

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.12-008.46:576.53

Лыков А.П.^{1,2}, Чернявский А.М.², Повещенко О.В.^{1,2}, Фомичев А.В.²,
Суровцева М.А.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Карева Ю.Е.², Таркова А.Р.²

Характеристика костномозгового клеточного трансплантата больных хронической сердечной недостаточностью до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, 630060, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2

² ФГБУ «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, 630055, г. Новосибирск, Россия, ул. Речкуновская, д. 15

Аутологичные костномозговые стволовые клетки являются альтернативным способом терапии пациентов с сердечной недостаточностью. **Цель** работы — изучение фенотипа и функциональных свойств костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК) больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином *in vitro*. **Методика.** КМ-МНК выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho = 1,077$ г/л). Фенотип КМ-МНК, клеточный цикл и апоптоз CD34+ клеток определяли до и после экспозиции с эритропоэтином на проточном цитометре. Проллиферативный потенциал КМ-МНК до и после экспозиции с эритропоэтином оценивали в спонтанном и стимулирующем тесте. Пролиферацию, миграцию и ангиогенный потенциал клеток EA.hy 929 изучали в тесте «раневого дефекта» монослоя клеток и на матригеле под влиянием 30% кондиционных сред от КМ-МНК. **Результаты.** Показано, что КМ-МНК представляют собой смесь гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) на разных этапах созревания и дифференцировки, и мезенхимных стволовых клеток (МСК). Под действием эритропоэтина увеличивается количество CD34+ клеток в G0G1 фазе клеточного цикла, CD45+/EpoR+, CD31-/CD184+, CD31+/CD184+ и CD34+/CD184-, и уменьшается количество CD34+/CD133+, CD34+/EpoR-. Кондиционная среда от КМ-МНК способствует пролиферации, миграции и формированию сосудисто-подобных структур клетками EA.hy 929. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что кратковременная экспозиция КМ-МНК больных ХСН задерживает CD34+ клетки в стадии покоя, увеличивает пул ЭПК, экспрессирующих «хоуминг» рецептор, а кондиционная среда от КМ-МНК стимулирует пролиферацию, миграцию и ангиогенный потенциал EA.hy 929, что следует учитывать при выборе методов усиления «приживаемости» клеточного трансплантата.

Ключевые слова: сердечная недостаточность; костномозговые стволовые/прогениторные клетки; цитопротекторный эффект эритропоэтина.

Для цитирования: Лыков А.П., Чернявский А.М., Повещенко О.В., Фомичев А.В., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Карева Ю.Е., Таркова А.Р. Характеристика костномозгового клеточного трансплантата больных хронической сердечной недостаточностью до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 51–61. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8523

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке РФФ (Заявка № 16-15-00057).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН; ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: aplykov2@mail.ru

Поступила 04.05.2017

Lykov A.P.^{1,2}, Cherniavsky A.M.², Poveshchenko O.V.^{1,2}, Fomichev A.V.², Surovtseva M.A.^{1,2},
Bondarenko N.A.^{1,2}, Kim I.I.^{1,2}, Kareva Yu.E.², Tarkova A.R.²

Characteristics of bone marrow cell graft from patients with chronic heart failure before and after a short-term exposure to erythropoietin

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Timakova Str. 2, Novosibirsk 630060, Russia

² E.N. Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Rechkunovskaya Str. 15, Novosibirsk 630055, Russia

Autologous bone marrow stem cells are an alternative therapy for patients with heart failure. The **aim** of this work was to study the phenotype and functional properties of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) from patients with chronic heart failure (CHF) before and after a short-term *in vitro* exposure to erythropoietin. **Methods.** BM-MNCs were isolated using density gradient. The BM-MNC phenotype, cell cycle, and apoptosis of CD34+ cells were evaluated before and after exposure to erythropoietin with a flow cytometer. Proliferation of BM-MNCs before and after the erythropoietin exposure was evaluated in a spontaneous and stimulating test. Proliferation, migration, and angiogenic potential of EA.hy 929 cells were studied in the wound closure test and in the tubule formation test under the influence of 30% conditioned medium from BM-MNCs. **Results.** BM-MNCs represented a mixture of hematopoietic stem cells (HSCs), endothelial progenitor cells (EPCs) at different stages of maturation and differentiation, and mesenchymal stem cells (MSCs). Erythropoietin increased the number of CD34+ cells in the G0/G1 cell cycle phase, CD45+/EpoR+, CD31-/CD184+, CD31+/CD184+, and CD34+/CD184-, and decreased the number of CD34+/CD133+ and CD34+/EpoR. The erythropoietin exposure of BM-MNCs reduced their proliferative capacity. The BM-MNCs-conditioned medium promoted EA.hy 929 cell proliferation, migration, and formation of vascular-like structures. **Conclusion.** A short-term exposure of BM-MNCs delayed the resting stage of CD34+ cells, increased the pool of EPCs expressing the homing receptor while the BM-MNC conditioned medium stimulated EA.hy 929 proliferation, migration and tubule formation, which should be taken into account when selecting methods to enhance survival of cellular grafts.

Keywords: heart failure; bone marrow stem/progenitor cells; cytoprotective effect of erythropoietin.

For citation: Lykov A.P., Cherniavsky A.M., Poveshchenko O.V., Fomichev A.V., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Kareva Yu.E., Tarkova A.R. Characterization of bone marrow cells graft from patients with chronic heart failure before and after short-term exposure with erythropoietin. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 51–61. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8523

For correspondence: Alexander P. Lykov, Candidate of Medical Science, leading researcher of the laboratory of cellular technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Timakova str., 2, Novosibirsk, 630060, Russian Federation, e-mail: aplykov2@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. Work is executed at financial support Russian Science Foundation № 16-15-00057.

