На правах рукописи

КОЧЕГУРА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ СОПУТСТВУЮЩЕГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА НА ТЕЧЕНИЕ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

14.03.03 – патологическая физиология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Краснодар – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" и в федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты: академик РАН, доктор биологических наук, профессор
Ткачук Всеволод Арсеньевич;
доктор медицинских наук, профессор
Парфенова Елена Викторовна.

Официальные оппоненты:
Галагудза Михаил Михайлович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной медицины, директор;
Афанасьев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук", научно-исследовательский институт кардиологии, лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, руководитель лаборатории;
Бородулин Владимир Борисович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов".

Защита состоится 20 марта 2018 года в 10.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) (350063, Краснодар, ул. Седина, 4, тел. (861) 2627375).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (http://www.ksma.ru) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан "____" _____ 201_ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д208.038.02
доктор медицинских наук,
доцент Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН), в большинстве случаев ишемической этиологии, остается одной из важнейших проблем современной кардиологии, несмотря на существенный прогресс в медикаментозном, эндоваскулярном и хирургическом лечении. В последние годы наблюдается неуклонно прогрессирующий рост распространенности ХСН, приобретающий характер эпидемии, что является значительной социальной и экономической нагрузкой на общество (В.Ю. Мареев и соавт., 2004; 2006; Ю.Н. Беленков и соавт., 2011). В Российской Федерации ХСН диагностирована у 7% населения, причем у людей старше 90 лет ее частота достигает 70%. Пятилетняя выживаемость после постановки диагноза ХСН составляет менее 50% (J.G. Cleland, 2003; И.В. Фомин и соавт., 2012; C. Berry, 2016).

В настоящее время как в России, так и во всех развитых странах мира в структуре основных причин ХСН помимо артериальной гипертензии (АГ) и ИБС возрастает доля сахарного диабета 2 типа (СД2), который в общероссийской выборке встречается в 16 % случаев и достигает 27% в общеевропейской выборке (И.В. Фомин и соавт., 2012; V. M. van Deursen, 2014; J.C. Trullas, 2016; H.H.van der Wal, 2017). При этом метаболические нарушения, в частности гипергликемия, как фактор риска смерти, занимает третье место, уступая только артериальной гипертензии и курению, а ожирение входит в пятерку лидеров факторов риска смерти (G. Danaei, 2011; S. S. Lim, 2012; E. M. Pinho, 2015; C. L. Chen, 2017).

При ХСН, наличие сопутствующего СД2 сопряжено с более высокой общей и сердечно-сосудистой смертностью, а также с большей частотой нефатальных осложнений, являющихся причинами повторных госпитализаций (W.B. Kannel, 1974; L. N. McEwen, 2007; M. Dauriz, 2017). Важная роль СД2, как коморбидности, осложняющей течение ХСН, диктует необходимость выяснения патофизиологических механизмов, посредством которых сопутствующий СД2 может ухудшать прогноз ХСН, что необходимо для повышения эффективности лечения данной категории больных.

Большинство сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) сопряжены с нарушениями углеводного и липидного обмена, к которым со временем присоединяется воспаление в жировой ткани, развитие резистентности к инсулину и ожирение, эндотелиальная дисфункция, атеросклеротическое ремоделирование сосудов, гипертрофия миокарда, увеличение его жесткости и диастолическая дисфункция левого желудочка (ДД ЛЖ) (В.В. Калюжин, 2007; А.Г. Овчинников, 2012; A.M. Walker, 2016). В последнее десятилетие в качестве молекулярных факторов, вовлеченных в усугубление структурно-функциональных изменений сердца и сосудов у больных ССЗ, сочетающимися

с метаболическими нарушениями, рассматриваются такие, как дисбалансе циркулирующих гормонов (M.N. Kroon, 2012), факторов роста (N. Lamblin, 2005), воспалительных цитокинов (M. Nian, 2004) и адипокинов (J. Kocot, 2017). Помимо этого, в последние годы представлены убедительные доказательства роли стволовых и прогениторных клеток в репарации и обновлении тканей сердца и сосудов, а также влиянии факторов риска ССЗ на клеточное звено репаративных-регенеративных процессов (A. Stoltzing, 2008; X. Liang, 2014; J. Watt, 2016; R.J Medina, 2017). В связи с этим особый интерес и актуальность для современной кардиологии представляет исследование влияния сопутствующего СД2 и присущих ему метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) на стволовые и прогениторные клетки, вовлеченные в репарацию сердца и сосудов в комплексе с изучением циркулирующих гормонов, ангиогенных факторов, воспалительных цитокинов и адипокинов и в сопоставлении с нарушениями систолической и диастолической функции сердца, выраженностью эндотелиальной дисфункции, прогнозом течения больных с ХСН, что позволит выявить новые мишени для терапевтических воздействий, направленных на улучшение прогноза этой категории кардиологических больных.

Степень разработанности темы исследования. Известно, что СД2, как коморбидность, лидирует среди прочих заболеваний, отягощающих клиническое течение всех без исключения ССЗ, в основном за счет раннего развития сердечно-сосудистых осложнений, ухудшающих прогноз. Длительное время считалось, что компенсация углеводного обмена у больных СД2 является ключевым фактором профилактики сердечно-сосудистых осложнений, однако, данные мета-анализов показали, что даже интенсивный контроль гликемии не уменьшает риск развития сердечно-сосудистых осложнений (M. Parry, 2015; Y. Wang, 2015; J.D. Newman, 2017). Это позволило предположить, что мишенью воздействий, направленных на предотвращение неблагоприятного влияния сопутствующего СД2, должны быть и другие факторы, определяющие механизмы этого влияния. В экспериментальных исследованиях убедительно показана роль стволовых и прогениторных клеток в репарации сердца и сосудов (T. Asahara, 1999; J. M. Hill, 2003; S. Dimmeler, 2004; C. A. Akyurekli, 2015; K. Sun, 2016; J. Wils, 2017). Более того, нарушения функционирования этих клеток могут быть вовлечены в развитие микро- и макрососудистых осложнений. В последние годы большое внимание привлечено к исследованию влияния сахарного диабета и гипергликемии на функциональное состояние циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), участвующих в репарации поврежденного эндотелия и васкулогенезе в ишемизированных тканях. Показано, что уменьшение продукции оксида азота при СД 2 типа

является ключевым фактором, определяющим нарушение репаративных функций ЭПК, что может способствовать дисфункции эндотелия (E. I. Lev et al., 2014; H. Kim, 2015; H. Wu, 2016). Нарушение функций ЭПК при сахарном диабете обусловлено множественными патофизиологическими механизмами, включающими воспаление, оксидативный стресс, дисфункцию Akt и eNOS сигнальных путей, обусловленную нарушением экспрессии регуляторных микро РНК (miR-126), что может воздействовать на различные функции ЭПК: дифференцировку и мобилизацию в костном мозге, выживание в циркуляции, хоуминг и участие в неоваскуляризации тканей (J. Yu et al., 2012; H. Patel, 2013; Y. Li, 2016). Особое внимание привлечено к исследованию молекулярных механизмов влияния высокой концентрации глюкозы на прогениторные клетки. Установлено, что увеличенная продукция активных форм кислорода митохондриями играет критическую роль в развитии дисфункции ЭПК при воздействии высокой концентрации глюкозы (N. Krankel et al., 2005; R. Madonna, 2014). Однако, остается неясным, насколько нарушения функционального состояния прогениторных клеток, вызванные сопутствующим сахарным диабетом, могут влиять на прогноз больных. Поскольку в реализации репаративных процессов в тканях принимают участие различные типы прогениторных клеток, включающие помимо циркулирующих клеток костномозгового происхождения и тканевые резидентные прогениторные клетки, для понимания механизмов отягощающего влияния сопутствующего СД2 на течение сердечной недостаточности важно исследовать влияние диабета и сопутствующих ему метаболических нарушений и на другие типы прогениторных клеток, а также другие компоненты, определяющие важнейшее звено организма - систему регенерации. К таким компонентам относятся факторы роста, цитокины, хемокины и адипокины.

Цель исследования: выяснение молекулярных и клеточных механизмов, ассоциированных с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа и влияющих на течение и прогноз у больных с ишемической (постинфарктной) хронической сердечной недостаточностью.

Задачи исследования:

1. Исследовать механизмы влияния метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) в условиях моделирования in vitro на прогениторные клетки.
2. Оценить ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток жировой ткани при ишемической болезни сердца и сопутствующем сахарном диабете 2 типа.

3. Исследовать влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на клинико-биохимические и функциональные характеристики пациентов с ишемической болезнью сердца и постинфарктной хронической сердечной недостаточностью.

4. Изучить уровни ангиогенных факторов роста, циркулирующих натрийуретических пептидов, адипоцитокинов и эндотелина-1 у пациентов с ишемической болезнью сердца и постинфарктной хронической сердечной недостаточностью при сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

5. Оценить корреляцию выраженности диастолической дисфункции миокарда левого желудочка у больных постинфарктной хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа с уровнем в крови натрийуретических пептидов, эндотелина-1, ангиогенных факторов роста и адипоцитокинов.

6. Исследовать влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных ишемической болезнью сердца с постинфарктной хронической сердечной недостаточностью.

7. Изучить в процессе проспективного наблюдения прогностическое значение: количества циркулирующих прогениторных клеток, уровня ангиогенных факторов роста и адипоцитокинов, эндотелина-1 в связи с уровнем натрийуретических пептидов у пациентов постинфарктной хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа.

Научная новизна. Впервые в экспериментально-клиническом исследовании проведен анализ влияния сопутствующего сахарного диабета 2 типа, с присущими ему метаболическими нарушениями (гипергликемией и гиперлипидемией), у больных ишемической болезнью сердца и постинфарктной ХСН, на комплекс параметров, характеризующих систему репарации/регенерации тканей и органов: на характеристики циркулирующих и тканевых прогениторных клеток, уровень факторов роста, регулирующих ангиогенез, цитокинов и адипокинов. В результате проведенных исследований впервые получены данные о повреждающем действии метаболических нарушений (гипергликемиии и гиперлипидемии) на клеточное звено системы регенерации: на циркулирующие прогениторные клетки и резидентные прогениторные клетки - МСК жировой ткани, которые являются наиболее широко используемым в регенеративной медицине типом клеток для аутологичной клеточной терапии.

Впервые установлено, что у пациентов ХСН, при наличии СД2, гипергликемия ассоциируется со снижением количества ЦПК, участвующих в

обновлении/репарации эндотелия и васкулогенезе в ишемизированных тканях, и подавляет способность МСК стимулировать ангиогенез посредством паракринных эффектов, что является важной составляющей репаративных/регенеративных процессов.

Впервые установлено, что наличие сопутствующего сахарного диабета 2 типа у пациентов с постинфарктной ХСН ассоциируется с повышенным уровнем ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, HGF) в периферической крови, который не коррелирует с тяжестью ХСН, но ассоциируется с выраженностью нарушений углеводного обмена.

В работе впервые показано, что значительное снижение количества $CD34^+$ ЦПК ассоциируется с плохим прогнозом (более высокой смертностью) у пациентов с постинфарктной ХСН, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа.

Теоретическая значимость работы. Несмотря на то, что за последние 20 лет произошла смена парадигм как во взглядах на патогенез, так и на лечение ХСН, тем не менее, исследования, посвященные влиянию коморбидности, в частности, СД2 на течение сердечной недостаточности с позиции ухудшения регенеративных процессов, крайне ограничены. Результаты данной работы указывают, что нарушения в клеточном звене регенерации, обусловленные влиянием сопутствующего СД2, могут являться новым патогенетическим звеном, отягощающим течение постинфарктной ХСН. Из этого следует, что стволовые и прогениторные клетки и механизмы, регулирующие их регенеративные функции, являются перспективными мишенями для разработки новых подходов к лечению этой категории больных.

Практическая значимость работы. В ходе выполнения данного исследования установлено, что количество $CD34^+$ ЦПК является перспективным новым прогностическим маркером для больных постинфарктной ХСН, особенно при сочетании с СД2, что необходимо подтвердить в крупных проспективных исследованиях. Выявленное в исследовании значительное снижение количества $CD34^+$ ЦПК у больных с неблагоприятным прогнозом течения ХСН указывает на эту категорию больных, как на целевую для применения клеточной терапии. Разработанная электронная карта-история болезни используется для дальнейших проспективных исследований в Научно-консультативном отделе ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России.

Методология и методы исследования. Работа состоит из трех частей. Первая - экспериментальная часть работы посвящена изучению механизмов влияния метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) в

условиях их моделирования in vitro на важные для регенерации свойства мезенхимальных стволовых клеток. Для этого нами были использованы in vitro модели (клеточные модели), имитирующие воздействие метаболических факторов на клетки, а именно на функциональные свойства МСК жировой ткани, определяющие их регенеративный потенциал.

Вторая клинико-экспериментальная часть работы посвящена сравнительному исследованию функциональных характеристик МСК жировой ткани, в частности, их способности стимулировать ангиогенез за счет паракринной активности, у больных ИБС в сочетании с СД2 и без СД2 и пациентов без ИБС.

Третья, клиническая часть работы включала одномоментное и проспективное исследование больных ИБС с постинфарктной ХСН с сопутствующим СД2 и без СД2, а также одномоментное клиническое исследование больных СД 1 и 2 типов в качестве контрольных групп. На первом этапе клинической части работы проводилось одномоментное исследование клинических особенностей больных в сопоставлении с данными оценки функции сердца, функции эндотелия, показателями ремоделирования сосудистой стенки, составом тела, молекулярными и клеточными факторами, вовлеченными в компенсаторно-приспособительные реакции при ХСН. На втором этапе в ходе проспективного наблюдения проведен анализ клинического течения ХСН и риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в сопоставлении с исходными уровнями исследованных параметров и факторов для определения их прогностической значимости.

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях моделирования метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) in vitro установлено повреждающее действие этих факторов на свойства МСК (стволовых клеток), важные для реализации их регенеративного потенциала, что, вероятно, может являться важным фактором неблагоприятного влияния сахарного диабета 2 типа на течение постинфарктной ХСН.

