

С.П. Чумакова¹, О.И. Уразова¹, В.М. Шипулин^{1, 2},
О.А. Денисенко¹, М.В. Гладковская¹, С.Л. Андреев²,
К.В. Невская³, Ю.В. Колобовникова^{1, 4}



¹Кафедра патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета,
Томск, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, Томск, Российская Федерация

³Центральная научно-исследовательская лаборатория Сибирского государственного медицинского университета,
Томск, Российская Федерация

⁴Кафедра нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета,
Томск, Российская Федерация

Роль медиаторов ангиогенеза в мобилизации ранних и поздних эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга при ишемической болезни сердца

549

Обоснование. Тяжелой формой ишемической болезни сердца (ИБС) является ишемическая кардиомиопатия (ИКМП), патогенез которой до конца не изучен. Нарушения мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) вследствие дисбаланса медиаторов ангиогенеза могут усугублять ишемию при ИКМП. **Цель исследования** — установить особенности изменения баланса ранних и поздних ЭПК и субпопуляций VEGFR2⁺ клеток в крови и костном мозге во взаимосвязи с содержанием медиаторов ангиогенеза и численностью десквамированных эндотелиальных клеток в крови у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП. **Методы.** Проведено одномоментное, клиническое, контролируемое (случай—контроль) исследование с марта 2019 по июнь 2022 г. Обследовано 52 больных ИБС, имевших инфаркт миокарда в анамнезе: 30 человек, страдающих ИКМП, и 22 человека, не страдающих ИКМП, а также 15 здоровых доноров. Содержание VEGFR2⁺, VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ (ранних ЭПК), VEGFR2⁺CD34⁺CD14[−] (поздних ЭПК), VEGFR2⁺CD34[−]CD14⁺, VEGFR2⁺CD34[−]CD14[−] клеток у больных ИБС в крови (до операции) и костном мозге (забор производился в начале коронарного шунтирования) и у здоровых лиц в крови, а также (в обеих группах) содержание CD45⁺CD146⁺ десквамированных эндотелиальных клеток в крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию SDF-1, VEGF-A, MCP-1, GM-CSF, G-CSF в плазме крови измеряли методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа. **Результаты.** Развитие ИБС без кардиомиопатии сопровождалось увеличением относительно нормы содержания VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и VEGFR2⁺ клеток (соответственно 0,74 [0,46; 1,23]% и 10,00 [8,20; 11,60]% против 0,19 [0,13; 0,32]%, $p < 0,001$, и 5,40 [4,30; 6,50]%, $p = 0,005$) и концентрации SDF-1, MCP-1, GM-CSF (соответственно 60,00 [50,00; 81,00]; 223,0 [180,0; 297,0]; 2,10 [1,45; 3,40] пг/мл против 30,00 [5,00; 45,00] пг/мл, $p = 0,041$; 175,1 [140,0; 204,0] пг/мл, $p = 0,046$; 0,96 [0,46; 1,41] пг/мл, $p = 0,038$) в крови. У пациентов с ИКМП такого рода изменения не отмечались. Вне зависимости от наличия ИКМП содержание VEGFR2⁺CD34⁺CD14[−], VEGFR2⁺CD34[−]CD14⁺, VEGFR2⁺CD34[−]CD14[−] клеток, VEGF-A, G-CSF в крови у больных ИБС варьировало в пределах физиологических значений, а численность десквамированных эндотелиальных клеток превышала норму (7,26 [5,43; 17,94] $\times 10^5$ /л, $p = 0,039$). Количество VEGFR2⁺ клеток и их иммунофенотипов в костном мозге у пациентов с ИКМП не отличалось от этого параметра у больных ИБС без кардиомиопатии. У одного больного ИБС без кардиомиопатии зарегистрировано пролонгированное кровотечение из области венопункции. **Заключение.** Развитие ИКМП ассоциировано с отсутствием компенсаторного ответа на атерогенез в форме усиления мобилизации ранних ЭПК из костного мозга вследствие отсутствия реакции, связанной с гиперпродукцией SDF-1, MCP-1, GM-CSF, которая характерна для ИБС без кардиомиопатии. Содержание ЭПК, VEGFR2⁺CD34⁺CD14[−] и VEGFR2⁺CD34[−]CD14[−] клеток, VEGF-A и G-CSF в крови при ИБС соответствует физиологическим значениям вне зависимости от наличия ИКМП. Генерация ЭПК в костном мозге при ИКМП не нарушена.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, цитокины, ангиогенез, гипоксия, эндотелиальные прогениторные клетки

Для цитирования: Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Денисенко О.А., Гладковская М.В., Андреев С.Л., Невская К.В., Колобовникова Ю.В. Роль медиаторов ангиогенеза в мобилизации ранних и поздних эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга при ишемической болезни сердца. Вестник РАМН. 2023;78(6):549–559. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn12452>

Обоснование

Сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться ведущей причиной смерти населения в большинстве экономически развитых и развивающихся стран мира. Ишемическая кардиомиопатия (ИКМП) представляет собой тяжелую форму ишемической болезни сердца (ИБС), не имеющей на сегодняшний день специфической фармакотерапии и характеризующейся прогрессированием болезни у части больных даже после хирургиче-

ческой коррекции коронарного русла и полости левого желудочка [1, 2]. Это демонстрирует недостаточную изученность патогенеза ИКМП, в котором на сегодняшний день активно обсуждается роль хронического воспаления, апоптоза кардиомиоцитов, нарушений гомеостаза кальция и сократительной функции миокарда, синтеза различных типов коллагенов и дисфункции микрососудов [2–4]. Интерес ученых сосредоточен на вазомоторной форме эндотелиальной дисфункции [5, 6], однако ее ангиогенная форма, включающая нарушение ангиогенеза,

баланса репаративных и деструктивных процессов в сосудах [7], остается без должного внимания.

Индукция ангиогенеза при ИБС необходима для формирования коллатерального кровотока и репарации поврежденных атеросклерозом сосудов, что имеет защитно-приспособительное значение при ИБС и ИКМП. Известно, что реализуют ангиогенез эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), экспрессирующие рецептор к фактору роста сосудистого эндотелия 2-го типа (VEGFR2). Для части этих клеток характерно гемопоэтическое происхождение (CD34⁺) — это ранние и поздние ЭПК, имеющие соответственно моноцитарный и немоноцитарный иммунофенотип (соответственно CD14⁺ и CD14⁻), а часть ЭПК имеет внекостномозговую природу, происходя из мезенхимальных стволовых клеток, локализованных в сосудистой стенке коронарного синуса и дуги аорты. ЭПК могут как непосредственно дифференцироваться в эндотелиоциты, так и паракринным образом стимулировать ангиогенез и выживаемость эндотелиоцитов [8]. Медиаторами ангиогенеза, активирующими пролиферацию, дифференцировку, мобилизацию

и хоуминг ЭПК, являются: фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), гипоксия-индуцируемый фактор (HIF), фактор стромальных клеток (SDF-1), колониестимулирующие факторы гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и гранулоцитов (G-CSF) [8, 9], а также, возможно, моноцитарный хемотаксический фактор (MCP-1), который как главный хемоаттрактант моноцитов может способствовать миграции ЭПК моноцитарного иммунофенотипа из костного мозга в кровь [10, 11].

