

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ПРОАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ И МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ЛИНИИ EA.Hy926

Александр Петрович ЛЫКОВ^{1,2}, Ольга Владимировна ПОВЕЩЕНКО^{1,2},
Наталья Анатольевна БОНДАРЕНКО^{1,2}, Александр Федорович ПОВЕЩЕНКО^{1,2},
Ирина Иннокентьевна КИМ^{1,2}, Татьяна Владимировна МИЛЛЕР¹,
Евгений Анатольевич ПОКУШАЛОВ², Александр Борисович РОМАНОВ²,
Владимир Иосифович КОНЕНКОВ^{1,2}

¹ ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² ФГБУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

В работе исследовано влияние ростовых факторов и цитокинов на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток человека перевиваемой линии EA.Hy926. Показано, что эритропоэтин и кондиционная среда от мононуклеарных клеток периферической крови, обогащенных клетками костного мозга путем мобилизации введением G-CSF от пациентов с ИБС, увеличивают пролиферацию клеток EA.Hy926. Миграционная активность клеток EA.Hy926 повышается под влиянием фактора роста эндотелия сосудов, фактора некроза опухоли- α , эритропоэтина. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования цитокинов и факторов, продуцируемых мононуклеарами, мобилизованными из костного мозга введением G-CSF, для стимуляции неоангиогенеза.

Ключевые слова: пролиферация, миграция, эндотелиальные клетки, ростовые факторы.

Репарация повреждений стенок сосудов и непосредственно формирование новых сосудов в постнатальном периоде осуществляются за счет развития коллатеральных сосудов (артериогенез), развития новых капилляров путем миграции и пролиферации предсуществующих дифференцированных эндотелиальных клеток (ангиогенез) и путем васкулогенеза эндотелиальными прогениторными клетками [5]. Также показано, что резидентные прогениторные клетки через продукцию биоактивных веществ стимулируют миграцию в

зону повреждения зрелых эндотелиальных и эндотелиальных прогениторных клеток из других зон, программируя их дифференцировку в зрелые клетки и способствуя тем самым репарации повреждений [8, 10]. Неоангиогенез протекает поэтапно: разрыв базальной мембраны сосудов и матрикса эндотелиоцитов, миграция эндотелиальных и эндотелиальных прогениторных клеток в направлении ангиогенных стимулов (хемотаксис), пролиферация и формирование трехмерных тубулоподобных структур (новых кровеносных

Лыков А.П. – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: lykovalex@freemail.ru

Повещенко О.В. – к.м.н., зав. лабораторией лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Бондаренко Н.А. – аспирант лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: bond802888@yandex.ru

Повещенко А.Ф. – д.м.н., зав. лабораторией физиологии протективной системы, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Ким И.И. – научный сотрудник лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: kii5@yandex.ru

Миллер Т.В. – аспирант лаборатории физиологии протективной системы, e-mail: tmw87@mail.ru

Покушалов Е.А. – д.м.н., зам. директора, e-mail: cpsc@nricp.ru

Романов А.Б. – к.м.н., врач-хирург центра хирургической аритмологии, e-mail: aromanov1981@rambler.ru

Коненков В.И. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, e-mail: lymphology@soramn.ru

сосудов). В последние годы в клиническую практику внедряются высокотехнологичные подходы реваскуляризации органов и тканей, основанных на применении проангиогенных факторов роста и клеточной терапии для лечения различных дегенеративных, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваний. Одним из возможных способов действия клеток-предшественников является паракринный механизм, обусловленный секрецией биологически активных веществ. Известно, что репарация поврежденных сосудов и неоваскуляризация поврежденных тканей и органов находятся под влиянием как стимулирующих, так и ингибирующих гуморальных факторов, в том числе цитокинов и ростовых факторов. Существенное значение в ангиогенезе отводится функциональной активности эндотелиальных клеток, в том числе их пролиферативному и миграционному потенциалу, который зависит от влияния цитокинов и ростовых факторов [1, 6, 8, 10, 13]. Поэтому, исходя из вышеизложенного, целью исследования стало изучение влияния ростовых факторов и цитокинов на пролиферацию и миграцию клеток EA.Hy926.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клетки эндотелиальной линии EA.Hy926 культивировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; Биолот, Россия), 160 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя. Пересев осуществляли 1 раз в 3–4 дня. Пролиферацию клеток EA.Hy926 оценивали спектрофотометрически при длине волны 492 нм по включению клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромидом (MTT) [6, 14], а также по изменению клеточного импеданса в режиме реального времени на анализаторе xCELLigence (Roche Applied Science, Германия) [7, 11]. Интенсивность пролиферативного потенциала изучали в присутствии эритропоэтина (Еро) (Рекормон, Германия; 33 МЕ/мл) и 30 % кондиционной среды (КС), а также в серии экспериментов с предварительной обработкой EA.Hy926 митомицином С (40 мкг/мл, США) [12].

