14⁺ и CD34⁺) культуры мононуклеаров крови у здоровых доноров выявил статистически значимое увеличение доли только CD146⁺ клеток в образце

с добавлением M-CSF относительно пробы без его внесения при сопоставимых показателях экспрессии для маркеров CD45, CD14 и VEGFR2 (таблица). У больных ИБС численность CD146⁺ клеток, напротив, не изменялась при добавлении в культуру M-CSF, как и количество VEGFR2⁺ клеток, однако, доля CD14⁺ мононуклеаров статистически значимо возрасла, а CD45⁺ снижалась относительно контрольной пробы. Между тем экспрессия CD34 не имела различий ни между контрольной и стимулированной пробами, ни между группами обследованных лиц.

Сопоставление показателей экспрессии изучаемых маркеров между группами обследованных лиц установило превышение относительного количества VEGFR2⁺ клеток у больных ИБС относительно здоровых доноров как в контрольной, так и в стимулированной M-CSF пробах, а для CD14⁺ мононуклеаров – только в стимулированной пробе (таблица 1).

Таблица

Экспрессия маркеров эндотелиальных прогениторных клеток и эндотелиоцитов, а также CD45-молекул в смешанной по CD14 ⁺ и CD34 ⁺ культуре мононуклеаров крови, стимулированных и не стимулированных M-CSF у больных ИБС и здоровых доноров, $Me [Q_1; Q_3]$				
Доля клеток, экспрессирующих маркер, %	Здоровые доноры		Больные ИБС	
	Контрольная проба	Проба с добавлением M-CSF	Контрольная проба	Проба с добавлением M-CSF
CD45	56,18 [40,55; 64,20]	30,93 [23,40; 47,12] $p_k = 0,288$	30, 79 [19,66; 46,60] $p = 0,135$	17,68 [11,62; 23,90] $p = 0,217$ $p_k = 0,049$
CD14	25,82 [18,34; 31,10]	19,17 [12,32; 26,80] $p_k = 0,627$	26,43 [15,93; 30,12] $p = 0,916$	40,36 [25,14; 51,69] $p = 0,046$ $p_k = 0,031$
CD34	22,71 [18,14; 27,58]	19,18 [15,07; 23,76] $p_k = 0,743$	15,84 [10,86; 24,11] $p = 0,566$	17,32 [14,24; 22,31] $p = 0,920$ $p_k = 0,855$
VEGFR2	4,38 [1,75; 9,25]	5,62 [2,51; 11,43] $p_k = 0,315$	21,16 [13,05; 28,56] $p = 0,002$	25,47 [13,80; 32,16] $p = 0,013$ $p_k = 0,407$
CD146	1,79 [0,94; 2,70]	2,82 [1,63; 5,40] $p_k = 0,023$	1,44 [0,90; 3,82] $p = 0,821$	2,36 [1,59; 4,27] $p = 0,763$ $p_k = 0,194$

Примечание. Уровень статистической значимости различий показателей по сравнению с содержанием клеток в контрольной пробе – p_k , у здоровых доноров – p .

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния M-CSF на экспрессию маркеров, присущих ранним ЭПК (VEGFR2, CD34, CD14) и более дифференцированным эндотелиоцитами (CD146), установила различия в эффектах этого цитокина на смешанную по CD14⁺ и CD34⁺ культуру мононуклеаров крови у больных ИБС и здоровых до-

норов (см. таблицу). Показано, что физиологическая реакция данных клеток на M-CSF заключается в усилении экспрессии CD146, которая у больных ИБС не происходит.

Молекула CD146 экспрессируется на эндотелиоцитах и перицитах, способствуя формированию межклеточных контактов между ними, повышая адгезивность эндотелия и выживаемость эндотели-

оцитов, а также внося вклад в рекрутирование перидцитов, хоуминг ЭПК, архитектуру сосудов и их стабилизацию [13, 14]. Показано, что растворимая его форма sCD146 усиливает ангиогенные свойства ЭПК, а инъекция sCD146 улучшает неоваскуляризацию в модели ишемии на мышах, что опосредуется VEGFR1, VEGFR2, ангиомотином и shCD146-изоформой [13]. Поэтому увеличение экспрессии CD146 в культуре мононуклеаров крови у здоровых лиц можно рассматривать как позитивный эффект М-CSF, который у больных ИБС мог бы оказать протективное влияние на пораженные атеросклерозом сосуды ишемизированного миокарда, но при ИБС не реализуется (см. таблицу).