Понимание особенностей регуляции ангиогенеза при ИКМП, в отличие от ИБС без кардиомиопатии, поможет установить патогенез данного заболевания и найти мишени для патогенетически обоснованной терапии ИКМП, которая замедлит ее прогрессирование.

Цель исследования — установить особенности изменения баланса ранних и поздних эндотелиальных прогениторных клеток и субпопуляций VEGFR2⁺ клеток в крови и костном мозге во взаимосвязи с содержанием медиаторов ангиогенеза и численностью десквамированных эндотелиальных клеток в крови у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП.

S.P. Chumakova¹, O.I. Urazova¹, V.M. Shipulin^{1, 2}, O.A. Denisenko¹, M.V. Gladkovskaya¹, S.L. Andreev², K.V. Nevskaya³, Yu.V. Kolobovnikova^{1, 4}

¹ Pathophysiology Division of Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Cardiology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

³ Central Research Laboratory of Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

⁴ Normal Physiology Division of Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

The Role of Angiogenesis Mediators in the Mobilization of Early and Late Endothelial Progenitor Cells from the Bone Marrow in Coronary Heart Disease

Background. A severe form of coronary heart disease (CHD) is ischemic cardiomyopathy (ICMP), the pathogenesis of which has not been fully studied. Disturbances in the mobilization of endothelial progenitor cells (EPC) due to an imbalance of angiogenesis mediators may exacerbate ischemia in ICMP. **The aim** — to establish the peculiarities of changes in the balance of early and late EPC and subpopulations of VEGFR2⁺ cells in the blood and bone marrow in relation to the content of angiogenesis mediators and the number of desquamated endothelial cells (DEC) in the blood of patients with CHD, suffering and not suffering from ICMP. **Methods.** A single-stage, clinical, controlled (case-control) study was conducted from March 2019 to June 2022. 52 patients with CHD who had a history of myocardial infarction were examined: 30 people suffering from ICMP and 22 people not suffering from ICMP, as well as 15 healthy donors. The content of VEGFR2⁺, VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ (early EPC), VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁻ (late EPC), VEGFR2⁺CD34⁻CD14⁺, VEGFR2⁺CD34⁻CD14⁻ cells in patients with CHD in the blood (before surgery) and bone marrow (sampling was performed at the beginning of coronary bypass) and in healthy individuals in the blood, as well as (in both groups) the content of CD45⁺CD146⁺ DEC in the blood was determined by flow cytometry. The concentration of SDF-1, VEGF-A, MCP-1, GM-CSF, G-CSF in blood plasma was measured by multiplex immunofluorescence analysis. **Results.** The development of CHD without cardiomyopathy was accompanied by an increase in the content of VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ and VEGFR2⁺ cells (0.74 [0.46; 1.23]% and 10.00 [8.20; 11.60]%, respectively, versus 0.19 [0.13; 0.32]%, $p < 0.001$ and 5.40 [4.30; 6.50]%, $p = 0.005$) and concentrations of SDF-1, MCP-1, GM-CSF (respectively 60.00 [50.00; 81.00] pg/ml; 223.0 [180.0; 297.0] pg/ml; 2.10 [1.45; 3.40] pg/ml versus 30.00 [5.00; 45.00] pg/ml, $p = 0.041$; 175.1 [140.0; 204.0] pg/ml, $p = 0.046$; 0.96 [0.46; 1.41] pg/ml, $p = 0.038$) in the blood relative to the norm. No such changes were observed in patients with ICMP. Regardless of the presence of ICMP, the content of VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁻, VEGFR2⁺CD34⁻CD14⁺, VEGFR2⁺CD34⁻CD14⁻ cells, VEGF-A, G-CSF in the blood of patients with CHD varied within physiological values, and the number of DEC exceeded the norm (7.26 [5.43; 17.94] × 10⁵/l, $p = 0.039$). The number of VEGFR2⁺ cells and their immunophenotypes in the bone marrow of patients with ICMP did not differ from the parameters in patients with CHD without cardiomyopathy. Prolonged bleeding from the venopuncture area was registered in one CHD patient without cardiomyopathy. **Conclusion.** The development of ICMP is associated with the absence of a compensatory response to atherogenesis in the form of increased mobilization of early EPC from the bone marrow due to the absence of a reaction associated with hyperproduction of SDF-1, MCP-1, GM-CSF, which is characteristic of CHD without cardiomyopathy. The content of EPC, VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ and VEGFR2⁺CD34⁻CD14⁻ cells, VEGF-A and G-CSF in the blood in CHD corresponds to physiological values, regardless of the presence of ICMP. The generation of EPC in the bone marrow in ICMP is not impaired.

Keywords: coronary heart disease, cytokines, angiogenesis, hypoxia, endothelial progenitor cells

For citation: Chumakova SP, Urazova OI, Shipulin VM, Denisenko OA, Gladkovskaya MV, Andreev SL, Nevskaya KV, Kolobovnikova YuV. The Role of Angiogenesis Mediators in the Mobilization of Early and Late Endothelial Progenitor Cells from the Bone Marrow in Coronary Heart Disease. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2023;78(6):549–559. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn12452>

Методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное, клиническое, контролируемое (случай–контроль) исследование с марта 2019 по июнь 2022 г. с участием 52 больных ИБС, находившихся в кардиохирургическом стационаре: 30 человек, страдающих ИКМП, и 22 человека, не страдающих ИКМП, а также 15 здоровых доноров. У больных ИБС периферическую кровь забирали в день операции до ее проведения, костный мозг — интраоперационно.

Критерии соответствия

Проведено одномоментное, клиническое, контролируемое (случай–контроль) исследование, в которое вошло 52 больных ИБС (86,5% мужчины) со стенокардией напряжения II–IV функционального класса и недостаточностью кровообращения II–III функционального класса по NYHA в возрасте от 48 до 69 лет (табл. 1), находившихся в кардиохирургическом стационаре на этапе обследования перед проведением операции коронарного шунтирования. Все пациенты имели в анамнезе острый инфаркт миокарда и были распределены на две группы:

1) больные ИКМП — 30 человек (27 мужчин и 3 женщины), у которых регистрировались критерии ИКМП (фракция выброса левого желудочка $\leq 40\%$, реваскуляризация в анамнезе или показание к таковой, $\geq 75\%$ стеноз ствола левой коронарной артерии или проксимальной части передней нисходящей артерии или $\geq 75\%$ стеноз двух или более эпикардиальных сосудов [12]); 2) больные ИБС без кардиомиопатии — 22 человека (18 мужчин и 4 женщины), у которых также имелись реваскуляризация в анамнезе или показание к таковой и стеноз коронарных сосудов любой локализации $\geq 75\%$, но фракция выброса левого желудочка была $> 40\%$.

Группу контроля составили 15 человек (12 мужчин и 3 женщины), сопоставимых по возрасту с больными в группах исследования, находившихся, по данным профилактического осмотра, в состоянии относительного здоровья, не страдающих сердечно-сосудистой патологией и не предъявляющих жалоб соответствующего или иного характера.