Источником КС служили мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) от 5 пациентов с ИБС. МНК получали путем обогащения на градиенте плотности фиколл/верографин аферезного продукта после мобилизации стволовых/прогениторных клеток из костного мозга в периферическое русло введением G-CSF (Грасальва,

Израиль; 3,3–5,0 мкг/кг в сутки, в течение 5 дней). МНК инкубировали в течение 72 ч, собирали КС, разливали по аликвотам и хранили при –70 °C до использования.

Миграционную способность клеток EA.Hy926 изучали в камере Бойдена (BD, США) с учетом количества мигрировавших через микропоры клеток через 24 ч и по изменению клеточного импеданса в двухуровневых камерах в спонтанном тесте и при добавлении в нижнюю камеру Еро, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (BioVision, США; 10 нг/мл), фактора некроза опухоли- α (TNF- α) (Sigma-Aldrich, США; 5нг/мл) при низком содержании FCS (1 %) в культуральной среде.

Изменение клеточного импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражалось как клеточный индекс, который автоматически вычислялся программой как $(R_n - R_b)/t$, где R_b – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду, R_n – значение импеданса в лунке в любое время (t), содержащей помимо ростовой среды и тестируемые клетки.

Меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (L_q) и верхним (H_q) квартилями; достоверность различий рассчитывали по U -критерию Манна–Уитни и принимали при значениях $p < 0,05$. Связь между различными признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, интенсивность пролиферации EA.Hy926 зависела от наличия в питательной среде сыворотки и ростовых факторов. Дефицит FCS в культуральной среде приводил к статистически значимому подавлению пролиферации клеток EA.Hy926 в сравнении с аналогичным показателем в присутствии сыворотки и ростовых факторов на различные сроки инкубации. Добавление Еро к клеткам EA.Hy926 при обеднении культуральной среды FCS приводило к увеличению пролиферации клеток через 24 ч наблюдения ($p = 0,006$) и к некоторому снижению в более длительные сроки культивирования, в то время как пролиферативная активность клеток, росших при низкой концентрации сыворотки и добавлении в питательную среду 30 % КС, оставалась на всем протяжении эксперимента статистически значимо большей ($p = 0,006$) и существенно не менялась. Между уровнем пролиферации клеток EA.Hy926 в присутствии 10 % FCS и в присутствии 1 % FCS и дополнительных стимулов

Таблица

Показатель пролиферативной активности клеток эндотелиальной линии EA.Нy926 в МТТ-тесте (в условных единицах оптической плотности), Me (Lq-Hq)

Группа	24 ч (I)	24 ч (II)	72 ч (III)
Без FCS (1)	0,19 (0,19–0,21) $p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,006$ $p_{1-4} = 0,006$	0,17 (0,15–0,20) $p_{1-2} = 0,014$ $p_{1-3} = 0,01$ $p_{1-4} = 0,021$	0,18 (0,14–0,19) $p_{1-2} = 0,021$ $p_{1-3} = 0,011$ $p_{1-4} = 0,021$
10 % FCS (2)	0,43 (0,43–0,49)	0,49 (0,48–0,50) $p_{2-3} = 0,006$ $p_{2-4} = 0,027$	0,50 (0,49–0,51) $p_{2-3} = 0,011$ $p_{2-4} = 0,021$
1 % FCS + Eро (3)	0,45 (0,44–0,51) $p_{I-II} = 0,004$ $p_{I-III} = 0,004$	0,37 (0,37–0,38) $p_{3-4} = 0,01$	0,37 (0,36–0,38) $p_{3-4} = 0,011$
1 % FCS + КС (4)	0,49 (0,44–0,54)	0,52 (0,51–0,55)	0,54 (0,53–0,55)

