

Влияние высокой концентрации глюкозы на способность мезенхимальных стромальных клеток контролировать рост кровеносных сосудов

Акопян Ж.А., Шаронов Г.В., Кочегура Т.Н., Ильяшенко Н.Ф., Белянко И.Е., Димитрова В.И., Зотиков А.Е., Калинина Н.И., Парфенова Е.В.

ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
(декан — академик РАН и РАМН В.А. Ткачук)

Жировая ткань (ЖТ) является источником мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые могут быть использованы для стимуляции роста кровеносных сосудов в ишемизированных тканях. Однако различные метаболические расстройства, включая гипергликемию, могут отрицательно влиять на «терапевтические» свойства этих клеток.

Цель. Изучение влияния высокой концентрации глюкозы на функциональную активность МСК из ЖТ (МСК-ЖТ) человека.

Материалы и методы. С помощью методов проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени исследована функциональная активность культивируемых МСК из ЖТ человека в условиях инкубации в среде с высокой концентрацией глюкозы.

Результаты. Показано, что длительная (в течение 10–12 дней) инкубация в среде с высокой концентрацией глюкозы подавляла способность МСК стимулировать ангиогенез *in vitro*. При этом в клетках, культивируемых в присутствии 25 мМ глюкозы, изменялась экспрессия генов активаторов и ингибиторов ангиогенеза. Однако пролиферация и апоптоз МСК при инкубации в данных условиях не изменялись.

Заключение. Высокая концентрация глюкозы вызывает подавление ангиогенной активности МСК-ЖТ, что может являться причиной недостаточного восстановления кровотока у пациентов с сахарным диабетом.

Ключевые слова: гипергликемия, ангиогенез, мезенхимальные стволовые клетки, факторы роста

The influence of high glucose concentration on the ability of mesenchymal stromal cells to stimulate blood vessel growth

Akopyan Zh. A., Sharonov G.V., Kochegura T.N., Il'yashenko N.F., Belyanko I.E., Dimitrova V.I., Zotikov A.E., Kalinina N.I., Parfenova E.V.

Department of Fundamental Medicine, M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow

Adipose tissue is a source of mesenchymal stem cells (MSC) that can be used to stimulate blood vessel growth in ischemic tissues. Various metabolic disorders including hyperglycemia may have negative effect on "therapeutic" properties of these cells.

Aim. To study the influence of high glucose concentration on functional activity in human adipose tissue.

Materials and methods. Flow cytometry and real time PCR were used to study functional activity of cultured MSC from human adipose tissue at high glucose concentration.

Results. Prolonged (10–12 days) incubation at a high glucose concentration (25 mM) suppressed the ability of MSC to stimulate angiogenesis. Also, glucose modified expression of genes activating and inhibiting angiogenesis but had no effect on MSC proliferation and apoptosis.

Conclusion. High glucose concentration suppresses angiogenic activity of MSC in adipose tissue; it may account for incomplete restoration of blood flow in diabetic patients.

Key words: hyperglycemia, angiogenesis, mesenchymal stem cells, growth factors

Повреждение эндотелиальных и гладкомышечных клеток, а также перицитов приводит к развитию тяжелых сосудистых патологий у пациентов с сахарным диабетом (СД) [1, 2]. Длительное пребывание клеток сосудистой стенки в условиях гипергликемии вызывает нарушение их функциональной активности и приводит к их гибели в результате апоптоза [3, 4]. Гипергликемия отрицательно влияет не только на зрелые клетки, но и на малодифференцированные прогениторные клетки. В частности, высокая концентрация глюкозы приводит к подавлению миграционной активности и апоптозу циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток. Это обуславливает нарушение роста кровеносных сосудов и развитие тяжелой ишемии конечностей у пациентов с СД [5].

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ) являются малодифференцированными прогениторными клетками, по своему фенотипу и дифференцировочным способностям сходными с МСК костного мозга [6]. МСК продуцируют множество факторов роста, включая VEGF, bFGF, PDGF-BB, HGF и TGF- β , которые стимулируют рост и созревание кровеносных сосудов [7, 8]. Благодаря этому МСК из ЖТ (МСК-ЖТ) являются перспективными

кандидатами для разработки методов аутологичной клеточной терапии при тяжелой ишемии тканей, включая ишемию конечностей у пациентов с СД. Однако влияние гипергликемии на способность МСК-ЖТ стимулировать рост кровеносных сосудов до сих пор не было изучено. Это может оказаться критическим моментом, определяющим возможность использования аутологичных МСК-ЖТ у пациентов с СД.