Критериями исключения обследуемых лиц из исследования считали наличие аутоиммунных и опухолевых заболеваний, аллергического процесса в стадии обострения, анемии, хронических инфекций (вирусных гепа-

Таблица 1. Клиническая характеристика больных с ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией

Показатель	Больные ИБС		p-value
	без ИКМП	с ИКМП	
Количество больных, <i>n</i> В том числе:	22	30	—
• мужчины, <i>n</i> (%)	18 (81,81)	27 (90,00)	0,658
• женщины, <i>n</i> (%)	4 (18,18)	3 (10,00)	0,658
Возраст, лет	64,0 [59,5; 67,0]	61,0 [56,0; 64,0]	0,110
Курение, <i>n</i> (%)	15 (68,18)	12 (40,0)	0,084
Индекс массы тела, кг/м ²	29,65 [26,25; 32,75]	28,00 [26,75; 31,25]	0,530
Функциональный класс стенокардии, <i>n</i> (%):			
• II	4 (18,18)	7 (23,33)	0,916
• III	16 (72,73)	20 (66,67)	0,870
• IV	2 (9,09)	3 (10,00)	0,714
Функциональный класс недостаточности кровообращения (по NYHA), <i>n</i> (%):			
• I	2 (9,09)	2 (6,67)	0,840
• II	9 (40,91)	19 (63,33)	0,187
• III	11 (50,00)	9 (30,00)	0,240
Фракция выброса ЛЖ, %	59,50 [50,25; 67,00]	30,00 [22,00; 36,00]	< 0,001
Конечный систолический индекс ЛЖ, мл/м ²	52,90 [50,20; 56,90]	75,30 [64,30; 82,30]	0,004
Масса миокарда ЛЖ, г	187,5 [142,8; 215,0]	233,5 [222,3; 265,3]	0,001
Гипертоническая болезнь, <i>n</i> (%):			
• I	0	1 (3,3)	0,875
• II	3 (13,6)	5 (16,7)	0,929
• III	18 (81,81)	21 (70,0)	0,517
Дислипидемия, <i>n</i> (%)	20 (90,9)	23 (76,7)	0,332
Концентрация холестерина в крови (достигнута медикаментозно), ммоль/л	3,29 [3,00; 3,70]	4,00 [3,60; 4,80]	0,140
ХНМК, <i>n</i> (%)	13 (59,1)	27 (90,0)	0,023
Сахарный диабет 2 типа, <i>n</i> (%)	7 (31,82)	2 (6,67)	0,046
Легочные заболевания, <i>n</i> (%)	3 (13,67)	5 (16,67)	0,929

Примечание. ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИКМП — ишемическая кардиомиопатия; ЛЖ — левый желудочек; ХНМК — хронические нарушения мозгового кровообращения; *p* — уровень статистической значимости различий между группами больных.

титов, сифилиса, ВИЧ-инфекции), проведение курсов иммуномодулирующей терапии или наличие острых инфекционных заболеваний менее чем за 3 нед до исследования, а также отказ пациента от исследования. Все пациенты и здоровые доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Условия проведения

Исследование выполнено на базе отделения сердечно-сосудистой хирургии Научно-исследовательского института кардиологии — филиала ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск) и кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск). В исследование были включены больные европеоидного происхождения из Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (39 и 5 соответственно). Формирование группы здоровых доноров производилось на базе ОГАУЗ «Поликлиника № 3» г. Томска из лиц, проживающих в г. Томске.

Продолжительность исследования

Исследование планировалось провести с марта 2019 по май 2021 г., но ввиду пандемии COVID-19 и редкой встречаемости ИКМП проект был продлен еще на 1 год (до июня 2022 г.), в течение которого обследовались преимущественно больные ИКМП.

Описание медицинского вмешательства

Периферическую кровь у больных ИБС обеих групп исследования забирали из кубитальной вены перед операцией коронарного шунтирования, красный костный мозг — интраоперационно, из разреза грудины после выполнения доступа к сердцу путем срединной стернотомии и до подключения аппарата искусственного кровообращения. У здоровых доноров забор периферической крови производили из кубитальной вены утром натощак. Кровь (5 мл) и костный мозг (2 мл) стабилизировали гепарином в дозе 25 Ед/мл.

Больным ИБС проводилось общепринятое и сходное в группах лечение лекарственными средствами: антиангинальная терапия с применением нитратов продленного действия, бета1-адреноблокаторов, коррекция липидного обмена с использованием статинов и коррекция гемостаза путем назначения антиагрегантов и антикоагулянтов. Доля лиц, принимавших данные препараты, была сопоставимой в группах, за исключением частоты использования блокаторов Ca^{2+} -каналов, которые у пациентов с ИКМП не назначались, в отличие от больных ИБС без кардиомиопатии (соответственно 0 и 63,6%; $p < 0,001$), ввиду их негативного влияния на сократимость миокарда, которая при ИКМП снижена вследствие его сократительной дисфункции.

Исходы исследования

Основной исход исследования. Путем сопоставления содержания ранних $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^-$ и поздних $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^-$ ЭПК в крови и костном мозге между группами больных ИБС, а также с показателями в крови у здоровых доноров оценивали миграцию этих клеток из костного мозга в кровь. Если отличия по этим параметрам отмечаются между группами больных только в крови при соизмеримых значениях в костном мозге, то нарушена мобилизация ЭПК при сопоставимой генерации клеток в миелоидной ткани; если отличия по па-

раметрам ЭПК обнаруживаются и в крови, и в костном мозге, то нарушена их генерация в миелоидной ткани.

Роль цитокинов в детерминации численности ЭПК в крови изучали путем сравнения концентрации фактора стромальных клеток 1 (SDF-1), фактора роста сосудистого эндотелия А (VEGF-A), моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и гранулоцитов (G-CSF) в плазме крови больных ИБС обеих групп и у здоровых доноров.

Дополнительные исходы исследования. Оценивали общее содержание VEGFR2^+ клеток, $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^+$ и $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^-$ клеток в образцах периферической крови и костного мозга у больных ИБС обеих групп и в крови у здоровых доноров как параметров, демонстрирующих распределение клеток с проангиогенным потенциалом (экспрессируют VEGFR2). Также в крови у больных ИБС обеих групп и здоровых доноров регистрировали содержание десквамированных эндотелиальных клеток с иммунофенотипом $\text{CD45}^-\text{CD146}^+$ с целью оценки степени деструкции сосудистого эндотелия и интерпретации причин и последствий изменения численности ЭПК в крови.

Методы регистрации исходов

Содержание VEGFR2^+ клеток и их иммунофенотипов $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^+$ (ранние ЭПК), $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^-$ (поздние ЭПК), $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^+$ и $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^-$ клетки определяли в цельной гепаринизированной (25 Ед/мл) крови методом проточной цитофлуориметрии с использованием проточного цитометра Accuri C6 (BD Biosciens, США) и с помощью моноклональных антител VEGFR2(KDR; CD309)-Alexa Fluor 647, CD34-PE и CD14-FITC (BD Biosciens, США), а также лизирующего раствора (BD Biosciens, США) согласно инструкциям производителя. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD Cell Quest for Mac OS® X (BD Biosciens, США). Содержание VEGFR2^+ клеток идентифицировали на скаттерограммах в области мононуклеаров (ранние и поздние ЭПК выделяют из мононуклеаров крови [8]) как долю (%) от общего числа мононуклеаров. Далее идентифицированные VEGFR2^+ клетки распределяли по экспрессии CD34 и CD14 на иммунофенотипы: $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^+$ (ранние ЭПК), $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^+\text{CD14}^-$ (поздние ЭПК), $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^+$ и $\text{VEGFR2}^+\text{CD34}^-\text{CD14}^-$ клетки, содержание которых выражали в процентах от численности мононуклеаров, при этом сумма процентного содержания четырех иммунофенотипов в совокупности равнялась доле VEGFR2^+ клеток в крови (рис. 1).