Information about authors:

Lykov A.P. <http://orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Cherniavsky A.M. <http://orcid.org/0000-0001-9818-8678>

Poveshchenko O.V. <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Fomichev A.V. Author ID: 57191833744

Surovtseva M.A. <http://orcid.org/0000-0002-4752-988X>

Bondarenko N.A. <http://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Kim I.I. <http://orcid.org/0000-0002-7380-2763>

Kareva Yu.E. Author ID: 55943873600

Tarkova A.R. Author ID: 56497020700

Received 04.05.2017

Введение

Известно, что смертность больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) в Российской Федерации высока [1]. Это диктует необходимость разработки новых способов терапии, включая и достижения в области клеточных технологий. Аутологичные костномозговые стволовые клетки (СК) являются альтернативным способом терапии пациентов с ХСН [2]. Так, на фоне введения аутологичных костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МН) как интрамиокардиально, так и комбинацией интрамиокардиального введения с интракоронарным введением больным с ХСН отмечено улучшение сократи-

тельной способности левого желудочка [3]. Проведено сравнительное исследование [4] клинической эффективности интрамиокардиального введения КМ-МНК и обогащенной фракции CD31 клеток предшественников эндотелиоцитов в процессе неоангиогенеза в миокарде при ХСН. Показано, что КМ-МНК способствуют усилению работы левого желудочка и региональной перфузии миокарда. Более того, интрамиокардиальное введение КМ-МНК, ведет к увеличению плотности капилляров, экспрессии мРНК фактора роста эндотелия сосудов и ангиопоэтина-2. О клинической эффективности интрамиокардиального введения аутологичных КМ-МНК сооб-

щается и в других работах [5]. Показано снижение функционального класса сердечной недостаточности и увеличения фракции выброса левого желудочка. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата. Функциональная активность клеточного трансплантата зависит от условий микроокружения в области пораженного миокарда [6—8]. Показано, что эритропоэтин повышает выживаемость клеток при гипоксии [9—10]. Так, инкубация костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК) подавляет апоптоз и стимулирует пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) [11]. Однако, как эритропоэтин влияет на субпопуляционный состав ЭПК, количество КМ-МНК, несущих рецептор к эритропоэтину у больных ХСН исследовано недостаточно.

Цель исследования — оценка эффекта кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на количество клеток, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, параметры апоптоза и время пребывания клеток в фазах клеточного цикла, а также пролиферативный, миграционный и ангиогенный потенциал КМ-МНК.

Методика

В исследование включено 24 мужчины и 5 женщин в возрасте 45—74 лет, с ишемической болезнью сердца с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHA II—III класса, давших информированное согласие на участие в исследовании. Аспират костного мозга забирали из подвздошной кости традиционным способом под местной анестезией. КМ-МНК выделяли из костного мозга на градиенте плотности фиколл/верографин ($\rho = 1,077$ г/л). Фенотип клеточного трансплантата до и после кратковременной экспозиции с эритропоэтином исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США) с использованием моноклональных антител, меченных FITC, PE или APC к CD31, CD34, CD45, CD131 и CD184 (BD, США), CD73, CD90, CD144 (BioLegend, США), CD105 (eBioscience, США), CD133 (Abcam, США), а также к рецептору эритропоэтина (EpoR, R&DS, США) и к рецептору 2 типа эндотелиального фактора роста (VEGFR-2/KDR, Novus Biologicals, США). Экспозицию КМ-МНК с эритропоэтином (Рекормон, Швейцария, 33,4 МЕ/мл) проводили в культуральных флаконах в физиологическом растворе с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 40 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. Далее КМ-МНК трижды отмывали от остатков эритропоэтина и аутологичной сыворотки при 1500 об/мин в течение 5 мин.

В популяции CD34+ клеток исследовали клеточный цикл с использованием пропидиума иодида (BD, США) и апоптоз с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США). При анализе пребывания клеток CD34+ клеток в фазе клеточного цикла выделяли следующие фазы: subG0G1 (клетки с гиподиплоидным набором хромосом, <2n); G0G1 (клетки с диплоидным набором хромосом, фаза покоя/начального роста, 2n); G2/M (клетки с гиперплоидным набором хромосом, фаза подготовки к митозу/митоз, 2n-4n); S (клетки с гиперплоидным набором хромосом, фаза синтеза/репликации ДНК клеточного ядра, >4n). При анализе нахождения CD34+ клеток в апоптозе выделяли следующие гейты: некроз (мертвые клетки, окрашенные красителем для нуклеиновых кислот пропидиум иодидом), ранний апоптоз (клетки, имеющие нарушение «фосфолипидной асимметрии» мембраны и появление фосфатидилсерина на наружном слое мембраны, выявляемого взаимодействием с антикоагулянтом Annexin A), апоптоз (клетки позитивные на фосфатидилсерин и нуклеиновые кислоты).

Пролиферацию 2x10⁵ КМ-МНК/лунку питательной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки плода (FCS, Биолот, Россия), 2 mM L-глутамин (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия) далее посадочная среда, исследовали в спонтанном тесте и в ответ на стимулы (конканавалин А и фитогемагглютинин А в дозе 10 мкг/мл, липополисахарид в дозе 1 мкг/мл, рекормон в дозе 33,4 МЕ/мл, фактор роста эндотелия сосудов в дозе 10 нг/мл и перекись водорода в дозе 1, 3 и 5 mM, Sigma, США) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США). Кондиционную среду от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина собирали через 72 ч, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, разливали по аликвотам и хранили при -70°C.

