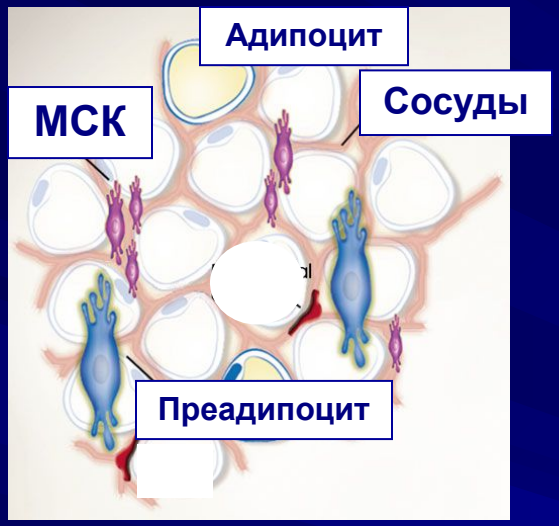
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

Влияние возраста пациентов на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

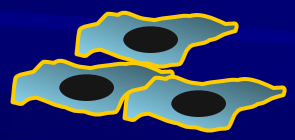
Докладчик:
Ефименко Анастасия Юрьевна

Москва - 2011

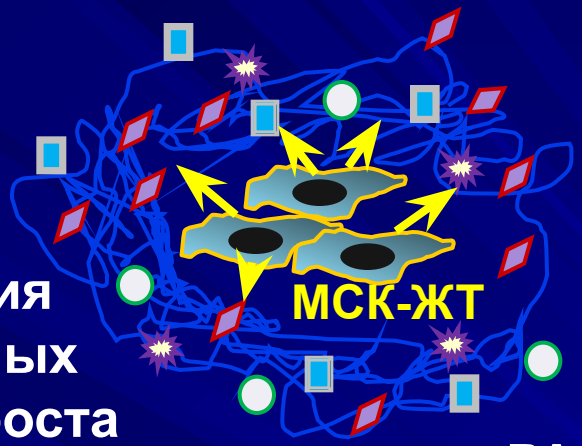
Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК-ЖТ) стимулируют рост кровеносных сосудов



Жировая ткань



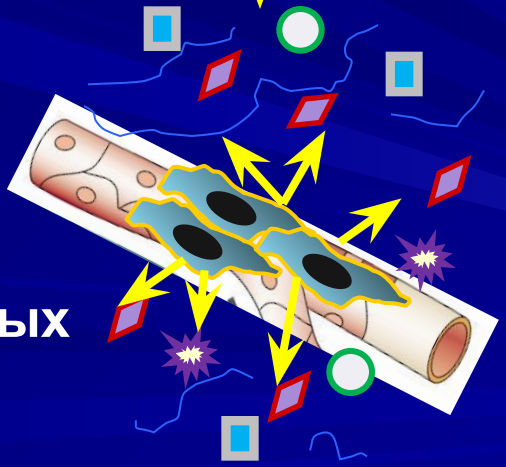
МСК-ЖТ



Продукция ангиогенных факторов роста

VEGF, HGF, bFGF, Angpt1 и др.

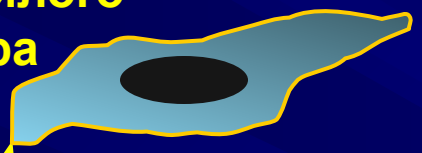
uPA, плазмин, матриксные металлопротеиназы



Стабилизация новообразованных сосудов

Старение МСК

МСК пожилого донора



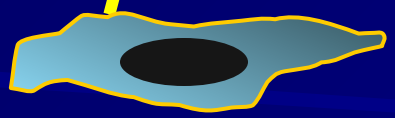
Клеточное старение

Функциональные нарушения
Апоптоз

Снижение числа и/или способности к самообновлению и регенеративного потенциала МСК

Возраст-ассоциированные заболевания

Укорочение теломер;
↓ теломеразной активности;
↑оксидативного стресса;
↑повреждения ДНК;
↑ p16/INK4a, p19/ARF, p21, p53



МСК молодого донора

Клеточная терапия аутологичными клетками

Генетические и эпигенетические нарушения

El-Ftesi et al., 2009; Zhu et al., 2009; Huang et al., 2010; Madonna et al., 2011

Цель работы - оценить влияние возраста на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани пациентов без кардиологических заболеваний и больных ишемической болезнью сердца.

Задачи

- Сравнить иммунофенотип, пролиферативную активность и накопление маркеров старения в МСК-ЖТ пациентов разного возраста с ишемической болезнью сердца (ИБС) и без нее.
- Оценить содержание ангиогенных факторов (VEGF, PlGF, HGF, ангиопоэтина-1, ангиогенина и тромбоспондина-1) в кондиционированной среде и ангиогенную активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ пациентов разного возраста с ИБС и без нее.
- Проанализировать профиль экспрессии генов, кодирующих факторы, которые участвуют в регуляции ангиогенеза, в МСК-ЖТ пациентов разного возраста с ИБС и без нее.

