



Взаимосвязь цитокинового профиля мононуклеаров и эндотелиальных прогениторных клеток, полученных в результате мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Повещенко О.В.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Лыков А.П.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Суровцева М.А.^{1,2},
Повещенко А.Ф.^{1,2}, Покушалов Е.А.², Романов А.Б.², Караськов А.М.², Коненков В.И.¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речуновская, 15

Поступила в редакцию 14 сентября 2015 г. Принята к печати 20 ноября 2015 г.

Цель	Изучение цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров периферической крови и ее корреляция с выходом эндотелиальных прогениторных клеток в процессе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor) у пациентов с хронической сердечной недостаточностью.
Материал и методы	Получили мононуклеарные клетки из периферической крови 35 пациентов с хронической сердечной недостаточностью до и после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Спектр продукции цитокинов и ростовых факторов мононуклеарными клетками оценивали с помощью иммуноферментного анализа как в спонтанных условиях, так и при стимулировании клеток конканавалином А, липополисахаридом, гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, эритропоэтином (Еро).
Результаты	Установили статистически значимое увеличение спонтанной продукции интерлейкина (IL-18), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), эритропоэтина и уменьшение продукции фактора некроза опухоли α (TNF- α) и G-CSF мононуклеарными клетками после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Обнаружили статистически значимое увеличение продукции мононуклеарными клетками IL-18, VEGF и G-CSF в ответ на стимуляцию конканавалином А и снижение продукции IL-8 после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. В ответ на липополисахарид мононуклеарные клетки, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками пациентов с хронической сердечной недостаточностью, демонстрировали статистически значимое увеличение продукции IL-18 и G-CSF и снижение TNF- α . Проангиогенные цитокины G-CSF или Еро приводят к статистически значимому увеличению продукции TNF- α , IL-10, VEGF и G-CSF мононуклеарными клетками, обогащенными эндотелиальными прогениторными клетками пациентов с хронической сердечной недостаточностью.
Выводы	Мононуклеарные клетки периферической крови, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью продуцируют цитокины и ростовые факторы с проангиогенным действием. При этом эндотелиальные прогениторные клетки вносят вклад в продукцию таких цитокинов и ростовых факторов, как TNF- α , IL-18, IL-10, Еро, VEGF. Мононуклеарные клетки, полученные в процессе мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, можно использовать для лечения хронической сердечной недостаточности.
Ключевые слова	Цитокины • Ростовые факторы • Мононуклеарные клетки • Эндотелиальные прогениторные клетки • Хроническая сердечная недостаточность

Клеточные технологии активно используют в лечении многих заболеваний, особенно сердечно-сосудистых, смертность от которых непрерывно увеличивается. Стволовые/прогениторные клетки для клинического применения можно получить различными способами: выделить из костного мозга, жировой ткани или, что менее травматично, периферической крови, предварительно проведя мобилизацию гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor) клеток в кровь [1]. Многие авторы считают, что эффективность лечения стволовыми/прогениторными клетками обусловлена в первую очередь их паракринным действием путем секреции различных ростовых факторов и цитокинов [2–4]. Локальные сигнальные молекулы, полный список которых еще предстоит определить, способствуют неоангиогенезу и влияют на образование сосудистых структур. Кроме того, они способны регулировать локальное воспаление и оказывать антиапоптотическое действие. Паракринные сигналы также влияют на внеклеточный матрикс и активируют соседние резидентные стволовые/прогениторные клетки [5].

Для стимуляции регенерации, особенно индукции ангиогенеза в ишемизированных и поврежденных тканях при сердечно-сосудистой патологии, необходимо влияние биологически активных веществ, в том числе цитокинов и ростовых факторов [6].

В некоторых исследованиях показано, что стволовые/прогениторные клетки костного мозга продуцируют широкий спектр ростовых факторов с проангиогенным действием: ангиопоэтин-1, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), HGF, FGF, TGF- β , интерлейкин (IL-1), IL-6, IL-10, IL-18, фактор некроза опухоли α (TNF- α), белок хемоаттрактант моноцитов, ростовые факторы (GM-CSF, G-CSF) и др. [7, 8]. При этом спектр продуцируемых цитокинов и ростовых факторов исследовали у общей популяции клеток костного мозга, которая кроме эндотелиальных прогениторных клеток содержит гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки. Данные о продуцирующей активности циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток немногочисленны и преимущественно относятся к определению секрета адгезивных культивируемых в ранние сроки клеток. Группа ученых под руководством J. Rehman исследовала уровень проангиогенных секреторных факторов эндотелиальных прогениторных клеток. Адгезивная фракция эндотелиальных прогениторных клеток, экспрессирующая моноцитарные маркеры, не отличается высоким пролиферативным потенциалом и секретирует ростовые факторы – VEGF, HGF, G-CSF,