Исследован эффект кондиционных сред от КМ-МНК на миграционный и пролиферативный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.hy 929, любезно предоставленной Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Клетки EA.hy 929 культивировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и НАТ (ICN, США), добавка к среде, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин, далее питательная среда для EA.hy929, в плоскодонных флаконах в концентрации 1,7x10⁵ клеток/мл при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ до образования монослоя. Пролиферацию и миграцию EA.hy 929 исследовали в тесте «раневой повер-

хности», для этого EA.hy929 вносили в 24-луночные плоскодонные планшеты в питательной среде для EA.hy929. Через 24 ч по центру лунок наносили кончиком наконечника на 200 мкл рану, слущенные клетки удаляли двукратной промывкой лунок забуференным физиологическим раствором. В контроле вносили питательную среду для EA.hy 929. В опыте DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина. Через 3 и 24 ч инкубации при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ закрытие раневого дефекта оценивали на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия). Ангиогенный потенциал EA.hy 929 под влиянием 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина или в питательной среде для EA.hy929 оценивали с использованием In Vitro Angiogenesis Assay Kit (Abcam, США) через 24 ч на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия). Для этого в 96-луночный плоскодонный планшет вносят по 50 мкл Extracellular Matrix Solution, далее инкубируют при 37°C в течение 40 мин, далее вносят по 10⁴ клеток/лунку EA.hy 929 в контроле — питательная среда для EA.hy929, а в опыте — DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и 30% кондиционной среды от КМ-МНК инкубированных без и в присутствии эритропоэтина. Через 24 ч инкубации при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ ангиогенный потенциал EA.hy 929 оценивали на инвертированном микроскопе Zeiss (Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows (Stat Soft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно W-критерию Шапиро—Уилкса, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квантилями; статистическую значимость рассчитывали по U-критерию Манна—Уитни и принимали при значениях $p \leq 0,05$. Связь между различными признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

Результаты и обсуждение

Среди КМ-МНК выделенных на градиенте плотности фиколл/верографин от больных ХСН можно выделить три основных типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), клетки предшественники эндотелиоцитов (ЭПК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) (табл. 1). Так, количество ГСК, несущих на своей мембране маркер CD45

(трансмембранный гликопротеин, член семейства протеин тирозин фосфатазы), у больных ХСН в среднем составило 1/3 от всех моноклеарных клеток костного мозга. Важным свойством стволовых клеток костного мозга является их способность мигрировать из костного мозга на периферию, так называемый «хоуминг», а молекулой, вовлеченной в миграцию клеток к месту назначения, является CXCR-4, CXС хемокиновый рецептор 4-го типа, специфический рецептор для CXС хемокина SDF-1/CXCL12 (фузин, CD184) [12].

Количество ГСК, не несущих на своей мембране CD184 было в два раза больше, чем ГСК, несущих на своей мембране данную молекулу. Одним из эффектов эритропоэтина, опосредуемого через взаимодействие эритропоэтина с рецептором к нему, является увеличение выживаемости клеток в неблагоприятном микроокружении [13]. Поэтому нами исследовано наличие экспрессии рецептора к эритропоэтину на ГСК. В популяции ГСК большая часть клеток не несет на своей мембране данного рецептора.

ЭПК — это неоднородная популяция клеток костного мозга, несущая на своей мембране разнообразные молекулы, которые отражают динамику созревания и дифференцировки от менее зрелых форм к зрелым формам эндотелиоцитов. Одним из маркеров ЭПК является мембранный белок, обеспечивающий межклеточную адгезию стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или со стромальными клетками, CD34.

Так, количество CD34+/CD45- клеток у больных ХСН не превышает 1% от общего пула КМ-МНК. В то же время, количество CD34+/CD45+ клеток свыше 6%. Среди пула ЭПК принято выделять «ранние» и «поздние» ЭПК, «незрелые» и «зрелые» ЭПК. О нахождении ЭПК на ранних стадиях дифференцировки судят по наличию экспрессии CD133 (проминин-1), гликопротеина, обеспечивающего топологию клеточной мембраны. У больных ХСН в костном мозге количество ранних ЭПК (CD34-/CD133+ клеток) больше поздних ЭПК (CD34+/CD133- клеток). О зрелости ЭПК судят по экспрессии CD31 и VEGFR-2. CD31 — это молекула адгезии тромбоцитов/эндотелиоцитов 1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, вовлеченный в обеспечение адгезии клеток. VEGFR-2 — это рецептор тирозинкиназы III типа, опосредует эффект фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а именно инициирует пролиферацию, выживание, миграцию, способность к формированию сосудоподобных структур и разрастанию эндотелиоцитов.

Количество зрелых форм ЭПК (CD34+/VEGFR-2+ и CD34+/CD31+ клеток)

в костном мозге больных ХСН также колеблется около 1%. Для миграции ЭПК из костного мозга на периферию необходимо наличие на клеточной мембране данных клеток «хоуминг-рецептора», так, нами показано, что количество CD34+ и CD31+ клеток, несущих на мембране CD184, сопоставимо. Кроме этого, нами изучена экспрессия на мембране CD34+ клеток, молекулы необходимой для адгезии к эндотелию — Кадгерин 5 2-го типа, контролирующей и организующей межклеточное соединение (CD144). Ко-

личество ЭПК у больных ХСН, несущих данную молекулу на мембране не превышает 0,3%. Также нами исследовано количество ЭПК, несущих на своей мембране рецептор к эритропоэтину. Показано, что количество CD34+/EpoR+ клеток в костном мозге больных ХСН меньше 0,3%. Классическими маркерами принадлежности клеток к мезенхимным стволовым клеткам являются CD90 (мембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, вовлечен в трансдукцию сигналов), CD73 (поверхност-