2. Активность системы натрийуретических пептидов у пациентов с ишемической ХСН, в сочетании с СД2, ассоциируется со степенью диастолической дисфункции ЛЖ и не компенсирует высокую сывороточную активность эндотелина-1.

3. У пациентов с ишемической ХСН сопутствующие нарушения углеводного обмена, но не тяжесть сердечной недостаточности, ассоциируются с повышением уровней ангиогенных факторов роста (VEGF, sVEGFR1 и HGF) в периферической крови.

4. У пациентов с ишемической ХСН в сочетании с СД2, низкий уровень циркулирующих прогениторных клеток ассоциируется с гипергликемией, не зависит от тяжести сердечной недостаточности и является независимым предиктором неблагоприятного течения ИБС.

Степень достоверности и апробация работы. Апробация диссертации состоялась 18 апреля 2017 г. на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, лаборатории генных и клеточных технологий, лаборатории постгеномных технологий Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, научно-поликлинического отделения медицинского научно-образовательного центра МГУ и лаборатории ангиогенеза ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум по биологии клетки в культуре "Культивируемые клетки как основа клеточных технологий", Санкт-Петербург, (2009), 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD), Venice, (2011), the 3rd International Congress on Abdominal obesity, Quebec - Canada, (2012), V Всероссийская научно-практическая конференция "Стволовые клетки и регенеративная медицина", (2013), Heart Failure Congress, Lisbon - Portugal, (2013), ESC Congress, Amsterdam - Netherlands, (2013). Российский национальный конгресс кардиологов "Инновации и прогресс в кардиологии", Казань (2014), IV международная научно-практическая конференция "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине", Казань, (2014), IV съезд физиологов СНГ, Сочи - Дагомыс, (2014), Heart Failure Congress 2014 and the 1st World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece, (2014), the American Society of Gene & Cell Therapy, Washington, (2014), Российский национальный конгресс кардиологов, Санкт-Петербург, (2017), III Национальный конгресс по Регенеративной медицине, Москва, (2017).

Внедрение результатов в практику. Материалы диссертационного исследования внедрены и используются в учебном процессе кафедры биохимии и молекулярной медицины, кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова". Результаты исследования внедрены в лабораторную практику Отдела лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, из них 20 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе 5 патентов на изобретение РФ.

Личный вклад автора в исследование. Диссертант непосредственно участвовал в планировании и организации исследований, проведении всех экспериментов in vitro, анализе экспериментальных и клинических результатов, формулировке научных положений и выводов, написании статей и представлении результатов работы на научных конференциях. Личный вклад автора в написании научных работ по теме диссертации - 85%. Соавторы указаны в публикациях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 308 страницах текста, содержит 41 рисунок, 41 таблицу. Состоит из разделов: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и обсуждение", "Заключение", "Выводы", "Практические рекомендации", "Список литературы". Библиография включает 416 ссылок, из них 50 отечественных и 366 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В диссертационное исследование включено всего 250 пациентов, из них 112 пациентов включено в проспективное клиническое исследование (медиана наблюдения 3,7 [2,4:3,9] года), 59 пациентов включено в одномоментное клиническое исследование для оценки циркулирующих прогениторных клеток и 79 пациентов включено в одномоментное клиническое исследование для изучения характеристик МСК ЖТ. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали информированное согласие на участие в исследованиях, форма которого зависела от содержания исследования. Протоколы исследований были одобрены этическими комитетами клиник, в которых они проводились - ФГБУ "НМИЦ кардиологии" МЗ РФ и ФГБУ "НМИЦ эндокринологии" МЗ РФ.

1. Дизайн проспективного четырехлетнего клинического исследования

Критерии включения: Наличие установленного диагноза ИБС (ИМ в анамнезе) с развитием постинфарктной ХСН; наличие хотя бы одного из

следующих объективных критериев при скрининге: ФВ ЛЖ ≤ 40% по данным Эхо-КГ; размер левого предсердия >4,0 см или >2,5 см/м роста; уровень NT-proBNP>400 пг/мл; возраст > 18 лет; информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии не включения: ИМ или ОНМК в течение 6 недель до включения в исследование; КИНК; беременность; потребность в гемодиализе или перитонеальном диализе; воспалительные заболевания миокарда и перикарда, гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия; онкологическая патология в анамнезе; тяжелые сопутствующие заболевания; системные васкулиты; инфекционные заболевания; анемия (Hb<90 г/л).

В проспективное исследование включено 25 относительно здоровых добровольцев, составивших группу сравнения, 30 больных ИБС с ХСН, 25 больных ИБС с ХСН в сочетании с СД2 и 32 больных СД2 без ХСН. Все участники исследования были сопоставимы по возрасту. Всем участникам проспективного исследования исходно и на протяжении всего периода наблюдения проводили клиническое и лабораторно-инструментальное обследование, включавшее сбор жалоб, анамнеза, клинический осмотр с оценкой общего состояния, артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), регистрацию ЭКГ, ЭХО-КГ определение функционального класса СН (ФК по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации), проведение 6-минутного теста ходьбы, КАГ (по показаниям), лабораторные анализы (общий анализ крови и мочи; липидный спектр, глюкоза плазмы натощак, креатинин, мочевина, мочевая кислота, калий, натрий, АЛТ, АСТ, КФК. Клинико-демографическая характеристика больных, включенных в исследование представлена в таблице 1.

Анализ лабораторных параметров обнаружил наиболее значимые статистические различия по показателям углеводного обмена (уровню глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина, p<0,001) у больных в группе ХСН+СД2 и СД2 без ХСН в сопоставлении с больными ХСН без СД2 и группой сравнения, что было ожидаемо. У больных ХСН+СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 отмечалась характерная для диабета гипертриглицеридемия (p=0,001).

Анализ параметров ЭХО-КГ обнаружил, что у больных ХСН без СД2 в сравнении с больными ХСН+СД2 размер левого предсердия и показатель соотношения E/e' статистически значимо больше (p=0,004 и p=0,006, соответственно), что свидетельствует о более значимом ремоделировании миокарда и большей выраженности ДД ЛЖ.

На всех этапах наблюдения, при личном визите больных или в ходе телефонного контакта оценивали течение и исход заболевания. По итогам

четырехгодичного наблюдения из 55 больных ХСН- 12 человек были утеряны для наблюдения. Остальные 43 больных были разделены на две группы: пациенты, у которых отмечалось благоприятное течение заболевания, включали в группу А; пациенты, у которых отмечалось неблагоприятное течение заболевания, включали в группу Б.

Таблица 1 – Клинико-демографическая характеристика больных, включенных в проспективное исследование

Показатели	группа сравнения, n=25 (1)	ХСН, n=30 (2)	ХСН+СД2 n=25 (3)	СД2, n=32 (4)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{1-4}	p_{2-3}	p_{2-4}	p_{3-4}
Клинико-анамнестические данные										
Возраст, годы	56,7±8,7	60,1±9,2	59,5±7,8	61,2±7,5	0,112	0,181	0,061	0,811	0,771	0,581
Пол, м/ж	19/6	26/5	20/4	11/21	0,344	0,392	0,001	0,612	<0,001	<0,003
ИМТ, кг/м^2, Me (25% и 75%)	29,0 (24,2:32,0)	28,7 (24,9:32,3)	33,5 (31,2: 35,3)	30,6 (28,0: 34,8)	0,751	0,001	0,024	<0,007	0,025	0,131
Артериальная гипертензия, n (%)	13 (65)	20 (66,7)	19 (76)	16 (64)	0,253	0,044	0,543	0,193	0,181	0,024
Длительность ХСН, лет	-	3,0±2,4	3,5±3,0	-	-	-	-	0,561	-	-
Длительность СД 2 типа, лет	-	-	5,9±5,1	6,8±6,7	-	-	-		-	0,841
Инфаркт миокарда, n (%)	-	31 (100)	24 (100)	-	-	-	-	-	-	-
Вмешательства по реваскуляризации КА, n (%)	-	11 (35,5)	5 (20,8)	-	-	-	-	0,191	-	-
ФК NYHA II/ III, n (%)	-	24 (77,4)/ 7 (22,6)	11(45,8)/ 13 (54,2)	-	-	-	-	0,016	-	-
Тест 6-минутной ходьбы, м	-	385,1±68,3	245,2±65,5	-				<0,001		

Клиническое течение заболевания оценивали как благоприятное у больных, (вошедших в состав группы А), если в течение исследуемого периода на фоне адекватно проводимой терапии состояние пациента отвечало следующим

критериям: стабильное состояние гемодинамических показателей, отсутствие нарастания симптомов и признаков ХСН; отсутствие госпитализаций по поводу СН или не более 1 раза в год; отсутствие снижения ФВ ЛЖ; сохранение прежнего ФК ХСН по NYHA или его уменьшение.

Критерии неблагоприятного течения ХСН у больных, вошедших в состав группы Б: увеличение ФК ХСН по NYHA на 1 и более в течение периода проспективного наблюдения; госпитализация по поводу СН более 1 раза на протяжении четырехгодичного наблюдения; прогрессивное снижение фракции выброса ЛЖ в течение периода наблюдения; летальность либо другие неблагоприятные клинические события (повторные ИМ, мозговой инсульт, ТЭЛА, декомпенсация ИБС, потребовавшая реваскуляризации, декомпенсация ХСН и др.).

Таким образом из 43 больных ХСН, в группу А (с благоприятным течением ИБС) вошло - 25 пациентов (58,1%), а в группу Б (с неблагоприятным течением) - 18 пациентов (41,9%).

В одномоментное клиническое исследование для оценки ЦПК было включено 45 больных СД1 и 14 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу, но ожидаемо статистически значимо отличавшихся большим уровнем глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина. *Критериями не включения* были: СД2, состояние кетоацидоза, острые и хронические воспалительные заболевания, онкологические и системные заболевания, тяжелая анемия и другие гематологические заболевания, алкоголизм, пороки сердца, инфаркт миокарда в анамнезе, инсульт, оперативные вмешательства (в том числе и малоинвазивные процедуры) менее 6 месяцев назад, рефрактерная артериальная гипертония (АД>180/100 мм рт. ст. на фоне гипотензивной терапии), ожирение, синдром диабетической стопы, диабетическая макроангиопатия, терминальная почечная недостаточность, диализ. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был утвержден на заседании локального этического комитета ФГБУ ЭНЦ МЗ России от 19 января 2009 г. (протокол №1). Больным СД1 типа проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование, включавшее общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, определение HbA1c. Инструментальное обследование включало ЭКГ, ЭХО-КГ, нагрузочные пробы для исключения ИБС.

В одномоментное клиническое исследование для изучения ангиогенных свойств МСК-ЖТ у больных ИБС включено 79 пациентов обоего пола (женщины в периоде постменопаузы и не получавшие заместительную гормональную терапию), среди которых 19 пациентов без ИБС (больные, которым проводились плановые абдоминальные операции - грыжесечения или

холецистэктомия, составившие контрольную группу), 32 больных ИБС и 28 больных ИБС в сочетании с СД2, которым проводилось плановое аорто-коронарное шунтирование. Всем больным ИБС, поступившим в стационар для плановой операции аорто-коронарного шунтирования помимо типового клинического и лабораторно-инструментального обследования, была выполнена КАГ, 6-минутный тест ходьбы (по показаниям).

Все больные, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и полу. В обеих группах больных ИБС более 60% пациентов имели анамнестические указания на ИМ. Среди сопутствующей патологии в обеих группах больных ИБС диагностированы АГ, избыточная масса тела и ожирение I степени. Больные ИБС в сочетании с СД2 статистически значимо отличались от группы контроля и больных ИБС без СД2 по уровню глюкозы плазмы натощак, что было ожидаемо. Все больные ИБС получали стандартную терапию, включавшую β-блокаторы, антиагреганты, статины, иАПФ, антагонисты кальция и диуретики.

Критериями не включения были: аутоиммунные и онкологические заболевания; острые и хронические воспалительные заболевания, потребовавшие антибактериальной или гормональной терапии; ИМ в течение 6 недель до включения в исследование; анемия (гемоглобин менее 90 г/л) и другие заболевания крови, ОНМК в течение 12 недель до включения в исследование. Дополнительными критериями не включения для пациентов группы контроля были наличие любых ССЗ и СД2 по результатам клинического и лабораторно-инструментального обследования (постинфарктный кардиосклероз, миокардит, стенокардия, ХСН, тяжелые нарушения ритма и проводимости сердца, нарушение толерантности к глюкозе, выраженная дислипидемия).

Инструментальные методы исследования. *ЭХО-КГ и оценка ФК ХСН.* Оценку структурно-функционального состояния сердца выполняли методом трансторакальной ЭХО-КГ с использованием ультразвуковой системы iE 33 (Philips, Нидерланды). В ходе ультразвукового исследования определяли структурно-морфологические параметры сердца, а также рассчитывали ФВ ЛЖ (по Симпсону), которую использовали в качестве одного из критериев включения в исследование.

Разделение пациентов на функциональные классы проводили согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (1964 г.), с использованием теста с 6-минутной ходьбой (Беленков, Ю. Н., 2001).

Поток-зависимую вазодилатацию плечевой артерии (ПА) оценивали в пробе с реактивной гиперемией по протоколу D.S. Celermajer (Celermajer, D.S. et al., 1992).

Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий. В ходе исследования оценивали толщину комплекса интима-медиа, наличие атеросклеротических бляшек в сонных артериях в соответствии с Рекомендациями (2013) на ультразвуковом аппарате "EnVisor HD", (Philips, США).

Рутинно всем больным проводилась ЭКГ в 12 отведениях, холтеровское мониторирование при показаниях.

Биоимпедансометрию проводили с помощью анализатора оценки баланса водных секторов организма с программным обеспечением АВС-01 "Медасс". В ходе исследования оценивали абсолютные и относительные значения компонентов состава тела (жировой, мышечной массы, водных секторов). Исследование проводили утром натощак, в положении больного лежа на кушетке.

