

# Циркулирующие остеогенные стволовые клетки-предшественники при стенозирующем атеросклерозе аорты и её ветвей

А.А. Агапов, З.А. Габбасов, Т.В. Балахонova, Б.А. Руденко, О.С. Сабурова

ФГУ «Клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва  
Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава, Москва

## Резюме

**Цель исследования.** Целью данной работы было изучение наличия стволовых клеток-предшественников, стромальной линии дифференцировки, в крови больных с документированным атеросклеротическим стенозирующим поражением аорты и её ветвей, в том числе коронарных артерий, и у пациентов без их выявленного поражения.

**Материалы и методы.** Обследовали 149 пациентов с атеросклеротическим стенозирующим поражением аорты и её ветвей, а также 8 пациентов с документированными непораженными сосудами артериального русла и 19 практически здоровых добровольцев. Методом проточной цитофлуориметрии исследовали циркулирующие в периферической крови лимфоцитоподобные клетки-предшественники, экспрессирующие остеонектин, который является маркером остеогенной дифференцировки стволовых клеток.

**Результаты.** В крови практически здоровых добровольцев и пациентов без выявленных поражений рассматриваемых артерий содержался небольшой процент остеонектин-положительных клеток  $0.27 \pm 0.11$  и  $0.26 \pm 0.07\%$  соответственно (среднее значение  $\pm$  SD). У людей с документированным стенозирующим атеросклерозом аорты и её ветвей ( $n=149$ ) процент остеонектин-положительных клеток составлял в среднем  $0.98 \pm 0.48\%$  и был достоверно и значительно выше, чем у здоровых добровольцев ( $p < 0.0001$ ) и у 8 пациентов с нестенозированными артериями ( $p < 0.0001$ ).

**Выводы.** Высокое содержание обнаруженных в периферическом кровотоке лимфоцитоподобных остеонектин-положительных клеток может отражать наличие атеросклеротического поражения просвета сосудов артериального отрезка кровеносного русла. Определение количества циркулирующих стромальных ON-положительных клеток может служить новым инструментом для диагностики, прогноза и лечения атеросклеротических поражений артерий человека.

**Ключевые слова:** атеросклероз, стволовые клетки, методы диагностики и прогнозирования

## Circulating osteogenic stem-cells in the patients with stenosing atherosclerosis of aorta and its branches

A.A. Agapov, Z.A. Gabbasov, T.V. Balakhonova, B.A. Rudenko, O.S. Saburova

«Clinical hospital» of the Department of affairs management of President of Russian Federation, Moscow

Russian cardiological scientific and industrial complex of Roszdrava, Moscow

## Summary

The determination of a quantity of circulating ON- positive stem-cells can use as new tool for diagnostics and treatment of atherosclerotic disease of the arteries.

**Key words:** atherosclerosis, stem cells, the methods of diagnostics and prognosis.

**Coordinates for contact with author:** 107143, г.Москва, ул. Лосиноостровская, 45

Гипотезы атерогенеза постоянно дополняются и модифицируются в соответствии с новыми клиническими и экспериментальными данными. В настоящее время наиболее распространена гипотеза, согласно которой атеросклеротический процесс является цепью биологических событий внутри интимы артериальной стенки. Эти события происходят в результате повреждения эндотелия, проникновения в субэндотелиальное пространство моноцитов и в последующем образования макрофагов, липидной инфильтрации, активации тромбоцитов и атеротромбоза. Заключительное звено этой цепи – миграция и пролиферация гладкомышечных клеток и синтез избыточного экстрацеллюлярного матрикса [12].