Таблица 1

Фенотипическая характеристика клеточного трансплантата больных ХСН

Фенотип	Количество (%)	Фенотип	Количество (%)
Гемопоэтические стволовые клетки		CD34+/CD184+	2,0 (0,97 — 3,35)
CD45+/CD34-	26,0 (26,0 — 44,16)	CD34-/CD184+	8,0 (2,85 — 19,85)
CD45+/CD184-	36,0 (24,56 — 36,0)	CD31+/CD184-	13,35 (8,0 — 20,0)
CD45+/CD184+	16,0 (5,4 — 17,7)	CD31+/CD184+	2,0 (2,0 — 7,45)
CD45+/EpoR-	11,5 (9,72 — 19,9)	CD31-/CD184+	2,0 (2,0 — 8,6)
CD45+/EpoR+	0,72 (0,39 — 1,0)	CD34+/EpoR-	11,0 (8,3 — 19,9)
Эндотелиальные прогениторные клетки		CD34+/EpoR+	0,67 (0,39 — 0,97)
CD34+/CD45+	2,61 (0,95 — 7,0)	CD34-/EpoR+	7,95 (0,1 — 12,0)
CD34+/CD45-	0,3 (0,2 — 0,6)	CD34+/CD131-	0,5 (0,1 — 0,7)
CD34-/CD133+	2,8 (0,9 — 14,4)	CD34+/CD131+	1,0 (0,2 — 2,3)
CD34+/CD133+	1,0 (0,6 — 1,15)	CD34-/CD131+	6,2 (4,1 — 8,8)
CD34+/CD133-	0,65 (0,1 — 1,0)	Мезенхимные стволовые клетки	
CD34-/VEGFR-2+	7,05 (2,6 — 20,65)	CD90+/CD73-	0,3 (0,1 — 0,3)
CD34+/VEGFR-2+	0,95 (0,67 — 1,85)	CD90+/CD73+	0,85 (0,35 — 2,05)
CD34+/VEGFR-2-	0,5 (0,05 — 4,0)	CD90-/CD73+	20,0 (11,73 — 23,6)
CD34-/CD31+	16,0 (10,0 — 28,4)	CD90+/CD105-	0,9 (0,3 — 1,0)
CD34+/CD31+	0,72 (0,39 — 1,0)	CD90+/CD105+	0,5 (0,35 — 0,99)
CD34+/CD31-	0,23 (0,1 — 10,0)	CD90-/CD105+	2,0 (1,9 — 4,1)
CD34-/CD144+	5,0 (5,0 — 5,0)	CD73+/CD105-	13,0 (5,5 — 20,6)
CD34+/CD144+	0,2 (0,2 — 0,2)	CD73+/CD105+	1,95 (1,07 — 5,8)
CD34+/CD144-	0,7 (0,7 — 0,7)	CD73-/CD105+	3,0 (0,9 — 4,2)
CD34+/CD184-	1,2 (0,46 — 4,0)		

Таблица 2

Клеточный цикл и уровень апоптоза CD34+ клеток у больных ХСН

Фазы клеточного цикла (%)	
subG0G1 (Апоптоз)	5,0 (5,0 — 5,0)
G0G1	78,0 (78,0 — 78,0)
G2/M	13,0 (13,0 — 13,0)
S	3,0 (3,0 — 3,0)
Параметры гибели клеток (%)	
Некроз (Annexin V-/PI+)	0,8 (0,32 — 1,05)
Ранний апоптоз (Annexin V+/PI-)	0,4 (0,1 — 3,05)
Апоптоз (Annexin V+/PI+)	5,35 (1,85 — 10,0)

но-клеточный протеин с энзимной и проводящей сигнал активностью) и CD105 (эндоглин, основной гликопротеин эндотелия сосудов человека, связывает различные белки TGF-β суперсемейства киназа рецепторного комплекса). У больных ХСН количество МСК в пуле КМ-МНК не превышало 3%.

О функциональной активности клеток костного мозга можно судить по пребыванию их в фазах клеточного цикла и уровню апоптоза (табл. 2).

Так, нами показано, что количество CD34+клеток КМ-МНК больных ХСН в 78% случаев находятся в фазе покоя/начального роста (G0G1), а в фазе синтеза и митоза — 18%, количество гиподиплоидных клеток не превышает 6%.

Более точную картину о количестве погибших и апоптотических клеток мы получили при исследовании апоптоза. Так, количество некротических клеток в популяции CD34+клеток КМ-МНК больных ХСН меньше 2%, клеток на ранней стадии апоптоза и поздней стадии апоптоза около 10%.

Кроме этого, нами показано, что КМ-МНК больных ХСН не отвечают на митогенный (Конканавалин А, Фитогемагглютинин А) и антигенный (Липополисахарид) стимулы (табл. 3).

В то же время, КМ-МНК больных ХСН проявляют тенденцию к увеличению пролиферации в ответ на фактор роста эндотелия сосудов и эритропоэтин.

Важной характеристикой клеточного трансплантата является устойчивость к действию неблагоприятных факторов микроокружения [14]. Поэтому, нами изучен пролиферативный потенциал КМ-МНК больных ХСН в условиях индукции окислительного стресса, вызываемого добавлением в питательную среду перекиси водорода. Так, нами показано, что при окислительном стрессе, индуцированного 1 мМ перекисью водорода, отмечается значимое увеличение пролиферативного потенциала КМ-МНК. В то же время, по мере возрастания концентрации перекиси

водорода в питательной среде отмечено значимое снижение пролиферативного потенциала КМ-МНК больных ХСН.

Корреляционный анализ полученных данных выявил наличие сопряженности между возрастом больных ХСН и количеством CD34+/CD133+, CD34-/CD31+, CD45+/EpoR- и CD34+/EpoR+ клеток ($r = +0,052, p \leq 0,05$; $r = +0,47, p \leq 0,05$; $r = +0,55, p \leq 0,05$ и $r = +0,49, p \leq 0,05$ соответственно). Количество ГСК и ЭПК, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину находилось в обратной взаимосвязи с классом сердечной недостаточности по Нью-Йоркской классификации ($r = -0,49, p \leq 0,05$ и $r = -0,43, p \leq 0,05$ соответственно). Количество CD34+/CD45+ клеток в костном мозге больных ХСН взаимосвязано с количеством CD34+/CD184+, CD34+/CD133-, CD34+/KDR-, CD34+/CD31+, CD45-/EpoR+, CD34-/EpoR+ и CD31+/CD184- клеток ($r = +0,50, p \leq 0,05$; $r = +0,47, p \leq 0,05$; $r = +0,44, p \leq 0,05$; $r = +0,45, p \leq 0,05$; $r = +0,60, p \leq 0,05$; $r = +0,66, p \leq 0,05$ и $r = +0,67, p \leq 0,05$ соответственно). Кроме этого, количество CD34+/CD45+ клеток взаимосвязано с уровнем апоптоза ($r = +0,58, p \leq 0,05$ и $r = -0,56, p \leq 0,05$ соответственно subG0G1 и Annexin V+/Propidium iodid-). Количество ГСК, экспрессирующих или не экспрессирующих «хоуминг» рецептор (CD184, рецептор к SDF-1) сопряжено с количеством ЭПК, также экспрессирующих или нет CD184 до и после экспозиции с эритропоэтином. Так, количество CD45+/CD184- до инкубации с эритропоэтином взаимосвязано с количеством CD31+/CD184+ ($r = +0,52, p \leq 0,05$). Количество CD45+/CD184+ до инкубации с эритропоэтином находилось в обратной взаимосвязи с количеством CD31+/CD184+ и количеством CD31+/CD184- после инкубации с эритропоэтином ($r = -0,62, p \leq 0,05$ и $r = -0,36, p \leq 0,05$ соответственно). Между

