

Е.В. Парфенова¹, В.А. Ткачук²

¹ ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России

² ГУНУ Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Влияние гипергликемии на ангиогенные свойства эндотелиальных и прогениторных клеток сосудов

В докладе приведены собственные данные авторов, касающиеся влияния гипергликемии на основные функциональные свойства эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток и циркулирующих прогениторных клеток, определяющие их участие в процессах ангиогенеза. Полученные данные показывают, что культивирование эндотелиальных клеток в условиях, моделирующих гипергликемию, подавляет их способность к направленной миграции и формированию сосудоподобных структур на Матригеле, а также экспрессию рецепторов к VEGF в этих клетках. Культивирование МСК в условиях, моделирующих гипергликемию, изменяет экспрессионный профиль этих клеток, уменьшает их способность стимулировать ангиогенез через паракринную активность. У больных ишемической болезнью сердца, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа, гипергликемия, вероятно, приводит к нарушению мобилизации циркулирующих прогениторных клеток из костного мозга в ответ на ишемию тканей и повреждение эндотелия, что может нарушать их участие в репарации эндотелия и ангио- и васкулогенезе при ишемии. Выявленные нарушения могут быть мишенью для терапии, направленной на предотвращение сердечно-сосудистых осложнений при сахарном диабете.

Ключевые слова: гипергликемия, сахарный диабет 2 типа, ангиогенез.

38

Хорошо известно, что сердечно-сосудистые осложнения — основная причина смерти больных сахарным диабетом. Именно стенка сосуда служит основной мишенью для повреждения при сахарном диабете. Основным повреждающим фактором является гипергликемия, которая через активацию сорбитолового пути, протеинкиназы С и гликирование белков приводит к развитию оксидативного стресса, уменьшению образования оксида азота, активации провоспалительного пути NF-κB и увеличению синтеза белков внеклеточного матрикса клетками сосудистой стенки, что, с одной стороны, способствует ускоренному развитию атеросклероза и прогрессированию макроангиопатий, а с другой — вызывает повреждение микрососудистого русла (рис. 1). Одно из проявлений такого повреждения — нарушение процессов неоваскуляризации: развитие патологического избыточного ангиогенеза с высокопроницаемыми сосудами в сетчатке глаза, что ведет

к диабетической ретинопатии и развитию недостаточного адаптивного ангио-артериогенеза в сердце и мышцах нижних конечностей, способствует тяжелой ишемии, незаживающим трофическим язвам и ампутациям.

Процессы неоваскуляризации ишемизированных тканей осуществляются при участии и взаимодействии нескольких типов клеток сосудистой стенки, а именно эндотелиальных и прогениторных, каковыми являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (мезенхимальные стволовые клетки). Помимо этого, процессы репарации сосуда и неоваскуляризации осуществляются при участии циркулирующих эндотелиальных предшественников, мобилизующихся из костного мозга в ответ на ишемию и повреждение сосудов.

Мы изучали влияние гипергликемии на основные функциональные свойства этих типов клеток, определяющие их участие в процессах роста сосудов.

E.V. Parfenova¹, V.A. Tkachuk²

¹ Federal State Budget Institution Russian cardiologic scientific productive complex Ministry of Healthcare and Social development of Russian Federation, Moscow

² Lomonosov Moscow State University

Hyperglycemia impact on angiogenic properties of endothelial and progenitor vascular cells

This report contains authors own data about hyperglycemia impact on main functional properties of endothelial cells, mesenchymal stem cells and circulating progenitor cells, which define their participation in angiogenesis. Obtained data shows that cultivation of endothelial cells in hyperglycemic conditions leads to decrease of their ability for targeted migration and vascular-like structures formation on matrigel, and to suppression of VEGF receptors expression in these cells. Mesenchymal stem cells cultivated in hyperglycemic conditions have altered expression profile, decreased ability to stimulate angiogenesis via paracrine activity. Hyperglycemia in CHD patients with concomitant diabetes mellitus type II most probably lead to circulating bone marrow progenitor cells mobilisation distortion in response to tissue ischemia and damage to the endothelium, that can infringe upon their participation in endothelium reparation and angiо- and vasculogenesis in the ischemic conditions. Found distortions can be used as targets for the treatment aimed at cardiovascular complications prevention in diabetic patients.