На модели хронической обструктивной болезни легких показано, что дефицит CD146 в клетках эндотелия легких связан с повышенной его проницаемостью и инфильтрацией тканей моноцитами, а добавление sCD146 увеличивает трансмиграцию моноцитов *in vitro* [13]. Соответственно, нарушение экспрессии CD146 при действии М-CSF у больных ИБС может не только затруднять ангиогенез, но и усиливать миграцию моноцитов в стенку сосуда и ткани, способствуя воспалению и фиброзу. Так, дефицит CD146 связан с подавлением и усилением неканонического и канонического путей Wnt соответственно, что приводит к профибротическому состоянию [15].

Поскольку CD146 в большей степени представлен на зрелых эндотелиоцитах и часто используется как маркер десквамированных эндотелиальных клеток [14, 16, 17], а в меньшей степени – на ЭПК [9, 14], то у здоровых лиц под влиянием М-CSF в культуре мононуклеаров крови происходит, вероятно, формирование зрелого фенотипа эндотелиоцитов. При этом экспрессия другого эндотелиального маркера VEGFR2, присущего ЭПК и эндотелиоцитам, и у здоровых лиц, и у больных ИБС в культуре мононуклеаров крови не изменялась в присутствии М-CSF (см. таблицу).

Связывание VEGFR2 со своими лигандами VEGF-A и VEGF-C стимулирует экспрессию адгезивных молекул, проницаемость сосудов и выживаемость клетки (через активацию пути PI3K/АКТ), ее прикрепление и миграцию (через активацию p38MAPK и киназы фокальной адгезии FAK), а также пролиферативный ответ (через активацию митоген-активируемой протеинкиназы MAPK и экстрацеллюлярно регулируемой киназы ERK) [18]. Следовательно, можно предположить, что ранние VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и поздние VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁻ ЭПК, которые присутствовали в культуре мононуклеаров (поскольку подверга-

лись сепарации по CD34⁺), трансформировались под влиянием М-CSF у здоровых доноров в более зрелый фенотип с экспрессией CD146, но без увеличения пролиферативного потенциала клеток посредством сигналинга VEGFR2. При ИБС данная трансформация, очевидно, не происходила. Поскольку экспрессия VEGFR2 и CD34 в культуре мононуклеаров крови не увеличивалась в присутствии М-CSF ни у здоровых лиц, ни у больных ИБС (см. таблицу), то нельзя утверждать, что М-CSF способствует дифференцировке или пролиферации ЭПК. Тем не менее доля VEGFR2⁺ клеток в смешанной культуре мононуклеаров крови у больных ИБС была выше, чем у здоровых лиц, как в присутствии М-CSF, так и без такового (см. табл. 1). Данный факт, очевидно, связан с исходно большей сепарацией VEGFR2⁺CD34⁺ клеток у пациентов ввиду высокого содержания VEGFR2⁺ клеток в крови у больных ИБС, который мы описывали ранее [17].

Обращает на себя внимание значительно большая доля CD34⁺ клеток в обеих группах обследованных лиц после культивирования мононуклеаров (см. таблицу) относительно того, который был получен с помощью иммуномагнитной сепарации (см. раздел «Материалы и методы»). Показано, что мононуклеары крови в культуре могут трансформироваться не только в эндотелиальные клетки и макрофаги, но и в фиброциты, экспрессирующие CD34 [19]. Мы наблюдали формирование в культуре веретенообразных клеток (результаты не представлены, ведется их статистическая обработка), форма которых присуща как фиброцитам [19], так и концевым эндотелиальным клеткам [2, 10]. Однако без изучения специфических маркеров фиброцитов, таких как наличие внутриклеточного коллагена и CD34 при отсутствии экспрессии CD33, CD35, CD93 [19], нельзя судить о влиянии М-CSF на дифференцировку фиброцитов.