Таблица 3

Прролиферативный потенциал клеток костного мозга больных ХСН

Пролиферация	Уровень пролиферации (ед. опт. пл.)
Спонтанная	0,66 (0,56 — 0,68)
Конканавалин А	0,57 (0,55 — 0,60) *
Фитогемагглютинин А	0,6 (0,6 — 0,67)
Липополисахарид	0,7 (0,66 — 0,7)
Фактор роста эндотелия сосудов	0,69 (0,64 — 0,7)
Эритропоэтин	0,7 (0,55 — 0,82)
1 мМ H ₂ O ₂	0,7 (0,58 — 0,76) *
3 мМ H ₂ O ₂	0,6 (0,51 — 0,64)
5 мМ H ₂ O ₂	0,57 (0,34 — 0,57) *

Примечание. $p \leq 0,05$ *по сравнению со спонтанной пролиферацией КМ-МНК

количеством CD34-/CD184+ и количеством CD31+/CD184+ в костном мозге больных ХСН установлена прямая сопряженность ($r = +0,50$, $p \leq 0,05$). Количество CD34-/CD133+ клеток в костном мозге больных ХСН взаимосвязано с количеством CD34-/KDR+ клеток ($r = +0,80$, $p \leq 0,05$). Количество CD34+/KDR+ клеток сопряжено с количеством CD34+/CD31- и с количеством CD34-/CD144+ клеток ($r = +0,42$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,63$, $p \leq 0,05$ соответственно), а количество CD34+/KDR- клеток — с количеством CD34+/CD31- ($r = +0,72$, $p \leq 0,05$). Кроме этого, количество CD34+/KDR- клеток взаимосвязано с количеством в костном мозге больных ХСН CD31+/CD184+ и CD31-/CD184+ клеток ($r = -0,41$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,57$, $p \leq 0,05$ соответственно). Между количеством в костном мозге больных ХСН CD34-/CD31+ клеток и количеством CD34+/EpoR-, CD34+/EpoR+, CD31+/CD184- и CD31+/CD184+ показана прямая взаимосвязь ($r = +0,61$, $p \leq 0,05$; $r = +0,49$, $p \leq 0,05$; $r = +0,45$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,62$, $p \leq 0,05$ соответственно). В то же время, между количеством костномозговых клеток с фенотипом CD34+/CD31+ и количеством CD34+/EpoR+, CD31+/CD184+ клеток показана значимая взаимозависимость ($r = +0,74$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,50$, $p \leq 0,05$ соответственно), а между количеством CD34+/CD31- клеток и количеством CD34-/EpoR+, CD31-/CD184+ клеток установлены следующие сопряженности ($r = +0,56$, $p \leq 0,05$ и $r = -0,43$, $p \leq 0,05$ соответственно). Необходимо отметить тот факт, что количество ГСК, экспрессирующих или нет рецептор к эритропоэтину взаимосвязано с количеством ЭПК, экспрессирующих или нет рецептор к эритропоэтину. В частности, количество CD45+/EpoR-клеток взаимосвязано с количеством CD34+/EpoR- клеток, а количество CD45+/EpoR+ клеток с количеством CD34+/EpoR+ клеток ($r = +0,66$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,59$, $p \leq 0,05$ соответственно). Количество клеток костного мозга с фенотипом CD34+/EpoR+ клеток сопряжено с количеством CD31+/CD184- и CD31+/CD184+ клеток ($r = +0,45$, $p \leq 0,05$ и $r = +0,41$, $p \leq 0,05$ соответственно), а количество клеток с фенотипом CD34-/EpoR+ взаимосвязано с количеством CD31+/CD184- клеток ($r = +0,56$, $p \leq 0,05$).

Следующим этапом работы стала оценка эффекта кратковременной экспозиции КМ-МНК от больных ХСН с эритропоэтином.

В первую очередь был исследован эффект эритропоэтина на количество клеток ГСК и ЭПК экспрессирующих рецептор к эритропоэтину (табл. 4). Показано, что кратковременная экспозиция КМ-МНК

с эритропоэтином в дозе 33,4 МЕ/мл приводила к статистически значимому увеличению ГСК с фенотипом CD45+/EpoR+ по сравнению с исходным количеством.

В отношении изменения количества различных фенотипов ЭПК после воздействия эритропоэтина, установлено значимое снижение количества клеток с фенотипом CD34+/CD133+ и клеток с фенотипом CD34+/EpoR- по сравнению с исходным количеством ($p \leq 0,05$). Кроме этого, инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует значимому увеличению пула клеток с фенотипом CD31-/CD184+, CD31+/CD184+ и CD34+/CD184- по сравнению с исходным количеством.

О функциональной активности клеток можно судить по параметрам клеточного цикла (табл. 5). Так, инкубация КМ-МНК больных ХСН привела к статистически значимому увеличению доли CD34+ клеток в фазе покоя/начального роста (G0G1) за счет уменьшения доли клеток в фазе подготовки к митозу/митоза (G2/M) и фазе синтеза/репликации (S). Кроме этого, эритропоэтин увеличивал количество апоптотических CD34+ клеток (subG0G1), согласно исследованию пребывания клеток, в фазах клеточного цикла.

В то же время, по данным оценки апоптоза с помощью Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, отмечена тенденция к возрастанию количества клеток с фенотипом CD34+ в гейтах характерных для некроза и апоптоза, и тенденция к уменьшению в гейте раннего апоптоза, но статистически незначимое.