Key words: hyperglycemia, diabetes mellitus type II, angiogenesis.

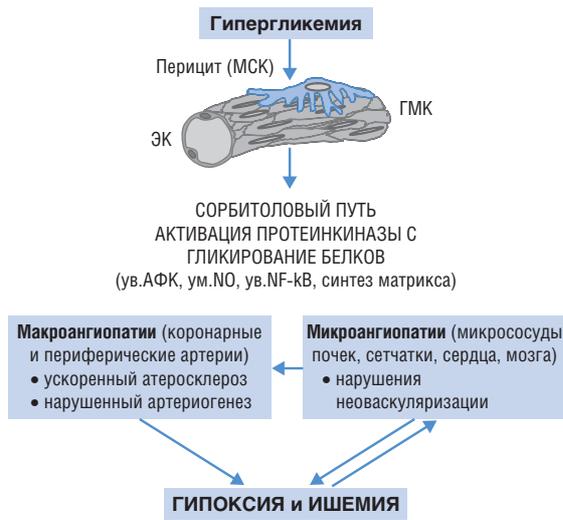


Рис. 1.

Основным типом клеток, определяющим процесс ангиогенеза — отрастания новых сосудов от уже существующих, являются эндотелиальные клетки (ЭК), которые активируются при возникновении локальной ишемии тканей за счет того, что в условиях гипоксии в клетках тканей повышается экспрессия и секреция ангиогенных факторов, прежде всего VEGF, рецепторы к которому селективно экспрессированы на эндотелиальных клетках (рис. 2). Взаимодействие VEGF с его рецепторами активирует экспрессию протеаз в ЭК, они разрушают межклеточные контакты и базальную мембрану, начинают активно делиться и мигрировать в ишемизированную ткань по градиенту хемоаттрактанта с образованием нового сосудистого отростка. Это основные процессы, с которых начинается ангиогенез при ишемии.

Мы исследовали, как влияет моделирование гипергликемии *in vitro* на ангиогенное поведение эндотелиальных клеток.

Для этого ЭК человека культивировались при нормальной (5,5 мМ) и повышенной (25 мМ) концентрации глюкозы с оценкой их способности к направленной миграции в трансвеллах на VEGF и эмбриональную сыворотку (рис. 3). Как видно, культивирование в условиях, моделирующих гипергликемию, приводит к небольшому, но достоверному подавлению способности ЭК к направленной миграции на VEGF и сыворотку.

Помимо этого, культивирование при повышенной концентрации глюкозы нарушает способность ЭК к капиллярогенезу, который оценивался нами как формирование капиллярноподобных структур ЭК на Матригеле. Количество капиллярноподобных структур, образуемых ЭК при высокой концентрации глюкозы, в четыре раза меньше, чем при нормальной концентрации (рис. 4).

Для выяснения возможного механизма подобных нарушений была исследована экспрессия рецепторов к VEGF на эндотелиальных клетках, так как именно процесс взаимодействия этого ангиогенного фактора с рецепторами на ЭК запускает адаптивный ангиогенез при ишемии. Оказалось, что культивирование ЭК при высокой концентрации глюкозы приводит к подавлению экспрессии генов рецепторов VEGF 1-го типа почти в 5 раз и рецепторов 2-го типа — более чем в 2 раза (рис. 5).

Уменьшалась не только экспрессия рецепторов на уровне мРНК, но и их количество на поверхности ЭК, что

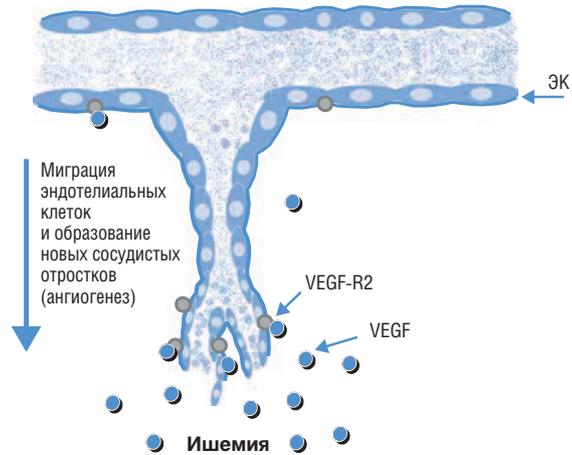


Рис. 2. Ангиогенез начинается с активации пролиферации и миграции эндотелиальных клеток и образования новых сосудистых отростков