Неизменность доли CD34⁺ мононуклеаров в культуре при действии М-CSF у обследованных лиц обеих групп (см. таблицу) может быть также связана с индукцией этим цитокином разнонаправленных процессов: стимуляции образования из моноцитов (CD14⁺), не экспрессирующих CD34⁺, в несущие его фиброциты, и с переходом CD34⁺ ЭПК в зрелые формы эндотелиальных клеток, утрачивающие CD34⁺. Так, в культуре моноцитов крови *in vitro* были обнаружены CD34⁺ клетки с высокой экспрессией маркеров эндотелиальных клеток, окруженные веретенообразными клетками.

Со временем стали выделять два типа колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуре моноцитов: КОЕ-клетки Хилла и эндотелиальные колониеобразующие клетки. Первые являются фагоцитирующе-

щими и экспрессируют CD14, CD45, CD115, но не обладают пролиферативной и васкулогенной активностью, а вторые не имеют CD14, CD45, CD115, экспрессируют маркеры эндотелиальных клеток и образуют капилляроподобные структуры *in vitro* и сосуды *in vivo* [2]. Поскольку у больных ИБС, в отличие от здоровых лиц, воздействие M-CSF вызвало накопление CD14⁺ клеток (см. таблицу), то это свидетельствует в пользу усиленного образования именно КОЕ-клеток Хилла. При этом снижение экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45 на культивируемых мононуклеарах крови у больных ИБС при добавлении M-CSF может объясняться, вероятно, его стимулирующим влиянием на трансформацию моноцитов в различные клетки, как не несущие CD45 (эндотелиальные [2]), так и слабо его экспрессирующие (фибробласты и макрофаги [19]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При ИБС изменяется характер ответной реакции CD14⁺ и CD34⁺ мононуклеаров крови на действие M-CSF, что проявляется усилением экспрессии маркеров CD14 и угнетением экспрессии CD45-молекул. При этом утрачивается физиологическая реакция этих клеток на стимуляцию M-CSF в виде усиления экспрессии эндотелиального маркера CD146. Между тем M-CSF не изменяет экспрессию маркеров ЭПК (VEGFR2, CD34) на CD14⁺ и CD34⁺ мононуклеарах крови как в норме, так и при развитии ИБС. Полученные знания формируют представления об эффективности цитокиновой и клеточной терапии с использованием M-CSF для индукции ангиогенеза у больных ИБС и механизмах возможного его терапевтического эффекта. Эти данные могут стать основой для разработки нового метода лечения ИБС при условии исключения побочного действия рекомбинантного M-CSF, что требует дальнейших исследований *in vivo*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Del Buono M.G., Moroni F., Montone R.A., Azzalini L., Sanna T., Abbate A. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr. Cardiol. Rep.* 2022;24(10):1505–1515. DOI: 10.1007/s11886-022-01766-6.
- Heinisch P.P., Bello C., Emmert M.Y., Carrel T., Dreßen M., Hörer J. et al. Endothelial Progenitor Cells as Biomarkers of Cardiovascular Pathologies: A Narrative Review. *Cells.* 2022;11(10):1678. DOI: 10.3390/cells11101678.
- Poston R.N. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc. Endocrinol. Metab.* 2019;8(2):51–61. DOI: 10.1097/XCE.0000000000000172.
- Zhang J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2022;23(2):73. DOI: 10.31083/j.rcm2302073.
- Мельникова Ю.С., Макарова Т.П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических заболеваний. *Казанский медицинский журнал.* 2015;96(4):659–665. DOI: 10.17750/KMJ2015-65.
- Eligini S., Cosentino N., Fiorelli S., Fabbiochi F., Niccoli G., Refaat H. Biological profile of monocyte-derived macrophages in coronary heart disease patients: implications for plaque morphology. *Sci. Rep.* 2019;9(1):8680. DOI: 10.1038/s41598-019-44847-3.
- Xu H., Jiang J., Chen W., Li W., Chen Z. Vascular macrophages in atherosclerosis. *J. Immunol. Res.* 2019;2019:4354786. DOI: 10.1155/2019/4354786.
- Moroni F., Ammirati E., Norata G.D., Magnoni M., Camici P.G. The role of monocytes and macrophages in human atherosclerosis, plaque neoangiogenesis, and atherothrombosis. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:e7434376. DOI: 10.1155/2019/7434376.
- Chopra H., Hung M.K., Kwong D.L., Zhang C.F., Pow E.H.N. Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem Cells International.* 2018;2018:9847015. DOI: 10.1155/2018/9847015.
- Lopes-Coelho F., Silva F., Gouveia-Fernandes S., Martins C., Lopes N., Domingues G. et al. Monocytes as endothelial progenitor cells (EPCs), another brick in the wall to disentangle tumor angiogenesis. *Cells.* 2020;9(1):107. DOI: 10.3390/cells9010107.
- Zhang Y., Adachi Y., Iwasaki M., Minamino K., Suzuki Y., Nakano K. et al. G-CSF and/or M-CSF accelerate differentiation of bone marrow cells into endothelial progenitor cells *in vitro*. *Oncol Rep.* 2006;15(6):1523–1527.
- Qiu C., Xie Q., Zhang D., Chen Q., Hu J., Xu L. GM-CSF induces cyclin D1 expression and proliferation of endothelial progenitor cells via PI3K and MAPK signaling. *Cell Physiol. Biochem.* 2014;33(3):784–795. DOI: 10.1159/000358652.
- Leroyer A.S., Blin M.G., Bachelier R., Bardin N., Blot-Chabaud M., Dignat-George F. CD146 (cluster of differentiation 146). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019;39(6):1026–1033. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312653.
- Гончаров Н.В., Попова П.И., Авдонин П.П., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Корф А. и др. Маркеры эндотелиальных клеток в норме и при патологии. *Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии.* 2020;37(1):3–21. DOI: 10.31857/S0233475519040054.
- Kaspi E., Heim X., Granel B., Guillet B., Stalini J., Nollet M. et al. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017;140(5):1448–1451.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.04.046.
- Сайганов С.А., Кузьмина-Крутецкая А.М. Эндотелиальная дисфункция и циркулирующие эндотелиальные клетки у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.* 2018;10(2):2732. DOI: 10.17816/mechnikov201810227-32.
- Чумакова С.П., Уразова О.И., Денисенко О.А., Погонченкова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С. и др. Моноциты крови в поддержании баланса деструктивных и репаративных процессов в сосудистом эндотелии при ишемической кардиомиопатии. *Комплексные проблемы сер-*