Пациенты

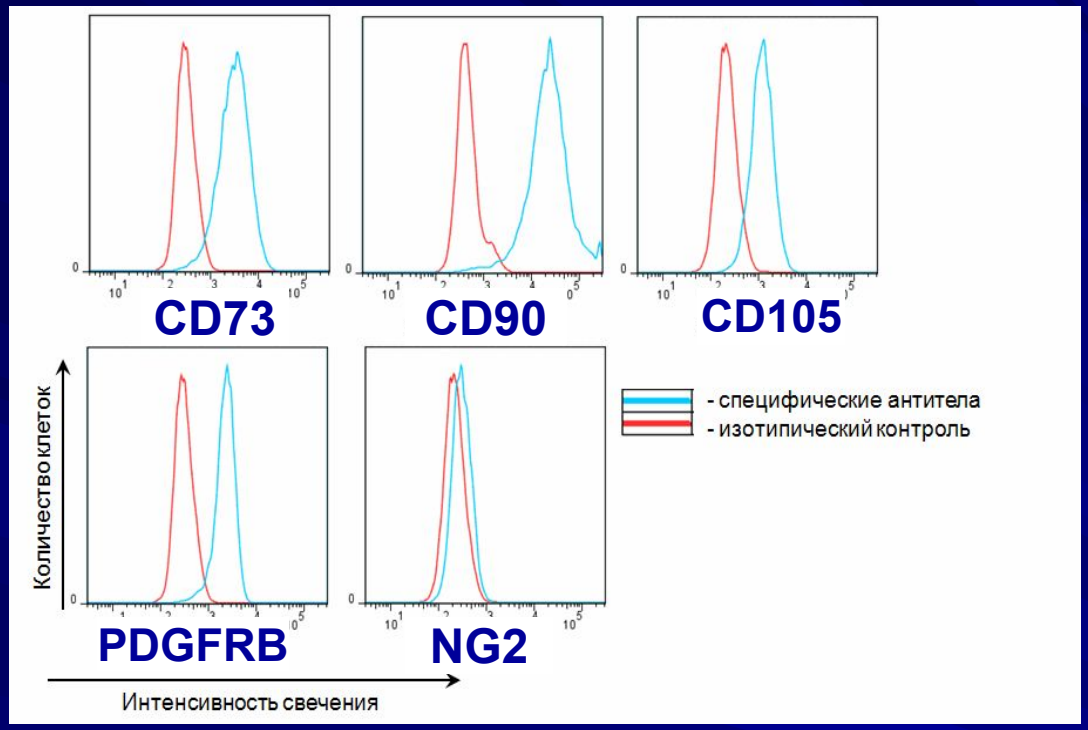
1. <u>Пациенты без ИБС (n=31):</u>

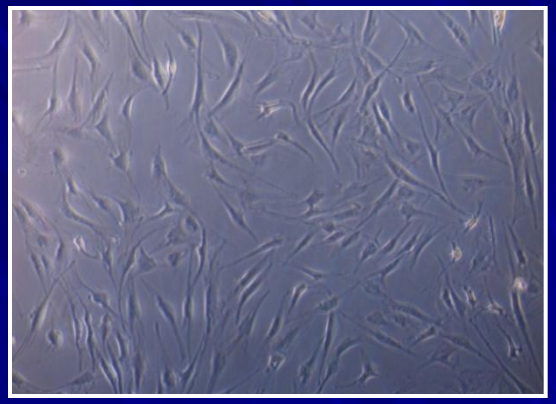
- 2-12 лет (n=4, средний возраст 7,3±5,4 лет)
- 35-55 лет (n=14, средний возраст 42,3±7,1 года)
- Старше 60 лет (n=13, средний возраст 66,2±6,8 лет)

<u>2. Пациенты с ИБС (n=31):</u>

- 44-48 лет (n=6, средний возраст 46,0±1,67 лет)
- 52-58 лет (n=10, средний возраст 55,4±1,9 лет)
- Старше 60 лет (n=15, средний возраст 68,9±4,2 лет)

Морфология и иммунофенотип МСК-ЖТ не различаются у пациентов разного возраста





Пациент К., 2,5 года

Пациент Д., 61 год

CD73(>85%),
CD90 (>95%),
CD105 (>95%),
CD14 (<10%),
CD34(<5%),
CD45 (<2%),
CD79 (<10%)
PDGFRB (>80%),
NG2 (>95%)

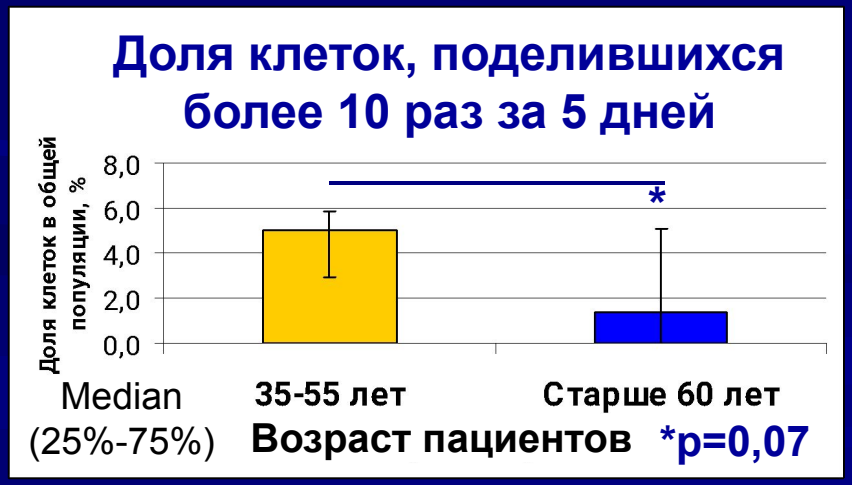
Маркеры	42-48 лет	Старше 60 лет
CD90	97 (96; 98)%	96 (95; 97)%
CD73	92 (88; 95)%	93 (92; 94)%
CD105	>99%	>99%
PFGFRB	83 (82; 84)%	85 (83; 88)%
NG2	>99%	>99%

С возрастом снижается доля активно пролиферирующих клеток и длина теломер в МСК-ЖТ

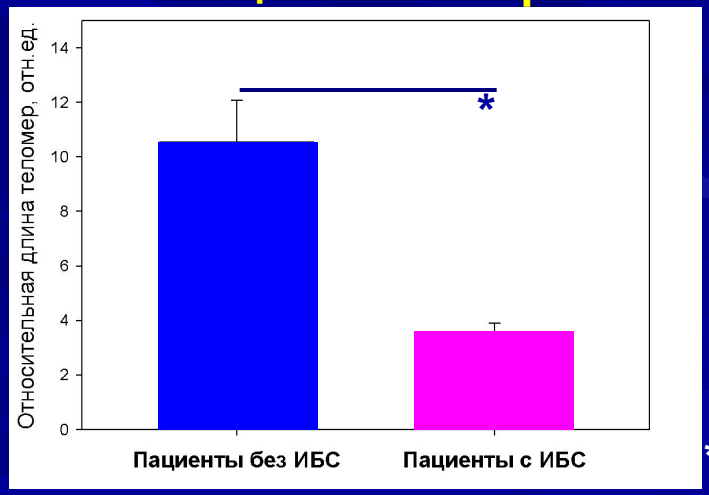
Пациенты без ИБС

Пациенты с ИБС

r=0,8, p=0,006



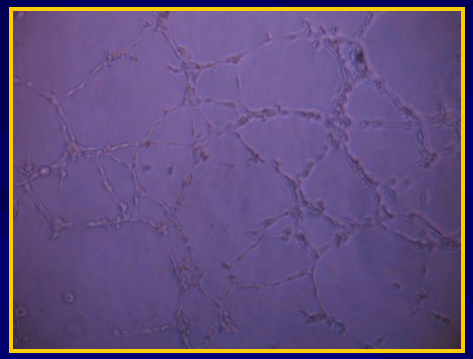
Относительная длина теломер в МСК-ЖТ пациентов старше 60 лет