Целью данного исследования являлось изучение влияния длительной инкубации в среде с высокой концентрацией глюкозы на функциональную активность МСК-ЖТ человека, в частности, на их способность стимулировать рост кровеносных сосудов.

Материалы и методы

Выделение и культивирование МСК-ЖТ

МСК были выделены из ЖТ взрослых доноров без СД, полученной с помощью ферментативной обработки в ходе плановых хирургических вмешательств [6]. МСК-ЖТ были культивированы в стандартном инкубаторе клеток в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных

клеток (HyClone, Logan, UT, USA), содержащей 10% ростовой добавки (HyClone), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина. Клетки пассировали при достижении монослоя с помощью обработки раствором ферментов (HyQ-Tase, HyClone). После первого пассирования клетки помещали на 10–12 дней в условия 5мМ или 25мМ концентрации глюкозы (высокую концентрацию создавали, добавляя в среду роста D-глюкозу (Sigma Aldrich)). Среду роста меняли каждые 3 дня.

Цитофлюориметрия в потоке

Для анализа экспрессии поверхностных маркеров МСК-ЖТ снимали с подложки с помощью р-ра Версена (ПанЭко). $0,5-1 \times 10^5$ клеток в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) были инкубированы с 2 мкл антител мыши против антигенов человека: CD73-PE, CD90-CyChrome (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), CD105-FITC или CD49a-Alexa488 (Serotec, Oxford, UK). Соответствующее количество изотипических иммуноглобулинов использовали в качестве контроля. Для анализа клеточного цикла клетки фиксировали в 70% этаноле в течение 2 ч при -20°C и окрашивали Hoechst33342 (10 мкМ, Applichem, Darmstadt, Germany) или йодидом пропидия (PI, 25 мкМ Invitrogen) в ФСБ, содержащем 0,2 мг/мл РНКазы А (Invitrogen) и 0,1% Тритона-Х-100 в течение 30 минут при комнатной температуре. Для оценки связывания аннексина V и накопления красителя 7-AAD $2-5 \times 10^5$ клеток в 400 мкл буфера для связывания с аннексином V с 10 мкл аннексина V, конъюгированного с фикоэритрином, и 20 мкл 7-аминоактиномицина (7-AAD) и инкубированы в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки, связывающие аннексин V и не накапливающие 7-AAD, считали как клетки в апоптозе. Клетки, накапливающие только 7-AAD, считали погибшими в результате некроза.

Формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками

Эндотелиальные клетки вены пуповины человека (HUVES) были любезно предоставлены О.А. Антоновой (ФГУ РКНПК, г. Москва). HUVES культивировали в среде DMEM, содержащей 10% ФБС (HyClone), 200 мкг/мл ECGF (RELIA Tech GmbH, Germany), 5 Ед/мл гепарина, 1мМ пирувата Na (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина (GIBCO BRL) и 20мМ HEPES (Helicon). Формирование капилляроподобных структур HUVES в присутствии концентрированной в 40 раз кондиционированной среды роста МСК-ЖТ оценивали, как описано ранее [9]. Суммарную длину структур подсчитывали в 5 полях зрения, используя программу MetaMorph 7.1 (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). Достоверность различий анализировали с помощью U-критерия Манна-Уитни, различия с $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Анализ гликозилирования белков с помощью флуоресцентной спектроскопии

Для этого анализа белки из кондиционированной среды МСК-ЖТ были концентрированы в 130 раз, используя 10кДа концентраторы. Поглощение при 280 нм и коэффициент экстинкции $1 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ были использованы для выравнивания концентраций белка в образцах. Для измерений спектра флуоресценции использовали 0,5 мг/мл белка в 10мМ ФБС. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции анализировали на флуоресцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Гликозилирование альбумина и других белков сыроворотка определяли по усилению флуоресценции и/или ее сдвигу в сторону красной области спектра [10, 11].