(Еро или КС) через 24 ч инкубации не выявлено статистически значимых различий. Необходимо также отметить тот факт, что интенсивности пролиферации клеток EA.Нy926 при добавлении в питательную среду Еро и ростовых факторов, содержащихся в КС, существенно не различались на 24 ч наблюдения, а в отдаленные сроки пролиферативный ответ на стимуляцию Еро был статистически значимо ниже, чем исходный ($p = 0,004$) и чем при стимуляции КС ($p < 0,02$).

Известно, что Еро оказывает протективный эффект и на клетки негемопозитического ряда, обусловленный стимуляцией через экспрессируемые на поверхности клеток рецепторы к нему или же через активацию в них генов Еро и синтезом Еро в клетках, тем самым осуществляя ауто- и паракринную регуляцию функциональной активности этих тканей [2]. Кроме этого Еро посредством воздействия на эндотелиальные клетки стимулирует процессы неоваскуляризации ишемизированных тканей [3] и снижает влияние окислительного стресса на ткани [15]. Активирующий пролиферативный потенциал клеток эффект КС обусловлен наличием в ней ряда биоактивных веществ. Так, нами ранее было показано, что в КС от МНК, мобилизованных из костного мозга введением G-CSF от пациентов с ИБС, отмечена продукция широкого ряда цитокинов с преобладанием провоспалительных, в частности TNF- α и IFN- γ . МНК продуцировали также IL-1 β , IL-6, G-CSF и Еро, другие цитокины и ростовые факторы с проангиогенными свойствами [3, 4].

Интенсивность пролиферации клеток EA.Нy926 по данным исследования клеточного импеданса зависит от количества клеток в лунке и наличия в питательной среде ростовых факторов, содержащихся в FCS (рис. 1, а). Так, концентрация клеток $(5-10) \times 10^4$ в лунке является оптимальной для исследования пролиферативного

потенциала, а при увеличении количества клеток до 20×10^4 на лунку отмечено снижение пролиферации клеток EA.Нy926. Вероятнее всего, это связано с более быстрым прилипанием клеток к датчикам и тем самым невозможностью оставшихся излишних клеток в лунке к адгезии на датчики. Также при увеличении количества клеток в лунке быстрее расходуются питательные вещества, необходимые для поддержания их роста и, возможно, в силу этого клетки погибают и открепляются от датчиков. Существенное значение для пролиферации клеток имеет наличие в питательной среде анализируемых ростовых факторов. В условии дефицита ростовых факторов, содержащихся в FCS, показано снижение пролиферативной активности клеток EA.Нy926. Как видно из рис. 1, б, в, даже при дефиците сыворотки в питательной среде добавление к культуре Еро и 30 % КС приводило к статистически значимому увеличению пролиферативного потенциала по сравнению с отрицательным контролем, а именно ростом клеток при 1 % FCS в питательной среде ($p < 0,01$). Более того, показано наличие сопряженности между параметрами пролиферации клеток EA.Нy926 с 10 % FCS и аналогичными показателями для клеток, инкубированных с 1 % сыворотки и добавлением Еро ($r = -0,83$; $p < 0,01$) или же КС ($r = 0,96$; $p < 0,01$), что не противоречит литературным данным [2, 3, 15].

В экспериментах с предварительной обработкой клеток EA.Нy926 митомицином С установлено снижение интенсивности пролиферативного потенциала (клеточный индекс 0,27), в то время как не предобработанные митомицином С клетки показывали большие значения клеточного импеданса (клеточный индекс 5,75), что указывает на сохранность функциональной активности клеток, не подвергшихся подавлению в них процессов метаболизма (данные не представлены) [12].