Кратковременная инкубация КМ-МНК от больных ХСН приводила к значимому снижению пролиферативной активности клеток как в спонтанном тесте, так и при стимуляции их различными веществами (табл. 6).

Заключительным этапом исследования стала оценка эффекта секретируемых КМ-МНК биологически активных веществ в окружающую среду (цитокины, ростовые факторы) на функциональные свойства клеток EA.hy 929.

Добавление к питательной среде DMEM/F12 30% кондиционной среды от КМ-МНК больных ХСН, клеток, росших в присутствии или отсутствии эритропоэтина, способствует в достаточной мере обеспечению пролиферации и миграции от краев «раневого дефекта» в монослое клеток EA.hy 929 для успешного «закрытия» в обоих случаях. Наличие ангиогенных факторов в кондиционной среде от КМ-МНК больных ХСН подтверждается данными в тесте формирования сосудисто-подобных структур под влиянием 30% кондиционных сред от клеток, росших в присутствии или отсутствие эритропоэтина (табл. 7).

Таблица 4

Эффект эритропоэтина фенотип КМ-МНК от больных ХСН

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
	кратковременной экспозиции с эритропоэтином	
Гемопоэтические стволовые клетки		
CD45+/EpoR+	0,72 (0,39 — 1,0)	4,95 (1,75 — 17,0) **
Эндотелиальные прогениторные клетки		
CD34-/CD31+	16,0 (10,0 — 28,4)	29,0 (9,3 — 29,0)
CD34+/CD31+	0,72 (0,39 -1,0)	1,0 (0,5 — 1,0)
CD34+/CD31-	0,23 (0,1 — 10,0)	1,7 (0,1 — 3,0)
CD34-/CD133+	2,8 (0,9 — 14,4)	0,54 (0,2 — 1,5)
CD34+/CD133+	1,0 (0,6 — 1,15)	0,7 (0,1 — 0,7) *
CD34+/CD133-	0,65 (0,1 — 1,0)	2,0 (0,01 — 6,0)
CD34-/KDR+	7,0 (2,6 — 20,65)	0,1 (0,03 — 0,3)
CD34+/KDR+	0,95 (0,67 — 1,85)	0,27 (0,1 — 2,5)
CD34+/KDR-	0,5 (0,04 — 4,0)	1,2 (0,01 — 2,4)
CD31-/CD184+	2,0 (2,0 — 8,6)	19,0 (3,1 — 19,0) **
CD31+/CD184+	2,0 (2,0 — 7,45)	10,0 (5,02 — 11,0) **
CD31+/CD184-	13,35 (8,0 — 20,0)	10,0 (7,08 — 12,8)
CD34-/CD184+	8,0 (2,85 — 19,85)	0,5 (0,1 — 3,0)
CD34+/CD184+	2,0 (0,97 — 3,35)	1,65 (0,4 — 2,0)
CD34+/CD184-	1,2 (0,46 — 4,0)	20,5 (15,95 — 26,95) *
CD34-/EpoR+	7,95 (0,1 — 12,0)	16,85 (7,45 — 25,0)
CD34+/EpoR+	0,67 (0,39 -0,97)	0,5 (0,35 — 0,65)
CD34+/EpoR-	11,05 (8,3 — 19,9)	1,0 (0,38 — 1,0) **
CD34-/CD131+	6,2 (4,1 — 8,8)	5,3 (2,9 — 27,8)
CD34+/CD131+	1,0 (0,2 — 2,3)	0,34 (0,2 — 1,7)
CD34+/CD131-	0,5 (0,1 — 0,7)	0,36 (0,04 — 0,6)

Примечание. p≤0,05 *по сравнению с исходным количеством клеток; p≤0,01 **по сравнению с исходным количеством клеток

Таблица 5

Влияние эритропоэтина на нахождение CD34+ клеток от больных ХСН в фазах клеточного цикла и апоптозе

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
	кратковременной экспозиции с эритропоэтином	
Фазы клеточного цикла CD34+ клеток		
subG0G1 (апоптоз)	5,0 (5,0 — 5,0)	6,0 (6,0 — 6,0) *
G0G1	78,0 (78,0 -78,0)	85,0 (85,0 — 85,0) **
G2/M	13,0 (13,0 — 13,0)	7,0 (7,0 — 7,0) **
S	3,0 (3,0 — 3,0)	1,0 (1,0 — 1,0) **
Параметры гибели CD34+ клеток		
Некроз	0,8 (0,32 — 1,05)	0,95 (0,25 — 1,0)
Ранний апоптоз	5,35 (1,85 — 10,0)	4,0 (0,9 — 5,0)
Апоптоз	0,4 (0,1 — 3,05)	2,0 (0,5 — 2,05)

Примечание. p≤0,05 *по сравнению с исходным количеством клеток; p≤0,01 **по сравнению с исходным количеством клеток

Сердечная недостаточность занимает существенную долю в инвалидизации и смертности населения во всем мире [15]. Сердечная недостаточность после инфаркта миокарда, это следствие ремоделирования миокарда. Структурное ремоделирование миокарда ассоциируется с воспалительной реакцией, сопровождается формированием рубца в области инфаркта миокарда, а также изменениями в перинфарктной зоне миокарда, такими как интерстициальный фиброз и ремоделированием кровоснабжения миокарда [15]. Костный мозг содержит эндотелиальные клетки-предшественники и мезенхимные стволовые клетки, которые могут использоваться для клеточной терапии с целью увеличения постишемической неоваскуляризации миокарда [16]. Нами показано, что в костном мозге больных ХСН содержатся основные типы стволовых клеток, в том числе и ЭПК. Более того, в костном мозге больных ХСН содержатся ЭПК, находящиеся на разных стадиях созревания и дифференцировки. В частности, в костном мозге