Количественные ПЦР-анализы

Общая РНК была выделена из МСК-ЖТ с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), в со-

ответствии с прилагаемой инструкцией. Геномная ДНК была удалена с помощью свободной от РНКазы ДНКазы (Qiagen). Анализ экспрессии ангиогенных факторов проводили согласно протоколу RT² Profiler PCR Array (SABiosciences, Frederick, MD, USA). Для этого 2 мкг РНК из каждого образца было конвертировано в кДНК с использованием набора для синтеза первой цепи RT² First Strand Kit (SABiosciences) и в составе смеси для ПЦР нанесено на 96-луночный планшет Angogenesis PCR Array (cat. # PAHS-024, SABiosciences). Амплификация специфичных продуктов была проанализирована на приборе iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Среднее количество пороговых циклов C_t, полученных при амплификации генов «домашнего хозяйства» (*B2m*, *Rpl13a*, *G3pd* и *Ps1tp5bp1*), использовали для определения относительного порогового цикла измеряемого гена (ΔC_t) в каждой лунке. Различия между значениями ΔC_t МСК-ЖТ, культивированных в условиях 5 или 25мМ содержания глюкозы ($\Delta \Delta C_t$), были проанализированы с помощью непараметрического теста Вилкоксона [12].

Результаты и обсуждение

Высокая концентрация глюкозы не влияет на пролиферацию и апоптоз МСК-ЖТ

Мы предположили, что высокая концентрация глюкозы может влиять на содержание МСК-ЖТ, а также на пролиферацию и апоптоз этих клеток. При культивировании в условиях нормогликемии доля МСК, несущих маркерные антигены CD105⁺/CD73⁺ [13], составляет $58 \pm 8\%$ МСК-ЖТ 2 пассажа. Кроме того, $18 \pm 7\%$ этих клеток содержали маркеры МСК с высоким клоногенным потенциалом, CD49a⁺/CD73⁺ [14]. Инкубация в присутствии 25мМ глюкозы не влияла на содержание МСК в популяции ($56 \pm 9\%$ и $14 \pm 6\%$ для CD105⁺/CD73⁺ и CD49a⁺/CD73⁺ соответственно). При анализе пролиферации и апоптоза этих клеток мы обнаружили, что около 20% МСК-ЖТ 2 пассажа находятся в активных фазах клеточного цикла (S+G2+M). Содержание пролиферирующих клеток при инкубации в условиях 5 или 25мМ глюкозы не различалось ($14 \pm 3,1\%$ и $14,6 \pm 4,3\%$ при 5 и 25мМ глюкозы соответственно). Около 0,3% МСК-ЖТ 2 пассажа находились на ранних стадиях апоптоза (связывали аннексин V). Инкубация в условиях высокой концентрации глюкозы не влияла на содержание апоптозных клеток в популяции МСК-ЖТ ($0,3 \pm 0,09\%$ и $0,26 \pm 0,08\%$ при 5 и 25мМ глюкозы соответственно). Влияние высокой концентрации глюкозы на пролиферацию и апоптоз в большей степени зависит от типа клеток. Так, высокая концентрация глюкозы стимулирует рост гладкомышечных клеток крысы и клеток кортикальных канальцев мыши, но подавляет пролиферацию и жизнеспособность эндотелиальных клеток, мезенхимальных клеток костного мозга и МСК-ЖТ крысы [3]. Кроме того, гипергликемия *in vivo* вызывает массовый апоптоз перитцитов, приводя к развитию диабетической ретинопатии [15, 16].

Высокая концентрация глюкозы подавляет ангиогенный потенциал МСК-ЖТ

Ранее в нашей лаборатории и в других коллективах было показано, что МСК-ЖТ стимулируют рост кровеносных сосудов посредством продукции цитокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [17, 9]. Кондиционированная среда МСК-ЖТ, культивированных в среде, содержащей 5мМ глюкозы, стимулировала формирование капилляроподобных структур HUVES. Однако среда клеток, культивированных в присутствии 25мМ глюкозы, в 3 раза хуже стимулировала формирование сосудистых структур *in vitro*. Так, суммарная длина капилляроподобных структур, сформированных HUVES в присутствии кондиционированной среды МСК-ЖТ, выращенных в условиях в присутствии 25мМ