Содержание десквамированных эндотелиальных клеток определяли в цельной гепаринизированной (25 Ед/мл) крови как долю $\text{CD45}^-\text{CD146}^+$ клеток среди всех анализируемых клеток крови и соотносили с общим количеством лейкоцитов, экспрессирующих CD45^+ (CD45 — общий лейкоцитарный антиген), выражая десквамированные эндотелиальные клетки в $\times 10^5/\text{л}$. Общее количество лейкоцитов в крови оценивали методом проточной цитометрии с помощью гематологического анализатора XS-1000i (Sysmex Corporation, Япония).

Плазму крови получали путем центрифугирования гепаринизированной (25 Ед/мл) цельной крови при 300 g в течение 10 мин и хранили при температуре -80°C для последующей оценки концентрации фактора стромальных клеток 1 (SDF-1), фактора роста сосудистого эндотелия

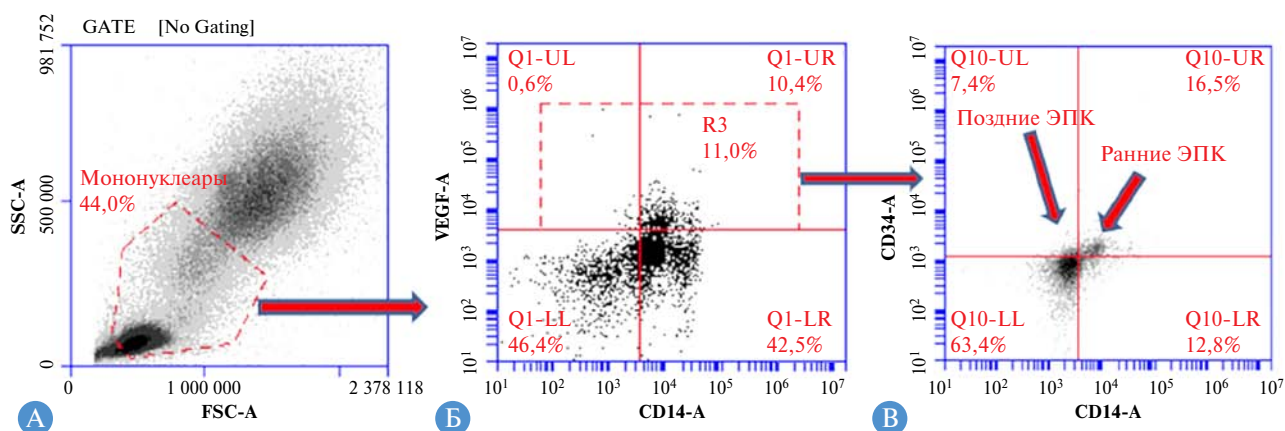


Рис. 1. Алгоритм гейтирования иммунофенотипов VEGFR2⁺ клеток, включая ранние и поздние эндотелиальные прогениторные клетки: А — распределение лейкоцитов крови по фронтальному и боковому светорассеянию; Б — гейтирование мононуклеаров по VEGFR2 и CD14 для оценки экспрессии VEGFR2⁺ клеток; В — гейтирование VEGFR2⁺ клеток по CD34⁺ и CD14⁺ для оценки иммунофенотипов VEGFR2⁺ клеток, включая ранние (VEGFR2⁺ CD34⁺CD14⁺) и поздние (VEGFR2⁺ CD34⁺CD14⁻) эндотелиальные прогениторные клетки

А (VEGF-A), моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и гранулоцитов (G-CSF) методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа с помощью коммерческой тест-системы для мультиплексного анализа Magnetic Luminesx Assay Kit for SDF1, SCF, VEGFA, VEGFB, GM-CSF, G-CSF, FGF1, MCP1 (Cloud-Clone-Corp., США) и автоматизированного анализатора Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США).

Этическая экспертиза

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (№ 6175 от 6 ноября 2018 г.). Всеми пациентами и донорами было подписано информированное согласие об участии в исследовании.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica for Windows 10.0. Для статистического описания результатов исследования вычисляли медиану, 25-й и 75-й процентиля. С целью проверки нулевой гипотезы при сравнении зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, при сравнении независимых выборок — критерий Манна–Уитни, применяя поправку Бенджамини–Хохберга для множественного сравнения. Для оценки взаимосвязей между изучаемыми показателями рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В течение трех лет больные ИБС, поступающие в кардиохирургический стационар с целью проведения операции коронарного шунтирования и удовлетворяющие критериям включения и исключения, распределялись согласно верифицированному диагнозу на две группы — пациенты с ИКМП и пациенты без ИКМП, средний

возраст которых был сопоставимым между группами (см. табл. 1). Возраст здоровых лиц составил 59,0 [50,0; 65,5] года и не отличался от групп больных (соответственно $p = 0,572$ и $p = 0,318$). Больные ИБС обеих групп также были сопоставимыми по полу, индексу массы тела, доле курящих лиц, функциональному классу стенокардии и недостаточности кровообращения. Однако для пациентов с ИКМП (относительно больных ИБС без кардиомиопатии) было характерным большее значение конечного систолического индекса и меньшее значение фракции выброса левого желудочка (см. табл. 1), поскольку снижение последней менее 40% было критерием диагностики ИКМП и распределения больных на группы. Более частая встречаемость сахарного диабета 2 типа отмечалась у больных ИБС без кардиомиопатии, а хронических нарушений мозгового кровообращения — у пациентов с ИКМП (см. табл. 1). Доля больных, имевших заболевания легких (пневмофиброз, хроническая обструктивная болезнь легких), была сопоставимой между группами пациентов.

Основные результаты исследования

Анализ полученных данных показал, что содержание ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК в крови у больных ИБС без кардиомиопатии было повышенным в 3,9 раза относительно показателя здоровых доноров и в 2,4 раза — относительно значений пациентов с ИКМП, у которых численность этих клеток соответствовала норме (табл. 2). Между тем численность поздних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁻ ЭПК в крови проявляла лишь аналогичные тенденции и варьировала у пациентов обеих групп в пределах физиологических значений (см. табл. 2). Следует отметить, что результаты сравнительного анализа численности поздних ЭПК в крови у больных ИБС без кардиомиопатии до использования поправки на множественное сравнение Бенджамини–Хохберга выявили почти 2-кратное превышение их числа над параметрами здоровых доноров ($p = 0,042$), однако применение указанной поправки трансформировало статистически значимый результат в незначимый при $p < 0,05$ ($p = 0,083$; см. табл. 2). В костном мозге содержание ранних и поздних ЭПК не различалось между группами больных ИБС (см. табл. 2). При этом сравнение численности этих клеток в миелиной ткани относительно крови выявило превышение

миелоидных показателей над гемическими у больных обеих групп исследования, но только для поздних ЭПК. Содержание ранних ЭПК в крови и костном мозге было сопоставимым. Между тем обращала на себя внимание тенденция к превышению уровня ранних ЭПК в крови над их значением в костном мозге у больных ИБС без кардиомиопатии, а у пациентов с ИКМП — напротив, превышение миелоидных значений содержания ранних ЭПК над гемическими (см. табл. 1).