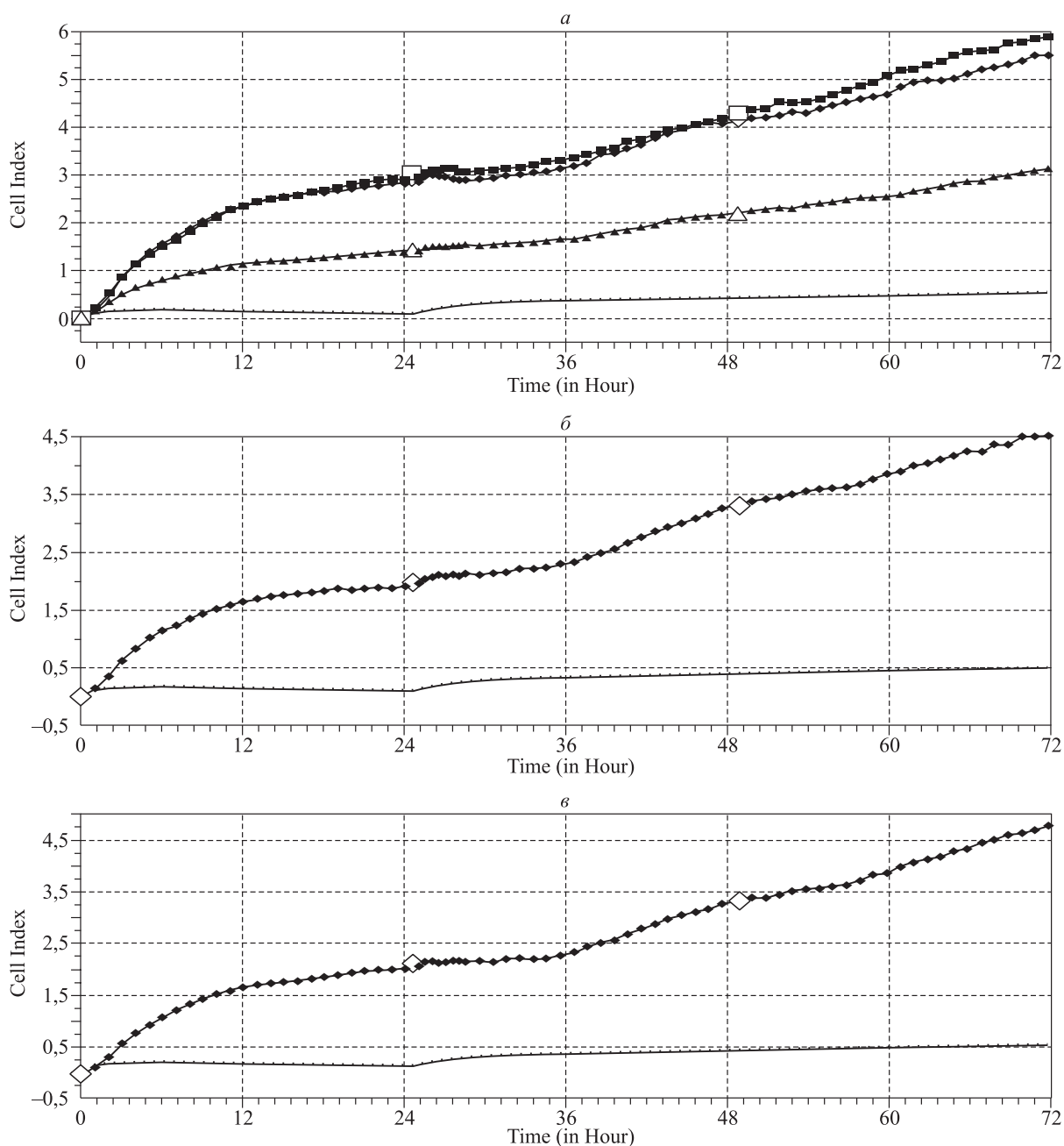


Рис. 1. Зависимость пролиферации клеток эндотелиальной линии EA.Hu926 от наличия ростовых факторов в питательной среде. Линия – 5×10^4 клеток на лунку с 1 % FCS. а – ромб – 5×10^4 клеток на лунку с 10 % FCS, квадрат – 10×10^4 клеток на лунку с 10 % FCS, треугольник – 20×10^4 клеток на лунку с 10 % FCS; б – ромб – 5×10^4 клеток на лунку с 1 % FCS и EPO (30 ME/мл); в – ромб – 5×10^4 клеток на лунку с 1 % FCS и 30 % КС от МНК, мобилизованных из костного мозга пациентов с ИБС введением Г-КСФ