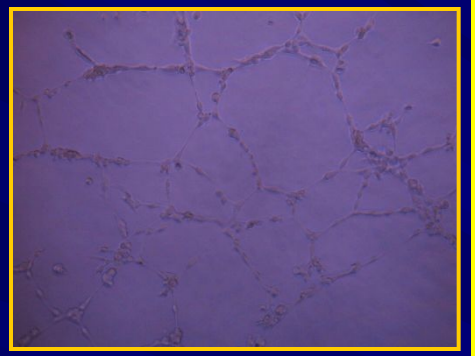
*p=0,01

Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ снижается с возрастом

Пациенты без ИБС

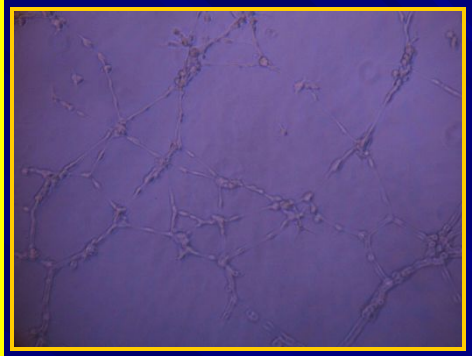


Пациент К., 2,5 года



Пациентка М., 71 год

Пациенты с ИБС



Пациент Н., 44 года

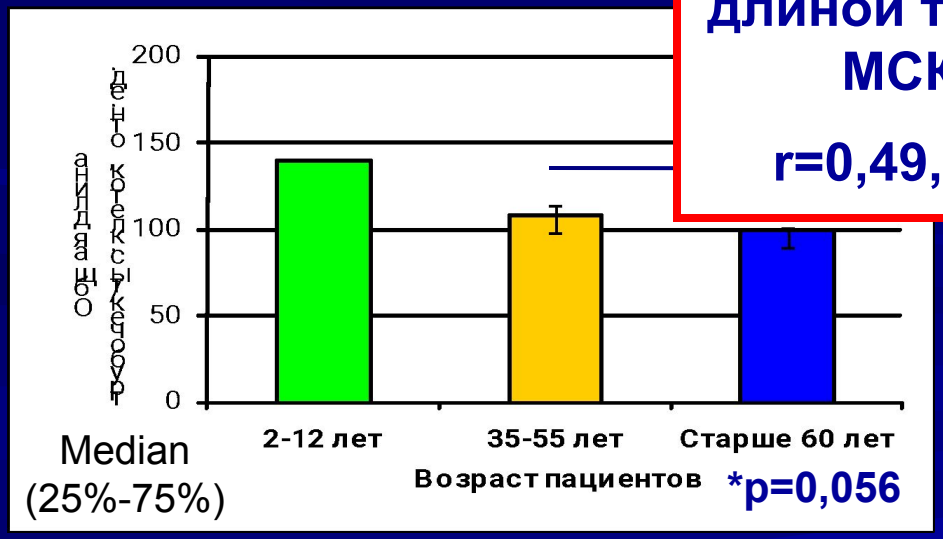
Пациент Г., 70 лет

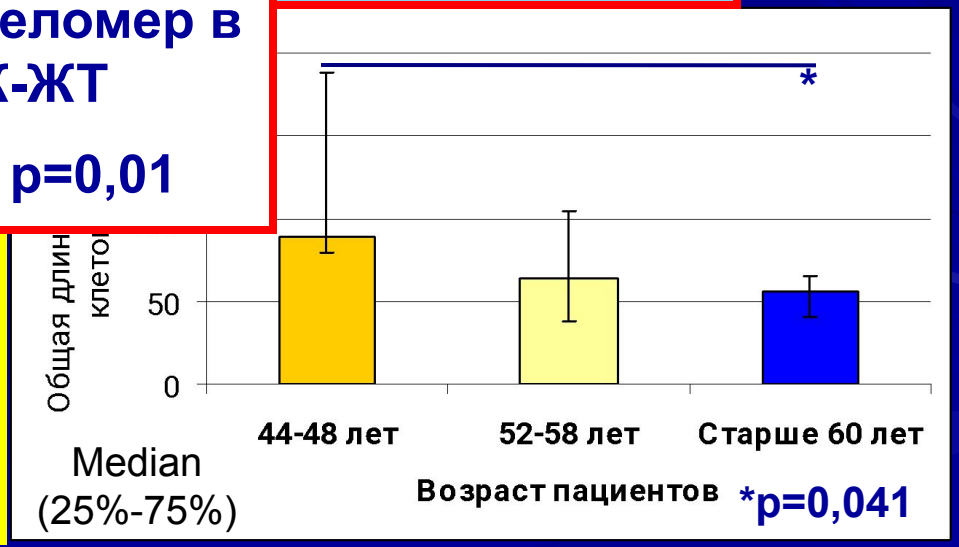
r=-0,68, p=0,01

Корреляция с длиной теломер в МСК-ЖТ

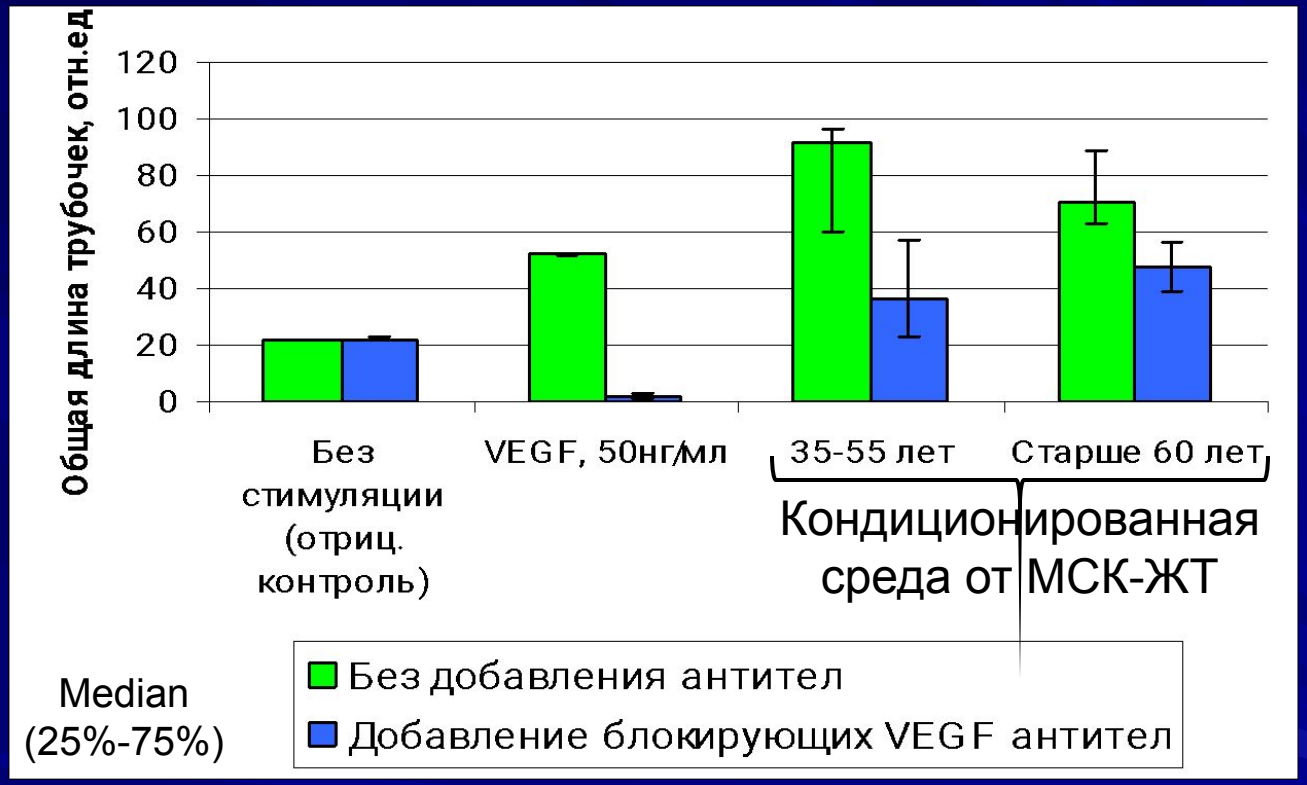
r=0,49, p=0,01

r=-0,53, p=0,03





Вклад VEGF в ангиогенную активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ снижается в клетках с укороченными теломерами



Корреляция между степенью подавления с помощью блокирующих VEGF антител (%) и длиной теломер в МСК-ЖТ r=0,46, p=0,09

Содержание проангиогенных факторов роста в кондиционированной среде от МСК-ЖТ снижается с возрастом: пациенты без ИБС

Содержание белка в кондиционированной среде от МСК-ЖТ, нг/млн.клеток