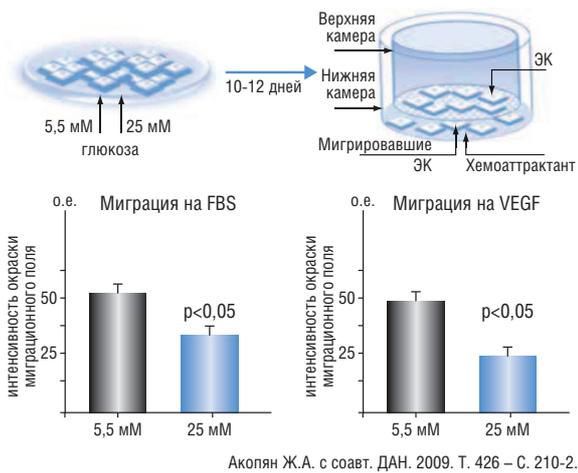


Рис. 3. Культивирование при высокой концентрации глюкозы подавляет миграцию эндотелиальных клеток (ЭК)

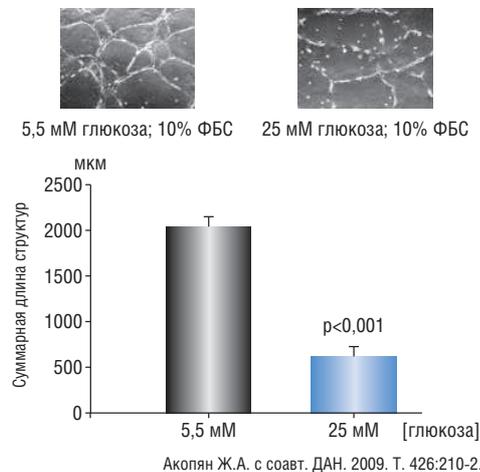
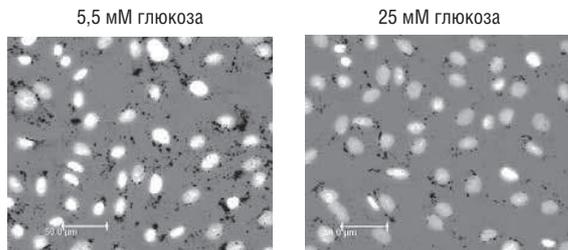


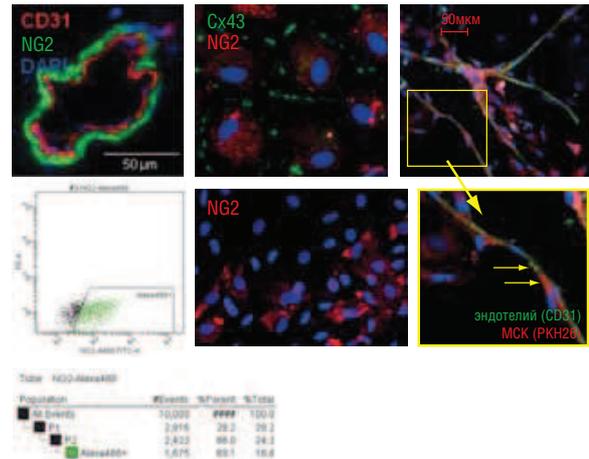
Рис. 4. Культивирование при высокой концентрации глюкозы подавляет формирование эндотелиальными клетками капиллярноподобных структур *in vitro*

ПЦР в реальном времени, отн.ед. n=6, * p<0,05		
мМ глюкозы/МРНК	5,5 мМ	25 мМ
VEGFR1/FLT1	1,1±0,4	0,21±0,18*
VEGFR2/FLK1	1,4±0,6	0,6±0,12*



Антитела против VEGFR2, Alexa 488 (черным цветом), ядра клеток докрашены DAPI (белым цветом)

Рис. 5. Культивирование ЭК в условиях высокой концентрации глюкозы подавляет экспрессию рецепторов VEGF



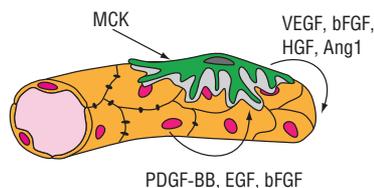
Rubina, Kalinina et al. Tissue Engineering Part A. 2009;15(8):2039-50