GM-CSF [9]. Другие авторы показали, что кондиционная среда при культивировании эндотелиальных прогениторных клеток доноров содержит VEGF, G-CSF, IL-8 и IL-17, при этом возраст не влияет на уровень секреции данных цитокинов [10].

Популяция CD34⁺/CD133⁺ эндотелиальных прогениторных клеток мышей экспрессирует несколько изоформ VEGF, кроме того при культивировании значительно увеличивается экспрессия VEGF-120 и VEGF-164 [11]. Спектр продуцируемых эндотелиальными прогениторными клетками биологически активных молекул преимущественно относится к факторам роста, а цитокинпродуцирующая активность исследована недостаточно.

Цель исследования – оценить цитокинпродуцирующую способность мононуклеарных клеток, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, и ее корреляцию с выходом эндотелиальных прогениторных клеток в процессе мобилизации G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Материал и методы

Исследовали 35 пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца с III–IV функциональным классом ХСН по классификации Нью-йоркской ассоциации сердца (NYHA), подписавших информированное согласие, в соответствии с протоколами, которые утвердили этические комитеты и ученые советы учреждений исполнителей (протокол № 5 от 02.06.2008 – НИИКЭЛ; № 26 от 24.02.2009 – НИИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина).

Средний возраст пациентов составил 57,0 \pm 7,6 года, 89% – мужчины. Длительность заболевания ишемической болезнью сердца – 7,94 \pm 5,86 года, количество перенесенных инфарктов миокарда – 1,59 \pm 0,77. Пациенты проходили обследование и плановое хирургическое лечение в центре интервенционной кардиологии НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Мобилизацию мононуклеарных клеток в периферическую кровь проводили путем введения пациентам рекомбинантного человеческого G-CSF (Grasvalva, Израиль) подкожно в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в сутки общим количеством 5 инъекций. До и после мобилизации G-CSF у пациентов забирали венозную кровь. На шестые сутки пациентам проводили процедуру аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови (Haemonetics MCS⁺, США). Использовали программу PBSC (получение периферических стволовых клеток). Мононуклеары из сепарированной крови выделяли на градиенте плотности фикола-верографина ($\rho = 1,078$ г/л), дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе,

Таблица 1 Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах мононуклеарных клеток до и после завершения мобилизации G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (n = 35)

Цитокины (Me; LQ–HQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	спонтанная секреция	конканавалин А	липополисахарид	спонтанная секреция	конканавалин А	липополисахарид
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	420,4 (172–1 376)	644,3 (405–900)	33,0 (23–85), p = 0,0003	278,3 (188–738), p = 0,59	240,3 (130–370), p = 0,14
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	570,6 (101–746)	534,7 (345–694)	72,1 (22–102), p = 0,72	484,6 (101–748), p = 0,47	680,3 (102–119), p = 0,75
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	58,1 (50–64)	39,2 (36–40)	103,2 (67–135), p = 0,034	197,3 (102–374), p = 0,017	147,2 (102–256), p = 0,0004
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	1550,3 (147–4 450)	1425,0 (120–4 000)	735,7 (103–822), p = 0,31	740,2 (420–4 805), p = 0,09	735,1 (350–4 065), p = 0,14
Еро, МЕ/мл	27,2 (17,8–101)	215,7 (161–277)	234,8 (171–240)	102,2 (36–306), p = 0,008	213,5 (130–289), p = 0,67	162,5 (129–223), p = 0,63
G-CSF, пг/мл	13,1 (10–101)	135,5 (127–165)	16,1 (15–18)	11,0 (10–30), p = 0,3	967,4 (769–1 010), p = 0,0007	940,3 (763–3 332), p = 0,0007
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	293,5 (256–300)	448,4 (432–458)	298,1 (113–340), p = 0,03	300,2 (287–339), p = 0,56	386,7 (211–470), p = 0,09

p – достоверность различий по сравнению с показателями продукции цитокинов до введения G-CSF