Концентрация SDF-1, MCP-1 и GM-CSF в крови у больных ИБС без кардиомиопатии была повышенной относительно группы здоровых доноров, чего у пациентов с ИКМП не отмечалось (табл. 3). Концентрация VEGFA и G-CSF в крови у пациентов с ИБС вне зависимости от наличия ИКМП соответствовала таковой у здоровых доноров (см. табл. 3). Статистически значимых различий в концентрации изучаемых медиаторов при их сравнении между группами больных ИБС не отмечалось (см. табл. 3).

Дополнительные результаты исследования

Показано, что содержание VEGFR2⁺ в крови было повышенным у больных ИБС без кардиомиопатии, а у пациентов с ИКМП соответствовало показателям у здоровых доноров (см. табл. 2). При этом отличий по данному параметру в костном мозге между группами пациентов не отмечалось. Численность VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ клеток в крови и костном мозге у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП, не отличалась ни между группами пациентов, ни между типами биоматериала, ни по сравнению со здоровыми донорами. При этом иммунофенотип VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ был самым многочисленным из четырех субпопуляций VEGFR2⁺ клеток как в крови, так и в костном мозге (см. табл. 2). Содержание CD45⁺CD146⁺ десквамированных эндотелиальных клеток в крови у больных ИБС превышало их количество у здоровых доноров вне зависимости от наличия ИКМП (см. табл. 2).

Таблица 2. Содержание VEGFR2⁺ клеток и их субпопуляций, включая ранние и поздние эндотелиальные прогениторные клетки, в крови и костном мозге у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией, Me [Q₁–Q₃]

Относительное содержание VEGFR2 ⁺ клеток и их субпопуляций	Группа обследуемых лиц		
	ИБС без ИКМП	ИБС с ИКМП	Здоровые доноры
Кровь			
VEGFR2 ⁺ клетки, %	10,00 [8,20; 11,60] <i>p_к</i> = 0,005	7,55 [3,50; 11,00] <i>p_к</i> = 0,460 <i>p₂</i> = 0,274	5,40 [4,30; 6,50]
Ранние ЭПК VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	0,74 [0,46; 1,23] <i>p_к</i> < 0,001	0,31 [0,15; 0,64] <i>p_к</i> = 0,260 <i>p₂</i> = 0,038	0,19 [0,13; 0,32]
Поздние ЭПК VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	0,21 [0,11; 0,55] <i>p_к</i> = 0,083	0,09 [0,04; 0,18] <i>p_к</i> = 0,926 <i>p₂</i> = 0,096	0,11 [0,06; 0,16]
Клетки VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	1,84 [1,14; 3,12] <i>p_к</i> = 0,252	1,70 [0,71; 2,60] <i>p_к</i> = 0,807 <i>p₂</i> = 0,974	1,41 [0,89; 1,83]
Клетки VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	7,08 [4,05; 9,07] <i>p_к</i> = 0,166	6,33 [2,32; 9,17] <i>p_к</i> = 0,463 <i>p₂</i> = 0,792	4,10 [3,26; 4,70]
Костный мозг			
VEGFR2 ⁺ клетки, %	7,50 [5,10; 14,40] <i>p₁</i> = 0,153	6,85 [4,10; 8,30] <i>p₁</i> = 0,833 <i>p₂</i> = 0,325	—
Ранние ЭПК VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	0,58 [0,48; 1,36] <i>p₁</i> = 0,530	0,57 [0,45; 0,98] <i>p₁</i> = 0,234 <i>p₂</i> = 0,546	—
Поздние ЭПК VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	0,33 [0,10; 0,90] <i>p₁</i> = 0,047	0,41 [0,10; 0,46] <i>p₁</i> = 0,049 <i>p₂</i> = 0,644	—
Клетки VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	1,05 [0,33; 2,00] <i>p₁</i> = 0,272	0,87 [0,76; 1,09] <i>p₁</i> = 0,374 <i>p₂</i> = 0,915	—
Клетки VEGFR2 ⁺ CD34 ⁺ CD14 ⁺ , %	5,98 [2,28; 11,39] <i>p₁</i> = 0,790	5,24 [2,60; 6,24] <i>p₁</i> = 0,953 <i>p₂</i> = 0,649	—

Примечание. ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИКМП — ишемическая кардиомиопатия; *p_к* — уровень статистической значимости различий показателей по сравнению со здоровыми донорами; *p₁* — по сравнению с кровью у соответствующей группы больных; *p₂* — по сравнению с больными ИБС без кардиомиопатии.

Таблица 3. Концентрация медиаторов ангиогенеза и десквамированных эндотелиальных клеток в крови у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией, $Me [Q_1-Q_3]$

Концентрация цитокинов в крови	Группа обследуемых лиц		
	ИБС без ИКМП	ИБС с ИКМП	Здоровые доноры
SDF-1, пг/мл	60,00 [50,00; 81,00] $p_k = 0,041$	49,00 [37,00; 56,00] $p_k = 0,174$ $p_2 = 0,760$	30,00 [5,00; 45,00]
VEGF-A, пг/мл	3,00 [2,00; 4,50] $p_k = 0,688$	3,00 [2,00; 4,67] $p_k = 0,930$ $p_2 = 0,869$	2,59 [0,49; 4,83]
MCP-1, пг/мл	223,0 [180,0; 297,0] $p_k = 0,046$	202,5 [170,5; 249,75] $p_k = 0,098$ $p_2 = 1,000$	175,1 [140,0; 204,0]
GM-CSF, пг/мл	2,10 [1,45; 3,40] $p_k = 0,038$	1,48 [1,16; 2,00] $p_k = 0,138$ $p_2 = 0,236$	0,96 [0,46; 1,41]
G-CSF, пг/мл	1,74 [1,40; 3,80] $p_k = 0,465$	1,69 [1,00; 2,20] $p_k = 0,469$ $p_2 = 0,528$	1,00 [0,32; 3,51]
ДЭК, $\times 10^5$ /л	7,25 [6,80; 7,47] $p_k = 0,039$	7,26 [5,43; 17,94] $p_k = 0,038$ $p_2 = 0,260$	5,12 [3,73; 5,84]

Примечание. ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИКМП — ишемическая кардиомиопатия; ДЭК — десквамированные эндотелиальные клетки.

555

Анализ взаимосвязей между содержанием различных цитокинов в крови у больных ИБС объединенной выборки (пациенты, страдающие и не страдающие ИКМП в совокупности) показал положительную корреляцию плазменной концентрации SDF-1 и G-CSF ($r = 0,74$; $p < 0,05$) и содержания обоих медиаторов с уровнем GM-CSF (соответственно $r = 0,55$; $p < 0,01$, и $r = 0,46$; $p < 0,05$) и VEGF-A (соответственно $r = 0,80$; $p < 0,001$, и $r = 0,84$; $p < 0,001$). Наряду с этим в крови содержание VEGF-A было позитивно взаимосвязанным с концентрацией MCP-1 ($r = 0,39$; $p < 0,05$). Примечательно, что корреляционных связей между концентрацией цитокинов и численностью VEGFR2⁺ клеток и их субпопуляциями в крови выявлено не было. При этом содержание VEGFR2⁺ клеток в крови оказалось положительно взаимосвязанным с количеством ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК ($r = 0,54$; $p < 0,01$), долей VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ клеток (соответственно $r = 0,77$; $p < 0,01$, и $r = 0,93$; $p < 0,001$), но не с уровнем поздних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК.