При исследовании миграции клеток EA.Hu926 в камере Бойдена показано, что через микропоры в направлении градиента ростовых факторов мигрирует небольшое количество клеток (данные не приводятся). Результаты изучения миграционного потенциала клеток EA.Hu926 по данным клеточного импеданса в режиме реального времени дают большую информацию об их миграции. Как

видно из рис. 2, а, интенсивность миграции клеток EA.Hu926 существенно не менялась в зависимости от их количества в питательной среде, и только к концу эксперимента отмечалась тенденция нарастания миграционного потенциала при большей концентрации сыворотки в среде (10 %). Одним из объяснений такого феномена может быть наличие в сыворотке большого коли-

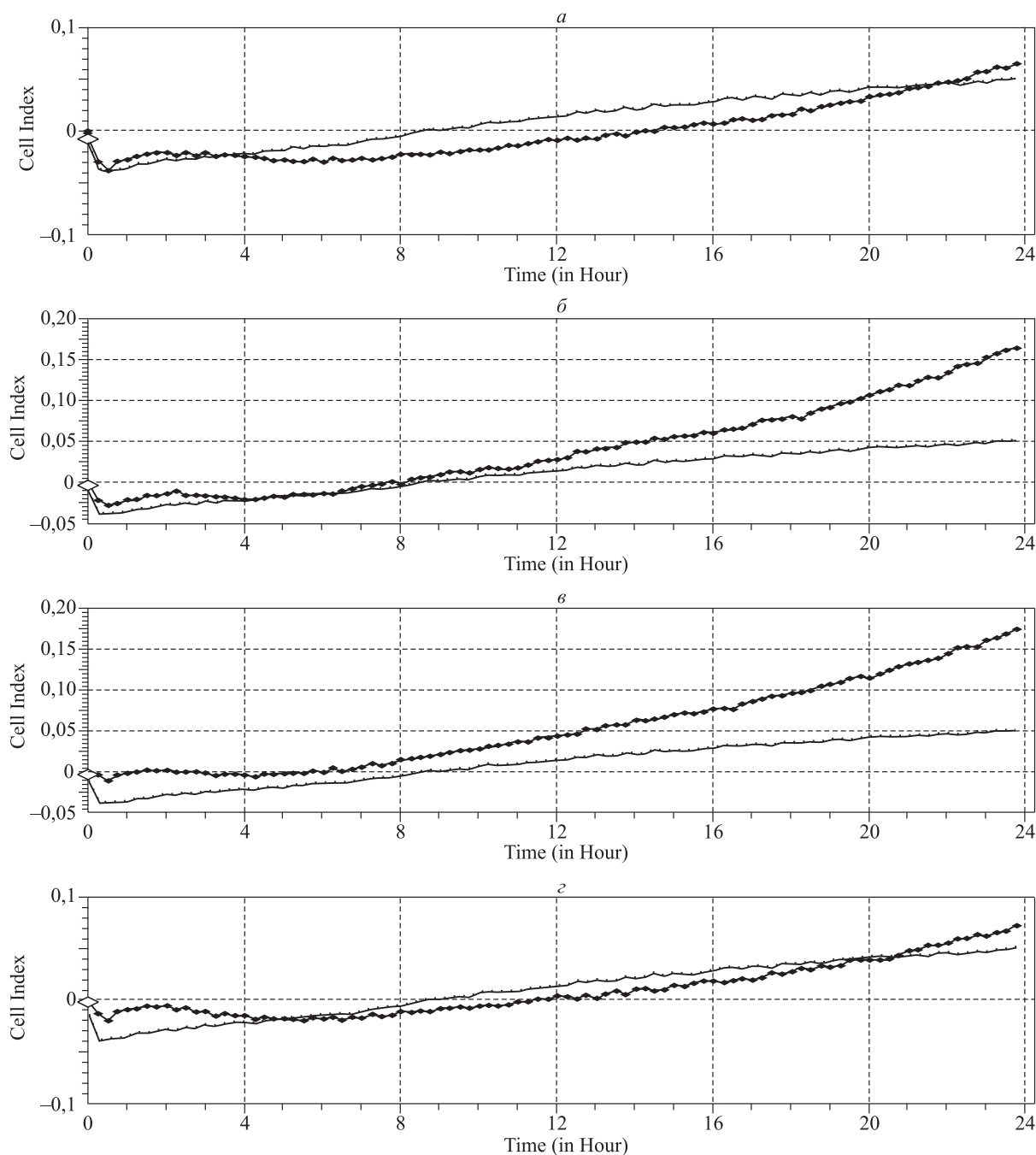


Рис. 2. Эффект ростовых факторов на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.Hu926. Линия – 1 % FCS; ромбами обозначены: а – 10 % FCS, б – 1 % FCS и VEGF (10 нг/мл), в – 1 % FCS и TNF-α (5 нг/мл), г – 1 % FCS и EPO (33 ME/мл)

чества биологически активных веществ (например, TGF-β, IL-10), способных не только активировать, но и ингибировать клеточные функции (пролиферация и миграция).

На рис. 2, б–г показано, что добавление к питательной среде с минимальным содержанием сыворотки VEGF, TNF-α приводило к статистически значимому увеличению миграционной активности клеток EA.Hu926. Известно о способности TNF-α стимулировать функционирование

эндотелиоцитов сосудистой стенки [1, 3, 6] и активировать экспрессию молекул адгезии [9]. VEGF выступает в качестве не только фактора роста сосудистого эндотелия, но и мощного стимулятора миграции эндотелиальных клеток, способствуя формированию сосудистых структур эндотелиальными клетками [1, 6, 8]. Эффект EPO на клетки EA.Hu926 был снижен по сравнению с эффектом VEGF и TNF-α, что, скорее всего, связано с аутокринным характером регуляции

цитокином функциональной активности клеток, относящихся к негемопозитическому ряду [2, 3], с одной стороны, и, возможно, с недостаточной экспозицией клеток с данным фактором для проявления его стимулирующего эффекта, с другой стороны.