VEGF

r=-0,42, p=0,02

Ангиопоэтин-1

r=-0,38, p=0,11

Ангиогенин

Корреляция с ангиогенной активностью суммарных продуктов секреции

r=0,66, p=0,05

r=-0,66, p=0,005

Корреляция с длиной теломер в МСК-ЖТ

r=0,49, p=0,06

PlGF

r=-0,59, p=0,01

HGF

r=-0,59, p=0,03

Возраст пациентов

Содержание проангиогенных факторов роста в кондиционированной среде от МСК-ЖТ снижается с возрастом: пациенты с ИБС

Содержание белка в кондиционированной среде от МСК-ЖТ, нг/млн.клеток

VEGF

PlGF

Ангиогенин

r=-0,37, p=0,09

r=-0,59, p=0,004

Ангиопоэтин-1

HGF

Корреляция с ангиогенной активностью суммарных продуктов секреции

r=0,79, p=0,004

r=-0,72, p=0,001

Корреляция с длиной теломер в МСК-ЖТ

r=0,71, p=0,001

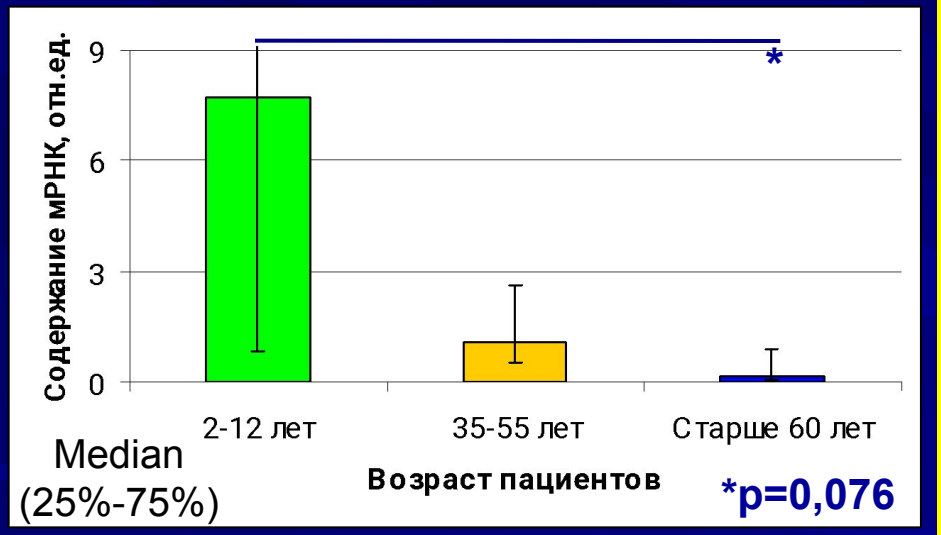
r=-0,44, p=0,07

Возраст пациентов

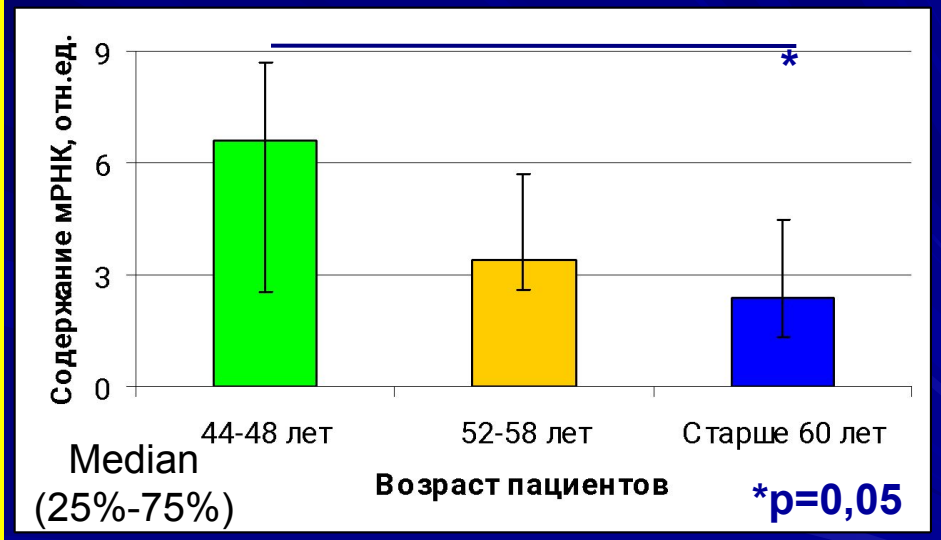
Содержание мРНК генов факторов, регулирующих ангиогенез, в МСК-ЖТ пациентов разного возраста