Нежелательные явления

В ходе обследования у одного больного из группы ИБС без кардиомиопатии было зарегистрировано незначительное пролонгированное кровотечение из области венопункции.

Обсуждение

Согласно полученным данным, у больных ИБС без кардиомиопатии в крови было повышенным содержание ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК при аналогичной тенденции со стороны количества поздних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК, чего у пациентов с ИКМП не отмечалось (см. табл. 2). Данный факт свидетельствует об усиленном привлечении ЭПК с репара-

тивным потенциалом из костного мозга в кровь при ИБС без кардиомиопатии, что является компенсаторной реакцией при атерогенезе и, очевидно, обеспечивает репаративный ангиогенез и формирование коллатералей. Ранние ЭПК способны паракринным образом стимулировать выживаемость зрелых эндотелиоцитов и дифференцировку их предшественников, секретируя проангиогенные факторы (VEGF, ангиопоэтин и др.), а также *in vitro* дифференцироваться в эндотелиоциты при культивировании в «эндотелиальных условиях» (гипоксия, VEGF и др.). Поздние ЭПК могут не только дифференцироваться в эндотелиоциты, но и формировать тубулярные структуры, участвуя в васкулогенезе [8, 9]. У пациентов с ИКМП компенсаторная активация мобилизации ЭПК, по всей видимости, не реализуется: содержание и ранних, и поздних ЭПК в крови сохранялось на физиологическом уровне (см. табл. 2). При этом отсутствие накопления ЭПК в крови при ИКМП нельзя объяснить их усиленной миграцией в ткани и эффективным участием в ангиогенезе, поскольку степень деструкции эндотелия (по содержанию десквамированных эндотелиальных клеток) была повышенной и сопоставимой с таковой у больных ИБС без кардиомиопатии (см. табл. 3), а не меньшей, как следовало бы ожидать при активации хоуминга ЭПК. Очевидно, физиологический уровень ЭПК в крови при ИКМП недостаточен для репарации коронарных сосудов в условиях атеросклероза, что, вероятно, способствует более выраженной, чем при ИБС без кардиомиопатии, ишемии миокарда и развитию его сократительной дисфункции. При этом ранние ЭПК играют ведущую роль в ангиогенезе при ИБС ($p < 0,05$), участие поздних ЭПК менее значимо и может быть принято за истину при только при уровне статистической значимости $p < 0,10$ (см. табл. 2).

Содержание клеток с иммунофенотипами VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ в крови у больных ИБС вне зависимости от наличия ИКМП

проявляло тенденцию к увеличению, но не достигало достоверных различий с нормой (см. табл. 2). Клетки с фенотипом VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ нельзя считать тождественными негемопоэтическим прогениторным эндотелиальным клеткам, которые происходят из стволовых клеток в сосудистой стенке корня аорты [13], поскольку VEGFR2-рецептор экспрессируется и на зрелых эндотелиоцитах, и на некоторых лейкоцитах, включая нейтрофилы [14] и лимфоциты [15]. Несмотря на то что стратегия гейтирования исключала область гранулоцитов, некоторые клетки все же могли попасть в анализ. Кроме того, активированные лимфоциты (и CD4⁺, и CD8⁺, и Foxp3⁺) способны экспрессировать VEGFR2, особенно в составе инфильтрата при опухолевом процессе [15]. В связи с этим популяция VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ самая многочисленная, вероятно, потому, что включает в себя несколько видов клеток. Учитывая факт экспрессии VEGFR2-рецептора на лейкоцитах, обнаружение клеток с иммунофенотипом VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ у больных ИБС и здоровых доноров, очевидно, связано с экспрессией на моноцитах VEGFR2-рецептора, благодаря чему они тоже способны участвовать в ангиогенезе, однако направленность этого процесса не уточняется. В частности, V. Genkel et al. (2022) установили, что при развитии даже субклинического атеросклероза уменьшается содержание VEGFR2⁺ нейтрофилов в крови, которые, как предполагают авторы, мигрируют в бляшку и, стимулируя в ней ангиогенез, оказывают проатерогенное действие [14]. В этой связи VEGFR2⁺ моноциты (VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺) могут оказывать как аналогичное проатерогенное действие, так и репаративное влияние на эндотелий, что предстоит еще выяснить. Тем не менее по данным настоящего исследования значимая роль этой популяции клеток в патогенезе ИБС в целом и ИКМП в частности отсутствует (см. табл. 2). Накопление в крови у больных ИБС без кардиомиопатии VEGFR2⁺ клеток, по всей видимости, обусловлено суммацией позитивных тенденций каждого иммунофенотипа и коррелирует с количеством клеток трех иммунофенотипов VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺, VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ и VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ (см. выше), кроме VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ как самого малочисленного (см. табл. 2).

Сравнительный анализ общего содержания VEGFR2⁺ клеток и их иммунофенотипов в костном мозге у больных ИБС отличий между группами пациентов не выявил (см. табл. 2). В совокупности с аккумуляцией ранних ЭПК в крови у больных ИБС без кардиомиопатии это свидетельствует о том, что у данных пациентов усилена мобилизация ранних ЭПК из костного мозга в кровь, а не их генерация в миелоидной ткани. Следовательно, при ИКМП усиленное привлечение ранних ЭПК в кровь не отмечается по причине нарушения их мобилизации, но образование этих клеток в костном мозге при ИКМП не нарушено. Важно отметить, что сопоставление численности изучаемых клеток в крови и костном мозге у больных ИБС установило превышение миелоидного показателя над гемическим только для содержания поздних ЭПК, что соответствует данным об их генерации в костном мозге [8].

Центральным регулятором ангиогенеза является HIF-1, поскольку усиливает транскрипцию генов нескольких проангиогенных белков (SDF-1, VEGF, PDGFB, ангиопоэтина-1 и -2) и их рецепторов [16], благодаря чему препятствует ишемическому повреждению миокарда [17]. Согласно ранее опубликованным данным, у больных ИКМП (в отличие от больных ИБС без кардио-