Биохимические методы исследования. *Получение образцов плазмы и сыворотки.* Образцы крови в количестве 10-12 мл собирали натощак, методом венепункции с использованием системы Vacutainer, заполненной стабилизирующим агентом или разделительным гелем для получения плазмы или сыворотки, соответственно. Хранение образцов плазмы и сыворотки для последующего анализа осуществлялось при температуре - 80ºС.

Липидный спектр крови определяли на биохимическом анализаторе "Synchron CX-7" фирмы "Beckman" (США) с использованием реактивов фирмы "Human" (Германия). Оценивали следующие показатели: общий холестерин сыворотки крови (ОХС), холестерин липопротеидов высокой плотности, триглицериды, холестерин липопротеидов низкой плотности.

Углеводный обмен оценивали по уровню глюкозы плазмы натощак и уровню гликозилированного гемоглобина (HbA1c), измеренного иммунотурбидиметрическим методом;

Определение сывороточного уровня NT-proBNP и MR-proANP выполняли методом ИФА с помощью соответствующих наборов реактивов на приборе Roche Elecsys 2010 (Roche, Швейцария).

Определение факторов роста методом ИФА. Содержание ангиогенных факторов роста (VEGF165, sVEGFR1, HGF, PIGF, PAI-1) в образцах плазмы, сыворотки и кондиционированной среды, а также циркулирующего эндотелина-1, определяли с использованием наборов Quantikyne (R&D Systems, США).

Клеточные методы. *Выделение МСК из жировой ткани.* Для выделения МСК-ЖТ человека использовали фрагменты подкожной жировой ткани (от 0,5 до 5 мл), отсекаемые при проведении абдоминальных операций, операций по поводу травм и заболеваний суставов, а также при выделении сосудов и постановке шунтов при АКШ. Выделение клеток из полученного в результате

операции материала осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса, согласно ранее опубликованному протоколу (Zuk, P.A. et al., 2001). Ткань измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких (размером не более 2 кубических миллиметров) кусочков и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл, Worthington Biochemical, США) и диспазы (40 ед/мл, Sigma, Германия) при соотношении объема ткани (в мл) к объему ферментативного раствора (в мл) 1:2. Образец инкубировали при 370С в течение 30-45 мин при постоянном встряхивании. По окончании инкубации добавляли равный объем среды DMEM (Gibco)/10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone) и центрифугировали при 200g в течение 7 мин.

Белесый поверхностный слой, состоящий из зрелых адипоцитов и кусочков ферментативно необработанной ткани, удаляли с помощью вакуумного насоса, а осадок, состоящий из клеток стромы жировой ткани и клеток сосудистой стенки и крови, суспендировали в стерильной деионизованной воде для лизирования эритроцитов. Чтобы восстановить осмотическое давление, добавляли 10-тикратный объем среды DMEM, а затем фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell Strainer, США). Для очищения популяции стромальных клеток от клеток крови и клеточного дебриса на конечном этапе суспензию центрифугировали при 200g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в соответствующей среде роста. Выделенные клетки высаживали на чашки Петри в концентрации 5х104/см3 и инкубировали при 37°С, 5% СО2. На следующий день в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся клеток. Выход клеток при использованном нами методе выделения составлял 4-7х104 `прикрепившихся клеток на 1 мл ткани.

Культивирование МСК-ЖТ. Выделенные клетки выращивали на стандартном пластике для культивирования клеток (Corning Costar) в СО2 – инкубаторе (5% СО2; 95% воздуха) при 370С. МСК-ЖТ мыши культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (HyClone), содержащей 10% ФБС (HyClone), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина/фунгизона (HyClone). МСК-ЖТ человека культивировали в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных прогениторных клеток (Advance Stem Cell Basal Medium, HyClone), содержащей 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, HyClone), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина/фунгизона (HyClone).

Смену среды проводили каждые 2-3 дня; при достижении 70-80% конфлуента клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% ЭДТА. После прикрепления к пластику клетки хорошо росли и пролиферировали в культуре.

В экспериментах использовали МСК-ЖТ 2 и 3 пассажей, достигшие 70-80% конфлуента. Для получения кондиционированной среды клетки в течение 24 часов депривировали в среде роста, не содержащей сыворотку, затем меняли среду на свежую, также не содержащую сыворотку, и культивировали клетки в течение 48 часов. После этого среду собирали, освобождали от неприкрепленных клеток и клеточного дебриса путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин, добавляли коктейль ингибиторов протеаз (1:500, Sigma, кат. № P1860), разделяли на аликвоты по 1,5 мл и замораживали в жидком азоте. Образцы кондиционированной среды хранили при - 70^0С.

Анализ экспрессии маркеров МСК на поверхности клеток. Для того чтобы оценить содержание МСК в популяции культивируемых клеток, выделенных из жировой ткани, МСК-ЖТ 2 пассажа открепляли от поверхности культурального пластика с помощью раствора Версена и окрашивали антителами против CD14 (eBioscience, кат. № 14-0141-81), CD34 (BD Pharmingen, кат. № 555824), CD45 (BD Pharmingen, кат. № 340953), CD73 (BD Pharmingen, кат. № 550257), CD90 (BD Pharmingen, кат. № 555597), CD105 (BD Pharmingen, кат. № 560819), NG2 (Chemicon, кат. № ab5320) и PDGFRB (BD Pharmingen, кат. № 558821), конъюгированными с различными флуорохромами (см. рисунки в главе "Результаты"). В качестве отрицательного контроля использовали соответствующие изотипические иммуноглобулины. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного сортера клеток MoFlo (Dako Cytomation, Дания).

Оценка жизнеспособности клеток. Количество нежизнеспособных МСК-ЖТ оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по связыванию аннексина V, конъюгированного с фикоэритрином (AnnexinV–PE, BD Pharmingen, кат. № 556422), и накоплению красителя 7-аминоактиномицина D (7-AAD, BD Pharmingen, кат. № 559925). Для этого клетки открепляли от поверхности культурального пластика с помощью обработки раствором Версена, затем 100 мкл клеток в ФСБ (1–10x10^5 клеток/мл) инкубировали с AnnexinV-PE в течение 20 мин, отмывали буфером, прилагаемым к красителю, и добавляли 7-AAD на 5 мин. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного сортера клеток MoFlo (Dako Cytomation, Дания). Определяли долю клеток на ранних стадиях апоптоза ($AnnexinV^+$ $7\text{-}AAD^-$), а также содержание живых ($AnnexinV^-$ $7\text{-}AAD^-$) и мертвых клеток ($AnnexinV^+$ $7\text{-}AAD^+$).

Формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками на Матригеле. Ангиогенную активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ оценивали с помощью методики образования капилляроподобных структур на Матригеле, обедненном ростовыми факторами (Growth factors reduced Matrigel, BD Biosciences) эндотелиальными клетками пупочной вены человека

(HUVEC) или эндотелиальными клетками линии EA.hy926 (Aranda, E., Owen, G.I., 2009). Для этого предварительно депривированные в течение 18 часов эндотелиальные клетки вены пуповины человека (HUVEC) 2-4 пассажа или эндотелиальные клетки линии EA.hy926 высаживали на 48-луночный планшет, покрытый Матригелем, в количестве 2x104 клеток на лунку. Затем в каждую лунку добавляли кондиционированную среду от МСК-ЖТ (в случае HUVEC в соотношении 1:1 со средой роста HUVEC). Каждый образец кондиционированной среды использовали не менее чем в двух лунках. В качестве отрицательного контроля использовали среду роста эндотелиальных клеток, не содержащую сыворотку, в качестве положительного контроля – среду роста HUVEC, содержащую 20% ФБС, или DMEM с низким содержанием глюкозы с добавлением 50нг/мл VEGF человека. Планшет помещали в CO2-инкубатор при 37ºC на 24 ч, после чего анализировали образование капилляроподобных структур с помощью светового микроскопа (Leica, Германия). Суммарную длину трубчатых структур в 5 случайно выбранных полях зрения в каждой лунке подсчитывали на изображениях, полученных при использовании объектива x10, с помощью программы MetaMorph 5.0 (Universal Imaging).

Цитофлюориметрия в потоке для количественной оценки циркулирующих прогениторных клеток. Для исследования с помощью венепункции кубитальной вены собирали 10 мл крови пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта утром натощак, в положении больного сидя на стуле. В рамках данного исследования мы провели количественный анализ суммарной популяции $CD34^+$ клеток, включающей как гемопоэтические клетки-предшественники, так и предшественники эндотелиальных клеток. В ходе цитометрического анализа среди суммарной $CD34^+$ популяции обнаруживаются клетки с отсутствием экспрессии CD45 (CD45-), сравнительно низким уровнем CD45 (относительно зрелых лейкоцитов, CD45-Dim) и высоким уровнем экспрессии CD45. Клетки с высоким уровнем экспрессии CD45 достаточно хорошо отличимы от клеток с низким уровнем или отсутствием экспрессии, однако последние две субпопуляции часто не различимы. В связи с этим для анализа мы использовали объединенную популяцию из $CD34^+$ CD45 - и $CD34^+$ CD45-dim клеток.

Из образцов крови выделяли мононуклеарную фракцию с помощью раствора Hisopaque-1077 (Sigma-Aldrich, кат. № 10771) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные клетки ресуспендировали в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с 2% бычьим сывороточным альбумином (конечная концентрация ~ 108/мл). Клеточную суспензию разделяли на 2 пробы: 1) пробу для выявления предшественников (100 мкл), 2) пробу с изотипическими

контролями (50 мкл клеточной суспензии + 50 мкл ФСБ с 2% альбумином). Добавляли по 20 мкл на пробу флуоресцентно-меченные антитела и инкубировали в темном месте при легком перемешивании при комнатной температуре в течение 2 ч.

По истечении периода окраски антителами разбавляли каждую пробу ФБС до объема 1,5 мл и осаждали центрифугированием при ускорении 300g×10 мин, удаляли супернатант, ресуспендировали в 600 мкл ФСБ (300 мкл для изотипического контроля) и добавляли Хехст 33342 (Invitrogen кат № H21492) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали 20-90 мин при комнатной температуре.

Анализировали клетки на проточном цитофлюориметре/сортировщике MoFlo (Beckman Colter, США) с использованием возбуждения на длинах волн 355, 488 и 635 нм. При этом накапливали не менее 2 млн. Хехст-положительных событий для первой пробы и не менее 1 млн. - для пробы с изотипическими контролями. Анализ данных осуществлялся при помощи программного обеспечения цитометра, (Summit для Beckman Coulter и FACSDiva для BD) или специализированного программного обеспечения FlowJo (Treestar Inc, США).

Статистический анализ результатов. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ STATISTICA v. 8.0. и IBM SPSS Statistics 21. Определяли среднее значение и стандартное отклонение исследуемых количественных переменных, распределение которых существенно не отклонялось от нормального. Если распределение отклонялось от нормального, то для описания количественных признаков приводили медиану, интерквартильный размах, максимальное и минимальное значение. Для сравнительного анализа показателей в трех группах использовали ранговый непараметрический Н-критерий Краскела-Уоллеса. Для попарного сравнения применяли U-критерий Манна-Уитни. Описание качественных данных проводилось путем построения таблиц сопряженности с указанием абсолютных и относительных частот встречаемости признаков. Попарное сравнение частот встречаемости признаков в группах проводили при помощи χ^2 - критерия.

Для описания качественных признаков использовали анализ таблиц сопряженности 2x3 (критерий χ^2-квадрат), анализ таблиц сопряженности 2x2 проводили двусторонним точным критерием Фишера. Для проведения корреляционного анализа был использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Для выявления вероятных предикторов неблагоприятного течения ИБС и ХСН применяли отношение шансов при указанном значении исследованной

переменной в сравнении с отсутствием этого значения, для которого строились 95% доверительные интервалы.

Статистическую значимость в модели бинарной логистической регрессии каждого из включенных параметров оценивали по критерию Вальда, для которого также рассчитывалось точное p - значение.

Для оценки прогностического влияния факторов был выполнен ROC анализ. В зависимости от значения медианы количественных показателей строились кривые Каплана-Майера с анализом достоверности различий при помощи теста log-rank.

Уровень значимости для всех критериев принимали равным 0,05. В диссертации приведены точные p-значения для каждой вычисленной критериальной статистики до третьего знака после запятой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) при моделировании этих нарушений in vitro на функциональные характеристики МСК ЖТ

Для того, чтобы выяснить, насколько метаболические нарушения, характерные для ИБС и диабета (гипергликемия и гиперлипидемия) могут изменять функции стволовых и прогениторных клеток, мы исследовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани. МСК обнаружены не только в ткани костного мозга и в жировой ткани, но присутствуют практически во всех тканях организма, локализуясь в стенке сосудов. Сегодня МСК считаются одним из самых перспективных типов постнатальных прогениторных клеток для регенеративной медицины благодаря их способности стимулировать ангио-артериогенез, рост нервных окончаний, регулировать иммунные реакции за счет секреции широчайшего спектра биологически активных молекул и внеклеточных везикул. Поскольку МСК локализованы периэндотелиально и в адвентиции сосудов, адекватная функциональная активность этих клеток необходима для нормального роста и обновления сосудов, а ее изменение в условиях гипергликемии и гиперлипидемии может значительно нарушать эти процессы.

Для выяснения возможных механизмов влияния таких метаболических нарушений на функции МСК-ЖТ, мы провели сравнительный анализ ключевых характеристик этих клеток при их культивировании в условиях, моделирующих нормо- и гипергликемию и гиперлипидемию.

Влияние гипергликемии in vitro на МСК ЖТ

Ранее было показано, что МСК ЖТ стимулируют рост кровеносных сосудов посредством продукции цитокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток (Е.В. Парфенова, 2007; К.А.

Рубина, 2010; П.И. Макаревич, 2015). Чтобы выяснить, как повышенная концентрация глюкозы влияет на ангиогенные свойства МСК, мы проанализировали влияние суммарных продуктов секреции МСК ЖТ (кондиционированной этими клетками среды), культивированных в условиях, моделирующих гипер- и нормогликемию, на формирование капилляроподобных структур ЭК in vitro. Было показано, что кондиционированная среда МСК ЖТ, культивированных при 25 мМ глюкозы в 3 раза меньше стимулировала формирование сосудистых структур in vitro, чем среда МСК-ЖТ, культивированных при 5,5 мМ глюкозы.