PIGF

Пациенты без ИБС



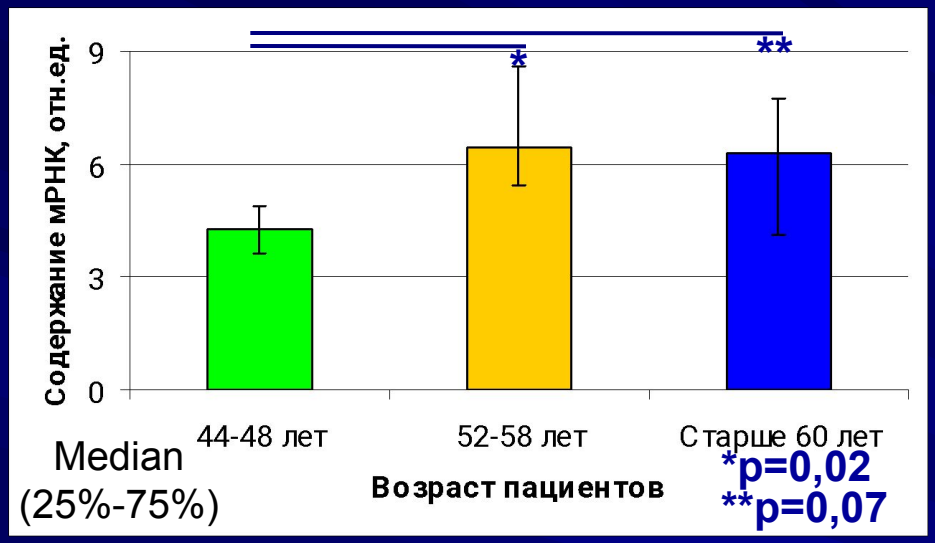
Пациенты с ИБС



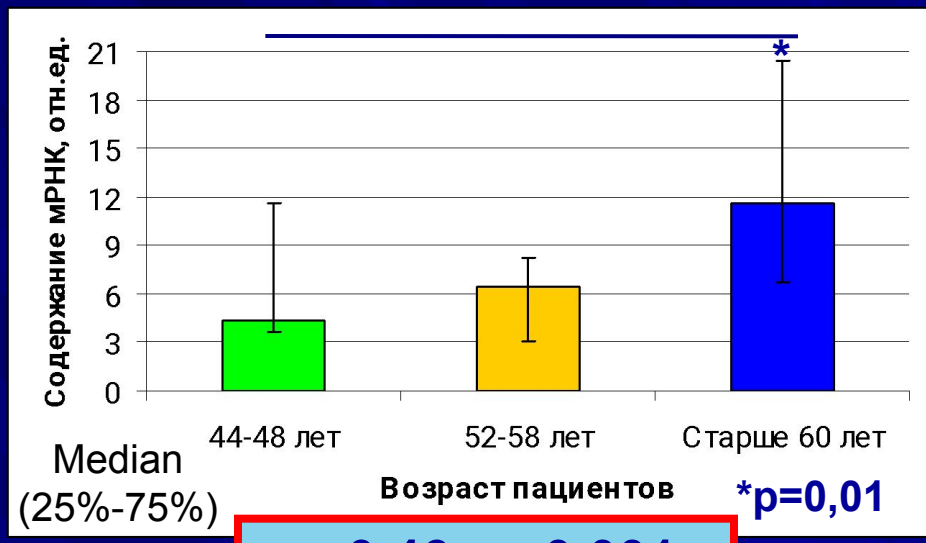
HGF

С возрастом происходит активация системы урокиназы в МСК-ЖТ, особенно в группе кардиологических больных