больных ХСН в большом количестве содержатся ранние ЭПК, клетки, несущие на своей мембране только CD133 и являющиеся пулом для созревания более поздних ЭПК, несущих двойной маркер ЭПК CD34+/CD133+, что можно расценивать как сохранность костного мозга к выработке ЭПК. Кроме этого, в костном мозге больных ХСН выявляются ЭПК с высокой степенью зрелости, а именно CD34+/VEGFR-2+(KDR) и CD34+/CD31+, способные к репарации поврежденной стенки сосудов и к формированию новых сосудов. Более того, ЭПК несут на своей поверхности молекулы необходимые для осуществления «хоуминга» к месту востребованности (CD184) и адгезии к эндотелию сосудов (CD144), а также рецептор к эритропоэтину, что способствует увеличению выживаемости данного пула клеток на периферии в неблагоприятном микроокружении. Известно, что ЭПК характеризуются наличием на клеточной поверхности маркеров, таких как CD34, VEGFR-2. Именно ЭПК, несущие на своей

Таблица 6

Эффект эритропоэтина на пролиферативный потенциал КМ-МНК больных ХСН

Параметры	Количество клеток (%)	
	до	после
кратковременной экспозиции с эритропоэтином		
Пролиферативный потенциал КМ-МНК (ед. опт. пл.)		
Спонтанный	0,66 (0,56 — 0,68)	0,40 (0,40 — 0,45) ***
Конканавалин А	0,57 (0,55 — 0,60) *	0,36 (0,36 — 0,46) **
Фитогемагглютинин А	0,6 (0,6 — 0,67)	0,45 (0,37 — 0,46) ***
Липополисахарид	0,7 (0,66 -0,7)	0,50 (0,45 — 0,51) ***
Фактор роста эндотелия сосудов	0,69 (0,64 — 0,7)	0,39 (0,32 — 0,39) ***
Эритропоэтин	0,7 (0,55 — 0,82)	0,50 (0,49 — 0,54) ***
1 мМ H ₂ O ₂	0,7 (0,58 — 0,76) *	0,36 (0,32 — 0,36) ***
3 мМ H ₂ O ₂	0,6 (0,51 — 0,64)	0,40 (0,30 — 0,42) ***
5 мМ H ₂ O ₂	0,57 (0,34 -0,57) *	0,38 (0,34 — 0,38) **

Примечание. p<0,05 *по сравнению со спонтанной пролиферацией КМ-МНК; p<0,05 **по сравнению с аналогичным параметром после инкубации КМ-МНК с эритропоэтином; p<0,01 ***по сравнению с аналогичным параметром после инкубации КМ-МНК с эритропоэтином

Таблица 7

Эффект кондиционных сред от КМ-МНК больных с ХСН на клетки EA.hy 929

Параметры	Кондиционная среда от КМ-МНК	
	без эритропоэтина	с эритропоэтином
Тест "раневого дефекта" (пролиферация и миграция клеток EA.hy 929)		
"закрытие раневого дефекта" через 24 ч (мкм)	60,7 (26,96 — 89,44)	50,52 (26,85 — 87,35)
Тест формирования сосудистоподобных структур клетками EA.hy 929		
Длина через 3 ч (мкм)	20,58 (17,77 — 23,35)	19,77 (18,25 — 22,9) *
Длина через 24 ч (мкм)	43,30 (34,96 — 45,91)	41,43 (35,21 — 49,46) *

Примечание. p<0,05 *по сравнению с 3-часовым значением

мембране CD34+/VEGFR-2+, являются независимым предиктором клинической эффективности при кардиоваскулярной патологии [17]. ЭПК это гетерогенная популяция клеток среди которых выделяют ранние и поздние ЭПК, отличающиеся по наличию на мембране CD144, VEGFR-2 [18]. Необходимо отметить тот факт, что в костном мозге больных ХСН также содержатся и МСК, которые способствуют формированию новых сосудов в ишемизированной ткани [19]. Полученный клеточный трансплантат от больных ХСН, характеризуется высокой пролиферативной активностью. Так, количество клеток в пуле CD34+ клеток ($14,85 \pm 1,75\%$) находится на стадии подготовки к митозу или же уже на стадии митоза. Высокая спонтанная пролиферация КМ-МНК также указывает на высокую пролиферативную активность клеточного трансплантата. Кроме этого, показано, что клеточный трансплантат устойчив к неблагоприятным факторам микроокружения, который был смоделирован *in vitro* добавлением к КМ-МНК перекиси водорода. Кроме этого, о высоком функциональном потенциале КМ-МНК больных ХСН можно судить и по малому проценту мертвых клеток ($1,4 \pm 0,46\%$) в пуле CD34+ клеток. Полученные нами результаты исследования эффекта preconditionирования КМ-МНК на количественный состав, нахождение в фазах клеточного цикла и параметры апоптоза, пролиферативный потенциал не противоречат исследованиям других исследователей. Известно, что рецепторы к эритропоэтину (EpoR), экспрессируются не только на эритроидных клетках, но и на других клетках, в том числе и ЭПК [7, 9]. Эритропоэтин взаимодействует с рецептором к нему, который существует в виде двух субъединиц или же в комбинации с CD131 (β -общее звено), через которые и осуществляется цитопротекторное действие эритропоэтина на клетки [7]. Так показано, что эритропоэтин в дозе 5 МЕ/мл стимулирует пролиферацию ЭПК, закрытие раневого дефекта монослоя ЭПК, миграцию и формирование сосудодобных структур, повышает устойчивость ЭПК к действию окислительного стресса [7]. Об активации пролиферации и снижении уровня апоптоза, приживлении ЭПК сообщается в работе [20]. В работе авторов [21], показано, что до 40% клеток, мобилизованных на периферию из костного мозга введением гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора, экспрессируют рецептор к эритропоэтину. В ответ на инкубацию с 10 МЕ/мл таких клеток показано увеличение уровней экспрессии васкулогенных факторов (IL8, IL10, bFGF, PDGF, MMP9) и молекул адгезии (интегринов α V, β 1, β 2, β 8). Полученные нами данные об активации пролиферативного и миграционного потенциала EA.hy 929 в присутствии конди-

ционной среды от КМ-МНК согласуются с данными авторов [22], показавших усиление регенерации эндотелия трахеи, поврежденной химическим ожогом, в ответ на кондиционную среду от мезенхимных стволовых клеток.

