

1	2
Осмотр после сеанса	После окончания процедуры КДФ из кабинета эфферентной терапии пациент переводится в палату дневного стационара, где проводят контроль клинического состояния, артериального давления, частоты сердечных сокращений, гемостаза в месте сосудистого доступа. Врач-трансфузиолог осматривает пациента и делает заключение о безопасности его выписки. Согласуется дата следующей процедуры [1, 2]
Рекомендации пациентам после сеанса	Наблюдать за повязками, наложенными на место пункций, и по возможности их снять не ранее, чем на следующее утро; избегать физической работы; соблюдать назначенные терапевтом диету и медикаментозное лечение

ток. Вместе с тем оба пациента после четырех и двух сеансов прекратили экстракорпоральное лечение, так как на фоне комплексной терапии была достигнута стойкая ремиссия. В итоге с октября 2023 г. у женщины прекратились обострения панкреатита, ранее возникающие 2 раза в год и требующие госпитализации в хирургическое отделение.

Трое пациентов с гиперхолестеринемией хорошо переносили КДФ, а в ряде случаев отмечали «прилив сил» в течение первых двух недель после сеанса. Они получили по 6, 5 и 3 сеанса и продолжают посещать сеансы КДФ с интервалом 1 месяц. Плановые сеансы переносились трижды по причине ОРВИ с обострением гепатита, острой хирургической патологии, плановой операции.

В ходе обработки 1,5 объема ОЦП уровень общего ХС снижался на 58–70 % (в среднем на 64,7 %), ЛПНП – на 47,6–72,2 % (64,8 %), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) – на 31,8–71,9 % (49,8 %). Это частично расходится с информацией изготовителя фракционаторов Evaflux 5a (Kawasumi Laboratories Inc., Япония), согласно которой снижение данных показателей должно составлять 52, 67 и 10 % соответственно [5], то есть ЛПВП должны задерживаться фильтром минимально – на 10 %.

Заключение. Методика каскадной плазмофильтрации в комплексе лечения атерогенных дислипидемий показала высокую эффективность при гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии и, следовательно, нуждается в масштабировании. Нежелательным побочным эффектом метода является снижение содержания ЛПВП. Необходимо провести поиск путей устранения этого эффекта.

Литература

1. Соколов А.А. Современные экстракорпоральные технологии: каскадная плазмофильтрация. СПб.: Инновационная медицина, 2013. С. 36–39.
2. Соколов А.А., Попов А.В. Каскадная плазмофильтрация: характеристика метода, выбор оборудования. *Тверской мед. журн.*, 2017; 5: 46–58.
3. Соколов А.А., Тишко В.В., Бельских А.Н., Есипов А.В. Современные экстракорпоральные технологии: перспективы использования. *Госпитальная медицина: наука и практика*, 2019; 1 (1): 32–41.
4. Ежов М.В., Кухарчук В.В., Сергиенко И.В. и др. Нарушения липидного обмена. Клинические рекомендации 2023. *Рос. кардиол. журн.*, 2023; 28 (5): 250–297.
5. EVAFLUX™ – фракционатор плазмы для процедуры каскадной плазмофильтрации / Буклет продукции KAWASUMI LABORATORIES INC. ООО НПФ «ПОКАРД», 2022. С. 4.

DOI 10.52727/2078-256X-2023-19-3-323-326

Анергия экспрессии маркеров эндотелия CD146 и VEGFR2 на моноклеарах крови *in vitro* при стимуляции М-CSF у больных ишемической болезнью сердца

С.П. Чумакова¹, М.В. Гладковская¹, О.И. Уразова¹, В.М. Шипулин²,
С.Л. Андреев², К.В. Невская¹, А.А. Дмитриева¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

² НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

Введение. Моноциты крови при атеросклерозе могут играть как негативную, так и протективную роль: макрофаги бляшки, поддерживая хроническое воспаление, пролонгируют альтера-

цию сосудов [1, 2] и способствуют васкуляризации атеромы [3, 4], но при этом моноциты крови содержат популяцию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) с иммунофенотипом

VEGFR2+CD34+CD14+ [5] и могут участвовать в индукции репаративного и коллатерального ангиогенеза при ишемической болезни сердца (ИБС). Показано, что культивирование клеток костного мозга с колониестимулирующим фактором гранулоцитов (G-CSF) и макрофагов (M-CSF) увеличивало экспрессию эндотелиальных маркеров CD31 и CD146 [6], а культивирование моноцитов крови в присутствии фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) вызывало их трансформацию в промежуточный иммунотип с экспрессией VEGFR2 [7]. Возможно, нарушение ответной реакции ЭПК и моноцитов крови на M-CSF является причиной недостаточной дифференцировки эндотелиальных клеток при атеросклерозе и важным патогенетическим фактором его прогрессирования.