Рисунок 1 показывает, что суммарная длина капилляроподобных структур, сформированных ЭК в присутствии кондиционированной среды МСК ЖТ, культивируемых в условиях 25 мМ глюкозы, составила 5,3±0,9 ОЕ, по сравнению с 15,3±2,2 ОЕ, формирующихся в присутствии кондиционированной среды клеток, культивированных при 5,5 мМ глюкозы (n=9; p=0,001).

Таким образом, длительное культивирование МСК ЖТ при повышенной концентрации глюкозы, подавляет способность продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез.

Для выяснения механизма подавляющего влияния гипергликемии на ангиогенный потенциал продуктов секреции МСК ЖТ мы исследовали экспрессию генов в клетках, культивированных при различных концентрациях глюкозы.

Было обнаружено, что высокая концентрация глюкозы (25 мМ) вызывала в МСК-ЖТ изменение экспрессии ряда генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза. В частности, культивирование МСК ЖТ в условиях, моделирующих гипергликемию, вызывало повышение экспрессии тканевого ингибитора металлопротеаз-3 (в 2,6 раза; p=0,03 по сравнению с нормогликемией) при тенденции к снижению экспрессии металлопротеазы-9 (в 2,4 раза; p=0,1 по сравнению с нормогликемией). В тоже время экспрессия генов лептина - проангиогенного, провоспалительного и атерогенного адипокина, фактора некроза опухоли-альфа (TNFα) - основного провоспалительного цитокина, плазминогена, предшественника плазмина, протеазы широкой специфичности и ангиопоэтин-подобного фактора 3 (ANGPTL3) значительно повышалась. Однако нам не удалось выявить значимых изменений экспрессии основных ангиогенных факторов и их рецепторов при культивировании МСК ЖТ в условиях повышенной концентрации глюкозы.

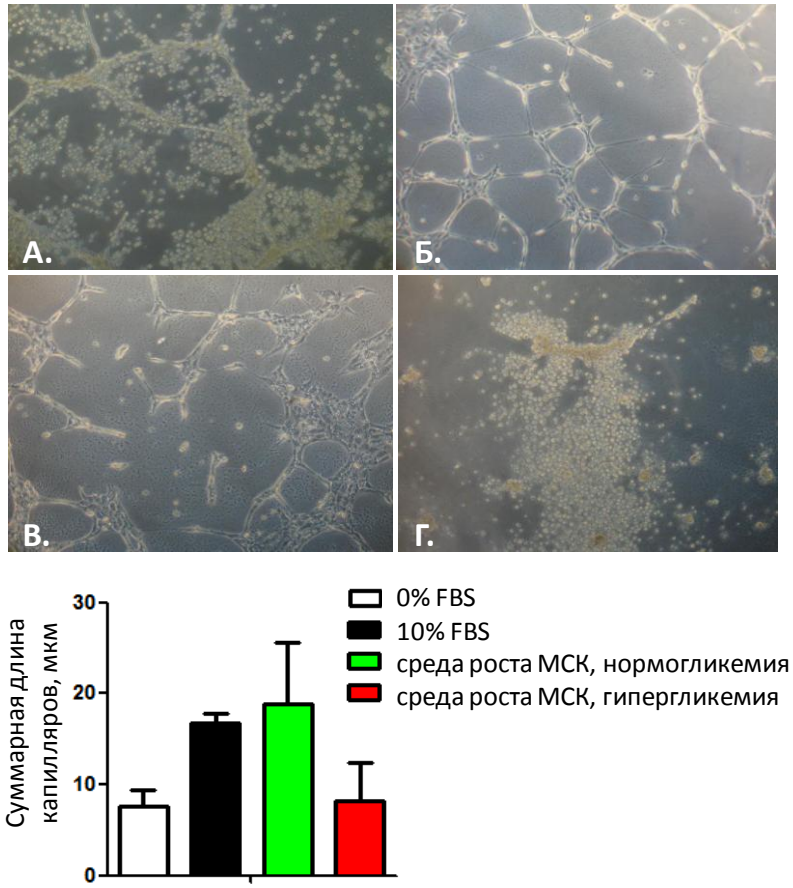

Рисунок 1 – Формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками под влиянием кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток. А - Г – Репрезентативные микрофотографии капилляров, сформированных эндотелиальными клетками на Матригеле. А – Капилляры, образованные эндотелиальными клетками в отсутствии FBS. Б – Капилляры, образованные эндотелиальными клетками в присутствии 10% FBS. В – Капилляры, образованные эндотелиальными клетками под действием кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток, культивированных при нормальной концентрации глюкозы 5,5 мМ. Г – Капилляры, сформированные эндотелиальными клетками, под действием кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток, культивированных при повышенной концентрации глюкозы 25 мМ. Фазовый контраст, об. х10. Результаты морфометрического анализа суммарной длины капилляроподобных структур суммированы на диаграмме

Пытаясь найти объяснение тому, что способность суммарных продуктов секреции МСК ЖТ стимулировать ангиогенез in vitro значительно снижается, мы обратили внимание на повышение экспрессии плазминогена. Известно, что в опухолях значительное повышение экспрессии плазминогена приводит к параллельному возрастанию активности матриксных металлопротеиназ, которые расщепляют плазминоген с образованием мощного ингибитора ангиогенеза - ангиостатина. Нельзя исключить, что повышение экспрессии плазминогена в МСК ЖТ также может приводить к образованию ангиостатина, подавляющего ангиогенез. Помимо этого, уменьшение ангиогенной активности продуктов секреции МСК ЖТ может быть обусловлено сочетанным

повышением экспрессии и, вероятно, секреции этими клетками TNFα и ANGPTL3, которые при совместном нанесении на эндотелиальные клетки вызывают их апоптоз.

Эти данные указывают на то, что в условиях повышенной концентрации глюкозы в МСК ЖТ изменяется экспрессия целого ряда генов, продукты которых вовлечены в регуляцию роста и ремоделирования сосудов.

Таким образом, возможно, что наблюдаемое подавление ангиогенных свойств кондиционированной среды МСК обусловлено влиянием повышенной концентрации глюкозы на экспрессию и секрецию комплекса факторов, участвующих в регуляции ангиогенеза.

Влияние гиперлипидемии на жизнеспособность МСК ЖТ in vitro

Дополнительным фактором, который может влиять на функции МСК у больных ИБС, могут быть нарушения липидного обмена. Мы исследовали влияние нативных и окисленных ЛПНП на МСК ЖТ как клеточной мишени повреждающего действия факторов риска развития атеросклероза, лежащего в основе ИБС и ишемической ХСН.

Эксперименты проводили как в условиях без депривации (в присутствии 10% stem cell growth supplement), моделируя in vitro условия, в которых функционируют нативные и окисленные ЛПНП in vivo (рисунок 2А), так и в условиях депривации МСК (0% stem cell growth supplement) (рисунок 2Б). Было обнаружено, что в условиях без депривации нативные ЛПНП не оказывают влияния на жизнеспособность МСК, а окисленные ЛПНП на 30-35% уменьшают количество живых клеток в культуре по данным цитофлюориметрии. Наблюдаемое снижение жизнеспособности МСК, вероятно, обусловлено цитотоксическим эффектом окисленных ЛПНП, что документировано и для других типов клеток. При культивировании МСК-ЖТ в среде без сыворотки (0% stem cell growth supplement) действие нативных и окисленных ЛПНП на живые клетки также различалось (рисунок 2).

Обнаружено, что нативные ЛПНП повышают жизнеспособность клеток. Этот эффект называют "сывороткоподобным" или "нутритивным". Окисленные ЛПНП показывают подобный же эффект, но в существенно больших концентрациях, чем нативные ЛПНП. Поскольку мы применяли ЛПНП, окисленные методом автоокисления, т.е. частичное окисление ЛПНП, то проявляется, по-видимому, их двойное действие - как нутритивное, характерное для нативных ЛПНП, так и токсическое, характерное для окисленных ЛПНП.

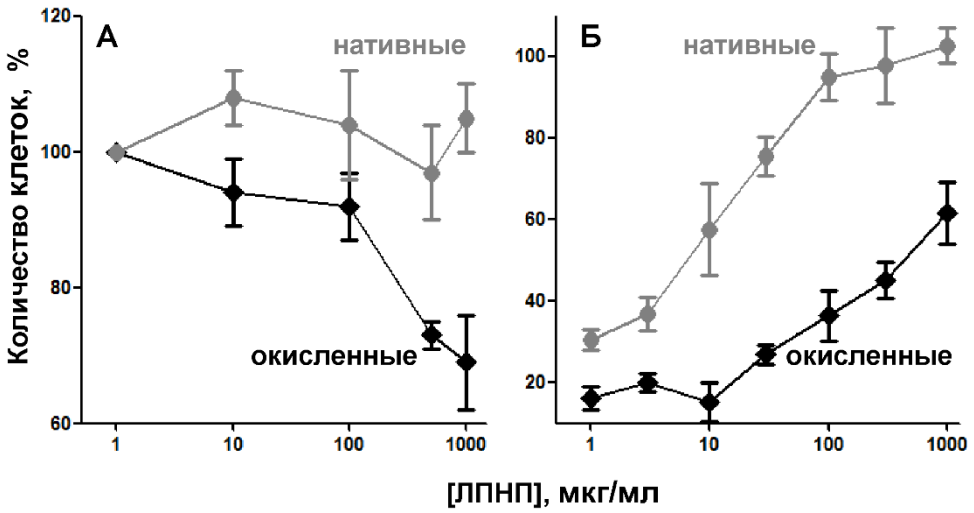

Рисунок 2 – Влияние нативных (1) и окисленных (2) липопротеинов низкой плотности на количество живых клеток в культуре в условиях без депривации (А) и в условиях депривации (Б). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МСК-ЖТ могут являться мишенями для повреждающего действия окисленных ЛПНП. Учитывая, что МСК имеют перицитарный фенотип и многие свойства перицитов, полученные данные могут отражать повреждающее действие окисленных ЛПНП на перициты сосудистой стенки. С другой стороны, если рассматривать МСК ЖТ в качестве "инструмента" для клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, то действие окисленных ЛПНП на эти клетки может способствовать снижению терапевтического потенциала МСК ЖТ у больных ишемической болезнью и другими сердечно-сосудистыми заболеваниями с гиперлипидемией. Окисленные ЛПНП, содержание которых в плазме крови больных, страдающих гиперлипидемией, повышено, могут снижать содержание МСК в тканях, а также влиять на перициты в стенках сосудов, тем самым ослабляя их участие в процессах регенерации/репарации.

Полученные в этой части работы результаты послужили основой для оценки ангиогенных свойств МСК-ЖТ, изолированных у больных ИБС и СД2 и наличием соответствующих метаболических факторов риска (гипергликемии и дислипидемии).

Ангиогенные свойства МСК ЖТ у больных ИБС в сочетании с СД2 типа

Многочисленными исследованиями показано, что МСК ЖТ обладают выраженным ангиогенным и регенеративным эффектом при трансплантации в ишемизированные ткани, в том числе и в миокард как экспериментальных животных, так и человека (H. Yu et al., 2017). Основными механизмом ангиогенного и регенеративного действия этих клеток считается их способность секретировать широчайших спектр биологически активных молекул, включающий факторы роста, цитокины и хемокины, протеазы,

нейротрофические факторы (D. Pankajakshan, 2014; A. Langrzyk, 2017). Принимая это во внимание мы исследовали способность МСК-ЖТ, полученных от больных ИБС с сопутствующим СД2 и без него, стимулировать ангиогенез в модели in vitro. Для оценки ангиогенного потенциала паракринной активности этих клеток кондиционированная ими среда, содержащая суммарные продукты их секреции, наносилась на эндотелиальные клетки, помещенные на Матригель, на котором они способны формировать сосудоподобные структуры, а затем по увеличению этих структур оценивался стимулирующий ангиогенный эффект. Было обнаружено, что продукты секреции МСК ЖТ больных ИБС, как с СД2, так и без него, значительно в меньшей степени (более, чем в два раза) стимулируют формирование сосудоподобных структур на Матригеле (рисунок 3).

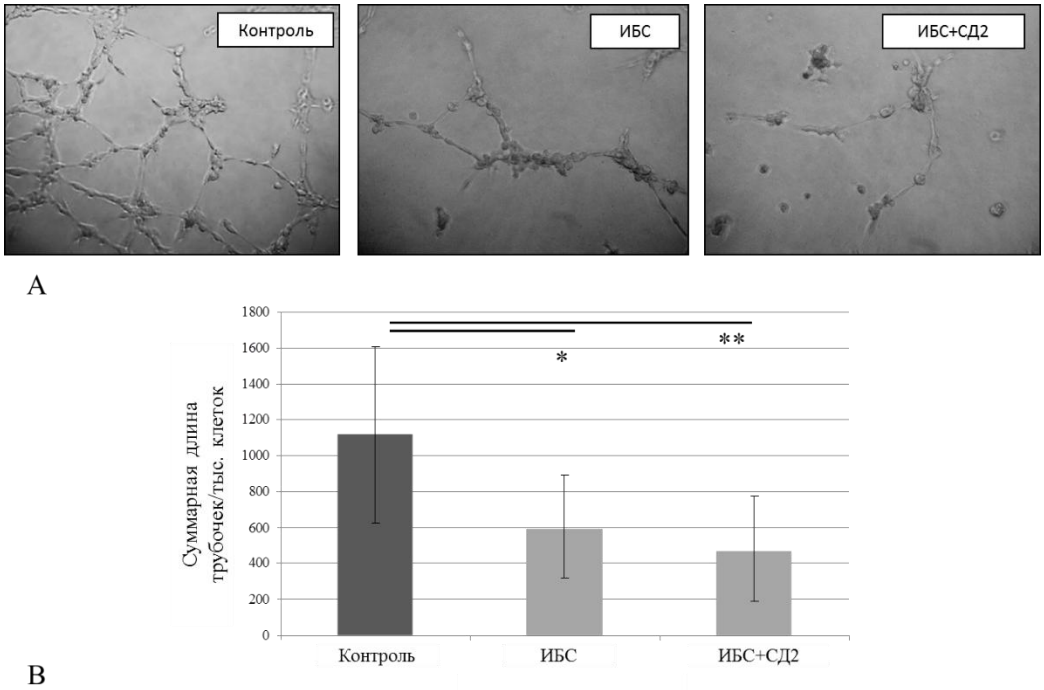

Рисунок 3 – Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа in vitro. А – Репрезентативные микрофотографии образования тубулярных структур эндотелиальными клетками линии EA.hy926 на Матригеле в присутствии кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани лиц контрольной группы, больных ишемической болезнью сердца и ишемической болезнью сердца, сочетанной с диабетом 2 типа. В – Суммарная длина тубулярных структур для мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, изолированых от лиц контрольной группы, больных ишемической болезнью сердца и ишемической болезнью сердца, сочетанной с сахарным диабетом 2 типа

Данные представлены как медиана и перцентили ((25-75%), *p = 0,03, **p = 0,017)

Чтобы выяснить, какие ангиогенные факторы ответственны за снижение ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК ЖТ, методом real-time ПЦР был проведен анализ экспрессии генов, вовлеченых в регуляцию ангиогенеза, а методом ИФА - анализ содержания продуктов этих генов.