В последние годы появляются новые данные об участии в атерогенезе клеток костномозгового происхождения [4, 13]. Эти работы, выполненные за рубежом, подтверждают результаты российских исследований 1986-2005 годов [3, 15-17], которые явились основой концепции об участии стволовых колониеобразующих клеток костного мозга в атерогенезе сосудов человека. Известно, что среди клеток атероматозной аорты человека находятся моноциты/макрофаги, тучные клетки и Т-лимфоциты. С помощью колониеобразующих тестов впервые в мировой практике коллективом ученых ИЭК Кардиоцентра в культурах клеток пораженной интимы сосудов впервые удалось обнаружить костномозговые стволовые колониеобразующие клетки гемопоэтической и стромальной линий дифференцировки [3, 16]. В 1998 году с помощью клонального метода подобные стромальные колониеобразующие клетки были обнаружены в крови у больных с первичной гиперхолестеринемией и ИБС [15]. Полученные данные явились основой клеточной теории формирования атеросклеротических бляшек, в которой, пролиферирующие в интиме клетки имеют костномозговую природу, а одним из основных механизмов атерогенеза является проникновение через кровотоки костномозговых стволовых клеток в интиму в места концентрации липидов. В интиме сосудов стволовые клетки способны реализовать свою полипотентность и создавать бляшки различного происхождения с разными типами склерозирования артериаль-

ной стенки: фибрирование, хондро-остеогенез, а также кальцификация.

Стромальные стволовые колониобразующие клетки были обнаружены в периферической крови больных с первичной гиперхолестеринемией и ИБС клональными методами [15]. Позднее аналогичные результаты на больных с теми же заболеваниями были получены с помощью антител и методов проточной цитометрии [1–2].

Целью данной работы было изучение стволовых клеток-предшественников, стромальной линии дифференцировки, в крови больных с документированным стенозирующим поражением аорты и её ветвей, в том числе коронарных артерий, и у пациентов без их выявленного поражения.

### Материалы и методы

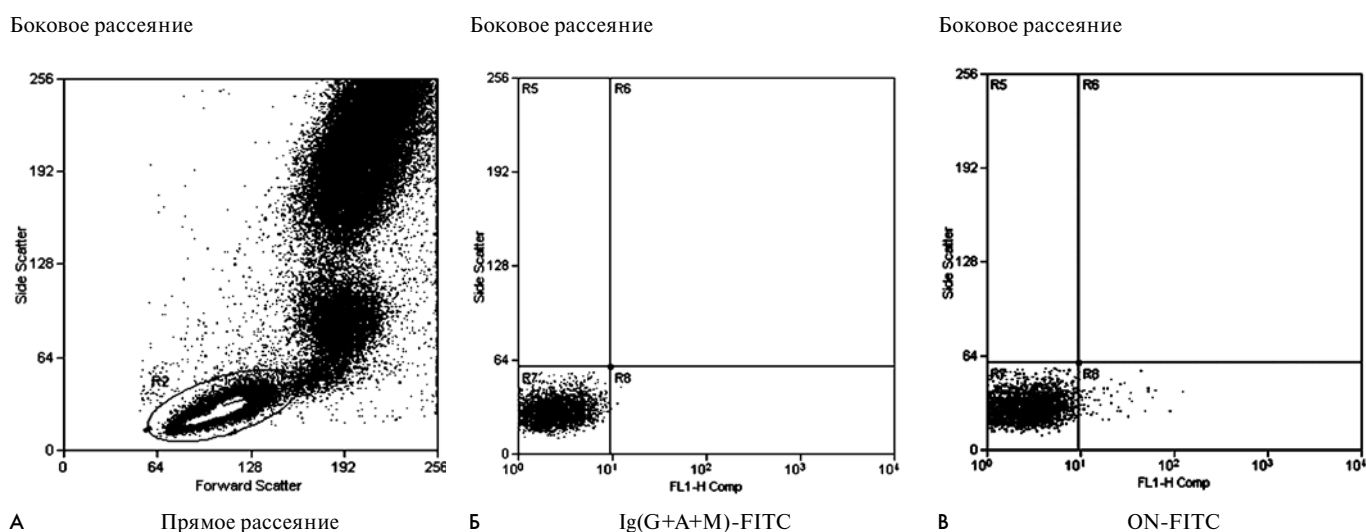
Обследовали 157 пациентов. Клиническое обследование включало запись ЭКГ в покое и при физической нагрузке на велоэргометре, суточное мониторирование ЭКГ, эхокардиографию, ультразвуковая диагностика (УЗДГ), коронароангиографию (КАГ). Части пациентов по показаниям проводили скинтиграфию миокарда в покое и после индуцированной велоэргометрией ишемии миокарда. ИБС различной степени тяжести диагностировалась по данным клинической картины, течения заболевания, результатам нагрузочных тестов и суточного мониторирования ЭКГ. При коронароангиографии у всех обследованных пациентов с ИБС выявлено наличие стенозирующего атеросклероза как минимум двух коронарных артерий или их магистральных ветвей. Амбулаторно тридцати пациентам с жалобами на симптоматику соответствующей энцефалопатии и перемежающейся хромоты проведена УЗДГ брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей без последующей КАГ.