- дечно-сосудистых заболеваний. 2022;11(3):84–96. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-84-96.
18. Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A., Alcobia D.C., Hill S.J., Kilpatrick L.E. et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(4):1264. DOI: 10.3390/ijms19041264.
19. Pilling D., Fan T., Huang D., Kaul B., Gomer R.H. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One*. 2009;4(10):e7475. DOI: 10.1371/journal.pone.0007475.

Вклад авторов

Чумакова С.П. – разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи. Уразова О.И. – разработка дизайна исследования, материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, корректировка текста рукописи. Шипулин В.М. – консультирование по вопросам планирования исследования и интерпретации клинических аспектов результатов, полученных у кардиологических больных. Гладковская М.В. – пробоподготовка биоматериала и выполнение культурных методов исследования. Андреев С.Л. – взаимодействие с кардиологическими пациентами, обеспечение клинического материала. Невская К.В. – выполнение метода проточной цитофлуориметрии. Зима А.П. – материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов. Никулина Е.Л. – статистическая обработка результатов исследования.

Информация об авторах

Чумакова Светлана Петровна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск, chumakova_s@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Уразова Ольга Ивановна – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ; профессор кафедры комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР; г. Томск, urazova72@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Шипулин Владимир Митрофанович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, науч. руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ; профессор, кафедра госпитальной хирургии с курсом сердечно-сосудистой хирургии, СибГМУ, г. Томск, shipulin@cardio-tomsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1956-0692>

Гладковская Маргарита Вадимовна – лаборант-исследователь, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, gladkovskay0@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1163-3439>

Андреев Сергей Леонидович – канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург, ст. науч. сотрудник, отделение сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, anselen@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4049-8715>

Невская Ксения Владимировна – канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск, nevskayaksenia@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

Зима Анастасия Павловна – д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, e-mail: zima2302@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9034-7264>

Никулина Евгения Леонидовна – канд. мед. наук, доцент, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, nikulina85@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9673-5487>

(✉) Чумакова Светлана Петровна, chumakova_s@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023;
одобрена после рецензирования 19.05.2023;
принята к публикации 25.05.2023