Цель: оценить характер изменений экспрессии маркеров эндотелиальных клеток VEGFR2 и CD146 при культивировании *in vitro* смешанной культуры мононуклеаров крови CD14+ и CD34+ в присутствии M-CSF у больных ИБС и здоровых доноров.

Материал и методы. В исследование вошло 12 больных ИБС (10 мужчин и 2 женщины, возраст 62,0 [56,5; 64,0] года (медиана [25-й перцентиль; 75-й перцентиль])) со стенокардией напряжения II–IV функционального класса и недостаточностью кровообращения преимущественно II–III функционального класса по NYHA, имевших инфаркт миокарда в анамнезе и находившихся в стационаре НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН с целью выполнения операции коронарного шунтирования. Группу сравнения составили 10 практически здоровых доноров (7 мужчин и 3 женщины, возраст 57,5 [48,0; 65,5] года), не имеющих каких-либо заболеваний сердечно-сосудистой системы и жалоб соответствующего характера.

Материалом исследования служила кровь из кубитальной вены в объеме 30 мл, взятая утром натощак, которую стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл). Мононуклеары крови выделяли методом градиентного центрифугирования (фиколл 1,077 г/см³ (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва). Иммуномагнитную сепарацию выполняли с использованием антител CD14 MicroBeads и CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Германия), сепарационных колонок MS (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG) и магнита MiniMACS (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG) согласно инструкциям производителя. Клетки вносили в две лунки 24-луночного планшета по 10⁶ клеток в каждую. Инкубировали 6 суток в условиях 5 % CO₂ в полной питательной среде с добавлением в одну из лунок 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF человека (Cloud-Clone Corp.,

США), при этом через 3 суток инкубации производили частичную замену среды и повторное внесение стимулятора в той же дозе. Пробу с рекомбинантным M-CSF считали стимулированной, без M-CSF – контрольной. Через 6 суток клетки снимали с поверхности планшетов с помощью 0,05%-го раствора трипсин-ЭДТА (ООО НПО «ПанЭко», г. Москва) и осуществляли проточную цитофлуориметрию для определения экспрессии молекул VEGFR2 (KDR; CD309) и CD146 в смешанной культуре мононуклеаров крови с использованием моноклональных антител VEGFR2(KDR; CD309)-Alexa Fluor 647 и CD146-PerCP согласно инструкциям производителя (BD Biosciences, США). Оценивали долю позитивных по каждому маркеру клеток от общего количества случаев в процентах.

При статистическом описании результатов вычисляли медиану, 25-й и 75-й перцентили. С целью сравнительного анализа выборочных данных применяли критерии Манна – Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Сравнительный анализ контрольной и стимулированной с помощью M-CSF проб смешанной (по CD14+ и CD34+) культуры мононуклеаров крови у здоровых доноров выявил статистически значимое увеличение доли только CD146-позитивных клеток в образце с добавлением M-CSF относительно пробы без его внесения (соответственно 2,82 [1,63; 5,40] и 1,79 [0,94; 2,70] %, $p = 0,023$) при сопоставимых показателях экспрессии для маркеров VEGFR2 (соответственно 5,62 [2,51; 11,43] и 4,38 [1,75; 9,25] %, $p = 0,315$). У больных ИБС при добавлении в культуру M-CSF численность клеток CD146+, напротив, не изменялась (соответственно 2,36 [1,59; 4,27] и 1,44 [0,90; 3,82] %, $p = 0,194$), как и количество VEGFR2-позитивных клеток (25,47 [13,80; 32,16] и 21,16 [13,05; 28,56] %, $p = 0,407$). Следовательно, физиологическая реакция сепарированных мононуклеаров крови на M-CSF заключается в усилении экспрессии CD146, которая у больных ИБС не происходит.

Молекула CD146 экспрессируется на эндотелиоцитах и перицитах, способствуя формированию межклеточных контактов между ними, повышая выживаемость эндотелиоцитов, рекрутирование перицитов, хоуминг ЭПК, стабилизацию сосудов [8, 9]. Поэтому увеличение экспрессии CD146 в культуре мононуклеаров крови у здоровых лиц можно рассматривать как протективный эффект M-CSF, который у больных ИБС мог бы оказать благоприятное влияние на

пораженные атеросклерозом сосуды ишемизированного миокарда, но при ИБС не реализуется. Анергия экспрессии CD146 при действии М-CSF у больных ИБС может не только затруднять ангиогенез, но и усиливать миграцию моноцитов в стенку сосуда и ткани, способствуя воспалению и фиброзу [10]. Поскольку CD146 в большей степени представлен на зрелых эндотелиоцитах [9, 11], а в меньшей степени — на ЭПК [5, 9], то у здоровых лиц под влиянием М-CSF в культуре мононуклеаров крови происходит, вероятно, формирование зрелого фенотипа эндотелиоцитов.