Контрольная группа состояла из 8 пациентов с непопораженными коронарными артериями по данным КАГ и 19 практически здоровых добровольцев в возрасте от 21 до 45 лет. ИБС у добровольцев была отвергнута суточным мониторированием ЭКГ и велоэргометрией, а у 8 пациен-

тов – КАГ, перечисленными функциональными методами и радиоизотопной скинтиграфией миокарда со стресс-тестом. Стенозирующий атеросклероз аорты и ее ветвей у здоровых добровольцев исключали при помощи УЗДГ.

Кровь для исследования брали из локтевой вены больных и пациентов контрольной группы утром натощак после 14-часового голодания и стабилизировали ЭДТА. Исследование экспрессии различных антигенов клетками крови проводили в течение 2 часов после взятия, используя меченые флуоресцеинизотиоцианатом поликлональные кроличьи антитела к остеонектину человека (ИМТЕК, Россия), меченые фикоэритрином моноклональные антитела к CD41 (CD41-PE, Becton Dickinson, США), меченые CY5-PE моноклональные антитела к CD45 человека (CD45-TC, Becton Dickinson, США). В контроле использовали соответствующие изотипические антитела (кроличьи Ig(G+A+M)-FITC, ИМТЕК, Россия, мышиные IgG1-PE и мышиные IgG1-TC, Becton Dickinson, США). Клеточные аликвоты инкубировали с антителами в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. По окончании реакции в пробы добавляли лизирующий раствор (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson), через 15 мин. клетки центрифугировали при 500 g (15 минут) и отмывали фосфатным буфером (0.1M, pH=7.4), фиксировали 1% параформальдегидом и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Сбор и обработку информации производили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson). В каждом образце анализировали по 100000 лейкоцитов.

Количество ON-положительных клеток определяли с помощью 3-х цветной проточной цитофлуориметрии с использованием комбинации антител: ON-FITC/CD41-PE/CD45-TC. На диаграмме зависимости бокового рассеяния света от прямого по параметрам светорассеяния выделяли гейт лимфоцитов (Гейт R2, рис. 1А). Далее, среди клеток этого лимфоцитарного гейта выделяли клетки, которые одновременно экспрессировали антигены CD41 и CD45. Среди CD41+/CD45+ клеток на графике зависимости бокового рассеяния света от интенсивности



**Рис. 1. FACS-анализ ON-положительных клеток в периферической крови больного ИБС.**

**А** – выделение гейта лимфоцитоподобных клеток на диаграмме зависимости бокового рассеяния от прямого.

**Б** – связывание FITC-меченых изотипических иммуноглобулинов с CD41+/CD45-положительными клетками лимфоцитарного гейта. **В** – связывание FITC-меченых антител к остеонектину с CD41+/CD45-положительными клетками лимфоцитарного гейта.