Оказалось, что экспрессия и секреция таких ключевых ангиогенных факторов роста как, VEGF, HGF, PIGF была повышена у больных ИБС и ИБС, в сочетании с СД2 в сравнении с контрольной группой (рисунок 4). В то же время, экспрессия и секреция основного фактора роста фибробластов (bFGF), ангиопоэтина-1 и ангиогенина в исследуемых группах не различалась (данные не представлены).

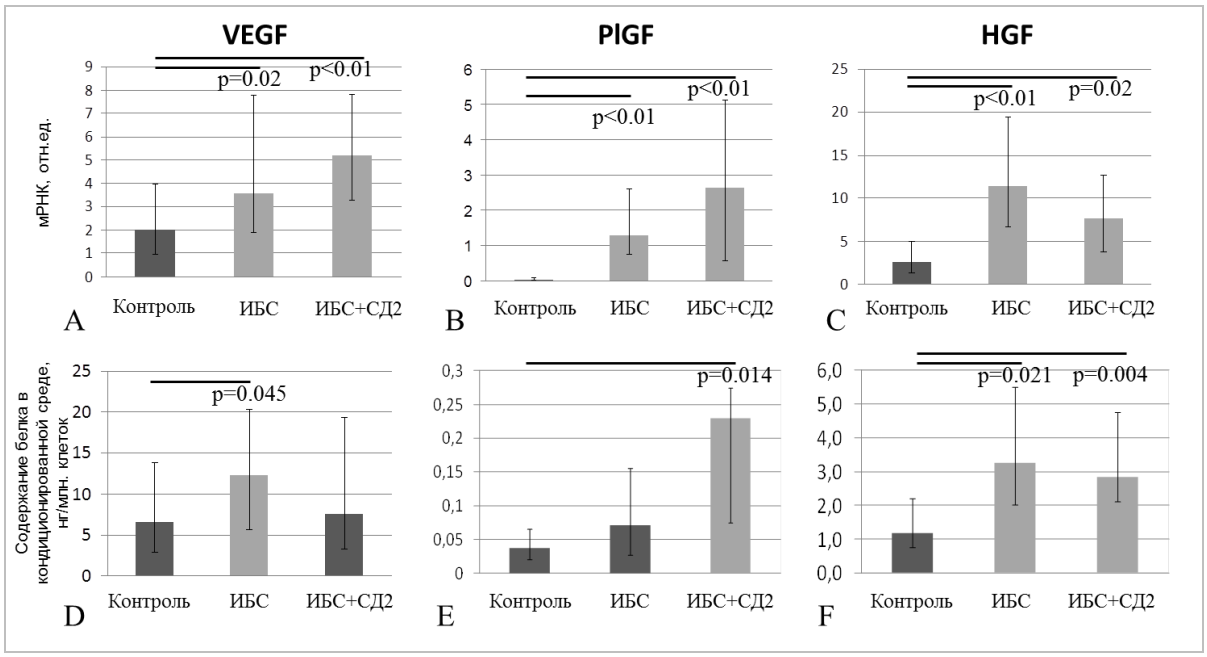

Рисунок 4 – Продукция проангиогенных факторов роста мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани, изолированными у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа. (A-C) Экспрессия гена VEGF (A), PIGF (B) и HGF (C) в мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани в исследованных группах, (мРНК, отн.ед.). (D-F). Концентрация VEGF (D), PIGF (E) и HGF (F) в кондиционированной среде мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в исследованных группах, нг/млн.клеток. Данные представлены как медиана и перцентили (25%-75%)

В тоже время, мы обнаружили значительное увеличение экспрессии ингибиторов ангиогенеза - тромбоспондина 1 и ингибитора активаторов плазминогена -1 (PAI-1). Экспрессия и секреция PAI-1 превышала значения в контрольной группе в 3-8 раз, что было значительно больше, чем степень повышения ангиогенных факторов. Поскольку процессы ангиогенеза и регенерации тканей в целом осуществляются благодаря изменению баланса проангиогенных и антиангиогенных факторов в сторону ангиогенных, мы предположили, что высокая продукция ингибиторов ангиогенеза, в частности,

PAI-1, может нивелировать ангиогенные эффекты повышения секреции ангиогенных факторов роста.

Известно, что помимо ангиогенных факторов роста для адекватного ангиогенеза важным этапом в процессе регенерации тканей является ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ). Ремоделирование ВМК является координированным процессом направленной миграции клеток, их инкорпорации в формирующиеся сосуды и регулируется многими факторами, среди которых наибольшее значение имеют урокиназа (uPA) и ее рецептор (uPAR), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) и матриксные металлопротеиназы (MMP). Помимо этого урокиназа и активируемый ею каскад протеолитических реакций важны для активации многих ангиогенных факторов роста, которые секретируются клетками в неактивном состоянии. Повышенная секреция PAI-1 может ингибировать это звено ангиогенеза. Для подтверждения этой гипотезы мы использовали подавление активности PAI-1 с помощью антител.

Было обнаружено, что блокирование PAI частично, но статистически значимо способствовало восстановлению ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСКЖТ больных ИБС и диабетом (рисунок 5).

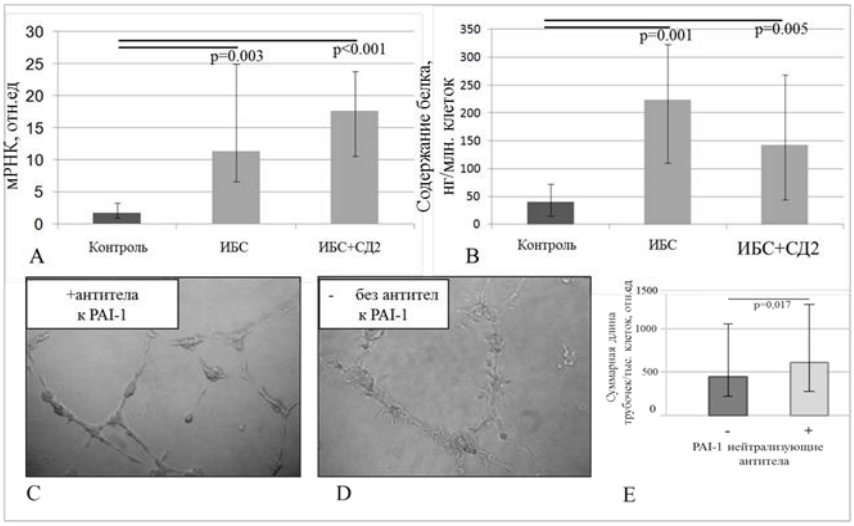

Рисунок 5 – Влияние PAI-1 на ангиогенную активность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа. A – Экспрессия гена PAI-1 в мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани. B – Содержание белка в кондиционированной среде в исследуемых группах. Данные представлены как медиана, 25% и 75 перцентили. C.-D – Репрезентативные микрофотографии капилляроподобных структур, формируемых эндотелиальными клетками линии EA.hy926 на Матригеле в присутствии кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани больных ишемической болезнью сердца с (C) или без (D) PAI-1 нейтрализующих антител (5 мкг/мл). E – Суммарная длина капилляроподобных структур в отсутствии и присутствии PAI-1 нейтрализующих антител (5 мкг/мл) в кондиционированной среде мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

Таким образом, у больных ИБС и в большей степени, у больных ИБС и сопутствующим СД2 ангиогенный потенциал МСК-ЖТ снижен за счет нарушения баланса между ангиогенными и антиангиогенными факторами.

Для того, чтобы выяснить влияние СД2 на другой тип клеток сосудов, а именно, циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток у больных ИБС и ишемической ХСН, было проведено проспективное исследование, в ходе которого была изучена связь течения ИБС и сердечной недостаточности и уровнем циркулирующих прогениторных клеток.

Клинико-биохимические особенности больных с ишемической ХСН и сопутствующим СД2 типа, включенных в проспективное исследование

Анализ параметров ЭХО-КГ показал, что у больных ХСН в сочетании с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 наблюдались более выраженные признаки ДД при сопоставимой степени снижения систолической функции ЛЖ, что может быть связано как с различием в скорости активного расслабления ЛЖ, так и различием в податливости ЛЖ. Поскольку эти две группы больных ХСН оказались сопоставимы по всем показателям, отражающим скорость активного расслабления ЛЖ и различались по показателям, отражающим податливость/давление наполнения ЛЖ, различие между группами по степени диастолической дисфункции (ДД) связано именно с различным состоянием пассивных свойств миокарда ЛЖ (менее податливым ЛЖ в группе ХСН с сопутствующим СД2). Кроме этого, у больных ХСН с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 обнаружен больший размер и объем левого предсердия, что также свидетельствует о более выраженной ДД ЛЖ у больных ХСН сопутствующим СД2.

Сравнительный анализ степени ДД ЛЖ у больных ХСН обнаружил более выраженную ДД, а также большую частоту мерцательной аритмии в группе больных ХСН в сочетании с СД2 (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительный анализ степени диастолической дисфункции у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью

Степень диастолической дисфункции ЛЖ	ХСН, n=30	ХСН+СД2, n=25	p-value
Ia, n (%)	8 (25,8)	0 (0)	**0,007**
Ib, n (%)	17 (54,8)	7(29,2)	0,056
II, n (%)	1(3,2)	3 (12,5)	0,189
III, n (%)	4 (12,5)	4 (16,7)	0,694
IV, n (%)	0 (0)	1 (4,2)	0,251
Мерцательная аритмия, n (%)	0 (0)	4 (16,7)	**0,018**
Выраженная ДД (II-IV ст., мерцательная аритмия), n (%)	5 (16,1)	12 (50)	**0,007**

Таким образом сопутствующий СД2 у больных ишемической ХСН ассоциируется с большей тяжестью ДД ЛЖ., что согласуется с данными других работ (Ф.Т. Агеев 2010; В.Ю. Мареев, 2013).

Было также обнаружено, что, несмотря на достаточно высокую сывороточную активность как MR-proANP, так и NT-proBNP, даже на фоне стандартной терапии ХСН нейрогуморальными модуляторами, уровень циркулирующего эндотелина-1 также оставался высоким (таблица 3). Это позволяет предполагать, что повышенная сывороточная активность системы натрийуретических пептидов у больных ишемической ХСН в сочетании с СД2 не компенсирует высокую сывороточную активность эндотелина-1.

Таблица 3 – Результаты сравнительного анализа MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 в исследуемых группах

Показатель	группа сравнения, n=25 (1)	ХСН, n=30 (2)	ХСН+СД2, n=25 (3)	СД2, n=32 (4)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{1-4}	p_{2-3}	p_{2-4}	p_{3-4}
MR-proANP, пг/мл	56,2 [46,2:72,1]	122 [94,4:193,2]	165,7 [119,6:296,4]	93,9 [42,5:118,2]	<0,001	<0,001	0,293	0,143	0,020	0,001
NT-proBNP, пг/мл	39,1 [21,9:48,5]	365,3 [203,7:732,0]	757,4 [348,6:1892,0]	87,4 [31,9:172,4]	<0,001	<0,001	0,030	0,003	<0,001	<0,001
Эндотелин-1, пг/мл	432,1 [358,0:543,4]	497,3 [422,9:628,8]	793,4 [566,8:1142,4]	558,8 [443,0:712,7]	0,143	0,001	0,013	0,005	0,227	0,009

Принимая во внимание тот факт, что эндотелин-1 является функциональным антагонистом натрийуретических пептидов, есть вероятность того, что хронические эффекты эндотелина-1 у больных ХСН преобладают над благоприятными компенсаторными реакциями НУП на сердечно-сосудистую систему и отягощают течение сердечной недостаточности, несмотря на многокомпонентную патогенетическую терапию у больных ХСН. Более того, мы обнаружили, что уровень циркулирующего эндотелина-1 прямо коррелировал с тяжестью ДД ЛЖ ($r=0,6$, $p<0,0001$), (таблица 4).

Полученные в этой части работы результаты не противоречат существующим представлениям о дисбалансе системы НУП и эндотелиновой системы у больных с ХСН (А.Г. Овчинников, 2013; D. Javier, 2016). В настоящее время влияние эндотелина-1 на клетки сосудов и деятельность ССС окончательно не выяснено. Можно предполагать, что у больных с постинфарктной систолической СН высокий уровень эндотелина-1 способствует прогрессированию диастолической СН за счет подавления продукции оксида азота эндотелиальными клетками и усугубления

эндотелиальной дисфункции на уровне микроциркуляторного русла миокарда ЛЖ, что, безусловно, требует экспериментальных подтверждений.