Заключение

Таким образом, клеточный трансплантат от больных ХСН характеризуется наличием в нем гемопоэтических стволовых клеток, эндотелиальных прогениторных клеток, находящихся на разных стадиях созревания и дифференцировки, а также мезенхимных стволовых клеток, с высоким пролиферативным потенциалом и устойчивостью к окислительному стрессу, продукцией биологически активных веществ, способствующих пролиферации, миграции и формированию сосудистоподобных структур клеточной линией зрелых эндотелиоцитов, что позволяет использовать их для клеточной терапии.

References

1. Moiseeva OM, Karelkina EV, Moroshkin VS, Selyutin AV, Shlyakhto EV. The Study of Circulating Endothelial Precursor Cells in Patients With Chronic Heart Failure. *Kardiologiya*. (Cardiology Russian Journal). 2011; 12: 36-42. (in Russian)
2. Kochegura TN, Efimenko AY, Akopyan ZhA, Parfenova EV. Stem cell therapy of heart failure: clinical trial, problems and perspectives. *Geny I kletki*. (Gen and cells Russian Journal). 2010; 2: 11-8. (in Russian)
3. Seurder D, Radrizzani M, Turchetto L, Lo Cicero V, Soncin S, Muzzarelli S, Auricchio A, Moccetti T. Combined Delivery of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Chronic Ischemic Heart Disease: Rationale and Study Design. *Clin Cardiol*. 2013; 36(8): 435-41.
4. Tse H-F, Siu C-W, Zhu S-G, Songyan L, Zhang Q-Y, Lai W-H, Kwong Y-L, Nicholls J, Lau C-P. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischemic myocardium. *Eur J Heart Failure*. 2007; 9: 747-53.
5. Pokushalov E, Romanov A, Chernyavsky A, Lariov P, Terekhov I, Artyomenko S, Poveshenko O, Kliver E, Shirokova N, Karaskov A, Dib N. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; 3(2): 160-68.
6. Lykov AP, Bondarenko NA, Sakhno LV, Shevela EY, Poveshenko OV, Kim II, Nikonorova YV, Konenkov VI. The impact of secretory factors endothelial cells on the functional activity of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Fundamental'nye issledovaniya*. (Fundamental research Russian Journal). 2014; 4(2): 296-301. (in Russian)
7. Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Lucas L, Pellegrini L, Velly L, Blot-Chabaud M, Dignat-Georges F, Sabatier F, Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(9): 1914-28.
8. Kandala J, Upadhyay GA, Pokushalov E, Wu S, Drachman DE, Singh JP. Meta-analysis of stem cell therapy in

chronic ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013; 112(2): 217-25.

9. Osikov MV, Akhmatov VY, Telesheva LF, Fedosov AA, Ageev YI, Surovyatkina LG. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamental'nye issledovaniya.* (Fundamental research Russian Journal) 2013; 7(1): 218-24. (in Russian)

10. Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Larionov PM, Shurygin MG. Myocardial regeneration: proliferative potential of cardiomyocytes and induction of cardiomyogenesis at alternative and plastic cardiac failure. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2010; 5: 3-11. (in Russian)

11. Hristov M, Zernecke A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res.* 2007; 100(4): 590-7.

12. Colombo E, Marconi C, Taddeo A, Cappelletti M, Villa ML, Marzorati M, Porcelli S, Vezzoli A., Bella SD. Fast reduction of peripheral blood endothelial progenitor cells in healthy human exposed to acute systemic hypoxia. *J Physiol.* 2012; 590(3): 519-32.

13. Zakharov YuM. Citoprotective effects of erythropoietin. *Klinicheskaya nefrologiya.* (Clinical Nephrology Russian Journal). 2009; 1: 16-21. (in Russian)

14. Kiani AA, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. HIF-1 α confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2013; 44(3): 185-93.

15. Parkn J-H, Yoon JY, Ko SM, Jin SA, Kim JH, Cho C-H, Kim J-M, Lee J-H, Choi SW, Seong I-W, Jeong J-O. Endothelial progenitor cell transplantation decreases lymphangiogenesis and adverse myocardial remodeling in

a mouse model of acute myocardial infarction. *Exp Mol Med.* 2011; 43(8): 479-85.

16. Wang QR, Wang BH, Zhu WB, Huang YH, Li Y, Yan Q. An in vitro study of differentiation of hematopoietic cells to endothelial cells. *Bone Marrow Res.* 2011; 2011: 846096. DOI:10.1155/2011/846096.

17. Ahmed SH, Sabry D, Noh O, Samir M. Potential proliferative effect of lipopolysaccharide preconditioning on human umbilical blood-derived endothelial cells. *Afr J Biotechnol.* 2015; 14(13): 1167-73.

18. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, Oh B-H, Lee M-M, Park Y-B. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 288-93.

19. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnostou NP, Watt SM. Spindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One.* 2013; 8(1). E.54747. DOI: 10.1371/journal.pone.0054747.

20. Hu R, Cheng Y, Jing H, Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock.* 2014; 42(4): 327-36.

21. Kang J, Yun JY, Hur J, Kang JA, Choi JI, Ko SB, Lee J, Kim JY, Hwang IC, Park YB, Kim HS. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells. *Cardiovasc Res.* 2014; 104(1): 171-82.

22. Temnov A.A., Volkova A.G., Melerzanov A.V., Novoselov V.I. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium of HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61(2): 28-36. (in Russian)

Сведения об авторах:

Чернявский Александр Михайлович, доктор мед. наук, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: amchern@mail.ru

Повешенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, зав. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru;

Фомичев Алексей Вячеславович, канд. мед. наук, науч. сотр. Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: a_fomichev@list.ru

Суровцева Мария Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: mfelde@ngs.ru

Бондаренко Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: bond80288@yandex.ru

Ким Ирина Иннокентьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий Центра новых технологий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: ki15@mail.ru

Карева Юлия Евгеньевна, канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург, науч. сотр. Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, e-mail: julia11108@mail.ru

Таркова Александра Романовна, аспирант Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий «СФБИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России Ф, e-mail: artarkova@mail.ru