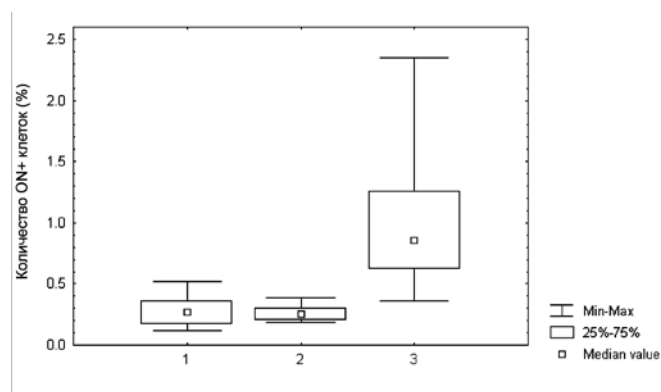
Характеристика пациентов с атеросклерозом аорты и её ветвей и пациентов без поражения коронарных артерий по КАГ и периферических артерий по УЗДГ

	Пациенты со стенозирующим атеросклерозом (n=149)	Пациенты без стенозирующего атеросклероза (n=8)	P
Возраст, лет	58 (50, 65)	55 (42, 58)	0.12
Пол (м/ж)	85/14	6/2	0.34
Холестерин, ммоль/л	5.1 (4.4, 5.9)	5.6 (5.2, 6.2)	0.17
Триглицериды, ммоль/л	1.58 (1.16, 2.50)	1.61 (0.82, 4.00)	0.86
ЛПНП, ммоль/л	3.05 (2.23, 4.38)	2.98 (2.61, 3.35)	0.85
ЛПВП, ммоль/л	1.23 (1.01, 1.45)	1.31 (1.16, 1.72)	0.35
Мочевая к-та, мкмоль/л	392 (331, 447)	307 (283, 397)	0.21
Гипертония	47/99	5/8	0.48
Диабет	13/99	1/8	1.00

Таблица 2

Наличие факторов риска у пациентов С. и Я.

Пациент	С.	Я.
Пол	М	М
Малоподвижный образ жизни	+	-
Избыточная масса тела	+	-
Психо-эмоциональный дисбаланс	+	-
Курение	+	-
Гипертоническая болезнь	+	-
Гипергликемия	+	-
Гиперлипидемия	+	-
Мочевая кислота (уровень)	повышен	нормальный



**Рис. 2. Количество ON-положительных лимфоцитоподобных клеток у практически здоровых добровольцев, пациентов с нестенозированными артериями и больных ИБС.**

**1 – добровольцы (n=19), 2 – пациенты с нестенозированными артериями (n=8), 3 – больные ИБС (n=99).  $p_{12}=3.4 \cdot 10^{-9}$ ,  $p_{23}=1.2 \cdot 10^{-9}$ .**

флуоресценции ON-FITC определяли количество ON-положительных клеток (рис. 1В). Для каждого образца крови проводили контроль связывания изотипических иммуноглобулинов с CD41+/CD45-положительными клетками лимфоцитарного гейта (рис. 1Б). Количество

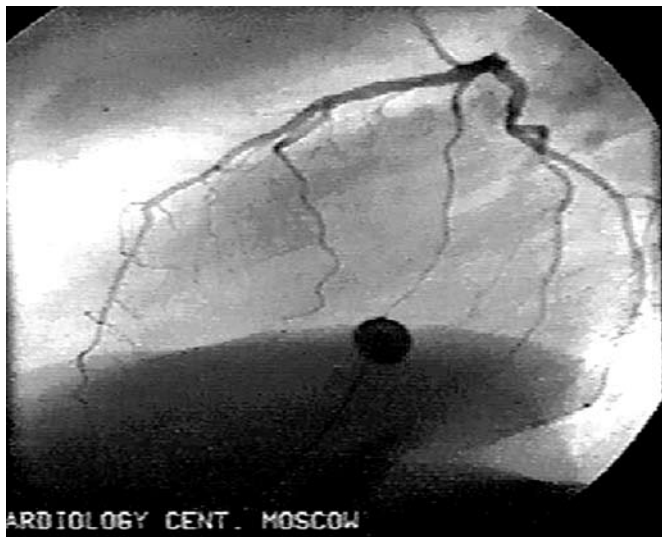
ON-положительных клеток приведено в процентах от количества лимфоцитоподобных CD41+/CD45+ клеток.