Таблица 4 – Результаты анализа уровней циркулирующего эндотелина-1 в объединенной группе больных с хронической сердечной недостаточностью в зависимости от степени диастолической дисфункции левого желудочка

Эндотелин-1, пг/мл					
Незначительная ДД ЛЖ (1) n=31	Умеренная ДД ЛЖ (2) n=12	Тяжелая ДД ЛЖ (3) n=12	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
527,4 [422,9:689,7]	811,5 [574,6:1072,9]	1016,4 [660,6:1203,2]	0,014	0,046	0,429

Таким образом, можно предполагать, что важнейшее компенсаторное звено - система натрийуретичеких пептидов у больных ХСН и особенно в сочетании с СД2 типа, не компенсирует неблагоприятные эффекты повышенного эндотелина-1 (вазоконстрикция, профиброгенное действие, ремоделирование миокарда и др.).

Анализ содержания ангиогенных факторов в периферической крови больных исследуемых групп показал, что уровень основного стимулятора ангиогенеза - фактора роста эндотелия сосудов VEGF был повышен в сопоставлении с группой сравнения только в группах больных с сахарным диабетом (ХСН+СД2 и СД2), но не отличался достоверно в больных ХСН без сопутствующего СД2 (рисунок 6). При оценке циркулирующей растворимой фракции рецептора первого типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1) оказалось, что его наименьшее содержание отмечалось в группе больных ХСН без диабета и в сопоставлении с группой сравнения статистически значимо было ниже (p=0,0069). Напротив, в группе больных ХСН в сочетании с сахарным диабетом, также как и у больных диабетом без сердечной недостаточности в сравнении с больными группы ХСН без диабета уровень VEGFR1 был значимо выше (p=0,0037 и p=0,0001, соответственно).

Обнаруженное повышение sVEGFR1 в периферической крови больных диабетом может носить компенсаторный характер в ответ на повышение циркулирующего VEGF. В литературе мы не обнаружили единой интерпретации повышенного уровня sVEGFR1 и VEGF у больных СД2. Принимая во внимание, что VEGF является ключевым фактором, стимулирующим миграцию эндотелиальных клеток и их предшественников в зону повреждения, большинство исследователей объясняют повышение VEGF

у больных ХСН наличием атеросклероза, хронической ишемии и повышенной потребностью эндотелия у больных диабетом в обновлении.

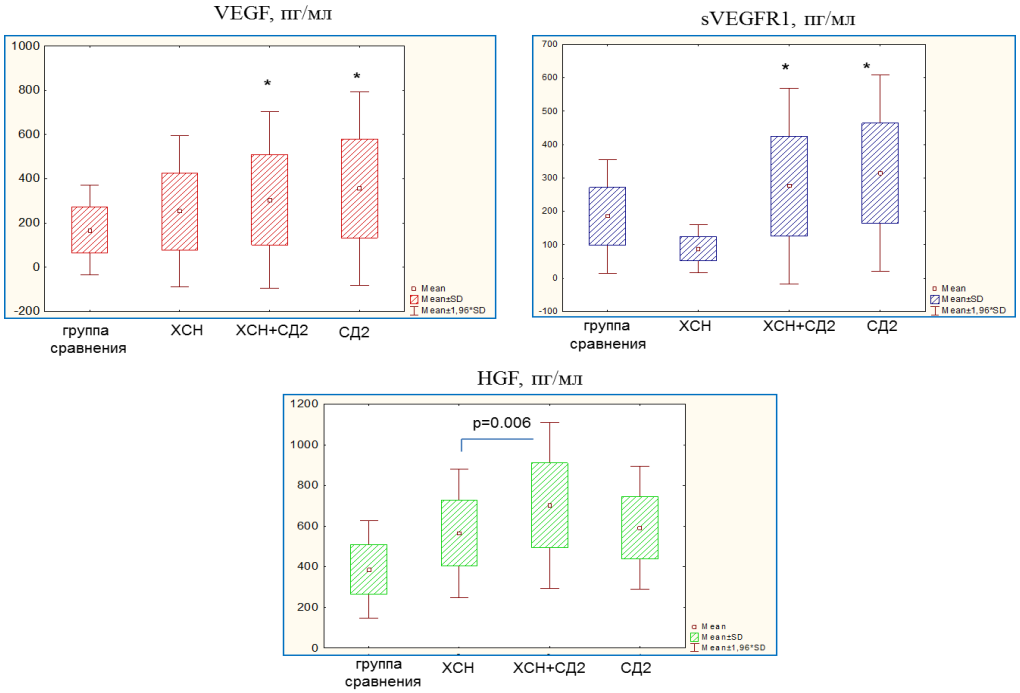

Рисунок 6 – Циркулирующие ангиогенные факторы роста VEGF, sVEGFR1 и HGF у больных хронической сердечной недостаточностью
(p* <0.05 по отношению к группе сравнения)

Анализ циркулирующего HGF показал, что его содержание у больных всех групп больше, чем в группе сравнения. У больных ХСН и ХСН в сочетании с СД2, а также больных СД2 без ИБС и ХСН наблюдалось статистически значимое повышение уровня HGF в периферической крови. Примечательно и то, что у больных ХСН в сочетании с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 уровень HGF был статистически значимо выше, что может отражать вклад диабета per se в увеличение экспрессии исследуемого фактора.

Полученные нами данные о более высокой концентрации HGF в периферической крови у больных с ишемической ХСН и сопутствующим СД2 с более выраженными нарушениями функции сердца позволяют рассматривать повышение HGF при ХСН как вероятный компенсаторный механизм, направленный на улучшение функции миокарда и его кровоснабжения. Остается неясным источник повышения HGF в циркуляции: является ли им только поврежденный миокард или также и другие ткани, например, жировая ткань. Для ответа на этот вопрос нужны экспериментальные исследования. Возможно, при ХСН HGF может выполнять защитные функции подобно натрийуретическим пептидам (ANP, BNP, NT-proBNP), которые секретируются в ответ на механическое растяжение кардиомиоцитов, стимулируют натрийурез и уменьшение объемной нагрузки на миокард, подавляют пролиферацию

фибробластов и предотвращают неблагоприятное ремоделирование миокарда (Hiroyuki, K., 2014; Lamblin, N., 2011).

Таким образом, при ХСН повышение уровня HGF в периферической крови может быть следствием как самой ХСН и нарушенной функции сердца, так и в случае сочетанной патологии следствием сопутствующих нарушений углеводного и жирового обмена. Все эти данные указывают на возможную роль HGF в патогенезе кардиометаболических заболеваний.

Только в группе больных с ХСН и сопутствующим СД2 мы обнаружили корреляционные связи исследованных ангиогенных факторов с показателями углеводного обмена (VEGF & HbA1c%, r=0,28, p=0,011; sVEGFR1& глюкоза плазмы натощак, r=0,52, p=0,015; sVEGFR1& HbA1c%, r=0,6, p=0,003; HGF & HbA1c%, r= 0,53, p=0,031).

Таким образом, у больных с ХСН и сопутствующим СД2 наблюдается напряжение системы ангиогенеза, которая является неотъемлемой частью системы регенерации и репаративных процессов, сопряженных с реваскуляризацией тканей при ишемическом повреждении.

В работе были исследованы циркулирующие концентрации адипокинов (лептин, общий и высокомолекулярный адипонектин), которые в настоящее время рассматриваются как факторы, участвующие в кардиопротекции при его ишемии. Анализ показал, что у больных ХСН в сочетании с СД2 на фоне ожирения I-II степени и гиперлептинемии обнаруживается снижение концентрации циркулирущего высокомолекулярного адипонектина, хотя при сердечной недостаточности ишемического генеза наоборот, наблюдается его компенсаторное повышение, препятствующее гибели кардиомиоцитов, формированию интерстициального фиброза и ремоделированию миокарда (I. Nigro et al., 2014; G. Balsan et al., 2015; S. Hogas et al., 2017).

Таким образом, наличие сопутствующего СД2 у больных с ХСН ассоциируется с отсутствием характерного для больных сердечной недостаточностью повышения высокомолекулярного адипонектина. Такое снижение адипонектина на фоне имеющейся недостаточной активности натрийуретических пептидов и гиперэндотелинемии у больных ХСН в сочетании с СД2 может отражать несостоятельность еще одного компенсаторного звена, участвующего в кардиопротекции при сердечной недостаточности ишемического генеза.

Циркулирующие прогениторные клетки у больных с ишемической ХСН и сопутствующим СД2 типа

Учитывая, что ЦПК участвуют в процессах репарации сосудов после ишемического повреждения, мы предположили, что у больных с ХСН их число может отражать тяжесть сердечной недостаточности.

Результаты показали, что наибольшее количество ЦПК определялось в группе сравнения, без ССЗ и у больных с ХСН без сопутствующего СД2, а наименьшее - у больных с ХСН в сочетании с СД2 и СД2 без ХСН (таблица 5).

Таблица 5 – Количество циркулирующих прогениторных клеток в обследованных группах

Количество ЦПК (CD 34^+ клеток/млн. лейкоцитов)			
группа сравнения (1) n=25	ХСН (2) n=30	ХСН+СД2 (3) n=25	СД2 без ХСН (4) n=32
594,0 [436,5:850,5]	730,0 [454,0:1160,0]	350,0 [200,0:579,0]	398,0 [248:810,0]

Примечание: $p^{1-2} = 0,993$; $p^{1-3} < 0,002$; $p^{1-4} = 0,029$; $p^{2-3} = 0,001$; $p^{2-4} = 0,066$; $p^{3-4} = 0,322$.

У больных с ХСН без сопутствующего СД2 усредненное количество ЦПК было выше, чем в группе сравнения, однако эти различия не были статистически значимыми из-за выраженного разброса показателей в группе больных ИБС с ХСН. В то же время, в обеих группах больных СД2 количество стволовых/прогениторных клеток в циркуляции было статистически значимо меньшим, чем в группе сравнения без ИБС и СД2 и в группе больных ИБС с ХСН. Это позволяет предполагать, что именно диабет является причиной снижения количества ЦПК.

В поисках объяснения обнаруженных различий между группами больных мы проанализировали связь количества ЦПК с тяжестью сердечной недостаточности. Оказалось, что количественное содержание прогениторных клеток в периферической крови не зависит от ФК сердечной недостаточности, как в объединенной группе больных ХСН, так и в отдельно взятых группах ХСН и ХСН и сопутствующим СД2, хотя в некоторых исследованиях такая связь была продемонстрирована

Дальнейший анализ показал, что количество ЦПК суммарной фракции $CD34^+$, которые являются предшественниками эндотелиальных клеток и участвуют в репарации эндотелия, в объединенной группе всех участников исследования статистически значимо обратно коррелирует с уровнем глюкозы плазмы натощак ($r=-0,38$, $p=0,0003$) и гликозилированного гемоглобина ($r=-0,49$, $p<0,0001$).

Корреляционная зависимость между этими параметрами сохранялась и в объединенной группе больных диабетом (ХСН, в сочетании с СД2 и СД2 без ХСН), но несколько меньшей силы, что вполне закономерно при исключении из анализа группы сравнения и больных ИБС без СД2, имеющих нормальные уровни показателей углеводного обмена (рисунок 7).

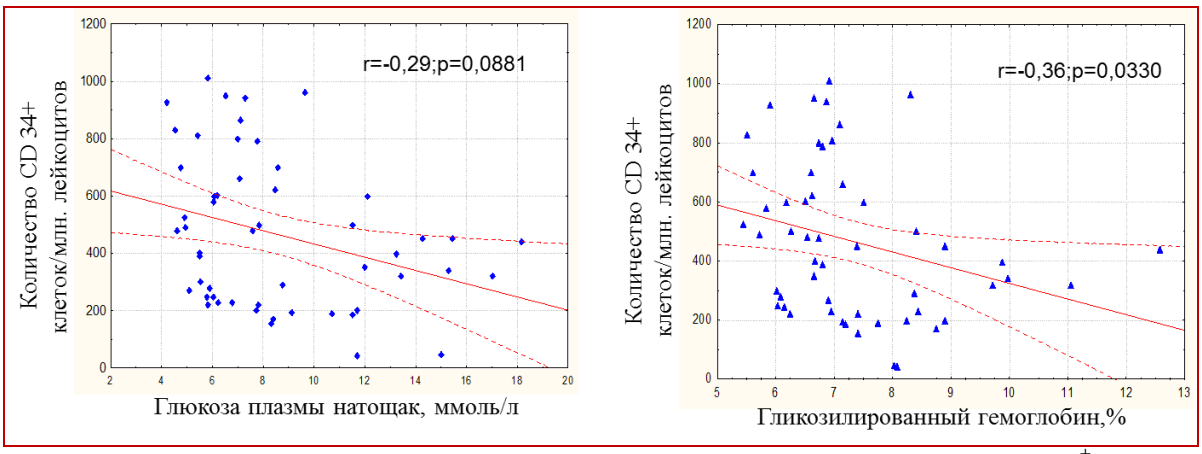

Рисунок 7 – Корреляционные связи между количеством циркулирующих $CD34^+$ клеток и уровнем глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина у больных диабетом

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных диабетом количество циркулирующих стволовых/прогениторных $CD34^+$ клеток зависит от эффективности контроля гликемии. Сравнительный анализ показал, что у больных СД2 типа и уровнем HbA1c <7% (HbA1c=6,5±0,10%) в сравнении с больными СД2 типа и уровнем HbA1c >7% (HbA1c=8,7±0,32%) количество ЦПК составило 480,0 [350,0-660,0]/млн. лейкоцитов, что было больше в 2 раза, чем у больных с неудовлетворительным контролем гликемии, у которых количество ЦПК составило 220,0 [150,0-341,0]/ млн. лейкоцитов (рисунок 8).