миопатии) обнаруживается дефицит HIF-1α в крови [18, 19]. Это, вероятно, определяет отсутствие компенсаторной гиперпродукции SDF-1 при гипоксии, а также влияет на секрецию MCP-1 и GM-CSF. Концентрация SDF-1, MCP-1 и GM-CSF в крови у больных ИБС без кардиомиопатии была повышенной относительно группы здоровых доноров, у пациентов с ИКМП этого не отмечалось (см. табл. 3). Известно, что накопление SDF-1 в плазме стимулирует мобилизацию CXCR4⁺ клеток из костного мозга, включая гемопоэтические стволовые клетки и ЭПК, которые экспрессируют CXCR4 как рецептор к SDF-1. Взаимодействие SDF-1 и CXCR4 также активирует привлечение и удержание стволовых клеток в ишемизированных областях [9, 20, 21]. Другой хемоаттрактант MCP-1, активируя после взаимодействия с CCR2 пути p42/44ERK1/2, p38 MAPK и JNK1 [22], не только приводит к миграции из костного мозга в кровь моноцитов [23], но и дозозависимо стимулирует мобилизацию ЭПК [10]. Кроме того, MCP-1 обеспечивает прикрепление моноцитарных ЭПК к поврежденному эндотелию, что сопровождается дифференцировкой их в клетки, экспрессирующие эндотелиальные маркеры (Tie2, CD31, VE-кадгерин), и ингибированием гиперплазии интимы сосудов [10, 23]. Между тем GM-CSF оказывает на ЭПК прямой пролиферативный эффект, опосредованный сигнальными путями PI3R/Akt, JNK, ERK и приводящий к активации циклина D1 и E [24]. Также GM-CSF, являясь многолинейным гемопоэтином, стимулирует пролиферацию и дифференцировку миелоидных клеток-предшественниц, участвуя и в моноцитопоэзе [25]. При этом MCP-1 и GM-CSF являются медиаторами воспаления [22, 25], и их физиологический уровень в крови согласуется с другими признаками иммуносупрессии при ИКМП (избыток интерлейкина-10 и недостаток M-CSF в крови [19]), которая, вероятно, замедляет развитие сахарного диабета при ИКМП и объясняет его более редкую встречаемость, чем у больных ИБС без кардиомиопатии (см. выше). Интегрируя данные литературы с результатами настоящего исследования, можно заключить, что при ИКМП отсутствие накопления ЭПК в крови связано, по всей вероятности, с недостаточным ответом клеток на гипоксию (SDF-1 и HIF-1α) и слабой выраженностью воспалительной реакции (по MCP-1 и GM-CSF) при наличии атеросклеротического процесса. Анергия медиаторного ответа при ИКМП, очевидно, затрудняет мобилизацию ЭПК в кровь под действием хемоаттрактантов SDF-1 и MCP-1 и, возможно, ограничивает их пролиферативную активность с участием GM-CSF.

Несмотря на сопоставимость концентрации VEGF-A и G-CSF в крови между группами больных ИБС и ее соответствие их физиологическому уровню (см. табл. 3), по-видимому, эти цитокины тоже вовлечены в регуляцию ангиогенеза, что подтверждается наличием трех положительных корреляций их плазменного уровня с большинством изучаемых индукторов ангиогенеза (см. выше). Показано, что G-CSF-индуцированная мобилизация ЭПК связана с увеличением в циркуляции числа нейтрофилов, высвобождающих VEGF, и стимуляцией мобилизации гемопоэтических стволовых клеток посредством костномозговых нейтрофилов, секретирующих эластазу и катепсин G [9]. Синтез VEGF-A может быть индуцирован MCP-1 [11], что согласуется с обнаруженной в настоящем исследовании положительной связью этих показателей (см. выше). В свою очередь, VEGF-A взаимодействует с VEGFR1 и VEGFR2, стимулируя пролиферацию и дифференциацию ЭПК в эндотелиальные клетки, образова-

ние тубулярных структур и повышение проницаемости сосудистой стенки [26, 27]. Учитывая, что при гипоксии возрастает экспрессия VEGFR1 [26], который является рецептором-ловушкой для VEGF-A и способен ингибировать ангиогенез [27], VEGF-A у пациентов с ИКМП может или не синтезироваться в избытке ввиду неадекватной реакции организма на гипоксию (дефицит HIF-1α [18]), или синтезируемый VEGF-A может оказаться связанным с VEGFR1. Между тем ожидаемая корреляция между содержанием цитокинов и ранних/поздних ЭПК в крови не была зарегистрирована, очевидно, по причине многообразия потенцирующих друг друга эффектов изучаемых медиаторов ангиогенеза. Это могло привести к нелинейным зависимостям между их концентрацией и численностью ЭПК в крови, притом что коэффициент корреляции выявляет лишь линейную взаимосвязь.

Ограничения исследования

Результаты проведенного исследования могут быть ограничены клиническим статусом больных, поскольку полученные данные справедливы для больных ИБС с гемодинамически значимым многососудистым поражением магистральных коронарных артерий, которое требует проведения коронарного шунтирования, и перенесших инфаркт миокарда. Ввиду этого у пациентов в начальной стадии ИБС с только формирующейся ИКМП установленные в настоящем исследовании отличия могут еще не обнаруживаться, что требует дальнейших исследований. Не исключено, что ограничения могут касаться региона проживания и национальной принадлежности больных ИБС, так как результаты получены для лиц европеоидного происхождения, проживающих преимущественно в Сибирском федеральном округе. Следует отметить ограниченный объем выборки больных ИБС. Последующее накопление данных, возможно, позволит получить достоверные различия для содержания поздних ЭПК в крови у больных ИБС без кардиомиопатии по сравнению со здоровыми донорами.

Заключение

Таким образом, развитие ИБС без кардиомиопатии характеризуется компенсаторным (в ответ на атеросклеротическое повреждение сосудов и повышенную десквамацию эндотелия) усилением мобилизации ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК из костного мозга в кровь в условиях избытка SDF-1 и MCP-1 в кровотоке и, возможно, усилением пролиферативного потенциала этих клеток вследствие профицита GM-CSF в крови. Формирование ИКМП ассоциировано с анергией проангиогенного медиаторного ответа, проявляющейся физиологическим уровнем SDF-1, MCP-1 и GM-CSF в крови, что препятствует усиленной мобилизации ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺

ЭПК в кровоток при наличии повышенной десквамации эндотелия, однако их генерация в костном мозге при ИКМП не нарушена. Субпопуляционный состав и общая численность VEGFR2⁺ клеток в костном мозге при ИКМП соответствуют таковым при ИБС без кардиомиопатии. При этом реактивность пула ранних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК при ИБС без кардиомиопатии значимо выше, чем поздних VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺ ЭПК, численность которых при ИБС соответствует норме вне зависимости от наличия ИКМП. Непосредственная роль VEGF-A и G-CSF в дисрегуляции ангиогенеза при ИКМП не подтверждается ввиду их физиологических значений у больных ИБС, как страдающих, так и не страдающих ИКМП, но данные цитокины взаимосвязаны с концентрацией SDF-1 и MCP-1 и GM-CSF в крови. Полученные результаты в дальнейшем позволят разработать патогенетически обоснованную цитокиновую и/или клеточную терапию данного заболевания путем стимуляции ангиогенеза, замедлив прогрессирование ИКМП и повысив качество жизни больных.

Дополнительная информация

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.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. С.П. Чумакова — разработка дизайна исследования, статистическая обработка результатов исследования, их интерпретация, анализ литературы, написание текста рукописи; О.И. Уразова — материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, утверждение текста рукописи; В.М. Шипулин — консультирование членов научной группы по вопросам планирования дизайна исследования и интерпретации результатов; О.А. Денисенко — выполнение проточной цитофлуориметрии, анализ результатов; М.В. Гладковская — подготовка биоматериала, выполнение иммуноферментного анализа; С.Л. Андреев — взаимодействие с пациентами, обеспечение клинического материала, интерпретация результатов; К.В. Невская — выполнение проточной цитофлуориметрии, анализ результатов; Ю.В. Колобовникова — материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Del Buono MG, Moroni F, Montone RA, et al. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr Cardiol Rep.* 2022;24(10):1505–1515. doi: <https://doi.org/10.1007/s11886-022-01766-6>
2. Шипулин В.М., Пряхин А.С., Андреев С.Л., и др. Современные клиничко-фундаментальные аспекты в диагностике и лечении пациентов с ишемической кардиомиопатией (обзор) // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* — 2021. — Т. 36. — № 1. — С. 20–29. [Shipulin VM, Pryakhin AS, Andreev SL, et al. Modern clinical and fundamental aspects in the diagnosis and treatment of patients with ischemic cardiomyopathy (Review). *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2021;36(1):20–29. (In Russ.)) doi: <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-1-20-29>