uPA

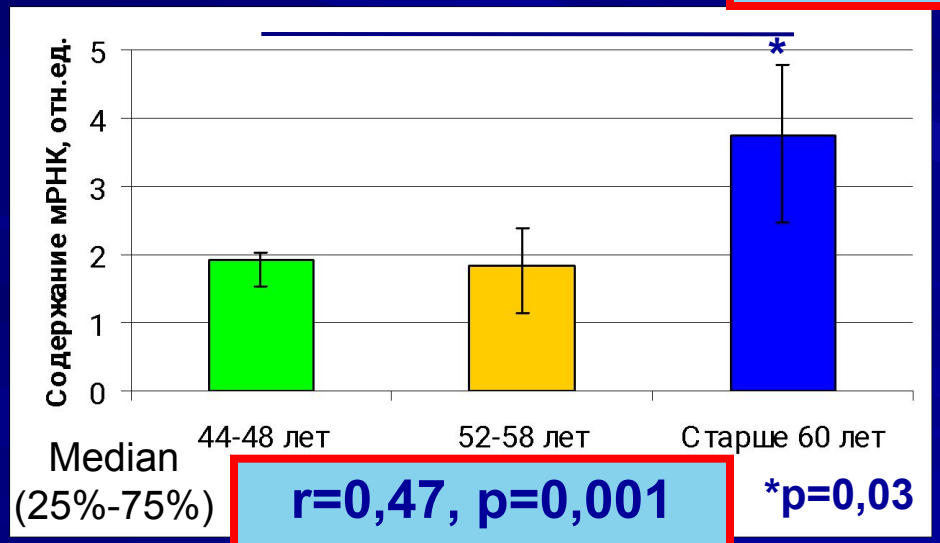


uPAR



r=0,46, p=0,001

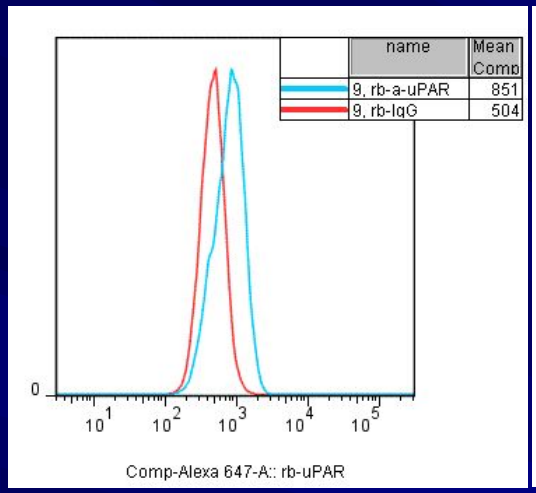
PAI-1

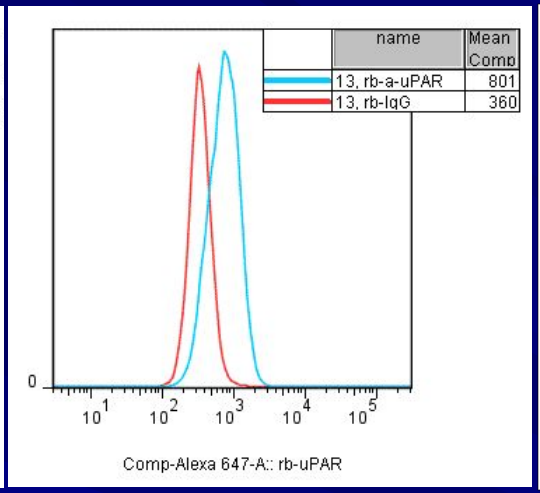


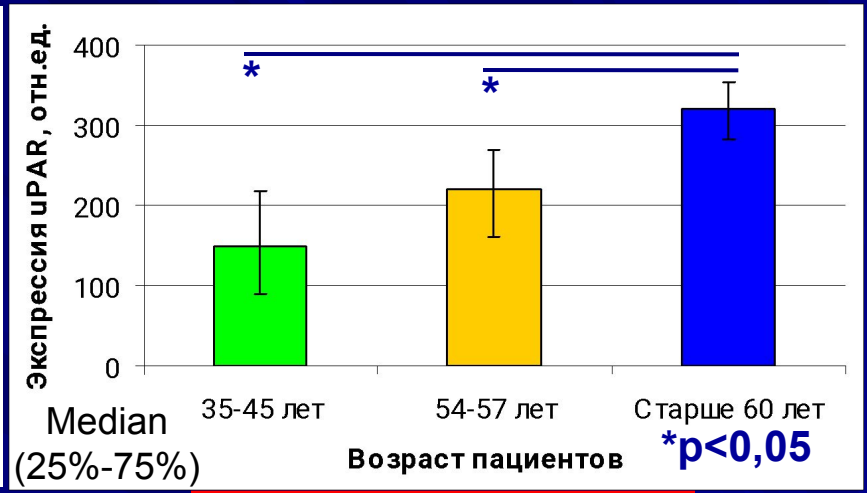
r=0,47, p=0,001

С возрастом происходит активация системы урокиназы и металлопротеиназ в МСК-ЖТ

Экспрессия uPAR на поверхности МСК-ЖТ увеличивается с возрастом



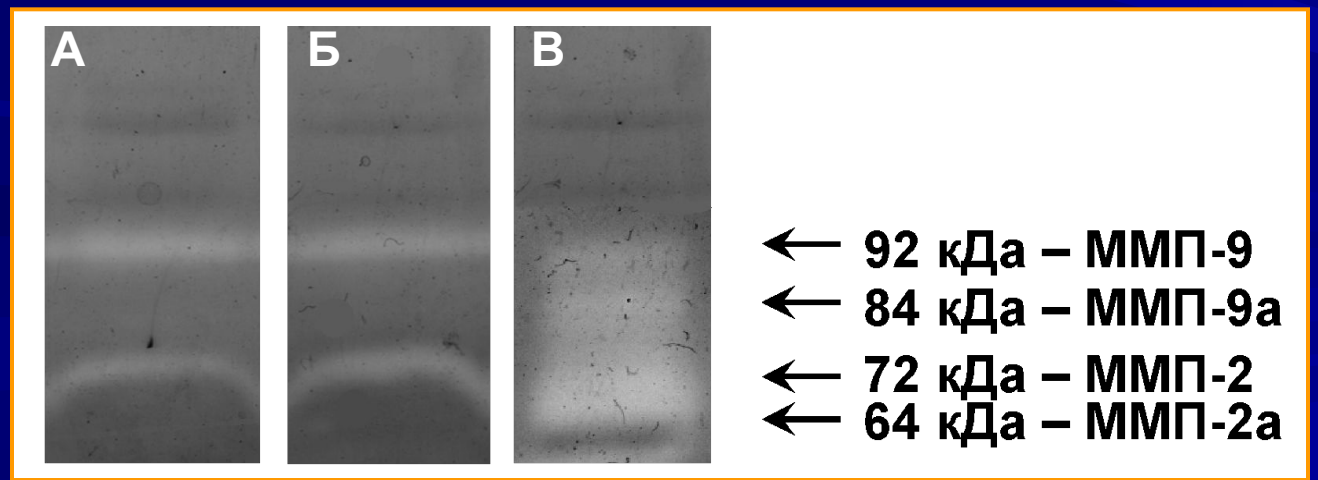




Пациентка П., 36 лет **Пациентка М., 71 год**

r=0,65, p=0,01

В МСК-ЖТ пожилых пациентов повышается содержание и активность ММП-2 и ММП-9

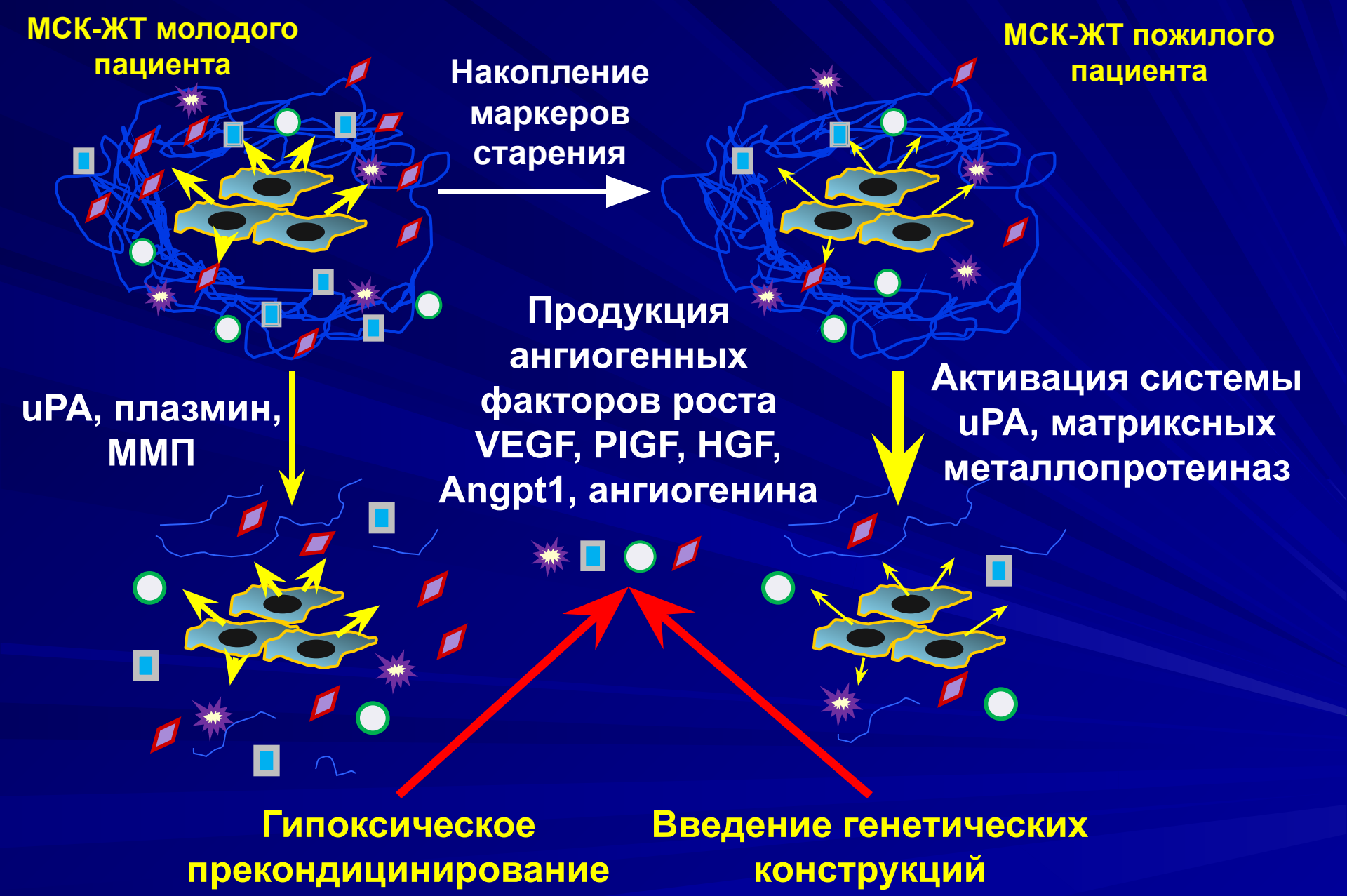


А – пациент К., 2,5 года

Б – пациент П., 52 года

В – пациентка Д., 73 года

Заключение


МСК-ЖТ молодого пациента
Накопление маркеров старения
МСК-ЖТ пожилого пациента
uPA, плазмин, ММП
Продукция ангиогенных факторов роста VEGF, PlGF, HGF, Angpt1, ангиогенина
Активация системы uPA, матриксных металлопротеиназ
Гипоксическое прекондиционирование
Введение генетических конструкций

Благодарности

- Моим соавторам Джояшвили Н.А., Старостиной Е.Е.
- Моим научным руководителям Парфеновой Елене Викторовне и Калининой Наталье Игоревне