Таблица 1

Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза, в МСК-ЖТ, культивированных в присутствии 25 мМ глюкозы

Ген	Белок	Среднее ^а	Гипергликемия/нормогликемия ^б	р ^б
Факторы роста и цитокины				
ANGPT2	Ангиопоэтин 2	0,35	1,83	0,1
ANGPTL3	Ангиопоэтин-подобный 3	0,017	1,74	0,057
ANGPTL4	Ангиопоэтин-подобный 4	0,47	1,55	0,03
PGF	Плацентарный фактор роста	1,29	1,08	0,7
VEGFC	Фактор роста эндотелия сосудов С	24	1,04	0,2
FGF1	Фактор роста фибробластов 1	0,22	1,55	0,03
FGF2	Фактор роста фибробластов 2	37	1,40	0,7
IGF1	Инсулин-подобный фактор роста 1 (соматомедин С)	2,6	0,54	0,2
IL6	Интерлейкин 6 (интерферон, бета 2)	60	1,26	0,2
IL8	Интерлейкин 8	17,7	1,34	0,49
LEP	Лептин	0,044	2,60	0,03
MDK	Мидкин (фактор роста нейритов 2)	1,81	0,84	0,49
TGFB1	Трансформирующий фактор роста, бета 1	36	0,63	0,2
TGFB2	Трансформирующий фактор роста, бета 2	0,76	1,24	1
TNFAIP2	Белок, индуцируемый фактором некроза опухолей 2	3,7	0,95	0,7
TNF	Фактор некроза опухолей	0,067	2,64	0,03
Рецепторы				
ENG	Эндоглин	70	1,41	0,2
EPHB4	Рецептор эфрина В4	0,43	0,54	0,03
ITGAV	Рецептор витронектина	52	0,82	0,057
JAG1	Джаггед 1	2,5	1,23	0,35
NRP1	Нейропилин 1	36	1,35	0,057
NRP2	Нейропилин 2	2,3	1,39	0,1
PLXDC1	Содержащий плексиновый домен 1	2,3	0,73	0,057
S1PR1	Рецептор сфингозин-1 фосфата 1	0,5	1,16	0,057
TGFBRI	Рецептор трансформирующего фактора роста бета 1	13,9	1,09	1
Синтез и деградация внеклеточного матрикса				
ANPEP	Мембранная аланил-аминопептидаза	39	1,56	0,03
COL4A3	Коллаген, тип IV, альфа 3	0,101	0,55	0,1
MMP2	Матриксная металлопротеаза 2 (желатиназа А, 72kDa)	260	1,01	0,67
MMP9	Матриксная металлопротеаза 9 (желатиназа В)	3,6	0,42	0,1
PLAU	Активатор плазминогена урокиназного типа	2,6	0,84	0,2
PLG	Плазминоген	0,052	1,88	0,03
SERPINF1	Альфа-2 антиплазмин	29	0,87	0,7
STAB1	Стабилин 1	1,6	0,88	0,1
THBS1	Тромбоспондин 1	58	0,93	0,7
THBS2	Тромбоспондин 2	25	1,09	0,67
TIMP1	Тканевой ингибитор металлопротеаз 1	1761	1,16	0,2
TIMP2	Тканевой ингибитор металлопротеаз 2	224	0,95	1
TIMP3	Тканевой ингибитор металлопротеаз 3	0,041	2,60	0,03
Хемокины				
CCL2	Хемокин (С-С) 2	1,2	1,78	0,5
CXCL1	Хемокин (С-Х-С) 1	7,6	0,90	0,89
CXCL5	Хемокин (С-Х-С) 5	1,2	1,69	0,49
Факторы транскрипции				
HAND2	Экспрессирован в производных сердца и нейрального гребня 2	4,9	1,29	0,057
HIF1A	Фактор, индуцируемый гипоксией 1, альфа	481	1,13	0,2
ID1	Ингибитор связывания с ДНК 1	42	1,09	0,89
Ферменты				
PTGS1	Простагландин-эндопероксид синтаза 1	5,3	0,52	0,2
SPHK1	Сфингозин киназа 1	2,6	1,32	0,2

ТУМР	Тимидин фосфорилаза	4,6	0,95	1
АКТ1	Гомолог вирусного онкогена тимомы мыши V-akt	3,1	0,99	1