Данные приведены в виде медианы (нижняя и верхняя квартили). Для статистического анализа были использованы непараметрический U критерий Манна-Уитни и критерий Фишера (точной вероятности). Величины  $p < 0.05$  считались статистически значимыми.

### Результаты и обсуждение.

Клиническая характеристика пациентов приведена в таблице 1. КАГ выявила у 119 пациентов критическое поражение как минимум двух коронарных артерий или их магистральных ветвей. Степень поражения указывала на необходимость проведения аортокоронарного шунтирования. В контрольной группе из 8 пациентов коронарная ангиография не выявила никаких стенозирующих поражений коронарных артерий. Стенозирующий атеросклероз аорты и других ее ветвей в контрольной группе (8 пациентов и 19 добровольцев) был исключен при помощи УЗДГ.

Количество ON-положительных клеток-предшественников в крови больных ИБС и в контрольной группе исследовалось в различных субпопуляциях лимфоцитоподобных клеток. Было обнаружено, что содержание ON+ клеток в пуле CD41+/CD45+ клеток было многократно выше у больных ИБС, чем в контрольной группе. Количе-



**Рис. 3. Ангиограммы левой коронарной артерии пациентов С. - (А) и Я. - (Б).**

ство CD41+/CD45+ клеток отражает наличие в образцах крови лимфоцитарно-тромбоцитарных конгломератов. Количество таких CD41+/CD45+ лимфоцитов, способных связывать тромбоциты, в крови больных ИБС [3800 (2350, 5800)] достоверно не отличалось от их количества в контрольной группе у пациентов с нестенозированными артериями [4315 (3570, 5200),  $p=0.78$ ] и здоровых добровольцев [3650 (2500, 5500),  $p=0.61$ ]. Тем не менее, число ON-положительных клеток в этом пуле (лимфоцитоподобные ON+/CD41+/CD45+ клетки) было значительно выше у больных со стенозирующим атеросклерозом по сравнению с пациентами контрольной группы.

В крови добровольцев и пациентов с непораженными артериями содержался небольшой процент лимфоцитоподобных ON-положительных клеток. Количество этих ON+ клеток у пациентов с нестенозированными артериями [0.25% (0.20, 0.30)] достоверно не отличалось от их количества у добровольцев [0.27% (0.17, 0.36),  $p=0.94$ ]. Неспецифическое связывание клеток с изотипическими иммуноглобулинами было на уровне 2–4 клеток на 100,000, что соответствовало 0.08% (0.06, 0.11) от количества лимфоцитарно-тромбоцитарных конгломератов. В некоторых случаях у здоровых добровольцев процент ON+ клеток был очень мал и сравним с уровнем связывания

клеток с изотипическими иммуноглобулинами. В этих случаях мы не могли уверенно констатировать факт наличия в крови ON-положительных клеток. У больных ИБС процент ON+/CD41+ клеток составлял 0.89% (0.62, 1.26) и был достоверно и значительно выше, чем у добровольцев ( $p<0.0001$ ) и пациентов с нестенозированными артериями ( $p<0.0001$ , рис. 2).