подсчитывали количество, жизнеспособность выделенных клеток. Фенотип эндотелиальных прогениторных клеток исследовали с использованием моноклональных антител, меченных FITC и PE к CD34, CD45, CD133, VEGFR₂, CD31, CD14 (Becton Dickinson, США) на проточном цитометре FACSCantoll (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя. Уровень продукции цитокинов изучали в кондиционных средах от 72-часовых культур мононуклеарных клеток как в спонтанном, так и стимулированных тестах (5 мкг/мл конканавалина А, США; 10 мкг/мл липополисахарида, США), а также в присутствии G-CSF (50 Ед/мл; Graspalva, Израиль) и эритропоэтина (33 Ед/мл; Рекормон, США). Аликвоты собранных кондиционных сред замораживали и хранили при –20 °С до тестирования. Содержание в кондиционной среде TNF- α , IL-8, IL-10, IL-18, VEGF, Еро и G-CSF определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Индекс стимуляции секреторного уровня рассчитывали как соотношение оптической плотности продукта реакции в опыте

к оптической плотности продукта реакции в контроле. Полученные результаты исследования статистически обрабатывали с использованием программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно критериям Колмогорова – Смирнова, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (25% LQ) и верхним (75% HQ) квартилями. Достоверность различий оценивали по критериям Манна – Уитни. Взаимосвязь явлений устанавливали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Мононуклеарные клетки (МНК) у пациентов с ХСН конститутивно продуцируют регуляторные цитокины и ростовые факторы (табл. 1), причем уровень секреции VEGF, IL-8 и TNF- α в спонтанных условиях был наиболее высоким. Продукция МНК TNF- α , IL-10, IL-8 и Еро стимулировалась как Т-клеточным митогеном конканавалином А, так и липополисахаридом – митогеном для клеток моноцитарного ряда. Продукция G-CSF и IL-18

Таблица 2 Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах мононуклеарных клеток до и после мобилизации G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (n = 35)

Цитокины (Ме; LQ–HQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	Спонтанная секреция	Секреция, стимулированная G-CSF	Индекс стимуляции	Спонтанная секреция	Секреция, стимулированная G-CSF	Индекс стимуляции
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	80,5 (55–110) p = 0,09	0,8	33,0 (23–85)	425,5 (208–888) p = 0,0004	12,8
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	525,2 (338–650) p = 0,01	7,7	72,1 (22–102)	1294,3 (990–1 520) p = 0,004	17,9
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	181,2 (167–198) p = 0,009	5,4	103,2 (67–135)	235,4 (113–274) p = 0,02	2,2
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	3115,4 (2 980–3 345) p = 0,008	4,2	735,7 (103–822)	1729,7 (357–3 586) p = 0,18	2,3
Еро, МЕ/мл	27,2 (18–101)	90,3 (80–101) p = 0,009	3,0	102,2 (35–306)	176,5 (132–201) p = 0,9	1,7
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	172,9 (156–180) p = 0,009	0,7	298,1 (113–340)	298,3 (240,5–389) p = 1,0	1,0

p – достоверность различий по сравнению с показателями спонтанной продукции цитокинов и ростовых факторов

МНК увеличилась при стимуляции конканавалином А, а VEGF – липополисахаридом. После окончания мобилизации МНК, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками, уменьшали продукцию двух цитокинов – TNF- α и G-CSF – по сравнению с продукцией до мобилизации G-CSF, но статистически значимо уменьшался только уровень TNF- α . В то же время уровень секреции IL-18, Еро и VEGF статистически значимо увеличился, а IL-8 и IL-10 сохранялся после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.

Функциональный резерв мобилизованных МНК, содержащих эндотелиальные прогениторные клетки, в виде ответа на митогенные стимулы оставался высоким, за исключением продукции VEGF и IL-8 после мобилизации.

Аутокринные и межклеточные паракринные взаимодействия во многом определяют функциональное состояние клеток, поэтому далее изучали влияние внешних цитокиновых стимулов на секреторную активность МНК пациентов с ХСН до и после введения G-CSF. Использовали G-CSF и Еро в качестве стимулятора культуры МНК до введения G-CSF пациентам и культуры МНК, обогащенной эндотелиальными прогениторными клетками. В экспериментальных исследованиях *in*

vitro и *in vivo* показано, что данные цитокины обладают проангиогенными свойствами [12, 13].