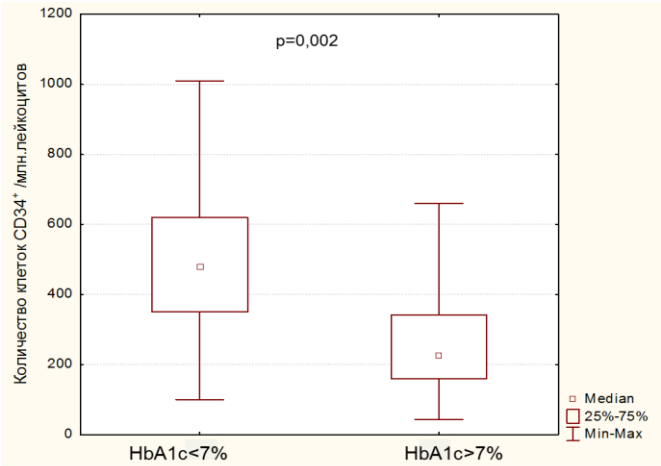

Рисунок 8 – Количество $CD34^+$ циркулирующих прогениторных клеток у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от уровня гликозилированного гемоглобина

В качестве контроля на влияние именно гипергликемии на количество циркулирующих прогениторных клеток мы исследовали больных СД1 типа, который в сравнении с СД2 типа представляет собой более "чистую" клиническую модель метаболических нарушений, поскольку характерен для лиц более молодого возраста и имеющих меньшее количество

модифицируемых факторов риска, которые могли бы повлиять на уровень ЦПК в периферической крови.

Мы обнаружили, что у больных СД1 типа в сравнении со здоровыми добровольцами того же пола и возраста количество ЦПК так же снижено и обратно коррелирует с уровнем гликозилированного гемоглобина (рисунок 9).

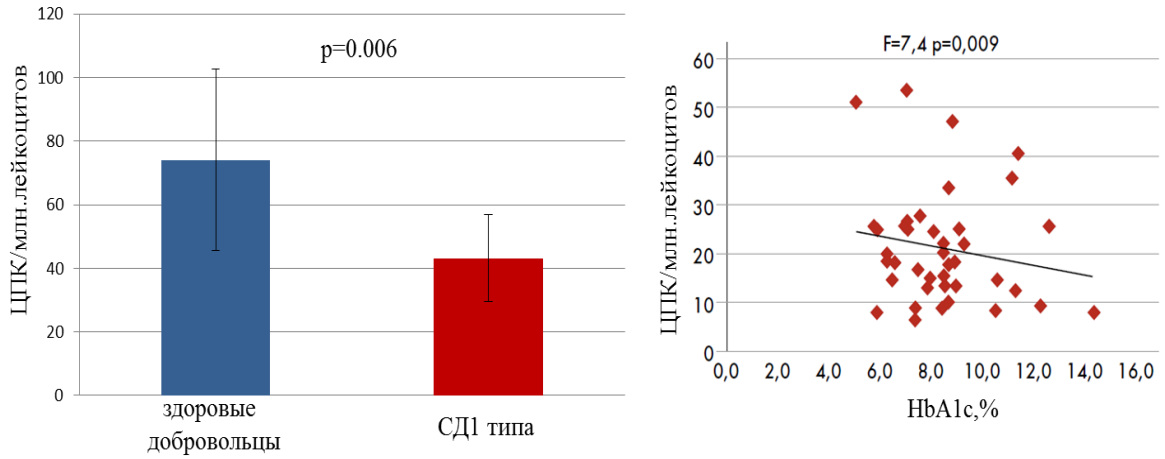

Рисунок 9 – Количество циркулирующих CD 34^{+} прогениторных клеток у больных сахарным диабетом1 типа и корреляционная связь с уровнем гликозилированного гемоглобина

Полученные результаты указывают на то, что гипергликемия является важнейшим фактором, отрицательно влияющим на количество циркулирующих ангиогенных прогениторных клеток.

Частота неблагоприятных ССС в ходе проспективного наблюдения у больных с ишемической ХСН

По результатам проспективного наблюдения в группе сравнения (без ИБС, ХСН и СД2) не было зарегистрировано ни одного случая смерти или возникновения сердечно-сосудистого заболевания.

Из общего количества больных ХСН 12 пациентов были утеряны для наблюдения. Таким образом, структура исходов была проанализирована у 43 пациентов с ишемической ХСН: в группу А включено 25 пациентов (18 человек (72,0%) из группы ХСН без СД2 и 7 человек (28%) из группы ХСН с сопутствующим СД2; в группу Б включено 18 пациентов (6 больных из группы ХСН без СД2 (33,3%) и 12 человек (66,7%) из группы ХСН с сопутствующим СД2).

В группе больных с ишемической ХСН без СД2 было зарегистрировано 6 нефатальных сердечно-сосудистых событий: 2 случая декомпенсация ИБС (8,7%) и 4 случая декомпенсация ХСН (17,4%).

В группе больных с ХСН и сопутствующим СД2 было 12 событий, среди которых: 4 случая смерти от сердечно-сосудистых причин (20%); 2 случая

декомпенсации ИБС (10%); 2 случая декомпенсации ХСН (10%); 4 случая декомпенсации СД2 (20%).

В группе больных с СД2 без ХСН за период наблюдения было зарегистрировано два ССС: у одного больного (3,1%) тромбоз глубоких вен нижних конечностей, у одного больного (3,1%) диагностирована стабильная стенокардия; 2 случая (6,3%) декомпенсации СД2, потребовавшей инсулинотерапии.

Анализ показал, что сопутствующий СД2 у больных ХСН ассоциирован с неблагоприятным течением ИБС и более высокой сердечно-сосудистой смертностью ($\chi 2$ Пирсона =0,008), что согласуется с другими исследованиями, продемонстрировавшими более высокую общую смертность и более высокую сердечно-сосудистую смертность больных с ХСН и сопутствующим СД2 (M. Dauriz et al., 2017).

При оценке вклада сопутствующего СД2 у больных с ХСН в риск развития фатальных событий, оказалось, что присутствие СД2 у больных ХСН в сравнении с больными ХСН без СД2 типа статистически значимо ассоциируется со смертельным исходом: 35,6% нефатальных ССС (декомпенсация ХСН, декомпенсация ИБС) и 8,9% летальных случаев (4 смерти, из которой 2 случая внезапной смерти на фоне декомпенсации ХСН и 2 случая смерти в результате декомпенсации ХСН), соответственно, в группе больных ХСН+СД2, против 55,6% нефатальных ССС и 0% летальных случаев, соответственно, в группе больных ХСН, (двусторонний критерий Фишера=0,032).

В структуре нефатальных ССС в подгруппе Б стали: в 55,6% случаев повторные госпитализации, из них у 6 больных по поводу декомпенсации ХСН, у 4 больных по поводу прогрессирования ИБС с развитием острого коронарного синдрома, потребовавшего реваскуляризации; у 4 больных (22,2%) причиной госпитализации была декомпенсация диабета.

Анализ прогностической значимости исследованных молекулярных факторов и циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической ХСН

Анализ прогностической значимости циркулирующих прогениторных клеток, эндотелина-1, натрийуретических пептидов, ангиогенных факторов и ЭХО-КГ параметров проводили методом логистической регрессии (множественная регрессия с логит-преобразованием). Больные с ишемической ХСН без СД2 и ХСН с сопутствующим СД2 были сопоставимы по возрасту и полу, что позволило пренебречь данными показателями.

Результаты однофакторного и многофакторного анализа влияния исследованных факторов на исход ИБС и ХСН при проспективном наблюдении представлен в таблице 6.

В однофакторном анализе наиболее прогностически неблагоприятными факторами оказались: низкий уровень ЦПК и высокий уровень циркулирующего эндотелина-1, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 9 и 6 раз, соответственно; высокий уровень натрийуретических пептидов, выраженность ДД ЛЖ по соотношению E/e', в меньшей степени, но также статистически значимо ассоциировались с неблагоприятным течением ИБС.

Таблица 6 – Однофакторный и многофакторный анализ влияния циркулирующих прогениторных клеток, эндотелина-1, натрийуретических пептидов, ангиогенного фактора HGF и параметров эхокардиографии на течение ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности при проспективном наблюдении

Фактор n=43	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (5%-95% ДИ)	p	ОШ (5%-95% ДИ)	p
ЦПК/млн.лейкоцитов	9,3 (2,09-38,6)	**0,002**	8,01 (1,26-51,8)	**0,022**
Эндотелин-1, пг/мл	6,2 (1,5-25,8)	**0,009**	2,6 (0,25-26)	0,4
MR-proANP, пг/мл	3,9 (1,2-14,9)	**0,041**	1,7 (0,17-15,9)	0,6
NT-proBNP, пг/мл	4,6 (1,2-17,9)	**0,022**	1,32 (0,12-14,5)	0,8
HGF, пг/мл	3,6 (0,95-13,2)	**0,051**	4,6 (0,5-41,3)	0,15
ФВ ЛЖ,%	2,4 (0,6-9,1)	0,2	1,5 (0,18-12,3)	0,6
Соотношение E/e'	5,8 (1,4-23,8)	**0,011**	1,97 (0,25-15,6)	0,5

В многофакторном анализе только низкий уровень ЦПК сохранял высокую прогностическую значимость, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 8 раз (p=0,022), что может отражать снижение репаративного потенциала клеток сосудов, усугубляя сосудистые нарушения и отягощая течение ХСН и ИБС в целом.

Несмотря на то, что представленная модель прогноза вероятности неблагоприятного течения ИБС построена на небольшой выборке больных ХСН и небольшом количестве ССС за весь период проспективного наблюдения, тем не менее, многофакторный анализ, включающий только уровень ЦПК и концентрацию эндотелина-1 свидетельствует, что оба этих показателя сопоставимо увеличивают риск неблагоприятного течения ИБС и ХСН в 7,4 и 6,8 раза, соответственно ($Хи^2$=19,9; p<0,001), (таблица 7) что, безусловно, нуждается в уточнении на большей выборке больных.

Таблица 7 – Многофакторный анализ связи между количеством циркулирующих прогениторных клеток, уровнем эндотелина-1 и характером течения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности при проспективном наблюдении

Фактор n=43	Многофакторный анализ	
	ОШ (5%-95%) ДИ	p
ЦПК, млн/лейк.	7,4 (2,1-25,8)	0,001
Эндотелин-1, пг/мл	6,8 (1,94-24,0)	0,002

В целом, результаты, полученные в этой части работы, свидетельствуют о том, что одновременное присутствие у больных с ишемической систолической ХСН в сочетании с СД2 более выраженных диастолических нарушений, повышенной концентрации эндотелина-1 и недостаточной эффективности системы натрийуретических пептидов, гипоадипонектинемии и пониженного количества циркулирующих прогениторных клеток, может являться совокупным фактором неблагоприятного (отягощенного) течения сердечной недостаточности и ИБС в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что мезенхимальные стволовые клетки и прогениторные клетки сосудов могут являться новыми мишенями для метаболических факторов риска (гипергликемии и окисленных ЛПНП). Более раннее развитие и высокий риск сердечно-сосудистых осложнений на фоне сахарного диабета у больных ИБС может объясняться снижением репаративного потенциала сосудов, в частности, подавлением ангиогенных свойств тканевых прогениторных клеток (МСК ЖТ) и уменьшением количества предшественников эндотелиальных клеток костномозгового происхождения. Таким образом, нарушения в клеточном звене системы регенерации может быть новым патогенетическим механизмом в осложненном течении сердечной недостаточности у больных ИБС.

ВЫВОДЫ

1. Метаболические нарушения, характерные для диабета 2 типа, являются факторами, обусловливающими снижение ангиогенных и регенеративных свойств тканевых прогениторных клеток, так как моделирование гипергликемии in vitro изменяет экспрессию генов, регулирующих ангиогенез, в мезенхимных стволовых клетках жировой ткани, подавляет способность продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез в моделях in vitro, а культивирование этих клеток в присутствии окисленных ЛПНП снижает их жизнеспособность.

2. Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток жировой ткани снижена у пациентов с ИБС, в том числе с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа, что обусловлено дисбалансом продукции ангиогенных и антиангиогенных факторов, прежде всего повышенной экспрессией и секрецией ингибиторов ангиогенеза - тромбоспондина-1 и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (PAI-1).

3. Метаболические нарушения, обусловленные сопутствующим сахарным диабетом 2 типа (гипергликемия и гиперлипидемия), отрицательно влияют на регенеративные свойства как циркулирующих, так и тканевых прогениторных клеток, способствуют дисбалансу циркулирующих факторов роста, эндотелина-1 и адипокинов, что может иметь патогенетическое значение в развитии осложнений ХСН и лежать в основе ее отягощенного течения при сочетании с сахарным диабетом. Характерные для данной категории пациентов нарушения свойств прогениторных клеток, дисбаланс ангиогенных факторов роста, эндотелина-1 и адипокинов могут служить мишенями для разработки новых методов лечения ХСН при ее сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

4. Наличие сопутствующего сахарного диабета 2 типа у пациентов с ИБС и постинфарктной ХСН ассоциировано с более высоким функциональным классом ХСН по NYHA, сниженной толерантностью к физической нагрузке и более выраженной диастолической дисфункцией ЛЖ, эндотелиальной дисфункцией и атеросклеротическим ремоделированием стенки сосудов (толщиной комплекса интима/медия), ожирением и гипергидратацией тканей по сравнению с пациентами с ИБС и ХСН без сопутствующего сахарного диабета, что указывает на большую тяжесть течения сердечной недостаточности и выраженность сосудистых нарушений при наличии сахарного диабета.

5. Больные ИБС с постинфарктной ХСН и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа в сравнении с больными без сопутствующего диабета характеризуются более высоким уровнем эндотелина-1 в периферической крови, который прямо коррелирует с выраженностью диастолической дисфункции и ассоциируется с неблагоприятным сердечно-сосудистым прогнозом.

6. Содержание ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, HGF) повышено в периферической крови больных ИБС с постинфарктной ХСН, их уровни не коррелируют с тяжестью ХСН, но ассоциируются с нарушением углеводного обмена и наличием сахарного диабета 2 типа. При этом высокий уровень циркулирующего HGF ассоциируется с неблагоприятным течением постинфарктной ХСН.

7. Снижение количества циркулирующих $CD34^+$ прогениторных клеток у пациентов с ишемической ХСН и сопутствующим сахарным диабетом коррелирует с выраженностью нарушений углеводного обмена (уровнем гипергликемии и гликозилированного гемоглобина).