Полученные результаты можно проиллюстрировать двумя клиническими примерами. Приведём сравнение результатов обследования двух пациентов (С. и Я.). У пациента С. были выявлены почти все основные факторы риска возникновения ИБС (гипертоническая болезнь, нарушение толерантности к глюкозе, гиперлипидемия, повышенный уровень мочевой кислоты и др.) при отсутствии таковых у пациента Я. (табл. 2). В то же время, по данным КАГ у пациента С. выявлены совершенно интактные коронарные артерии (рис. 3А). У пациента Я. наблюдались начальное сужение ствола левой коронарной артерии, окклюзия передней межжелудочковой ветви, неровности контуров огибающей ветви и стеноз ветви тупого края на 70%, окклюзия правой коронарной артерии. Из пяти ранее имплантированных шунтов три окклюзированы (рис. 3Б). По данным поточной цитометрии мы обнаружили очень малый уровень остеонектин-положительных стромальных клеток у пациента С (0.15%), при очень их большом уровне (3.5%) у пациента Я.

Важной находкой представленной работы является обнаружение нового пула циркулирующих лимфоцитоподобных ON-положительных клеток, количество которых многократно увеличивается у больных со стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий по сравнению с добровольцами и пациентами с нестенозированными артериями.

Известно, что неколлагеновый белок костной ткани остеонектин помимо процессов костеобразования [18, 20] участвует в регуляции различных клеточных и гуморальных реакций организма [10, 14, 19]. Безусловно, остеонектин представляет собой маркер остеобластной функциональной дифференцировки стволовых клеток-предшественников. Иммуноцитохимически показана локализация остеонектина в стволовых остеогенных (остеопрогениторных) клетках, активных остеобластах и в молодых остеоцитах, в то время как в зрелых покоящихся остеоцитах он не содержится [7].

Долгое время доказательства возможности циркуляции костномозговых стромальных клеток-предшественников обнаружить не удавалось. Существовало мнение о локальной тканевой оседлости стволовых колониеобразующих единиц для фибробластов в постэмбриональном периоде. Только единичные работы свидетельствовали о возможности циркулирования стромальных клеток-предшественников. Наличие гемопоэтических и стромальных стволовых клеток-предшественников в интима атероматозной аорты человека и циркуляция последних в крови больных ИБС позволило предположить их костномозговую природу [16]. Позднее стали появляться другие работы, подтверждающие циркуляцию в кровотоке стромальных костномозговых стволовых клеток, способных попадать в воспаленные участки поврежденных тканей и ремоделировать их [5]. Безусловные доказательства присутствия в кровотоке циркулирующих стволовых клеток с остеогенным и адипогенным (жировым) потенциалом были представлены в последние годы [8]. В настоящее время общепризнано, что костномозговые стволовые



стромальные клетки-предшественники циркулируют в периферической крови и благодаря этому способны проникать во все органы и ткани как в норме, так и при различных патологических состояниях.

Остеонектин активно захватывается клетками стенки сосуда при прогрессировании атеросклеротического поражения, а именно при кальцификации бляшки [6]. Методами клонального культивирования интимальных клеток из атеросклеротически измененных участков артерий (аутопсийный материал) были обнаружены стволовые колониеобразующие клетки, которые формировали в тест-системах как гемопоэтические, так и стромальные колонии. Клетки в сформированных стромальных колониях синтезировали коллагеновый фибриллярный и остеонидный матрикс [11]. Культивирование клеток мононуклеарной фракции периферической крови пациентов с первичной гиперлипидемией и коронарным атеросклерозом также позволило обнаружить колонии стромальных фибробластоподобных клеток, которые синтезировали фибриллярный и остеонидный внеклеточный матрикс. Клетки в колониях, в которых формировался костный матрикс, экспрессировали остеонектин. У практически здоровых добровольцев такие стромальные колонии отсутствовали [15]. Эти данные дают основание полагать, что существует тесная взаимосвязь между процессами стенозирующего атеросклероза и наличием в периферической крови костномозговых стромальных стволовых клеток-предшественников.

Высокое содержание обнаруженных в периферическом кровотоке лимфоцитоподобных остеонектин-положительных клеток-предшественников может отражать наличие атеросклеротического поражения просвета сосудов артериального отрезка кровеносного русла. Определение количества таких стромальных клеток-предшественников может служить лабораторным маркером для диагностики наличия атеросклеротического поражения кровеносных сосудов. Высокое содержание в кровотоке больных обнаруженных остеогенных клеток-предшественников может отражать наличие продуктивного этапа воспалительного процесса в сосудистой стенке. Полагаем, что клинический интерес заключается в использовании этого показателя как диагностического теста для наличия атеросклеротических изменений в организме и для оценки активности атеросклеротического процесса. Определение количества циркулирующих стромальных ON-положительных клеток может служить новым инструментом для диагностики, прогноза и лечения атеросклеротических поражений артерий человека.

#### Литература

1. Gabbasov Z.A., Agapov A. A., Saburova O. S., Komlev, A. E. Soboleva, E. L. Akchurin, R. S., et al. Circulating stromal osteonectin-positive progenitor cells and stenotic coronary atherosclerosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007, 85(3–4), 295–300.
2. Габбасов З.А., Агапов А.А., Сабурова О.С. и соавт. Определение циркулирующих стромальных стволовых клеток с остеогенной потенцией в крови пациентов с ишемической болезнью сердца методом лазерной проточной цитометрии. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2005; 139(2): 237–240.
3. Соболева Э.Л., Попкова В.М. Гемопоэтические клетки предшественники в интима атероматозной бляшки человека. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 1989; 107(5): 600–604.
4. Caplice N.M., Bunch T.J., Stalboerger P.G. et. al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(8):4754–4759.
5. Ferrari G., Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279(5356): 1528–1530.
6. Gadeau A.P., Chaleut H., Daret D. et al. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49: 79–86.
7. Jundt G., Berghauzer K-H., Termine J.D. et al. Osteonectin - a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res.* 1987; 248: 409–415.
8. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et. al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153(5):1133–1140.
9. Langer H., May A.E., Daub K. et. al.. Adherent Platelets Recruit and Induce Differentiation of Murine Embryonic Endothelial Progenitor Cells to Mature Endothelial Cells In Vitro. *Circ Res.* 2006; 98(2): 2–10.
10. Rempel S.A., Golembieski W.A., Fisher J.L. et. al. SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *J Neurooncol.* 2001; 53(2):149–60.
11. Romanov Yu.A., Balyasnikova I.V., Bystrevskaya V.B. et. al. Endothelial heterogeneity and intimal blood born cells: relation to human atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 748: 12–37.
12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362: 801–808.
13. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med*, 2003;13(6):249–53.
14. Sage H., Vernon R.B., Funk S.E. et. al. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989;109:341–356.
15. Soboleva E.L., Shindler E.M., Saburova O.S., et. al. In: *New pathogenic aspects of atherosclerosis.* Nordrhein-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Westdeutscher Verlag. 1994; 79–93.
16. Soboleva E.L., Saburova O.S., Rozhkova T.A., Tvorogova MG: Stem cells of hemopoietic and stromal differentiation lineages and human atherosclerosis. *Angiology and vascular surgery.* 1999; 5 (suppl.): 190–203.
17. Soboleva E.L., Gabbasov Z.A., Agapov A.A., Akchurin R.S., Saburova O.S., Romanov Y.A., and Smirnov V.N. Circulating bone marrow stem/progenitor cells in vascular atherogenesis and in non-invasive diagnosis of coronary stenosis. *Experimental and Clinical Cardiology.* 2005; 10(3): 184–188.
18. Stenner D.D., Tracy R.P., Riggs B.L., Mann K.G. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:6892–6896.
19. Wewer U.M., Albrechtsen R., Fisher L.W. et. al. Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissue characterized by de novo formation of basement membrane. *Am J Pathol.* 1988; 132:345–355.
20. Young M.F., Day A.D., Dominquez P. et. al. Structure and expression of osteonectin mRNA in human tissue. *Connect Tissue Res.* 1990;24:17–28.