3. Gyöngyösi M, Winkler J, Ramos I, et al. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(2):177–191. doi: <https://doi.org/10.1002/ehf.696>
4. Dang H, Ye Y, Zhao X, et al. Identification of candidate genes in ischemic cardiomyopathy by gene expression omnibus database. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020;20(1):320. doi: <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01596-w>
5. Argunova Y, Belik E, Gruzdeva O, et al. Effects of Physical Prehabilitation on the Dynamics of the Markers of Endothelial Function in Patients Undergoing Elective Coronary Bypass Surgery. *J Pers Med*. 2022;12(3):471. doi: <https://doi.org/10.3390/jpm12030471>
6. Poston RN. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019;8(2):51–61. doi: <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000172>
7. Мельникова Ю.С., Макарова Т.П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических заболеваний // *Казанский медицинский журнал*. — 2015. — Т. 96. — № 4. — С. 659–665. [Mel'nikova YuS, Makarova TP. Endothelial dysfunction as the key link of chronic diseases pathogenesis. *Kazan Medical Journal*. 2015;96(4):659–665. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17750/KMJ2015-65>
8. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, et al. Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem Cells Intl*. 2018;2018:9847015. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/9847015>
9. Денисенко О.А., Чумакова С.П., Уразова О.И. Эндотелиальные прогениторные клетки: происхождение и роль в ангиогенезе при сердечно-сосудистой патологии // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. — 2021. — Т. 36. — № 2. — С. 23–29. [Denisenko OA, Chumakova SP, Urazova OI. Endothelial progenitor cells: origin and role in angiogenesis in cardiovascular diseases. *Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;36(2):23–29. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-2-23-29>
10. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1 – dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. 2003;93(10):980–989. doi: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000099245.08637.CE>
11. Zhao H-Y, Zhu Y-P, Wen Y, et al. MCP-1 facilitates VEGF production by removing miR-374b-5p blocking of VEGF mRNA translation. *Biochem Pharmacol*. 2022;206:115334. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115334>
12. Felker GM, Shaw GM, O'Connor CM. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):208–210. doi: [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01738-7](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01738-7)
13. Van Kuijk K, Kuppe C, Betsholtz C, et al. Heterogeneity and plasticity in healthy and atherosclerotic vasculature explored by single-cell sequencing. *Cardiovasc Res*. 2019;115(12):1705–1715. doi: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz185>
14. Genkel V, Dolgushin I, Baturina I, et al. Associations between Circulating VEGFR2hi-Neutrophils and Carotid Plaque Burden in Patients Aged 40–64 without Established Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Immunol Res*. 2022;2022:1539935. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/1539935>
15. Kaira K, Imai H, Kawasaki T, et al. Potential of VEGFR2 expression as a predictive marker of PD-1 blockade in patients with advanced NSCLC. *Oncol Rep*. 2022;48(6):214. doi: <https://doi.org/10.3892/or.2022.8429>
16. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015:549412. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/549412>
17. Sun J, Shen H, Shao L, et al. HIF-1α overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):373. doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01881-7>
18. Чумакова С.П., Шипулин В.М., Уразова О.И., и др. Ишемическая кардиомиопатия: моноциты крови и медиаторы их дифференциации // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2019. — Т. 74. — № 6. — С. 396–404. [Chumakova SP, Shipulin VM, Urazova OI, et al. Ischemic cardiomyopathy: blood monocytes and mediators of their differentiation. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019;74(6):396–404. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1185>
19. Чумакова С.П., Уразова О.И., Денисенко О.А., и др. Цитокины в механизмах регуляции моноцитопоэза при ишемической болезни сердца // *Гематология и трансфузиология*. — 2022. — Т. 67. — № 4. — С. 511–524. [Chumakova SP, Urazova OI, Denisenko OA, et al. Cytokines in the mechanisms of regulation of monocytopoiesis in ischemic heart disease. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2022;67(4):511–524. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-4-511-524>
20. Dimova I, Karthik S, Makanya A, et al. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodelling by intussusception. *J Cell Mol Med*. 2019;23(6):3916–3926. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.14269>
21. Wang X, Jiang H, Guo L, et al. SDF-1 secreted by mesenchymal stem cells promotes the migration of endothelial progenitor cells via CXCR4/PI3K/AKT pathway. *J Mol Histol*. 2021;52(6):1155–1164. doi: <https://doi.org/10.1007/s10735-021-10008-y>
22. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol*. 2021;101(PtB):107598. doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
23. Niu J, Wang K, Zhelyabovska O. MCP-1-induced protein promotes endothelial-like and angiogenic properties in human bone marrow monocytic cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(2):288–297. doi: <https://doi.org/10.1124/jpet.113.207316>
24. Qiu C, Xie Q, Zhang D. 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: <https://doi.org/10.1159/000358652>
25. Hamilton JA. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front Immunol*. 2019;10:2055. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02055>
26. Laakkonen JP, Lähteenvuori J, Jauhiainen S, et al. Beyond endothelial cells: Vascular endothelial growth factors in heart, vascular anomalies and placenta. *Vascul Pharmacol*. 2019;112:91–101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.10.005>
27. Zhou Y, Zhu X, Cui H, et al. The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:738325. doi: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.738325>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Чумакова Светлана Петровна, д.м.н., доцент [Svetlana P. Chumakova, MD, PhD, Associate Professor];
адрес: 634034, Томск, ул. Учебная, д. 39 [address: 39 Uchebnaya str., 634034, Tomsk, Russia];
e-mail: chumakova_S@mail.ru, SPIN-код: 7536-2834, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Уразова Ольга Ивановна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН [Olga I. Urazova, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the RAS]; e-mail: urazova72@yandex.ru, SPIN-код: 9696-4110,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Шипулин Владимир Митрофанович, д.м.н., профессор [*Vladimir M. Shipulin*, MD, PhD, Professor];
e-mail: shipulin@cardio-tomsk.ru, **SPIN-код:** 3867-5360, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1956-0692>

Денисенко Ольга Анатольевна, соискатель [*Olga A. Denisenko*, Applicant]; **e-mail:** olga-muraveinik@yandex.ru,
SPIN-код: 3709-1493, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4524-8491>

Гладковская Маргарита Вадимовна, аспирант [*Margarita V. Gladkovskaya*, PhD Student];
e-mail: gladkovskay0@gmail.com, **SPIN-код:** 9186-1369, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1163-3439>

Андреев Сергей Леонидович, к.м.н. [*Sergey L. Andreev*, MD, PhD]; **e-mail:** anselen@rambler.ru, **SPIN-код:** 9070-7592,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4049-8715>

Невская Ксения Владимировна, к.м.н. [*Ksenia V. Nevskaya*, MD, PhD]; **e-mail:** nevskayaksenia@gmail.com,
SPIN-код: 1405-0472, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

Колобовникова Юлия Владимировна, д.м.н., доцент [*Yulia V. Kolobovnikova*, MD, PhD, Associate Professor];
e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru, **SPIN-код:** 3638-1577, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7156-2471>