Результаты исследования влияния на пролиферацию клеток EA.Hy926 ростовых факторов по данным клеточного импеданса не противоречат данным исследований пролиферации традиционным методом, однако дают более наглядное представление о процессах, происходящих в лунке в режиме реального времени. Кроме того, клеточный индекс, который является показателем электрического потенциала и отражает статус клеток, их пролиферативную и миграционную активность, может отслеживаться с первых минут и в течение всего периода исследования.

Заслуживающими внимания и новыми можно считать данные о влиянии на пролиферацию и миграцию клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 растворимых факторов, содержащихся в КС от МНК, обогащенных стволовыми/прогениторными костно-мозговыми клетками. При этом действие КС сопоставимо с влиянием таких известных факторов пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, как VEGF, TNF- α и EPO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные, можно заключить, что пролиферация и миграция эндотелиальных клеток человека перевиваемой линии EA.Hy926 возрастает под влиянием как цитокинов VEGF, TNF- α и EPO, так и ростовых факторов супернатанта, полученного при культивировании МНК, обогащенных стволовыми клетками костного мозга. Использование в качестве клеточного трансплантата МНК после мобилизации G-CSF может приводить к стимуляции ангиогенеза путем паракринного действия секретируемых ростовых факторов и цитокинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.Hy926 и ее модуляция // Цитология. 2005. (5). 389–399.
2. Захаров Ю.М. Цитопротекторные функции эритропоэтина // Клинич. нефрол. 2009. (1). 16–21.
3. Коненков В.И., Повещенко О.В., Ким И.И. и др. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у

больных с хронической сердечной недостаточностью // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. (3). 71–76.

4. Коненков В.И., Покушалов Е.А., Повещенко О.В. и др. Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. (1). 9–14.

5. Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза // Успехи физиол. наук. 2012. (3). 48–61.

6. Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И. и др. Изменение поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Мед. иммунол. 2003. (1–2). 39–48.

7. Atienza J.M., Yu N., Wang X. et al. Label-free and real-time cell-based kinase assay for screening selective and potent receptor tyrosine kinase inhibitors using microelectronic sensor array // J. Biomol. Screen. 2006. (11). 634–643.