При этом экспрессия другого эндотелиального маркера VEGFR2, присущего ЭПК и эндотелиоцитам, и у здоровых лиц, и у больных ИБС в культуре мононуклеаров крови не изменялась в присутствии М-CSF (см. выше). Связывание VEGFR2 со своими лигандами VEGF-A и VEGF-C стимулирует экспрессию адгезивных молекул, проницаемость сосудов и выживаемость клетки, ее прикрепление и миграцию, а также пролиферативный ответ [12]. Следовательно, можно предположить, что ЭПК, которые присутствовали в культуре мононуклеаров (поскольку подвергались сепарации по CD34+), трансформировались под влиянием М-CSF у здоровых доноров в эндотелиальные клетки, но без увеличения пролиферативного потенциала ЭПК посредством сигналинга VEGFR2. При ИБС данная трансформация, очевидно, не происходила.

Сопоставление показателей экспрессии обоих маркеров между группами обследованных лиц установило превышение относительного количества клеток VEGFR2+ у больных ИБС относительно здоровых доноров как в контрольной ($p = 0,002$), так и в стимулированной М-CSF пробах ($p = 0,013$); для CD146 подобных отличий между группами обследованных лиц не отмечалось ($p = 0,821$ и $p = 0,763$). Пятикратное превышение доли клеток VEGFR2+ в смешанной культуре мононуклеаров крови у больных ИБС относительно здоровых лиц как в присутствии М-CSF, так и без такового, очевидно, связано с исходно большей сепарацией клеток VEGFR2+CD34+ у пациентов ввиду высокого содержания клеток VEGFR2+ в крови у больных ИБС, который мы описывали ранее [11].

Заключение. При ИБС, обусловленной коронарным атеросклерозом, в ответ на стимуляцию М-CSF утрачивается физиологическая реакция ЭПК, заключающаяся в усилении экспрессии маркера зрелых эндотелиальных клеток CD146. Между тем М-CSF не изменяет экспрессию общего для прогениторных и зрелых эндотелиальных клеток маркера VEGFR2 как в норме,

так и при развитии ИБС. Полученные знания формируют представления об эффективности цитокиновой и клеточной терапии с использованием М-CSF для индукции ангиогенеза у больных ИБС.

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

Литература

1. Eligini S., Cosentino N., Fiorelli S., Fabbicchi F., Niccoli G., Refaat H. Biological profile of monocyte-derived macrophages in coronary heart disease patients: implications for plaque morphology. *Sci. Rep.*, 2019; 9 (1): 8680. doi: 10.1038/s41598-019-44847-3
2. Xu H., Jiang J., Chen W., Li W., Chen Z. Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *J. Immunol. Res.*, 2019; 4354786. doi: 10.1155/2019/4354786
3. Moroni F., Ammirati E., Norata G.D., Magnoni M., Camici P.G. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm.*, 2019; 2019: e7434376. doi: 10.1155/2019/7434376
4. Poston R.N. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc. Endocrinol. Metab.*, 2019; 8 (2): 51–61. doi: 10.1097/XCE.0000000000000172
5. Chopra H., Hung M.K., Kwong D.L., Zhang C.F., Pow E.H.N. Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem. Cells International.*, 2018; 2018: 9847015. DOI: 10.1155/2018/9847015
6. Zhang Y., Adachi Y., Iwasaki M., Minamino K., Suzuki Y., Nakano K., Koike Y., Mukaide H., Shigematsu A., Kiriya N., Li C., Ikehara S. G-CSF and/or M-CSF accelerate differentiation of bone marrow cells into endothelial progenitor cells *in vitro*. *Oncol. Rep.*, 2006; 15 (6): 1523–1527.
7. Lopes-Coelho F., Silva F., Gouveia-Fernandes S., Martins C., Lopes N., Domingues G., Brito C., Almeida A.M., Pereira S.A., Serpa J. Monocytes as Endothelial Progenitor Cells (EPCs), Another Brick in the Wall to Disentangle Tumor Angiogenesis. *Cells*, 2020 Jan 1; 9 (1): 107. doi: 10.3390/cells9010107
8. Leroyer A.S., Blin M.G., Bachelier R., Bardin N., Blot-Chabaud M., Dignat-George F. CD146 (Cluster of Differentiation 146). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2019; 39 (6): 1026–1033. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312653.
9. Гончаров Н.В., Попова П.И., Авдонин П.П., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Корф А., Авдонин П.В. Маркеры эндотелиальных клеток в норме и при патологии Биологические мембраны. *Журн. мембранной и клеточной биологии*, 2020; 37 (1): 3–21. doi: 10.31857/S0233475519040054
10. Kaspi E., Heim X., Granel B., Guillet B., Stalin J., Nollet M., Bertaud-Foucault A., Robaglia-Schlupp A., Roll P., Cau P., Leroyer A., Bachelier R., Benaymine A., Dignat-George F., Blot-Chabaud M., Bardin N. Identification of CD146 as a novel molecular

actor involved in systemic sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017; 140: 1448–1451.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.046