Добавление в культуру МНК *in vitro*, полученную до процедуры мобилизации у пациентов, ростового фактора G-CSF приводит к статистически значимому увеличению продукции IL-10, IL-18, IL-8 и Еро и снижению уровня VEGF (табл. 2). После мобилизации добавление G-CSF в культуру МНК статистически значимо стимулирует секрецию трех цитокинов – TNF- α , IL-10 и IL-18, при этом уровень секреции VEGF остается неизменным.

Добавление Еро в культуру МНК *in vitro*, полученную до мобилизации G-CSF, как и культивирование МНК с G-CSF, приводят к повышению секреции трех цитокинов – IL-10, IL-18 и IL-8. Уровень секреции G-CSF и VEGF остается неизменным (табл. 3). Добавление Еро к культивируемым МНК, обогащенным эндотелиальными прогениторными клетками путем мобилизации, повышает продукцию всех анализируемых цитокинов. Только Еро увеличивает секрецию VEGF в культуре, стимулированной введением G-CSF пациентам. G-CSF и Еро стимулируют сниженную продукцию TNF- α после мобилизации.

По данным литературы, TNF- α , провоспалительный цитокин, обладает и ангиогенными свойствами [14].

Таблица 3 Показатели концентрации цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах мононуклеарных клеток до и после мобилизации G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (n = 35)

Цитокины (Ме; LQ–HQ)	До мобилизации			После мобилизации		
	Спонтанная секреция	Секреция, стимулированная эритропоэтином	Индекс стимуляции	Спонтанная секреция	Секреция, стимулированная эритропоэтином	Индекс стимуляции
TNF- α , пг/мл	102,3 (100–175)	100,2 (99–101), $p = 0,09$	1,0	33,0 (23–85)	990,3 (792–1 298), $p = 0,0004$	30,1
IL-10, пг/мл	67,7 (57–101)	294,5 (189–300), $p = 0,006$	4,3	72,1 (22–102)	895,4 (790–1 190), $p = 0,001$	12,4
IL-18, пг/мл	33,0 (18–102)	399,4 (212–415), $p = 0,04$	12,1	103,2 (67–135)	190,5 (104–228), $p = 0,039$	1,8
IL-8, пг/мл	732,9 (103–965)	3 840,7 (2 890–4 160), $p = 0,009$	5,2	735,7 (103–822)	1 578,8 (348–3 100), $p = 0,008$	2,1
G-CSF, ME/мл	27,2 (18–101)	8,5 (7–10), $p = 0,06$	0,6	102,2 (35–306)	865,5 (586–3 660), $p = 0,0004$	78,6
VEGF, пг/мл	256,2 (102–450)	253,4 (219–270), $p = 0,06$	1,0	298,1 (113–340)	327,0 (278–492), $p = 0,03$	1,1

p – достоверность различий по сравнению с показателями спонтанной продукции цитокинов и ростовых факторов

Индекс стимуляции секреторной активности МНК, полученных до мобилизации, был наиболее высоким для IL-10, IL-18, IL-8 при стимулировании как G-CSF, так и Epo. После мобилизации G-CSF и Epo обладали максимальной стимулирующей активностью в отношении TNF- α и IL-10, а Epo стимулировал и продукцию G-CSF. Таким образом, добавление G-CSF в культуру МНК пациентов после мобилизации статистически значимо стимулирует продукцию трех цитокинов – TNF- α , IL-10 и IL-18, а культивирование МНК с Epo увеличивает продукцию еще IL-8, G-CSF и VEGF. Полученные данные свидетельствуют о паракринных взаимодействиях и возможном аутокринном влиянии указанных цитокинов, продуцируемых МНК, обогащенными эндотелиальными прогениторными клетками.

Далее выяснили участие различных популяций эндотелиальных прогениторных клеток в продукции цитокинов при мобилизации G-CSF. Результаты корреляционного исследования взаимосвязи абсолютного количества различных популяций циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и конститутивного уровня цитокинов в кондиционных средах при культивировании МНК после мобилизации G-CSF представлены в табл. 4.

Установили высокую и прямую взаимосвязь количества эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34⁺/CD133⁺ в периферической крови у пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF и продукции TNF- α ($R = 0,729$; $p = 0,02$). Между продукцией IL-18 и количеством в крови эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34⁺/VEGFR₂⁻ и с фенотипом CD34⁺/VEGFR₂⁺ имеется прямая и высокая зависимость ($R = 0,7$; $p = 0,03$ и $R = 0,82$; $p = 0,01$ соответственно). Продукция Epo имела высокую и прямую сопряженность с количеством эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34⁺/VEGFR₂⁺ среди мононуклеарных клеток у пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF. Кроме того, установили взаимосвязь количества эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34⁺/CD31⁺ с продукцией VEGF, которая носила прямой и сильный характер. Также установили высокую и прямую сопряженность количества эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34⁺/CD31⁺ с продукцией IL-10 ($R = 0,9$; $p = 0,03$).