- Коллективу кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ имени М.В.Ломоносова

Спасибо за внимание!

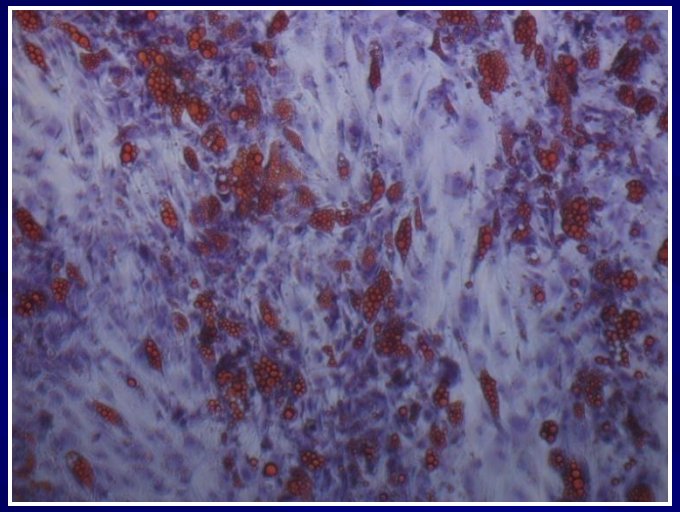
Критерии исключения (общие)

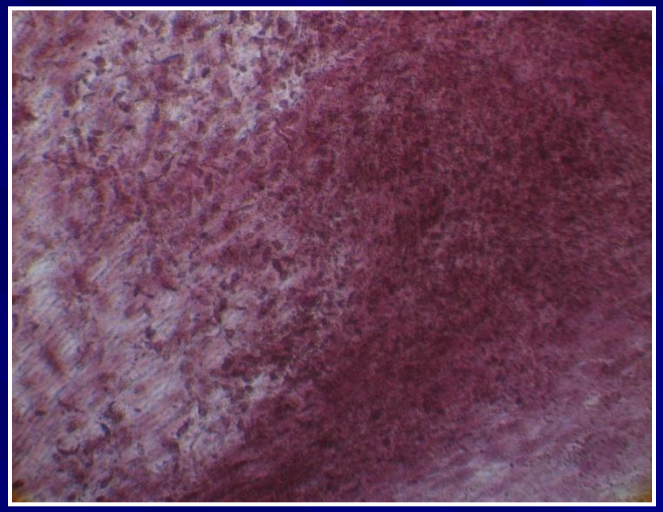
- наличие аутоиммунной патологии;
- наличие злокачественных новообразований, в том числе в анамнезе;
- наличие острых или хронических воспалительных заболеваний;
- сахарный диабет в фазе декомпенсации;
- длительная гормональная или антибиотикотерапия;
- анемия (гемоглобин $\leq$ 10 г/дл) и гематологические заболевания;
- острые нарушения мозгового кровообращения или черепно-мозговая травма в предшествующие 12 месяцев.

Специальные критерии исключения (пациенты без ИБС)

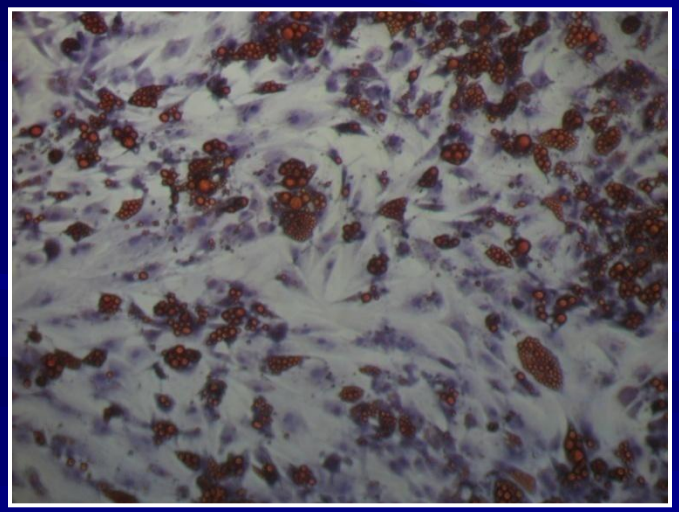
- наличие сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе инфаркта миокарда (ИМ) или миокардита в анамнезе;
- клинические признаки стенокардии;
- клинические признаки сердечной недостаточности;
- нарушения ритма сердца, такие как пароксизмальная или постоянная форма мерцательной аритмии, частая желудочковая экстрасистолия, пароксизмальная желудочковая тахикардия, блокада левой ножки пучка Гиса;
- выраженные гиперлипидемии.