8. Bendorf R., Boger R.H., Ergun S. et al. Angiotensin II type receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and *in vitro* tube formation of human endothelial cells // Circ. Res. 2003. (93). 438–447.

9. Drabarek B., Dymkowska D., Szczepanowska J. et al. TNF α affects energy metabolism and stimulates biogenesis of mitochondria in EA.hy926 endothelial cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2012. (44). 1390–1397.

10. Gao H., Zhang J., Liu T. et al. Rapamycin prevents endothelial cell migration by inhibiting the endothelial-to-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 and -9: An *in vitro* study // Mol. Vis. 2011. (17). 3406–3414.

11. Keogh R.J. New technology for investigating trophoblast function // Placenta. 2010. (31). 347–350.

12. Kin K., Kasahara T., Ithon Y. et al. Cellular cooperation in lymphocyte activation // Clin. Exp. Immunol. 1979. (36). 292–298.

13. Lai Y., Liu X.H., Zhang Y. et al. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the Rac 1/RhoA-p38MAPK pathway // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2012. (16). 630–638.

14. Lafontaine L., Chaudhry P., Lafleur M.J. et al. Transforming growth factor beta regulates proliferation and invasion of rat placental cell lines // Biol. Reprod. 2011. (84). 553–559.

15. Stein A., Knodler M., Makowski M. et al. Local erythropoietin and endothelial progenitor cells improve regional cardiac function in acute myocardial infarction // BMC Cardiovasc. Disord. 2010. (10). 43–52.

ESTIMATION OF THE EFFECT OF PROANGIOGENIC FACTORS ON THE PROLIFERATIVE AND MIGRATION ACTIVITIES OF THE ENDOTHELIAL CELL OF LINE EA.Hy926

Aleksander Petrovich LYKOV^{1,2}, Olga Vladimirovna POVESHCHENKO^{1,2}, Natalia Anatolievna BONDARENKO^{1,2}, Aleksander Fedorovich POVESHCHENKO^{1,2}, Irina Innokentievna KIM^{1,2}, Tatyana Vladimirovna MILLER¹, Eugenie Anatolevich POKUSHALOV², Aleksander Borisovich ROMANOV², Vladimir Iosiphovich KONENKOV^{1,2}

¹ *Institute of Clinical and Experimental Lymphology of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *E.N. Meshalkin Novosibirsk Institute of Circulation Pathology of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

The influence of growth factors and cytokines on the proliferation and migration of human endothelial cells (EC) of line EA.Hy926 was studied. It has been shown, that erythropoietin (Epo) and conditioned medium (CM) of peripheral blood mononuclear cells (MNCs) enriched with bone marrow cells by mobilizing due to the introduction of G-CSF from patients with chronic heart failure, increased cell proliferation of EA.Hy926. The EA.Hy926 cell migration activity increased under the influence of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and erythropoietin (Epo). The findings testify to the motivation for the use of cytokines and factors produced by MNCs mobilized from the bone marrow by the introduction of G-CSF to stimulate neoangiogenesis.

Key words: proliferation, migration, endothelial cells, growth factors.

Lykov A.P. – candidate of medical sciences, leading researcher laboratory of limphotropic therapy and limpodagnostic, e-mail: lykovalex@freemail.ru

Poveshchenko O.V. – candidate of medical sciences, head of the laboratory of limphotropic therapy and limpodagnostic, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Bondarenko N.A. – postgraduate student laboratory of limphotropic therapy and limpodagnostic, e-mail: bond802888@yandex.ru

Poveshchenko A.F. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of physiology of the protective system, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Kim I.I. – researcher laboratory of limphotropic therapy and limpodagnostic, e-mail: kii5@yandex.ru

Miller T.V. – postgraduate student laboratory of physiology of protective system, e-mail: tmw87@mail.ru

Pokushalov E.A. – doctor of medical sciences, vice-director, e-mail: cpsc@nricp.ru

Romanov A.B. – candidate of medical sciences, surgeon of the centre of surgically arrhythmology, e-mail: aromanov1981@rambler.ru

Konenkov V.I. – doctor of medical sciences, academician of RAMS, director, e-mail: lymphology@soramn.ru