Таким образом, можно предположить, что эндотелиальные прогениторные клетки практически всех анализируемых фенотипов (CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/VEGFR₂⁻, CD34⁺/VEGFR₂⁺, CD34⁺/

Таблица 4 Показатели взаимосвязи количества эндотелиальных прогениторных клеток в периферической крови и продукции цитокинов и ростовых факторов после мобилизации G-CSF (n = 35)

Популяции эндотелиальных прогениторных клеток	Анализируемые цитокины и ростовые факторы				
	TNF- α	IL-10	IL-18	Epo	VEGF
CD34 ⁺ /CD133 ⁺	R = 0,729, p = 0,02	R = 0,16, p = 0,67	R = -0,17, p = 0,65	R = 0,24, p = 0,51	R = 0,24, p = 0,51
CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁻	R = 0,25, p = 0,51	R = 0,22, p = 0,55	R = 0,7, p = 0,03	R = 0,3, p = 0,4	R = 0,05, p = 0,89
CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺	R = 0,4, p = 0,3	R = 0,32, p = 0,44	R = 0,82, p = 0,01	R = -0,4, p = 0,3	R = -0,3, p = 0,42
CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺	R = 0,42, p = 0,7	R = -0,4, p = 0,29	R = 0,1, p = 0,19	R = 0,86, p = 0,005	R = -0,21, p = 0,58
CD34 ⁺ /CD31 ⁺	R = -0,3, p = 0,62	R = 0,8, p = 0,1	R = 0,5, p = 0,39	R = -0,7, p = 0,18	R = 0,9, p = 0,03
CD34 ⁺ /CD31 ⁺	R = -0,1, p = 0,87	R = 0,9, p = 0,03	R = 0,6, p = 0,28	R = 0,6, p = 0,28	R = 0,7, p = 0,28

CD31⁺, CD34/CD31) участвуют в продукции цитокинов, обладающих выраженной проангиогенной активностью.

Выводы

Мононуклеарные клетки периферической крови у пациентов с ХСН продуцируют цитокины и ростовые факторы с проангиогенным действием. Обогащение периферической крови эндотелиальными прогениторными клетками в результате мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН приводит к увеличению секреции МНК цитокинов с проангиогенной активностью – IL-18, Epo и VEGF – и возрастанию функционального резерва продукции мононуклеарными клетками G-CSF. Мобилизация эндотелиальных прогениторных клеток G-CSF ведет к снижению секреции МНК провоспалительного цитокина TNF- α . При этом эндотелиальные прогениторные клетки вносят вклад в продукцию таких цитокинов и ростовых факторов, как TNF- α , IL-18, IL-10, Epo, VEGF.

Результаты исследования свидетельствуют о возможности использования мононуклеарных клеток, полученных в результате мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, для лечения хронической сердечной недостаточности.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Ким И.И., Повещенко О.В., Коненков В.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Бондаренко Н.А., Повещенко А.Ф., Сергеевичев Д.С., Караськов А.М. Эффективность мобилизации CD34⁺ прогениторных клеток препаратом G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2012. № 1. С. 75–78.
2. Повещенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Повещенко А.Ф., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Караськов А.М., Коненков В.И. Функциональная характеристика мононуклеаров периферической крови после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациентов с хронической сердечной недостаточностью // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. № 1. С. 26–31.
3. Richardson M.R., Yoder M.C. Endothelial progenitor cells: Quo Vadis? // J. Mol. Cell. Cardiol. 2011. Vol. 50. № 2. P. 266–272.
4. Maguire G. Stem cell therapy without the cells // Commun. Integr. Biol. 2013. Vol. 6. P. e26631.
5. Wang M., Crisostomo P.R., Herring C., Meldrum K.K., Meldrum D.R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2006. Vol. 291. P. R880–4.
6. Aicher A., Zeiher A.M., Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells // Hypertension. 2005. Vol. 45. P. 321–325.
7. Kim W.S., Lee S., Yoon Y.S. Cardiovascular repair with bone marrow-derived cells // Blood Res. 2013. Vol. 48. P. 76–86.
8. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine

- mechanisms // *Circulation*. 2004. Vol. 109. P. 1543–1549.
9. Rehman J., Li J., Orschell C.M. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors // *Circulation*. 2003. Vol. 5. P. 1164–1169.
 10. Kushner E., Van Guilder G., MacEneaney O., Greiner J., Cech J., Stauffer B., DeSouza C. Ageing and endothelial progenitor cell release of proangiogenic cytokines // *Age Ageing*. 2010. Vol. 39. P. 268–272.
 11. Li R., Nauth A., Li C., Qamirani E., Atesok K., Schemitsch E.H. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs // *J. Orthop. Trauma*. 2012. Vol. 26. P. 689–692.
 12. Hoch M., Fischer P., Stapel B., Missol-Kolka E., Sekkali B., Scherr M., Favret F., Braun T., Eder M., Schuster-Gossler K., Gossler A., Hilfiker A., Balligand J.L., Drexler H., Hilfiker-Kleiner D. Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies // *Cell Stem Cell*. 2011. Vol. 9. P. 131–143.
 13. H. Kojima., Otani A., Oishi A., Makiyama Y., Nakagawa S., Yoshimura N. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphologic protective effect in oxygen-induced retinopathy // *Blood*. 2011. Vol. 117. P. 1091–1100.
 14. Lu P., Li L., Liu G., Baba T., Ishida Y., Nosaka M., Kondo T., Zhang X., Mukaide N. Critical Role of TNF- α -Induced Macrophage VEGF and iNOS Production in the Experimental Corneal Neovascularization // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2012. Vol. 53. № 7. P. 3516–3526.

Correlation of cytokine profile mononuclear and endothelial progenitor cells, obtained in the course of the mobilization of granulocyte colony-stimulating factor in patients with chronic heart failure

Poveshchenko O.V.^{1,2*}, Bondarenko N.A.^{1,2}, Lykov A.P.^{1,2}, Kim I.I.^{1,2}, Surovtseva M.A.^{1,2}, Poveshchenko A.F.^{1,2}, Pokushalov E.A.², Romanov A.B.², Karas'kov A.M.², Kononov V.I.¹

* Corresponding author. Email: poveshchenkoov@yandex.ru

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, 2 Timakova St., 630060 Novosibirsk, Russian Federation

² Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation

Objective: The aim of the study was to evaluate the ability of cytokine peripheral blood mononuclear cells and its correlation with the release of endothelial progenitor cells after mobilization of G-CSF in patients with chronic heart failure.

Methods: Mononuclear cells were obtained from peripheral blood of 35 patients with chronic heart failure before and after mobilization procedures G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Spectrum of cytokine production and growth factors mononuclear cells was evaluated by ELISA in spontaneous conditions and upon stimulation of cells with concanavalin A, lipopolysaccharide, G-CSF, erythropoietin.

Results: A statistically significant increase in the spontaneous production of IL-18, VEGF, Epo and reducing TNF- α production and G-CSF mononuclear cells after mobilization procedures G-CSF. A statistically significant increase in mononuclear cell production of IL-18, VEGF, and G-CSF in response to mitogenic stimulation (Con A) and decrease in production of IL-8 after mobilization procedures G-CSF. In response to an antigenic stimulus (LPS) mononuclear cells were enriched with endothelial progenitor cells from patients with chronic heart failure responded statistically significant increase in the production of IL-18 and G-CSF, and decreased production - TNF- α , as compared to similar products of cytokines and growth factors prior to the procedure to mobilize G-CSF. Proangiogenic cytokines G-CSF or Epo result in a statistically significant increase in the production TNF- α , IL-10, VEGF, and G-CSF mononuclear cells enriched endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure.

Conclusion: Peripheral blood mononuclear cells, endothelial progenitor cells enriched after mobilization of G-CSF, in patients with chronic heart failure produce cytokines and growth factors with proangiogenic effect. Thus, endothelial progenitor cells contribute to the production of cytokines and growth factors such as TNF- α , IL-18, IL-10, Epo, VEGF. Mononuclear cells were obtained after mobilization of G-CSF, can be used to treat chronic heart failure.

Key words: cytokines; growth factors; mononuclear cells; endothelial progenitor cells; chronic heart failure

Received 14 September 2015. Accepted 20 November 2015.