^a Среднее уровня экспрессии гена, нормированное по среднему уровню экспрессии 4 генов «домашнего хозяйства» (B2m, Rpl13a, G3pd and Ps1p5bp1) и умноженное на 1000 ($1000/2^{\text{Среднее } \Delta C_t}$)

^b Значение медианы и p для отношения уровня экспрессии гена в гипергликемических условиях к уровню экспрессии этого гена в нормогликемических условиях, подсчитанные с помощью метода Yuan et al. [12]

глюкозы, составила $5,3 \pm 0,9$ по сравнению с $15,3 \pm 2,2$ в присутствии кондиционированной среды клеток, содержащей 5мМ глюкозы ($p=0,001$). Ранее мы установили, что инкубация в присутствии 25мМ глюкозы подавляет миграцию HUVEC и формирование ими капилляроподобных структур [18], влияя, таким образом, на начальные этапы ангиогенеза: выстраивание тяжей эндотелиальных клеток, их ветвление и формирование просвета капилляров. Однако в данном исследовании наблюдаемое различие не могло быть вызвано концентрацией глюкозы в среде формирования капилляров HUVEC, поскольку конечная концентрация глюкозы при разбавлении концентрированной среды культивирования в 40 раз составила 5,125 мМ. Поскольку МСК-ЖТ продуцируют факторы роста, стимулирующие ранние этапы ангиогенеза, включая VEGF, bFGF и HGF, мы предположили, что высокая концентрация глюкозы вызывает нарушение продукции цитокинов и факторов роста этими клетками, что и приводит к снижению ангиогенного эффекта кондиционированной среды МСК-ЖТ.

Высокая концентрация глюкозы не повышает гликозилирование белков кондиционированной среды

Присутствие в среде гликозилированных белков может подавлять формирование капилляроподобных структур HUVEC [19]. Более того, секретируемые ангиогенные факторы могут быть инактивированы посредством гликозилирования. Таким образом, кондиционированная среда МСК-ЖТ, культивированных в присутствии 25мМ глюкозы, может обладать сниженным ангиогенным эффектом из-за гликозилирования содержащихся в ней белков. Однако мы не обнаружили различий в спектре флуоресценции белков кондиционированных сред МСК-ЖТ, культивированных в условиях 5 или 25мМ концентрации глюкозы. Эти данные указывают на то, что наблюдаемое снижение ангиогенного эффекта кондиционированной среды МСК-ЖТ не вызвано гликозилированием содержащихся в ней белков, включая ангиогенные факторы роста.

Высокая концентрация глюкозы влияет на экспрессию факторов, регулирующих ангиогенез

При анализе экспрессии ангиогенных факторов мы обнаружили, что МСК-ЖТ наиболее выраженно экспрессируют плацентарный фактор роста, VEGF-C, bFGF, IGF1, IL-6, IL-8, мидкин, TGF- β 1, матриксные металлопротеазы 2 и 9, а также урокиназу (таблица 1). Эти клетки также содержали мРНК ингибиторов ангиогенеза, таких как тканевые ингибиторы металлопротеаз 1 и 2, а также тромбоспондины 1 и 2 (таблица 1). Инкубация в присутствии 25мМ концентрации глюкозы вызвала изменения экспрессии 19 из 84 проанализированных генов (22%) ($p \leq 0,1$ по сравнению с инкубацией в присутствии 5мМ глюкозы); из них экспрессия 13 генов была повышена и 6 — подавлена (таблица 1). Мы обнаружили повышение экспрессии ангиопоэтинов, aFGF и лептина при культивировании в среде с 25мМ глюкозы (таблица 1). Мы также обнаружили, что высокая концентрация глюкозы стимулирует экспрессию плазминогена, цинк-зависимой металлопротеазы APN, транскрипционного фактора HAND2 и 4 поверхностных рецепторов, включая нейропилины 1 и 2. Длительная инкубация МСК-ЖТ в условиях высокой концентрации глюкозы также вызвала одновременное снижение экспрессии металлопротеазы 9 (в 2,4 раза; $p=0,1$ по сравнению с 5мМ глюкозой) и по-

вышение экспрессии тканевого ингибитора металлопротеазы 3 (в 2,6 раза; $p=0,03$ по сравнению с 5мМ глюкозой). Однако экспрессия других проангиогенных факторов роста или ингибиторов ангиогенеза, таких как тромбоспондин 1 и 2 или TIMP2 не изменялась под действием 25мМ глюкозы. Необходимо отметить, что экспрессия TIMP1, которая была на несколько порядков выше, чем экспрессия других ингибиторов металлопротеаз, при культивировании в среде с высокой концентрацией глюкозы не изменялась.