Рис. 6. В тканях МСК локализованы периэндотелиально в перичитарном компартменте, имеют перичитарный иммунофенотип и при сокультивировании с эндотелиальными клетками стабилизируют сосудоподобные структуры

40

Полногеномный скрининг (Шумина)		
Ангиопоэтины		Трансформирующие факторы роста
Ang-1, -2		BMP 1, 2,4
Angiopoietin-like 2, -4		TGFβ1,b3
Интерлейкины		Факторы роста эндотелия сосудов
IL-6	IL-12A	VEGF A
IL-8	IL-15	VEGF B
IL-17D	IL-18	VEGF C
IL-10	IL-32	Placental growth factor
Протеазы		Факторы роста фибробластов
MMP 2		FGF 1
MMP 3		FGF 2
MMP 11		FGF 5
MMP 14		FGF 20
MMP 23		FGF 21
UPA		

ИФА (данные представлены как медиана (25%, 75% процентиля))	
Фактор	Секреция нг/млн клеток
VEGF-A	13,5 (4,6; 21,9)
PIGF	0,1 (0,05; 0,22)
HGF	2,2 (1,5; 3,3)
Ангиопоэтин	0,8 (0,4; 1,3)
Ангиогенин	2,1 (1,4; 3,9)
Урокиназа	1,8 (0,5; 3,0)



Калинина Н.И. с соавт. Acta Natura, 2011,3(4):6-13

Рис. 7. МСК продуцируют цитокины, факторы роста, протеазы и интерлейкины

хорошо видно при иммунофлуоресцентном анализе клеток при их окрашивании антителами к рецепторам VEGF 2-го типа. На рисунке 5 хорошо видно, что клетки, культивированные в условиях нормального содержания глюкозы, содержат на своей поверхности рецепторы 2-го типа (зеленая флуоресценция), и этих рецепторов значительно меньше на клетках, культивированных при высокой концентрации глюкозы, что, по-видимому, и является основным механизмом нарушения их ангиогенного поведения.

Другим типом клеток сосудистой стенки, участвующих в процессах ангио-артериогенеза, являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые выделены не только из ткани костного мозга, но и из многих тканей, в частности из жировой, и представляют собой тип резидентных прогениторных клеток, локализующихся в сосудистой стенке. Эти клетки в значительной степени представлены перичитами, локализируются периэндотелиально и способны контактировать с ЭК через поры в базальной мембране. Мы показали, что большая часть МСК, выделяемых из жировой ткани, несет на своей поверхности маркеры перичитов — NG2 и рецептор к тромбоцитарному фактору роста, а также экспрессирует белок щелевых контактов — коннексин 43 (рис. 6). При совместном культивировании МСК и ЭК они стабилизируют сосудоподобные структуры, образованные эндотелиальными клетками, примыкая и контактируя с ними через щелевые контакты. Но основным механизмом влияния МСК на ангиогенез является их способность секретировать широкий спектр ангиогенных факторов.

На рис. 7 приведены результаты полногеномного скрининга МСК, выделенных из жировой ткани человека, которые показали, что в этих клетках экспрессируются гены большинства регуляторов ангиогенеза, таких как факторы роста сосудистого эндотелия, факторы роста фибробластов, ангиопоэтины, морфогенные факторы, интерлейкины и протеазы. Эти факторы также и секретируются этими клетками (см. рис. 7). На моделях ангиогенеза *in vivo* показано, что именно паракринная активность МСК ответственна за их способность стимулировать ангиогенез при трансплантации.

Исследование функциональных свойств МСК при моделировании гипергликемии *in vitro* показало, что куль-

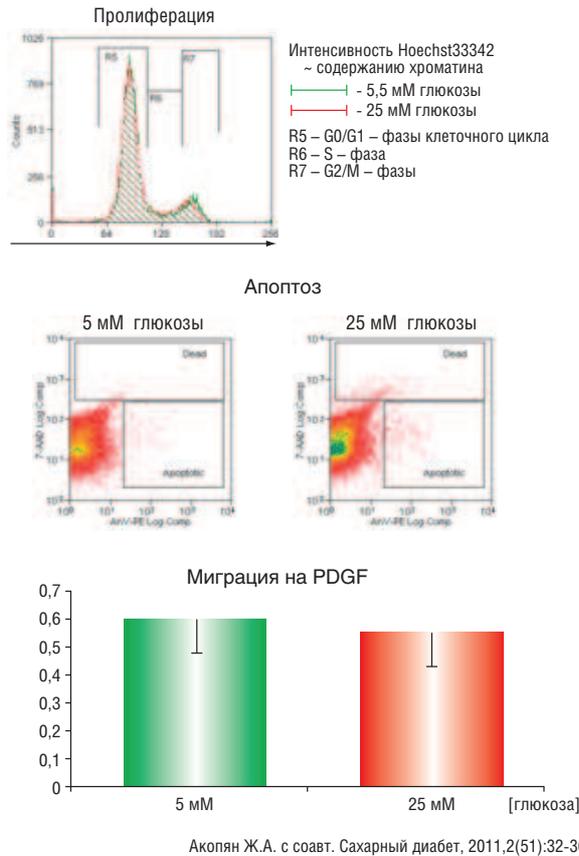


Рис. 8. Культивирование при высокой концентрации глюкозы не влияет на апоптоз, пролиферацию и миграцию МСК

тивирование при высокой концентрации глюкозы не изменяет их способность к пролиферации, не увеличивает апоптоз и не влияет на направленную миграцию МСК (рис. 8).

Однако при исследовании ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК, оцениваемой по способности кондиционированной среды МСК стимулировать образование эндотелиальными клетками капилляроподобных структур на Матригеле, было обнаружено, что при культивировании МСК в условиях повышенной концентрации глюкозы способность продуктов их секреции стимулировать ангиогенез *in vitro* значительно снижается (рис. 9).

Для того, чтобы понять, что может быть ответственно за такое снижение, мы проанализировали экспрессионный профиль МСК, культивированных при различных концентрациях глюкозы. Оказалось, что наиболее значимые изменения экспрессии касались генов эфринных рецепторов, гена витронектина и гена, кодирующего белок, содержащий плексиновый домен 1, экспрессия которых значительно снижалась в условиях, моделирующих гипергликемию. В то же время экспрессия генов лептина — проангиогенного, провоспалительного и атерогенного адипокина, фактора некроза опухоли альфа — основного провоспалительного цитокина, ангиопоэтин-подобного фактора 3 и плазминогена — предшественника плазмина, протеазы широкой специфичности — значительно повышалась. Не удалось выявить значимых изменений экспрессии основных ангиогенных факторов и их

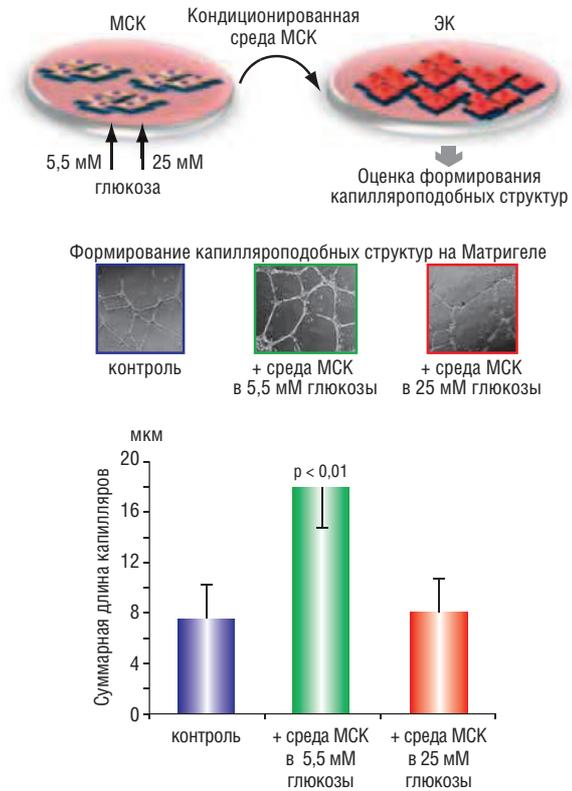


Рис. 9. Культивирование при высокой концентрации глюкозы подавляет способность продуктов секреции МСК стимулировать ангиогенез *in vitro*

рецепторов при культивировании МСК в условиях повышенной концентрации глюкозы.

Пытаясь найти объяснение тому, что способность суммарных продуктов секреции МСК стимулировать ангиогенез *in vitro* значительно снижается при культивировании в условиях, моделирующих гипергликемию, мы обратили внимание на повышение экспрессии плазминогена. Известно, что в опухолях значительное повышение экспрессии плазминогена сопровождается параллельным возрастанием активности матриксных металлопротеиназ, которые расщепляют плазминоген с образованием мощного ингибитора ангиогенеза — ангиостатина. Нельзя исключить, что повышение экспрессии плазминогена в МСК также способно приводить к образованию ангиостатина, подавляющего ангиогенез. Помимо этого, уменьшение ангиогенной активности продуктов секреции МСК может быть обусловлено сочетанным повышением экспрессии и, вероятно, секреции этими клетками фактора некроза опухоли альфа и ангиопоэтин-подобного фактора 3, которые при совместном нанесении на ЭК вызывают их апоптоз.

Обе гипотезы нуждаются в проверке, которая сейчас нами проводится.

И, наконец, третьим типом клеток, участвующих в процессах репарации сосудов и неоваскуляризации, являются циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток, которые мобилизуются из костного мозга в ответ на повреждение сосуда и ишемию, мигрируют в участок повреждения, где заменяют поврежденные ЭК и принимают участие в формировании новых сосудов

Анализ 84 генов (Angiogenic SuperArray)	
Экспрессия подавлена в условиях гипергликемии	Экспрессия повышена в условиях гипергликемии
<ul style="list-style-type: none"> • Рецептор эфрина В4 • Рецептор витронектина • Белок, содержащий плексиновый домен 1 	<ul style="list-style-type: none"> • Лептин • Фактор некроза опухоли-альфа • Плазминоген • Ангиопоэтин-подобный фактор 3

Гипотеза:



42

Рис. 10. Культивирование в условиях высокой концентрации глюкозы изменяет экспрессионный профиль МСК

в зоне ишемии (рис. 10). Если процессы мобилизации этих клеток из костного мозга не нарушены, то их количество в периферической крови возрастает при наличии повреждения эндотелия или развитии ишемии и может быть маркером этих состояний; в случаях нарушения процессов мобилизации этих клеток из костного мозга их количество в крови может снижаться, как и их участие в процессах репарации и неоваскуляризации, что способствует существенному нарушению этих процессов.

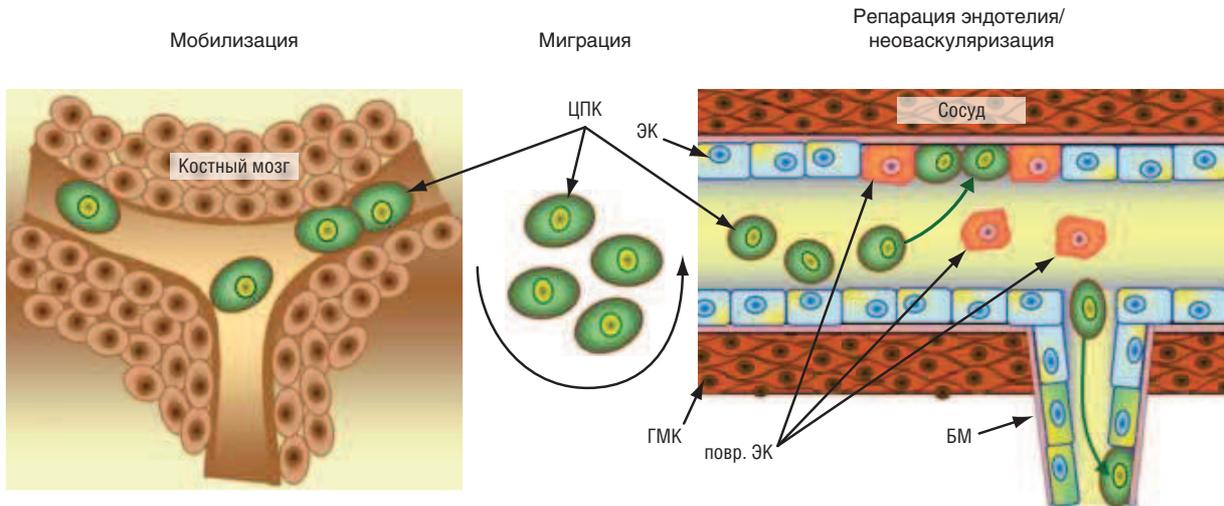
Мы оценили количество эндотелиальных прогениторных клеток в периферической крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с постинфарктной сердечной недостаточностью (СН) в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа. Работа проводилась совместно с научно-консультативным отделом ФГБУ РКНПК, руководимым профессором Ф.Т. Агеевым. На рис. 11 видно, что количество циркулирующих прогениторных клеток (ЦПК) достоверно повышено в группе больных с ИБС и СН по сравнению с контрольной группой относительно здоровых лиц без сердечно-сосудистых заболеваний, того же пола и возраста, что, вероятно, обусловлено повышенной мобилизацией этих клеток из костного мозга в ответ на гипоксию тканей при ИБС и сердечной недостаточности. Однако при сочетании СН с сахарным диабетом 2-го типа такого повышения не обнаружено, несмотря на то, что больные имели те же стадии СН. Это дает основание предполагать, что процессы мобилизации ЦПК нарушены при СД, что может способствовать нарушению участия этих клеток в процессах роста и репарации сосудов. Основным фактором, который, вероятно, ответственен за нарушение мобилизации ЦПК является гипергликемия. При анализе количества клеток в зависимости от компенсированности нарушений углеводного обмена, было обнаружено, что группа больных СН и СД 2 типа распалась на две подгруппы: больные с компенсированными и субкомпенсированными наруше-

ниями углеводного обмена имели уровень ЦПК такой же, как и больные без диабета, то есть у них, вероятно, была сохранена мобилизация этих клеток в ответ на гипоксию тканей при СН; больные с декомпенсированными нарушениями углеводного обмена имели значительно сниженный уровень ЦПК, что при наличии той же стадии СН и, следовательно, гипоксии тканей может указывать на значительное нарушение процессов мобилизации этих клеток из костного мозга. В пользу этого предположения свидетельствует и отсутствие увеличения количества апоптотических ЦПК в этой группе больных.

Количество ЦПК обратно коррелировало с уровнем глюкозы в крови больных, у которых ИБС и СН сочетались с сахарным диабетом 2-го типа; слабая корреляция между этими параметрами также выявлена в объединенной группе всех обследованных: наиболее высокий уровень глюкозы в крови соответствовал самому низкому количеству ЦПК. Это свидетельствует в пользу влияния гипергликемии на мобилизацию ЦПК (рис. 12).

Полученные данные показывают, что гипергликемия может подавлять процесс адаптивного ангиогенеза за счет подавления экспрессии рецепторов к VEGF на эндотелиальных клетках, их способности к направленной миграции и формированию сосудоподобных структур; за счет изменения экспрессионного профиля МСК, что приводит к уменьшению их способности стимулировать ангиогенез через паракринную активность; за счет нарушения мобилизации ЦПК из костного мозга в ответ на ишемию тканей и повреждение эндотелия, что в свою очередь может нарушать процессы его репарации и ангио- васкулогенеза при ишемии (рис. 13). Выявленные изменения могут быть мишенью для терапии, направленной на предотвращение сердечно-сосудистых осложнений при сахарном диабете.

Авторы доклада выражают глубокую благодарность коллегам, участвовавшим в данной работе:



CD34⁺, CD133⁺, KDR⁺, CD45⁻ ЦПК (проточная цитофлуориметрия)

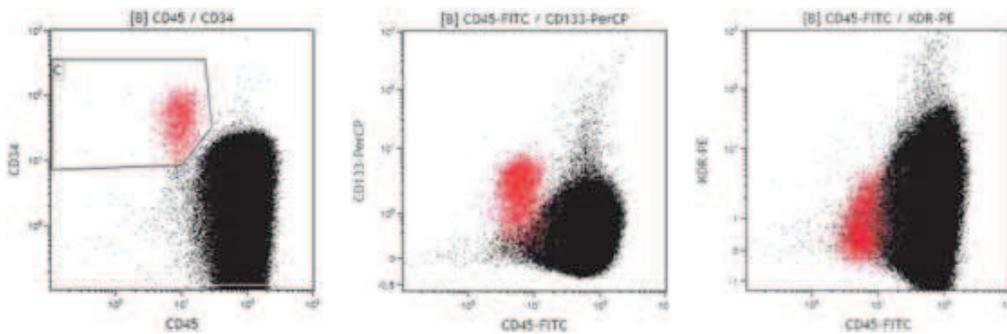


Рис. 11. Циркулирующие прогениторные клетки участвуют в процессах репарации эндотелия и неоваскуляризации