11. Чумакова С.П., Уразова О.И., Денисенко О.А., Погонченкова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Невская К.В., Гладковская М.В. Моноциты крови в поддержании баланса деструктивных и репаративных процессов в сосудистом эндотелии при

ишемической кардиомиопатии. *Комплекс. пробл. сердечно-сосудистых заболеваний*, 2022; 11 (3): 84–96. doi: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-84-96

12. Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A., Alcobia D.C., Hill S.J., Kilpatrick L.E., Woolard J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018; 19 (4): 1264. doi: 10.3390/ijms19041264

DOI 10.52727/2078-256X-2023-19-3-326-328

Нарушение ангиогенеза и структура сосудистой сети миокарда при ишемической кардиомиопатии

С.П. Чумакова¹, О.И. Уразова¹, В.М. Шипулин², И.В. Суходоло¹, А.И. Стельмашенко¹, О.А. Денисенко¹, С.Л. Андреев², М.С. Демин¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

² НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

Введение. Ишемическая кардиомиопатия (ИКМП) является тяжелым заболеванием, не имеющим на сегодняшний день специфической фармакотерапии и характеризующимся прогрессированием болезни даже после хирургической коррекции коронарного русла и полости левого желудочка [1, 2]. Одним из механизмов ИКМП является эндотелиальная дисфункция коронарных сосудов, но интерес ученых сосредоточен на вазомоторной ее форме [3, 4]. При этом ангиогенная форма эндотелиальной дисфункции, включающая дисбаланс клеточных и гуморальных факторов (VEGF, PDGF, SDF, ангиопоэтинов и др.) ангиогенеза, репаративных и деструктивных процессов в сосудах [5], при ИКМП не изучается.

Цель: выявить особенности формирования сосудистой сети в сердце и дисбаланса медиаторов ангиогенеза в коронарном кровотоке в ассоциации с численностью эндотелиальных прогениторных и десквамированных клеток в крови у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ИКМП.

Материал и методы. В исследование вошло 52 больных ИБС со стенокардией напряжения II–IV функционального класса и недостаточностью кровообращения преимущественно II–III функционального класса по NYHA, имевших инфаркт миокарда в анамнезе, которым выполнялась операция коронарного шунтирования: 30 человек с ИКМП (27 мужчин и 3 женщины, средний возраст 61,0 [56,0; 64,0] года) и 22 человека без кардиомиопатии (18 мужчин и 4 женщины, средний возраст 64,0 [59,5; 67,0] года). Диагностические критерии ИКМП соответствовали критериям G.M. Felker et al. [6]. Группу контроля составили 15 практически здо-

ровых доноров (13 мужчин и 2 женщины, возраст 57,63 ± 8,12 года), не имеющих каких-либо заболеваний сердечно-сосудистой системы и жалоб соответствующего характера.

Материалом исследования служили образцы крови из кубитальной вены (периферическая кровь) и крови из коронарного синуса (синусовая кровь), стабилизированные гепарином (25 МЕ/мл), а также биоптаты ушка правого предсердия. Периферическую кровь забирали в объеме 5 мл из кубитальной вены утром натощак как у здоровых доноров, так и у больных ИБС обеих групп исследования в день операции непосредственно перед индукцией в наркоз. Периферическую кровь использовали для иммунофенотипирования эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК). Кровь из коронарного синуса в объеме 5 мл получали только у пациентов с ИБС интраоперационно путем трансмиокардиальной пункции. В крови из коронарного синуса определяли содержание десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК), плазму крови из коронарного синуса использовали для исследования концентрации изучаемых медиаторов. Биоптаты миокарда ушка правого предсердия в объеме не более 10 мм³ получали интраоперационно и использовали для определения удельной площади сосудов морфометрическим методом и экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA) иммуногистохимическим методом.

Абсолютное количество ДЭК (CD45⁺CD146⁺) и относительное содержание ЭПК (CD14⁺CD34⁺VEGFR2⁺) в крови определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител Mouse Anti-Human CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2 (KDR; CD309)-Alexa Fluor 647, CD45-FITC и CD146-Alexa Fluor 647,