Ранее было показано, что высокая концентрация глюкозы влияет на экспрессию факторов, регулирующих ангиогенез, включая лептин, bFGF и ангиопоэтин в эндотелиальных и гладкомышечных клетках [20–22]. Это хорошо согласуется с нашими данными о том, что содержание мРНК лептина, bFGF и ангиопоэтина повышено в МСК-ЖТ, культивируемых в условиях гипергликемии. Высокая концентрация глюкозы может влиять на экспрессию генов посредством активации различных путей внутриклеточной сигнализации [23], включая мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} [17] и повышение продукции супероксид аниона NADPH-оксидазами [4]. Так, в микрососудистом эндотелии почек повышение входа глюкозы в клетку вызывало повышение экспрессии ангиопоэтина посредством образования метилглиоксаля. Такое увеличение экспрессии ангиопоэтина повышало чувствительность микрососудистых эндотелиальных клеток к провоспалительному действию TNF- α [22]. Одновременное повышение экспрессии TNF- α и ангиопоэтина в МСК-ЖТ, культивируемых в условиях 25мМ концентрации глюкозы, может, таким образом, стимулировать апоптоз HUVEC и объяснять подавление формирования капилляров. Более того, глюкоза может влиять на продукцию и активацию секретируемых факторов. Так, высокая концентрация глюкозы влияет на эффективность трансляции мРНК тромбоспондина, подавляя секрецию этого фактора [24]. Кроме того, мы показали, что высокая концентрация глюкозы подавляет экспрессию матриксной металлопротеазы 9 и стимулирует экспрессию TIMP3. Поскольку ангиогенные факторы роста, включая TGF- β , секретируются в латентной форме и требуют протеолитической активации, снижение окооклеточной протеазной активности в условиях гипергликемии может обуславливать подавление способности кондиционированной среды МСК-ЖТ стимулировать формирование капилляроподобных структур.

Выводы

Длительная инкубация в условиях высокой концентрации глюкозы подавляет ангиогенные свойства МСК-ЖТ посредством изменения экспрессии активаторов и ингибиторов ангиогенеза. Поскольку МСК-ЖТ представлены в значительной степени перицитами, можно предполагать, что подавление ангиогенной активности перицитов в условиях гипергликемии является одной из причин недостаточного адаптивного ангиогенеза у пациентов с СД, способствующего развитию ишемии конечностей и миокарда.

Исследование проводили при поддержке Министерства образования и науки — грант № 02.527.11.0007 и №02.740.11.0307, а также Российского Фонда фундаментальных исследований — грант №08-04-01284-а и №09-04-12132-офи_м.