Ф.Т. Агееву, д.м.н., профессору, руководителю научно-консультативного отдела ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития

М.В. Шестаковой, д.м.н., член-корр. РАМН, директору Института диабета Эндокринологического научного центра РАМН

Ж.А. Акопян, зам. декана факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Т.Н. Кочегура, к.м.н., докторанту факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

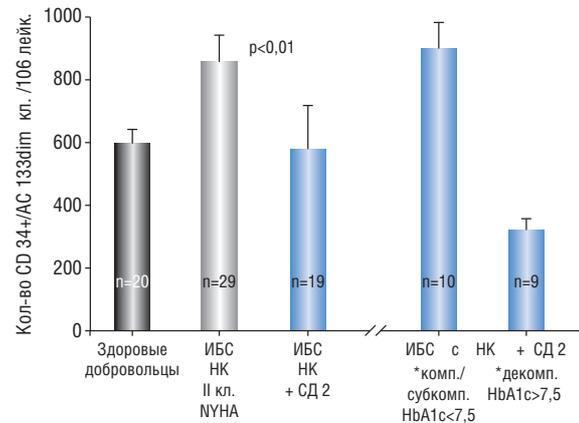
Н.И. Калининой, к.б.н., с.н.с. лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

К.А. Рубиной, к.б.н., с.н.с. лаборатории постгеномных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Г.В. Шаронову, к.ф.-м.н., н.с. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

А.Г. Овчинникову, к.м.н., в.н.с. научно-консультативного отдела ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития

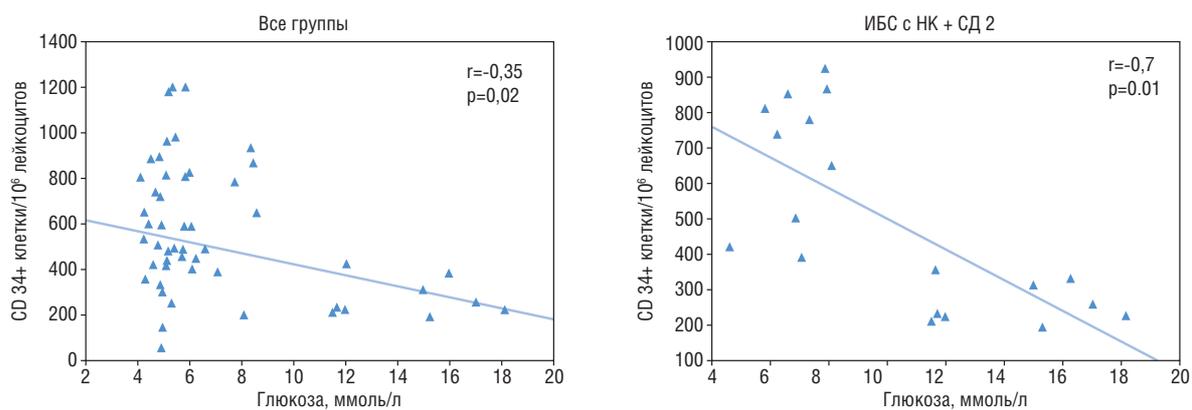
Л.В. Жигуновой, врачу научно-консультативного отдела ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития



*Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. 4-ый выпуск, Москва- 2009.

Кочегура Т.Н. с соав. Сахарный диабет, 2011;3(52):36-43

Рис. 12. Количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с сердечной недостаточностью в сочетании с сахарным диабетом 2 типа



Кочегура Т.Н. с соав. Сахарный диабет, 2011;3(52):36-43

Рис. 13. Корреляции количества циркулирующих прогениторных клеток с уровнем глюкозы плазмы крови

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Парфенова Елена Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории ангиогенеза ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России

Адрес: 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15-а

Тел.: +7(495)414-67-12

Е-mail: yeparfyon@mail.ru

Ткачук Всеволод Арсеньевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН и РАМН, декан ГУНУ факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., 31, корп. 5

Тел.: +7(495)932-88-14

Е-mail: tkachuk@fbm.msu.ru