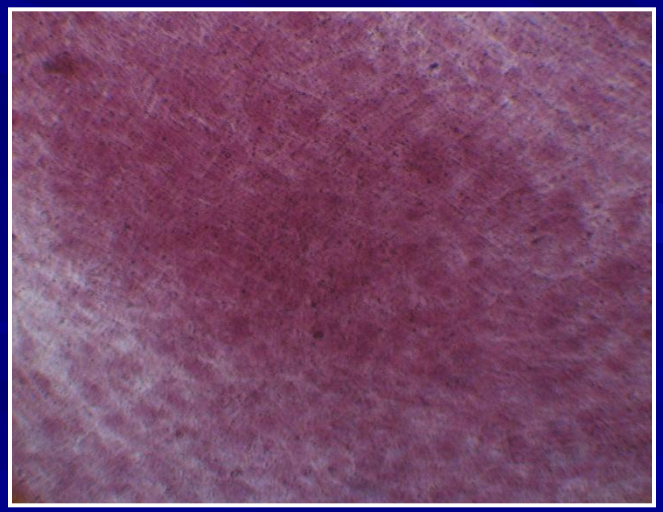
Дифференцировка МСК-ЖТ





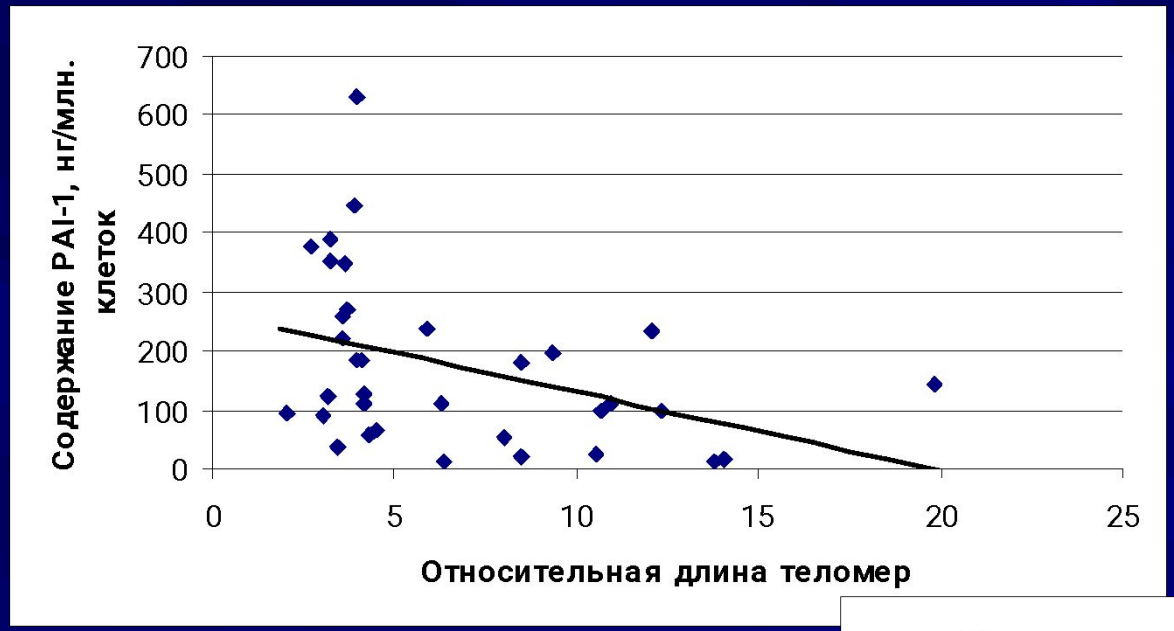
Пациентка П.,
36 лет

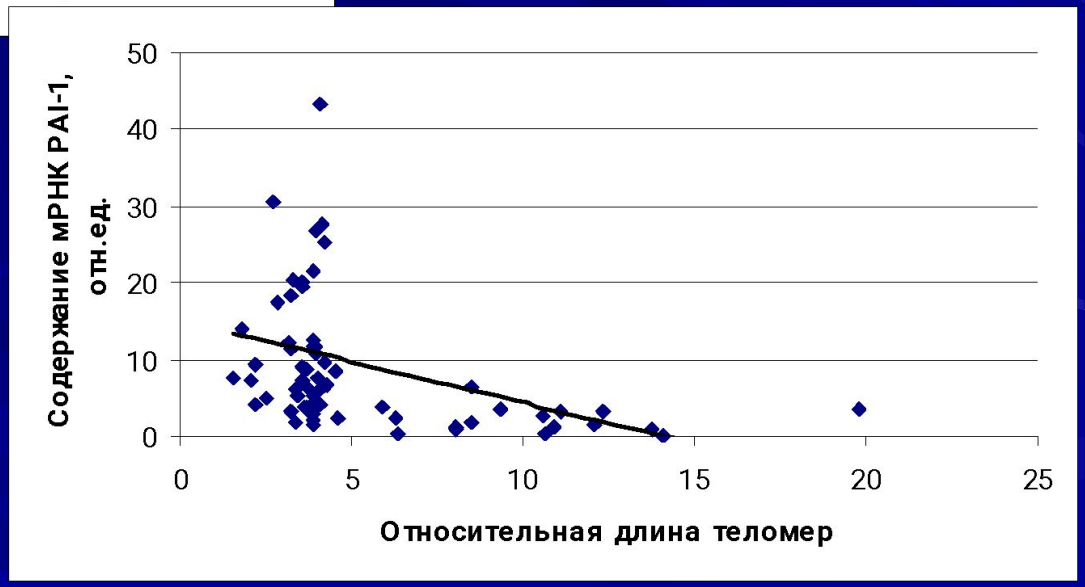




Пациентка Г.,
63 года

Содержание PAI-1 в кондиционированной среде и содержание мРНК PAI-1 обратно коррелируют с длиной теломер в МСК-ЖТ



r = -0,41, p=0,02

r = -0,54, p=0,01