Литература

- Spinetti G., Kraenkel N., Emanuelli C., Madeddu P. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies // *Cardiovasc. Res.* – 2008 – V. 78 – P. 265–273.
- Stratton I.M., Adler A.I., Neil H.A.W., Matthews D.R., Manley S.E., Cull C.A., Hadden D., Turner R.C., Holman R.R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study // *B.M.J.* – 2000 – V. 321 – P. 405–412.
- Calcutt N.A., Cooper M.E., Kern T.S., Schmidt A.M. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2009 – V. 8 – P. 417–430.
- Gao L., Mann G.E. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling // *Cardiovasc. Res.* – 2009 – V. 82 – P. 9–20.
- Kränkel N., Adams V., Linke A., Gielen S., Erbs S., Lenk K., Schuler G., Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005 – V. 25 – P. 698–703.
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2002 – V. 13 – P. 4279–4295.
- Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., Halvorsen Y.C., Cheatham B., Storms R.W., Gimble J.M. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors // *J. Cell. Physiol.* – 2007 – V. 212 – P. 702–709.
- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells // *Circulation.* – 2004 – V. 109 – P. 1292–1298.
- Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova Y. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation // *Tissue Eng Part A.* – 2009 – V. 15 – P. 2039–2050.
- Schmitt A., Schmitt J., Münch G., Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics // *Anal. Biochem.* – 2005 – V. 338 – P. 201–215.
- Wróbel K., Wróbel K., Garay-Sevilla M.E., Nava L.E., Malacara J.M. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system // *Clin. Chem.* – 1997 – V. 43 – P. 1563–1569.
- Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. Statistical analysis of real-time PCR data // *BMC Bioinformatics.* – 2006 – V. 7 – P. 85.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2006 – V. 8 – P. 315–317.
- Boiret N., Rapatel C., Veyrat-Masson R., Guillovard L., Guérin J., Pigeon P., Descamps S., Boisgard S., Berger M. G. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow // *Exp. Hematol.* – 2005 – V. 33 – P. 219–225.
- Kim H.K., Kim Y.J., Kim J.T., Kwon C.H., Kim Y.K., Bae Y.C., Kim D.H., Jung J.S. Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats // *Stem Cells Dev.* – 2008 – V. 17 – P. 669–680.
- Li W., Yanoff M., Liu X., Ye X. Retinal capillary pericyte apoptosis in early human diabetic retinopathy // *Chin. Med. J.* – 1997 – V. 110 – P. 659–663.
- Bhang S.H., Cho S., Lim J.M., Kang J.M., Lee T., Yang H.S., Song Y.S., Park M.H., Kim H., Yoo K., Jang Y., Langer R., Anderson D.G., Kim B. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs // *Stem. Cells.* – 2009 – V. 2 – P. 1976–1986.
- Калинина Н.И., Аюрян Ж.А., Пахомова Е.А., Шестакова М.В., Парфенова Е.В. Влияние гипергликемии на функциональное состояние клеток эндотелия вены пуповины человека in vitro // *ДАН.* – 2009 – Т. 426 – С. 210–21224.
- Kuzuya M., Satake S., Miura H., Hayashi T., Iguchi A. Inhibition of endothelial cell differentiation on a glycosylated reconstituted basement membrane complex // *Exp Cell Res* – 1996 – V. 226 – P. 336–345.
- McClain D.A., Paterson A.J., Roos M.D., Wei X., Kudlow J.E. Glucose and glucosamine regulate growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells // *PNAS.* – 1992 – V. 89 – P. 8150–8154.
- Moreno-Aliaga M.J., Stanhope K.L., Havel P.J. Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001 – V. 283 – P. 544–548.
- Yao D., Taguchi T., Matsumura T., Pestell R., Edelstein D., Giardino I., Suske G., Rabbani N., Thornalley P.J., Sathiy V.P., Hammes H., Brownlee M. High glucose increases angiotensin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A // *J. Biol. Chem.* – 2007 – V. 282 – P. 31038–31045.
- Young M.E., Yan J., Razeghi P., Cooksey R.C., Guthrie P.H., Stepkowski S.M., McClain D.A., Tian R., Taegtmeyer H. Proposed regulation of gene expression by glucose in rodent heart // *Gene Regul Syst Bio.* – 2007 – V. 1 – P. 251–262.
- Navedo M.F., Takeda Y., Nieves-Cintrón M., Molkentin J.D., Santana L.F. Elevated Ca²⁺ sparklet activity during acute hyperglycemia and diabetes in cerebral arterial smooth muscle cells // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* – 2010 – V. 298 – C. 211–220.

Аюрян Жанна Алексеевна

ученый секретарь, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
E-mail: secretary@fbm.msu.ru

Шаронов Георгий Владимирович
Кочегура Татьяна Николаевна
Ильяшенко Наталья Федоровна

к.б.н., м.н.с., ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
к.м.н., докторант, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
лаборант-исследователь, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Белянко Игорь Эдуардович

д.м.н., зав. отделением, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Димитрова Валентина Ивановна

к.м.н., зав. отделением, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Зотиков Андрей Евгеньевич

к.м.н., вед. специалист, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Калинина Наталья Игоревна

к.б.н., доцент, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Парфенова Елена Викторовна

д.м.н., профессор, ГУНУ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва