

## ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОСТНОМОЗГОВЫЕ МОНОНУКЛЕАРЫ

Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Суровцева М.А.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>,  
Чернявский А.М.<sup>2</sup>, Фомичев А.В.<sup>2</sup>, Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>, Ким И.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Стволовые/прогениторные клетки, рассматриваемые как альтернативный способ терапии сердечной недостаточности, способствуют регенерации поврежденного миокарда при инфаркте миокарда. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата, а функциональная активность клеточного трансплантата, в свою очередь, зависит от условий микроокружения. Культивирование стволовых/прогениторных клеток с эритропоэтином стимулирует пролиферативный потенциал, устойчивость к гипоксии *in vitro*, а также стимулированию ангиогенеза *in vivo*. Проведено исследование влияния кратковременной инкубации костномозговых мононуклеаров (КМ-МНК) больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с эритропоэтином на фенотип, клеточный цикл, апоптоз и пролиферативный потенциал. КМ-МНК выделяли из аспирата костного мозга больных ИБС на градиенте плотности, инкубировали в течение 60 минут с эритропоэтином (33,4 МЕ/мл). Методом проточной цитофлуориметрии показано, что в пуле КМ-МНК выявлены эндотелиальные прогениторные клетки, находящиеся на разных стадиях созревания и дифференцировки, мезенхимальные стволовые клетки, суммарное количество которых не превышает 30% от общего пула КМ-МНК. Кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином снижает экспрессию «хоминг-рецептора» CD184 на CD34<sup>+</sup> клетках и увеличивает экспрессию CD184 на CD31<sup>+</sup> клетках в пуле КМ-МНК ( $p < 0,05$ ). Кроме этого, показано, что эритропоэтин задерживает CD34<sup>+</sup> клетки в фазе покоя (G0G1), уменьшает долю клеток в фазе синтеза (S) и митоза (G2/M) ( $p < 0,05$ ) и не влияет на апоптоз по данным Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Эритропоэтин не оказывал существенного влияния на экспрессию КМ-МНК молекул, вовлеченных в обеспечение адгезии, таких как CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146 и CD202b. МТТ-методом показано, что кратковременная преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствовала существенно снижению пролиферативной активности КМ-МНК ( $p < 0,05$ ), но отмечена тенденция повышения резистентности преобработанных эритропоэтином КМ-МНК к окислительному стрессу, индуцированному перекисью водорода. Выявлена сопряженность эндотелиальных прогениторных клеток, находящихся на разных стадиях созревания и дифференцировки, с количеством гемопоэтических стволовых клеток в общем пуле КМ-МНК. На количество CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> в пуле КМ-МНК влияет возраст больных. Таким образом, кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует задержке клеток в фазе покоя клеточного цикла, что, в свою очередь, способствует снижению пролиферативного потенциала КМ-МНК.

**Ключевые слова:** эритропоэтин, костномозговые мононуклеары, фенотип, клеточный цикл, апоптоз, пролиферация

### Адрес для переписки:

Лыков Александр Петрович  
Научно-исследовательский институт клинической  
и экспериментальной лимфологии  
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
Тел.: 8 (383) 335-93-32.  
E-mail: aplykov2@mail.ru

### Address for correspondence:

Lykov Alexander P.  
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology  
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.  
Phone: 7 (383) 335-93-32.  
E-mail: aplykov2@mail.ru

### Образец цитирования:

А.П. Лыков, М.А. Суровцева, О.В. Повещенко,  
А.М. Чернявский, А.В. Фомичев, Н.А. Бондаренко,  
И.И. Ким «Влияние эритропоэтина на костномозговые  
мононуклеары» // Медицинская иммунология, 2020.  
Т. 22, № 1. С. 135-142.  
doi: 10.15789/1563-0625-EEO-1807