8. В ходе проспективного наблюдения установлено, что наличие у пациентов с ХСН сопутствующего СД2 ассоциируется с плохим прогнозом: более высокой сердечно-сосудистой смертностью и большей частотой нефатальных осложнений. При этом развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в однофакторной модели логистической регрессии связано с более высокими уровнями натрийуретических пептидов (NT-proBNP и MR-proANP), эндотелина-1, HGF, выраженностью диастолической дисфункции левого желудочка и снижением циркулирующих $CD34^+$ прогениторных клеток. Наибольшее прогностическое значение для данной категории больных имеет многофакторная модель прогноза, включающая количество циркулирующих $CD34^+$прогениторных клеток и уровень эндотелина-1 ($\chi 2=19,9$; $p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке протоколов аутологичной клеточной терапии на основе МСК-ЖТ у больных ИБС с ХСН необходимо учитывать сниженную способность этих клеток стимулировать ангиогенез за счет паракринных влияний, что диктует необходимость предтрансплантационной подготовки клеток, повышающей секрецию ими ангиогенных факторов (например, культивирование в условиях гипоксии перед трансплантацией).

2. Определение низкого уровня (<410 клеток/млн.лейкоцитов) циркулирующих $CD34^+$ прогениторных клеток может использоваться для стратификации риска сердечно-сосудистых осложнений у больных с постинфарктной ХСН и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Для более точной стратификции риска у данной категории больных рекомендуется определение уровня эндотелина-1 и циркулирующих $CD34^+$ прогениторных клеток.

3. Поскольку количество $CD34^+$ прогениторных клеток в периферической крови снижено и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом у больных ИБС с ХСН и сопутствующим сахарным диабетом данная категория больных может являться целевой для заместительной клеточной терапии биомедицинскими клеточными продуктами на основе $CD34^+$ прогениторных клеток, получаемых из костного мозга или периферической крови.

4. Поскольку уровень $CD34^+$ прогениторных клеток в циркуляции обратно коррелирует с выраженностью нарушений углеводного обмена и является независимым предиктором осложненного течения постинфарктной ХСН, при

проведении гипогликемической терапии у больных ИБС с ХСН и выраженными нарушениями углеводного обмена было бы целесообразно контролировать уровень $CD34^+$ прогениторных клеток в циркуляции.

5. Разработанная и оптимизированная в ходе выполнения проспективного исследования электронная карта-история болезни может быть использована для проведения подобных исследований.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

При сердечно-сосудистых заболеваниях, ассоциированных с сахарным диабетом, происходят существенные изменения регенеративных свойств стволовых и прогениторных клеток взрослого организма, что вносит существенный вклад в развитие осложнений. Это также может снижать эффективность аутологичной клеточной терапии у пациентов, страдающих ССЗ, ассоциированными с сахарным диабетом 2 типа, хотя именно эти больные являются наиболее вероятными кандидатами для клеточной терапии. Все это диктует необходимость дальнейшего углубленного изучения молекулярных, генетических и эпигенетических детерминант снижения регенеративного потенциала стволовых и прогениторных клеток у данной категории больных и разработки на основе полученных данных методов стимуляции их терапевтических свойств и активации эндогенных регенеративных процессов.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клинический опыт и перспективы применения аутологичных стволовых и прогениторных клеток для восстановления насосной функции сердца / А.Ю. Ефименко, **Т.Н. Кочегура**, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук // Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения: сб. науч. тр. – М. : Литтерра, 2009. – С. 292-319.

2. Хроническая гипергликемия и способность стромальных клеток жировой ткани воздействовать на рост кровеносных сосудов / Ж.А. Акопян, **Т.Н. Кочегура**, Г.В. Шаронов, Н.И. Калинина // Вестник РГМУ. – 2010. – № 2. – С. 449-450.

3. ****Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы / Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, Е.В. Парфенова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5. – №2. – С. 11-18.**

4. ****Влияние липопротеидов низкой плотности на мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани // Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, В.Ю. Сысоева [и др.] // Доклады Российской Академии наук. – 2011. – Т.441. – №5. – С. 714-717.**

5. ****Влияние высокой концентрации глюкозы на способность мезенхимальных стромальных клеток контролировать рост кровеносных**

сосудов / Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов, Т.Н. Кочегура [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 32-36.

6. ****Влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической кардиомиопатией / Т.Н. Кочегура, Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 36-43.**

7. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения / А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, **Т.Н. Кочегура** [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М. : МАКС Пресс Москва, 2011. – С. 206-234.

8. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца, сочетающейся с сахарным диабетом: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения / Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, **Т.Н. Кочегура** [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М. : МАКС Пресс Москва, 2011. – С. 235-263.

9. Circulating progenitor cells in patients with ischemic cardiomyopathy and type 2 diabetes mellitus comorbidity / **T. Kochegura**, Zh. Akopyan, G. Sharonov [et al.] // Abstracts book the 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD), Venice, 2011. – P. 1131.

10. ****Изменения ангиогенных свойств ММСК жировой ткани с возрастом у больных ишемической болезнью сердца / А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Т.Н. Кочегура [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7. – №4. – С. 74-83.**

11. **Kochegura, T.** Circulating adipocytokines in comorbid patients with ischemic cardiomyopathy and type 2 diabetes mellitus / **T. Kochegura**, P. Makarevich, Ye. Parfyonova // Abstract Book the 3rd International Congress on Abdominal obesity Québec City, Québec, Canada, 2012. – Vol. 5. – №1. – P. 64.

12. ****Циркулирующий фактор роста гепатоцитов (HGF) у больных с хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа и нарушением жирового обмена / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников [и др.] // Сахарный диабет. – 2013. – № 2. – С. 17-25.**

13. ***Циркулирующие факторы, ассоциированные с метаболическими нарушениями у пациентов с постинфарктной сердечной недостаточностью / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников [и др.] // Сердечная недостаточность. — 2013. – Т. 14. – № 4(78). – С. 191-199.**

14. Circulating level of endothelin-1 in patients with chronic systolic heart failure correlates with the degree of diastolic dysfunction and type 2 diabetes co-morbidity / **T. Kochegura**, A. Ovchinnikov, P. Makarevich [et al.] // European Heart Journal Abstract Suppl. – 2013. – Vol. 34. – P. 461.

15. Circulating level of hepatocyte growth factor in patients with a comorbidity of heart failure and diabetes mellitus type 2 / **T. Kochegura**, P Makarevich, A. Ovchinnikov [et al.] // European Journal of Heart Failure. – 2013. – Vol.15 (S1). – P. S108.

16. Циркулирущие ангиогенные факторы, ассоциированные с постинфарктной сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями / **Т.Н. Кочегура**, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина. V Всероссийская научно-практическая конференция: сб. науч. тр. – М., 2013. – С. 37.

17. ****Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells From Aged Patients With Coronary Artery Disease Keep Mesenchymal Stromal Cell Properties but Exhibit Characteristics of Aging and Have Impaired Angiogenic Potential / A. Efimenko, N. Dzhoyashvili, N. Kalinina, T. Kochegura [et al.] // Stem Cells Translational Medicine. – 2014. – Vol. 3. – №1. – P. 32-41.**

18. ****Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2 // N.A. Dzhoyashvili, A.Yu. Efimenko, T.N. Kochegura [et al.] // Journal of translational medicine. – 2014. – T.12. – №1. – P. 337-349.**

19. Аутологичная клеточная терапия: влияние факторов риска на стволовые и прогениторные клетки /А.Ю. Ефименко, **Т.Н. Кочегура**, Н.А. Джояшвили [и др.] // Клеточные технологии - практическому здравоохранению: сб. науч. тр. – Екатеринбург : Астер, 2014. – С.17-22.

20. Изменяются ли аутологичные стволовые и прогениторные клетки с возрастом и при развитии хронических патологий у человека? / **Т.Н. Кочегура**, А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М.: Изд-во. Московского университета, 2014. – С.117-139.

21. *****Патент №2531947 С1. Способ прогнозирования риска сердечно-сосудистой летальности у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа / Е.В. Парфенова, Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, Л.В. Жигунова, А.Г. Овчинников, В.А. Ткачук, Ф.Т. Агеев; патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Министерства здравоохранения Российской Федерации; заявка 2013129365/15, 27.06.2013; опубликовано 27.10.2014; Бюл. № 30. – 14 с.**

22. *****Патент №2548801. Способ оценки ангиогенного потенциала прогениторных клеток у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Е.Е. Старостина, ТН. Кочегура, Ж.А. Акопян, З.И. Цоколаева, К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева, Н.И. Калинина, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук; патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова" Министерства**

здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Минздравсоцразвития РФ, Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; заявка 2011149376/10, 20.06.2013; опубликовано 20.04.2015; Бюл. №11. – 13с.

23. Gene Therapy By VEGF and HGF: Stimulation of Angiogenesis and Inflammation Control / P. Makarevich, K. Dergilev, **T. Kochegura** [et al.] // Molecular Therapy. – 2014. – Vol. 22 (S1). – P. S232.

24. Reduced number of circulating progenitor cells in patients with chronic heart failure and type 2 diabetes mellitus is associated with cardiovascular death during three years follow-up / **T. Kochegura**, A. Ovchinnikov, L. Zhigunova [et al.] // European Journal of Heart Failure Abstracts Suppl. – 2014. – Vol. 16 (S2). – P. 301.

25. Adipose-Derived Stromal Cell (ADSC) for Autologous Cell Therapy: Disturbed Angiogenic Activity in Patients With Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus Type 2 / A.Yu. Efimenko, N.A. Dzhoyashvili, **T.N. Kochegura** [et al.] // Molecular Therapy. – 2014. – Vol. 22 (S1). – P. 185-186.

26. ****Изучение количества циркулирующих прогениторных клеток эндотелия у больных сахарным диабетом 1 типа. // А.В. Соколова, Т.Н. Кочегура, Е.В. Парфёнова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2015. – № 3. – С. 5-10.**

27. ****Однонуклеотидные замены в гене Т-кадгерина (cdh13) кумулятивно влияют на массу тела у лиц с ишемической болезнью сердца /А.В. Балацкий, Д.Ю. Коновалов, Л.М. Самоходская, Т.Н. Кочегура [и др.] // Кардиология. – 2015. – № 11. – С. 12-15.**

28. Autologous Stem Cell Therapy: How Aging and Chronic Diseases Affect Stem and Progenitor Cells / A.Yu. Efimenko, **T.N. Kochegura**, Zh.A. Akopyan [et al.] // Bioresearch open access. – 2015. – Vol.1. – №4 (1). – P. 26-38.

29. *****Патент №2574017. Средство для лечения ожогов и ран на основе цитокинов и факторов роста, секретируемых мезенхимными клетками человека, способ получения средства и способ лечения ожогов и ран / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, Т.Н. Кочегура, К.А. Рубина, Е.В. Семина, Д.В. Стамбольский, В.Ю. Сысоева, Е.В. Тарасова, патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"(МГУ); заявка 2014139540/15, от 30.09.2014; опубликовано 27.01.2016; Бюл. № 3. – 30 с.**

30. ****Транскрипционный контроль экспрессии инсулинчувствительного переносчика глюкозы glut4 в клетках жировой ткани / Д.Н. Пеньков, Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура, А.Д. Егоров //Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 467. – №5. – С. 612-616.**

31. ** **Механизмы транскрипционного контроля регуляции глюкозы в печени / К.Ю. Кулебякин, Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура, Д.Н. Пеньков // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19. – №3. – С. 190-198.**

32. ***Патент №2620167. Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, О.А. Григорьева, Н.И. Калинина, Т.Н. Кочегура, Г.Д. Сагарадзе, В.Ю. Сысоева, Е.В. Тарасова, А.А. Чапленко; патентообладатель: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"(МГУ); заявка 2015154800, 21.12.2015; опубликовано 23.05.2017; Бюл. № 15. – 2 с.**

33. ***Патент №2620342 С1. Косметическое средство на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых/стромальных клеток жировой ткани человека и способ его получения / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, О.А. Григорьева, Н.И. Калинина, Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, Г.Д. Сагарадзе, В.Ю. Сысоева, Е.В. Тарасова, А.А. Чапленко, Г.В. Широкова; патентообладатель: ООО "Генная и клеточная терапия"; заявка №2016118245 от 11.05.2016; опубликовано 24.05.2017; Бюл. № 15. – 4 с.**

34. **Прогностическое значение циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток и молекулярных факторов у больных ишемической ХСН / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. XII. – №3. – С. 133.**

35. **Изменение адипогенного потенциала мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека при инсулинорезистентности / А.В. Степанова, Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. XII. – №3. – С. 140-141.**

*** – работа опубликована в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основные научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.**

**** – работа опубликована в издании, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованном ВАК при Минобрнауки России для опубликования основные научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.**

***** – патенты**

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МСК-ЖТ	мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)
HGF	фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor)
ЦПК	циркулирующие прогениторные клетки
VEGFR1	рецептор фактора роста эндотелия сосудов1 типа
MR-proANP	средне-региональный предшественник предсердного натрийуретического пептида (mid-region pro-ANP)
HUVEC	эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells)
NT-proBNP	N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
ИБС	ишемическая болезнь сердца
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor – 1(ингибитор активатора плазминогена 1 типа)
ИМТ	индекс массы тела
tPA	тканевой активатор плазминогена (tissue plasminogen activator)
ИФА	иммуноферментный анализ
ИМ	инфаркт миокарда
АКШ	аорто-коронарное шунтирование
uPA	урокиназный активатор плазминогена (urokinase)
FBS	эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum)
ФВ ЛЖ	фракция выброса левого желудочка
ПЗВД	поток-зависимая вазодилатация
ССО	сердечно-сосудистые осложнения
мРНК	матричная РНК
ССС	сердечно-сосудистая смертность
СД2	сахарный диабет 2 типа
ХСН	хроническая сердечная недостаточность
ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ФК	функциональный класс
ФР	фактор роста
ЭК	эндотелиальные клетки