© Лыков А.П. и соавт., 2020

### For citation:

A.P. Lykov, M.A. Surovtseva, O.V. Poveschenko,  
A.M. Chernyavsky, A.V. Fomichev, N.A. Bondarenko, I.I. Kim  
“Effect of erythropoietin on bone marrow mononuclear cells”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 135-142.  
doi: 10.15789/1563-0625-EEO-1807

DOI: 10.15789/1563-0625-EEO-1807

## EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS

Lykov A.P.<sup>a, b</sup>, Surovtseva M.A.<sup>a, b</sup>, Poveshchenko O.V.<sup>a, b</sup>,  
Chernyavsky A.M.<sup>b</sup>, Fomichev A.V.<sup>b</sup>, Bondarenko N.A.<sup>a, b</sup>, Kim I.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Stem/progenitor cells are considered an alternative method of heart failure therapy by promoting regeneration of damaged myocardium in myocardial infarction. Effectiveness of cell therapy depends on the population composition and functional activity of the cell graft, and, in turn, it depends on the conditions of microenvironment. Cultivation of stem/progenitor cells with erythropoietin stimulates proliferative potential causing *in vitro* resistance to hypoxia, and *in vivo* stimulation of angiogenesis. We aimed for assessing effects of erythropoietin upon hematopoietic cells. We studied some effects of short-term incubation of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) in patients with coronary heart disease (CHD) with erythropoietin upon cellular phenotype, cell cycle, apoptosis and their proliferative potential. BM-MNCs were isolated from bone marrow aspirate from patients with CHD in a density gradient, then incubated for 60 minutes with erythropoietin (33.4 IU/ml). Using flow cytometric assay of the total BM-MNCs pool, we have shown there endothelial progenitor cells at different stages of maturation and differentiation, mesenchymal stem cells are. Their total number did not exceed 30%. Short-term incubation of BM-MNCs with erythropoietin reduces expression of CD184 “homing receptor” molecules on CD34<sup>+</sup> cells, and causes increase of CD184 on CD31<sup>+</sup> cells in the BM-MNCs pool ( $p < 0.05$ ). In addition, erythropoietin has been shown to cause a delay of CD34<sup>+</sup> cells in the resting phase (G0G1), reduce a proportion of cells in the synthetic phase (S) and mitosis (G2/M) ( $p < 0.05$ ), and does not affect apoptosis, as shown by Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Erythropoietin had no significant effects on expression on BM-MNCs surface molecules involved in providing adhesion, such as CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146, and CD202b. MTT-method has shown that the short-term preincubation of BM-MNCs with erythropoietin contributed to a significant decrease in proliferative activity of BM-MNCs ( $p < 0.05$ ). However, there was a tendency towards increased resistance of erythropoietin-pretreated BM-MNCs to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. We have also revealed a correlation between the numbers of endothelial progenitor cells at different stages of differentiation, and numbers of hematopoietic stem cells in the total BM-MNCs pool. The number of CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup>, and CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> in BM-MNCs pool are dependent on the age of patients. Hence, a short-term incubation of BM-MNCs with erythropoietin promotes the cells to be retained in resting phase of the cell cycle, thus, in turn, helping to reduce proliferative potential of BM-MNCs.

**Keywords:** erythropoietin, bone marrow, mononuclear cells, phenotype, cell cycle, apoptosis, proliferation

### Введение

Стволовые/прогениторные клетки, рассматриваемые как альтернативный способ терапии сердечной недостаточности, способствуют регенерации поврежденного миокарда при инфаркте миокарда (ИМ) [15, 19]. Показано, что аутологичные костномозговые мононуклеары при ишемии миокарда способствуют улучшению сократительной функции левого желудочка сердца, как следствие ангиогенеза в миокарде, опосредованного эндотелиальными прогениторными клетками (ЭПК) костного мозга [16, 18]. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата, а функциональная активность клеточного трансплантата, в свою очередь, зависит от условий микроокружения в области пораженного миокарда [2, 5, 11]. Эри-

тропоэтин — гликопротеин, продуцируемый в основном клетками почек в ответ на гипоксию, стимулирует эритропоэз. При этом было показано наличие у эритропоэтина цитопротекторного влияния на неэритроидные клетки, обусловленное связыванием эритропоэтина с рецептором для эритропоэтина, экспрессируемым на клетках, и запуском RAS-митогенактивирующей протеинкиназы, Акт/фосфатидилинозитол-3-киназы, JAK-2 сигнального пути, STAT-5, GATA-1, GATA-2, NF-2 и NF-κB транскрипционных факторов. Антиапоптотический эффект эритропоэтина обусловлен активацией bcl-2, bcl-XL, блокадой каспаз 3, 7, 8, 9 и регуляцией активности проапоптотических генов bax, DP5 [1, 4]. Эритропоэтин увеличивает долю выживших клеток при гипоксии, а инкубация КМ-МНК с эритропоэтином подавляет апоптоз и стимулирует

пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток [4, 6, 8]. Однако как эритропоэтин влияет на поверхностные молекулы КМ-МНК у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), исследовано недостаточно.

**Целью настоящего исследования** явилось установление влияния эритропоэтина на фенотип, клеточный цикл, апоптоз и пролиферацию костномозговых мононуклеаров.

## Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. Материалом для исследования служили КМ-МНК больных ИБС с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHA II-III класса (43 мужчины и у 7 женщин в возрасте 52-74 лет). КМ-МНК выделяли из аспирата костного мозга на градиенте плотности фиколл/верографин, инкубацию КМ-МНК с эритропоэтином (Рекормон, Швейцария, 33,4 МЕ/мл) проводили в культуральных флаконах в физиологическом растворе с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 60 минут при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с последующей отмывкой. Фенотип КМ-МНК определяли методом проточной цитофлуориметрии на FASC Canto II (BD, США) с использованием моноклональных антител к CD31, CD34, CD45, CD184 (BD, США), CD73, CD90 (BioLegend, США), CD105 (eBioscience, США), CD133 (Abcam, США), а также рецептора 2 типа эндотелиального фактора роста (VEGFR-2/KDR, Novus Biologicals, США), а количество поверхностных молекул адгезии в гейте CD34<sup>+</sup> клеток определяли с использованием моноклональных антител к CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146 (BD, США) и CD202b (BioLegend, США). Клеточный цикл КМ-МНК до и после экспозиции с эритропоэтином исследовали с использованием пропидиума иодида (BD, США), а апоптоз/некроз с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США). При анализе нахождения клеток в фазе клеточного цикла выделяли следующие фазы клеточного цикла: subG0G1 (< 2n), G0G1 (2n), G2/M (2n-4n) и S (> 4n). Пролиферативный потенциал 2 × 10<sup>5</sup>/лунку КМ-МНК до и после инкубации с эритропоэтином в спонтанном и стимулированном конканавалином А (Кон А, 10 мкг/мл; Sigma, США), фитогемагглютином А (ФГА, 10 мкг/мл; Sigma, США), липополисахаридом (ЛПС, 1 мкг/мл; Sigma, США), эритропоэтином (33,4 МЕ/мл) и перекисью водорода (1, 3 и 5 μМ/мл, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Sigma, США) тестах в питательной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 0,3 мг/мл L-глутамин, 5 мМ HEPES-buffer (Sigma, США)

и 80 мкг/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия) оценивали через 72 часа инкубации в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (Sigma, США) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows (StatSoft, США). Меры центральной тенденции и рассеяния описаны средней (М) и стандартным отклонением (SD), достоверность различий оценивали с помощью ANOVA и принимали при значениях  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

### Эритропоэтин влияет на уровень экспрессии CD184 на эндотелиальных прогениторных клетках

Ранее показано, что в общем пуле КМ-МНК больных ИБС присутствуют основные популяции стволовых/прогениторных клеток: гемопоэтические, эндотелиальные и мезенхимальные [13]. С учетом важной роли в процессах ангиогенеза эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в своей работе мы сосредоточили внимание на влиянии кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на фенотип, клеточный цикл и апоптоз/некроз среди данной популяции клеток костного мозга больных ИБС (табл. 1).

ЭПК – это неоднородная популяция клеток костного мозга, несущая на своей мембране разнообразные молекулы, которые отражают динамику созревания и дифференцировки от менее зрелых форм к зрелым формам эндотелиоцитов. Одним из маркеров ЭПК является мембранный белок, обеспечивающий межклеточную адгезию стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или со стромальными клетками, CD34. Так, количество CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> клеток у больных ИБС не превышает 1% от общего пула КМ-МНК. В то же время количество CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> клеток – свыше 5% (гемопоэтические стволовые клетки). Среди ЭПК принято выделять ранние и поздние, незрелые и зрелые клетки. О нахождении ЭПК на ранних/поздних стадиях дифференцировки судят по наличию экспрессии CD133 (проминин-1). У больных ИБС количество ранних ЭПК (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> = 11,23±16,2%) больше поздних ЭПК (CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> = 0,78±1,15%). О зрелости ЭПК судят по экспрессии CD31 (молекула адгезии тромбоцитов/эндотелиоцитов 1) и VEGFR-2 (рецептор тирозинкиназы III типа). Количество зрелых форм ЭПК (CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>) у больных ИБС находится в районе 1%. Кроме этого, в пуле CD34<sup>+</sup> имеются клет-

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КМ-МНК С ЭРИТРОПОЭТИНОМ НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ (% , M±SD)**

TABLE 1. EFFECT OF SHORT-TERM INCUBATION OF BM-MNCs WITH ERYTHROPOIETIN ON SURFACE MARKER EXPRESSION (% , M±SD)

Фенотип КМ-МНК Phenotype of BM-MNCs	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
<b>Эндотелиальные прогениторные клетки</b> Endothelial progenitor cells		
CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup>	0,87±0,58	0,33±0,27
CD34 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	0,78±0,87	0,55±0,54
CD34 <sup>+</sup> /CD131 <sup>+</sup>	2,67±2,93	1,69±1,73
CD34 <sup>+</sup> /CD184 <sup>+</sup>	2,67±2,93	1,69±1,73*
CD31 <sup>+</sup> /CD184 <sup>+</sup>	6,13±6,80	11,48±12,71*
CD34 <sup>+</sup> /KDR <sup>+</sup>	1,09±0,96	1,51±2,49
CD34 <sup>+</sup> /EpoR <sup>+</sup>	0,80±0,84	0,55±0,39
<b>Мезенхимальные стволовые клетки</b> Mesenchymal stem cells		
CD90 <sup>+</sup> /CD73 <sup>+</sup>	2,35±5,46	3,47±0,02
CD90 <sup>+</sup> /CD105 <sup>+</sup>	4,04±4,79	8,80±9,66
CD73 <sup>+</sup> /CD105 <sup>+</sup>	1,28±2,04	1,20±0,72

Примечание. \* p – статистическая значимость различия с исходным показателем (p < 0,05).

Note. \* p, significance of differences with basal parameters (p < 0.05).

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И АПОПТОЗ КМ-МНК (% , M±SD)**

TABLE 2. EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BM-MNCs DISTRIBUTION IN CELL CYCLE AND APOPTOSIS (% , M±SD)

Параметры Parameter	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
<b>Клеточный цикл</b> Cell cycle		
subG0G1	5,58±3,05	6,12±3,07*
G0G1	78,25±10,15	85,29±2,98*
S	3,25±1,25	1,08±0,74*
G2/M	14,85±6,30	7,10±2,31*
<b>Апоптоз</b> Apoptosis		
Annexin V <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup>	6,98±6,65	5,47±8,20
Annexin V <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	3,07±4,55	4,2±10,3
Annexin V <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup>	2,72±8,40	1,58±3,10

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ки, несущие рецептор к эритропоэтину. О количестве МСК в пуле КМ-МНК судили по наличию CD90 (мембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов), CD73 (поверхностно-клеточный протеин с энзимной и проводящей сигнал активностью) и CD105 (эндоглин), показано, что их количество не превышает 5%. Что касается эффекта кратковременной экспозиции

КМ-МНК с эритропоэтином, то отмечено уменьшение количества CD34<sup>+</sup> и увеличение количества CD31<sup>+</sup>, несущих «хоминг-рецептор» (фузин, CD184), по сравнению с исходным количеством (p ≤ 0,05).

**Эритропоэтин задерживает КМ-МНК в фазе покоя клеточного цикла**

О функциональной активности клеток костного мозга можно судить по клеточному циклу

и уровню апоптоза. Нами показано, что количество CD34<sup>+</sup> клеток больных ИБС в 78% случаев находятся в фазе покоя/начального роста (G0G1), а после экспозиции с эритропоэтином количество клеток в G0G1 возрастает, как следствие снижения доли клеток в фазе подготовки к митозу/митоз (G2/M) и фазе синтеза/репликации (S) (табл. 2;  $p \leq 0,05$ ). В то же время эритропоэтин увеличивал долю апоптотических клеток (subG0G1) ( $p \leq 0,05$ ). С другой стороны, нами не выявлено существенных различий по уровню апоптоза/некроза в пуле CD34<sup>+</sup> клеток больных ИБС до и после экспозиции с эритропоэтином ( $p \geq 0,05$ ).

#### **Эритропоэтин не влияет на экспрессию молекул адгезии на КМ-МНК**

В реализации межклеточного взаимодействия, миграции и пролиферации важная роль отводится молекулам адгезии, поэтому нами исследован эффект кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на количество поверхностных молекул адгезии (CD18 – интегрин бета-2, CD29 – бета-1-интегрин, CD44 – интегральный клеточный гликопротеин, CD49a – интегрин альфа-1, CD54 – молекула клеточной адгезии 1, CD62E – E-селектин, CD146 – молекула для альфа-ламинаина, CD202b – рецептор ангиопоэтин-1). Кратковременная экспозиция КМ-МНК больных ИБС существенно не влияла на количество CD34<sup>+</sup> клеток, несущих данные маркеры (табл. 3).

#### **Преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином снижает пролиферацию**

Как видно из таблицы 4, не обработанные эритропоэтином КМ-МНК больных ИБС характеризуются устойчивостью к действию стимулирующих факторов, но снижают свой потенциал в условиях индукции окислительного стресса. Преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином существенно снижает пролиферативный потенциал клеток как в спонтанном, так и в стимулированных тестах по сравнению с необработанными эритропоэтином КМ-МНК ( $p \geq 0,05$ ), но при этом отмечена тенденция увеличения устойчивости КМ-МНК к окислительному стрессу.

#### **Взаимосвязи фенотипа КМ-МНК**

Показано, что количество CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> клеток (гемопоэтические стволовые клетки) в костном мозге больных ИБС взаимосвязано с количеством CD34<sup>+</sup>/CD184<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>-</sup> и CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> клеток ( $r = 0,50$ ,  $r = 0,47$ ,  $r = 0,44$  и  $r = 0,45$ ;  $p \leq 0,05$  соответственно). Кроме этого, между количеством КМ-МНК с фенотипом CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> и количеством КМ-МНК с фенотипом CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> и CD31<sup>+</sup>/CD184<sup>+</sup> показана взаимозависимость ( $r = 0,74$  и  $r = 0,50$ ,  $p \leq 0,05$  соответственно).

Необходимо отметить тот факт, что количество CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, экспрессирующих или не экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, взаимосвязано с количеством ЭПК, экспрессирующих или не экспрессирующих рецептор к эритропоэтину. В частности, количество CD45<sup>+</sup>/EpoR<sup>-</sup> клеток взаимосвязано с количеством CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>-</sup> клеток, а количество CD45<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> клеток с количеством CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> клеток ( $r = 0,66$  и  $r = 0,59$ ;  $p \leq 0,05$  соответственно). Установлена сопряженность между возрастом больных ИБС и количеством CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> клеток ( $r = 0,052$  и  $r = 0,47$ ;  $p \leq 0,05$  соответственно). Кроме этого, количество CD45<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/EpoR<sup>+</sup> клеток напрямую взаимосвязано с возрастом пациентов ( $r = 0,43$  и  $r = 0,49$ ;  $p \leq 0,05$  соответственно).

## **Обсуждение**

Известно, что рецепторы к эритропоэтину имеются не только на эритроидных клетках, но и на других клетках, в том числе и на эндотелиальных прогениторных клетках [1, 4]. Авторы показали, что до 40% клеток, мобилизованных на периферию из костного мозга введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, несут на своей поверхности рецептор к эритропоэтину [12]. Эритропоэтин взаимодействует с рецептором к нему, который существует в виде двух субъединиц или же в комбинации с CD131 ( $\beta$  – общее звено), через которые и осуществляется цитопротекторное действие эритропоэтина на клетки. Так, показано, что эритропоэтин в дозе 5 МЕ/мл стимулирует пролиферацию, закрытие раневого дефекта монослоя, миграцию и формирование сосудоподобных структур, повышает устойчивость эндотелиальных прогениторных клеток к действию окислительного стресса. Показано, что эритропоэтин стимулирует пролиферацию, снижает апоптоз и улучшает приживление эндотелиальных прогениторных клеток [7].

В работе авторов показано, что костномозговые мезенхимальные стволовые клетки мышей C57BL/6 от 3-го пассажа несут на своей мембране CD29 [14]. Показано, что эритропоэтин индуцирует снижение уровней малонового альдегида и повышение экспрессии CD54 и CD31 в клетках, полученных из эндотелия вен пупочного канатика человека (HUVEC) [10]. Дарбэпоэтин альфа (эритропоэз-стимулирующий агент) у больных с хронической почечной недостаточностью повышает количество эндотелиальных прогениторных клеток, несущих на своей поверхности CD146 после 4 недель терапии [17]. У больных хронической почечной недостаточностью в сыроворотке крови выявляются повышенные уровни растворимых молекул адгезии [9]. Терапия

**ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КМ-МНК С ЭРИТРОПОЭТИНОМ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ (% , M±SD)**

TABLE 3. EFFECT OF SHORT-TERM INCUBATION BM-MNCs WITH ERYTHROPOIETIN ON SURFACE ADHESION MOLECULES EXPRESSION (% , M±SD)

Фенотип КМ-МНК Phenotype of BM-MNCs	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
CD34 <sup>+</sup> /CD18 <sup>+</sup>	1,4±1,3	1,70±2,18
CD34 <sup>+</sup> /CD54 <sup>+</sup>	1,78±1,44	2,00±1,68
CD34 <sup>+</sup> /CD29 <sup>+</sup>	97,28±2,31	89,20±11,63
CD34 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup>	91,25±11,99	86,97±19,52
CD34 <sup>+</sup> /CD49a <sup>+</sup>	37,93±23,88	56,0±6,5
CD34 <sup>+</sup> /CD62E <sup>+</sup>	44,60±27,38	42,40±32,73
CD34 <sup>+</sup> /CD146 <sup>+</sup>	6,85±10,86	5,87±6,05
CD34 <sup>+</sup> /CD202b <sup>+</sup>	13,65±11,77	13,65±7,58

**ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КМ-МНК (ОПТ. ПЛОТ.; M±SD)**

TABLE 4. EFFECT OF ERYTHROPOIETIN OF BM-MNCs PROLIFERATION (OD, M±SD)

Параметр Parameter	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
<b>Спонтанная</b> Spontaneous	0,63±0,16	0,45±0,17*
<b>Конканавалин А</b> Concanavalin A	0,55±0,13	0,42±0,13*
<b>Фитогемагглютинин А</b> Phytohemagglutinin A	0,61±0,09	0,44±0,11*
<b>Липополисахарид</b> Lipopolysaccharides	0,69±0,09	0,49±0,15*
<b>Эритропоэтин</b> Erythropoietin	0,67±0,19	0,50±0,12
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 мМ	0,65±0,19	0,34±0,09*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 мМ	0,55±0,14	0,35±0,14*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 мМ	0,46±0,19	0,37±0,16

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

больных с хронической почечной недостаточностью рекомбинантным эритропоэтином человека спустя 2 месяца приводила к увеличению в сыворотке крови таких больных растворимого Е-селектина и снижению уровней растворимого ICAM-1 и VCAM-1, тем самым влияя и на количество молекул адгезии на эндотелиальных прогениторных клетках. Нам не удалось найти в доступной нам литературе данных об эффектах кратковременной предобработки эритропоэтином костномозговых стволовых/прогениторных

клеток на количество поверхностных молекул адгезии.

## Заключение

Таким образом, кратковременная экспозиция костномозговых мононуклеаров больных ишемической болезнью сердца влияет на количество ЭПК, несущих «хоминг-рецептор», задерживает CD34<sup>+</sup> клетки в фазе покоя, уменьшает долю клеток в фазе синтеза и митоза и не влияет на количество клеток, несущих на своей мембране молекулы адгезии.

## Список литературы / References

1. Захаров Ю.М. Цитопротекторные функции эритропоэтина // Клиническая нефрология. 2009. № 1. С. 16-21. [Zakharov Yu.M. Citoprotective effects of erythropoietin. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2009, no. 1, pp. 16-21. (In Russ.)]

2. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Повещенко О.В., Ким И.И., Никонова Ю.В., Коненков В.И. Влияние секреторных факторов эндотелиальных клеток на пролиферативную и миграционную способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // *Фундаментальные исследования*, 2014. № 4, ч. 2. С. 36-42. [Lykov A.P., Bondarenko N.A., Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Nikonorova Yu.V., Konenkov V.I. The impact of secretory factors endothelial cells on the functional activity of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 4, Pt 2, pp. 36-42. (In Russ.)]
3. Лыков А.П., Никонова Ю.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Изучение пролиферации, миграции и продукции оксида азота костномозговыми мультипотентными мезенхимными стромальными клетками крыс Вистар при гипоксии и гипергликемии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2015. Т. 159, № 4. С. 432-434. [Lykov A.P., Nikonorova Yu.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Proliferation, migration, and production of nitric oxide by bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from Wistar rats in hypoxia and hyperglycemia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 159, no. 4, pp. 432-434. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Ахматов В.Ю., Телешева Л.Ф., Федосов А.А., Агеев Ю.И., Суровяткина Л.Г. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности // *Фундаментальные исследования*, 2013. № 7, ч. 1. С. 218-224. [Osikov M.V., Akhmatov V.Yu., Telesheva L.F., Fedosov A.A., Ageev Yu.I., Surovyatkina L.G. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2013, no. 7, Pt 1, pp. 218-224. (In Russ.)]
5. Bennis Y., Sarlon-Bartoli G., Guillet B., Lucas L., Pellegrini L., Velly L., Blot-Chabaud M., Dignat-Georges F., Sabatier F., Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J. Thromb. Haemost.* 2012, Vol. 10, no. 9, pp. 1914-1928.
6. Hristov M., Zerneck A., Bidzhekov K., Liehn E.A., Shagdarsuren E., Ludwig A., Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 100, no. 4, pp. 590-597.
7. Hu R., Cheng Y., Jing H., Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 4, pp. 327-336.
8. Jang W.Y., Kim H.J., Li H., Jo K.D., Lee M.K., Yang H.O. The neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy. *Mol. Neurobiol.*, 2016, Vol. 53, pp. 3812-3821.
9. Kahraman S., Yilmaz R., Kirkpantur A., Genctoy G., Arici M., Altun B., Erdem Y., Yasavul U., Turgan C. Impact of rHuEPO therapy initiation on soluble adhesion molecule levels in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 2005, Vol. 10, no. 3, pp. 264-269.
10. Kamianowska M., Szczepanski M., Skrzydlewska E. Effects of erythropoietin on ICAM-1 and PECAM-1 expressions on human umbilical vein endothelial cells subjected to oxidative stress. *Cell Biochem. Funct.*, 2011, Vol. 29, no. 6, pp. 437-441.
11. Kandala J., Upadhyay G.A., Pokushalov E., Wu S., Drachman D.E., Singh J.P. Meta-analysis of stem cell therapy in chronic ischemic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.*, 2013, Vol. 112, no. 2, pp. 217-225.
12. Kang J., Yun J.Y., Hur J., Kang J.A., Choi J.I., Ko S.B., Lee J., Kim J.Y., Hwang I.C., Park Y.B., Kim H.S. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 104, no. 1, pp. 171-182.
13. Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Cherniavsky A.M., Fomichev A.V., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Kareva Y.E., Tarkova A.R. Phenotype of bone marrow mononuclear cells before and after short-time precondition with Erythropoietin from patients with ischemic heart failure. *Russian Open Medical Journal*, 2018, Vol. 7, no. 2, pp. 202-208.
14. Liu N.M., Tian J., Wang W.W., Han G.F., Cheng J., Huang J., Zhang J.Y. Effects of erythropoietin on mesenchymal stem cells function of differentiation and secretion cultured under acute kidney injury microenvironment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012, Vol. 92, no. 6, pp. 417-421.
15. Madigan M., Atoui R. Therapeutic use of stem cells for myocardial infarction. *Bioengineering (Basel)*, 2018, Vol. 5, no. 2, E28. doi: 10.3390/bioengineering5020028.
16. Seurder D., Radrizzani M., Turchetto L., Lo Cicero V., Soncin S., Muzzarelli S., Auricchio A., Moccetti T. Combined delivery of bone marrow-derived mononuclear cells in chronic ischemic heart disease: rationale and study design. *Clin. Cardiol.*, 2013, Vol. 36, no. 8, pp. 435-441.
17. Mohler E.R. 3<sup>rd</sup>, Lifeng Zhang, Medenilla E., Rogers W., French B., Bantly A., Moore J.S., Yonghong Huan, Murashima M., Berns J.S. Effect of darbepoetin alfa on endothelial progenitor cells and vascular reactivity in chronic kidney disease. *Vasc. Med.*, 2011, Vol. 16, no. 3, pp. 183-189.
18. Tse H.F., Siu C.W., Zhu S.G., Songyan L., Zhang Q.Y., Lai W.H., Kwong Y.L., Nicholls J., Lau C.P. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *Eur. J. Heart Failure*, 2007, Vol. 9, pp. 747-753.
19. Wang Q.R., Wang B.H., Zhu W.B., Huang Y.H., Li Y., Yan Q. An *in vitro* study of differentiation of hematopoietic cells to endothelial cells. *Bone Marrow Res.*, 2011, Vol. 2011, 846096. doi: 10.1155/2011/846096.

**Авторы:**

**Лыков А.П.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Суровцева М.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Повешченко О.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; заведующая лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Чернявский А.М.** — д.м.н., руководитель ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Фомичев А.В.** — к.м.н., научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Бондаренко Н.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Ким И.И.** — к.м.н., научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; младший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Lykov A.P.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Surovtseva M.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Poveshchenko O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head of Laboratory, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernyavsky A.M.**, PhD, MD (Medicine), Head, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Fomichev A.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Bondarenko N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Kim I.I.**, PhD (Medicine), Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 06.07.2019  
Отправлена на доработку 13.09.2019  
Принята к печати 16.09.2019

Received 06.07.2019  
Revision received 13.09.2019  
Accepted 16.09.2019