

С.В. Лебедев, А.В. Карасев, В.В. Кунгурцев, А.В. Лохонина, Е.Б. Клейменова

Медицинский центр Банка России, Москва, Российская Федерация

Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы)

Критическая ишемия нижних конечностей — синдром ряда различных по этиологии и патогенезу заболеваний периферических артерий. Критическая ишемия нижних конечностей характеризуется неблагоприятным прогнозом, высоким уровнем инвалидизации и смертности. Возможности хирургической и консервативной терапии критической ишемии нижних конечностей практически полностью исчерпаны. Определенные надежды возникли в связи с достижениями в области клеточных технологий. В статье представлен критический анализ патогенетических предпосылок применения стволовых/прогениторных клеток для лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей, подробно рассмотрены основные результаты доклинических и клинических исследований безопасности и эффективности клеточных технологий, перспективы их практического внедрения в клиническую практику, а также сформулированы нерешенные вопросы. Ключевые слова: критическая ишемия нижних конечностей, патогенез, саногенез, терапевтический ангиогенез, тканевая репарация, клеточные технологии.

Введение. Актуальность внедрения новых технологий для лечения критической ишемии нижних конечностей

Термин «критическая ишемия нижних конечностей» (critical limb ischemia, КИНК) был введен P.R. Bell для обозначения больных с клиническими признаками крайней степени нарушения кровоснабжения конечности и высокой вероятностью ее ампутации [1].

КИНК не является самостоятельной нозологической формой, а представляет собой синдром ряда хронических облитерирующих заболеваний периферических артерий, различных по этиологии и патогенезу: таких как облитерирующий атеросклероз, облитерирующий тромбангиит (облитерирующий эндартериит и болезнь Бюргера), диабетические ангиопатии и болезнь Рейно, основным патогенетическим звеном которых является ишемия тканей. КИНК — это состояние, когда локальные компенсаторные возможности во многом исчерпаны, но эффективное медицинское вмешательство еще возможно [2].

Для хронической ишемии конечностей характерны следующие клинические признаки:

- перемежающаяся хромота;
- боли в конечности в покое;
- трофические язвы и дистальные некрозы;
- снижение артериального давления, измеренного на лодыжке и на первом пальце стопы;
- прогрессивное уменьшение дистанции безболевого ходьбы и показателей тредмил-теста;
- снижение температуры кожи и транскутанного парциального давления кислорода тканей конечности;
- окклюзия магистральных сосудов и обеднение микрососудистого русла по данным рентгеноконтрастного и ультразвукового исследования, лазерной доплеровской флоуметрии и др. [3].

Хроническую ишемию нижних конечностей регистрируют в 5–8% случаев у лиц старше 50 лет, при наличии факторов риска (курение, сахарный диабет, гиперлипидемия, артериальная гипертензия) — примерно у 30% [2, 4, 5], а по данным Европейского согласительного комитета (Second European Consensus Document on Chronic Leg Ischemia, 1991) — у 500–1000 пациентов на 1 млн

S.V. Lebedev, A.V. Karasev, V.V. Kungurtsev, A.V. Likhonina, E.B. Kleymenova

Medical Center of the Bank of Russia, Moscow, Russian Federation

Cell therapy of critical limb ischemia (problems and prospects)

Critical limb ischemia is a syndrome that combines several peripheral artery diseases with different etiology and pathogenesis but with similar prognosis, high morbidity and mortality. Possibility of surgical and conservative treatment of critical limb ischemia almost completely exhausted. Some hopes have arisen due to progress in cell technology. The article provides a critical analysis of pathogenic prerequisites of stem/progenitor cells for the treatment of patients with a critical limb ischemia in detail the basic results of preclinical and clinical studies on the safety and efficacy of cell technology. Unsolved problems and prospects of practical application are also discussed.

Key words: critical limb ischemia, pathogenesis, sanogenesis, therapeutic angiogenesis, tissue reparation, cell technologies.

жителей [6]. Число больших ампутаций конечностей в связи с КИНК в Евросоюзе и США превышает 100 тыс. в год [6, 7]. По данным отечественных авторов, число ампутаций у этой категории больных достигает 10–20% [4]. После такой операции риск смертности достигает 15–30%, а ожидаемая 5-летняя выживаемость не превышает 30% [4, 5, 8].

Основными методами терапии КИНК остаются хирургическая и эндоваскулярная реваскуляризация конечности. Несмотря на впечатляющие достижения в этих областях [9], примерно у 20–40% пациентов с КИНК такие технологии не могут быть применены вследствие особенностей анатомической локализации поражений магистральных сосудов, длительности заболевания или сопутствующей патологии [3, 10, 11]. Кроме того, не всегда удается добиться адекватной перфузии ишемизированных тканей. Актуальной является проблема раннего послеоперационного тромбоза шунтов и протезов. В силу этих причин ампутация конечности часто оказывается единственной возможностью продлить жизнь больному с КИНК. Вместе с тем существующее консервативное (нехирургическое) лечение КИНК не обладает необходимой эффективностью [7].

Прорывом в поиске новых способов лечения хронической ишемии конечностей стала разработка инновационных технологий терапевтического ангиогенеза — стимуляция роста кровеносных сосудов и коллатералей в зоне ишемии с помощью фармакологических и иных средств, в частности, путем введения:

- ангиогенных факторов в «чистом виде» (VEGF, FGF, трансформирующий фактор роста — ТФР b, ГМ-КСФ и др.) [12];
- генетических конструкций, способных обеспечить синтез упомянутых факторов в ишемизированной ткани конечности;
- имплантации стволовых (прогениторных) клеток, выделяющих в окружающую микросреду различные трофические, ростовые и в т.ч. ангиогенные факторы.

Монотерапия ангиогенными факторами оказалась малоэффективной. Результаты рандомизированных плацебоконтролируемых исследований пациентов с КИНК после инъекции сосудистого фактора роста VEGF свидетельствуют об отсутствии достоверного улучшения заживления язв и переносимости физической нагрузки, уменьшения частоты проведения ампутаций, хотя по данным ангиографии отмечено усиление васкуляризации пораженной конечности. Главная причина неудачи применения метода в том, что в организме эти молекулы быстро разрушаются, а повторное их введение вызывает ряд побочных эффектов, к примеру, выраженную вазодилатацию с развитием системной гипотензии и возникновение сосудистых новообразований — гемангиом [13, 14].

В настоящее время продолжается начатое в 1996 г. J.M. Isner и соавт. активное изучение возможности лечения КИНК генетическими препаратами, создаваемыми на основе плазмид, кодирующих один из ангиогенных факторов [15–19]. Однако клинические испытания этой технологии не оправдали оптимистических ожиданий. Так, в контролируемых клинических испытаниях в США, странах Европы и Азии препаратов, содержащих ген *VEGF*, было зарегистрировано лишь некоторое ускорение заживления язв, улучшение васкуляризации и повышение дистального артериального давления крови (лодыжечно-плечевой индекс, на 15%) [20, 21]. Другая генетическая конструкция с геном фактора роста фибробластов *FGF*,

по результатам клинических исследований «TRAFFIC» и «TALISMAN», оказалась полностью неэффективной [18, 22]. В более раннем аналогичном исследовании отмечена высокая частота развития побочных эффектов [23].

Перспективы клинического применения ангиогенных генетических конструкций при КИНК в ближайшие 5–7 лет представляются сомнительными, поскольку данный подход имеет ряд существенных недостатков. К их числу относятся быстрая деградация плазмид нуклеазами крови и тканей, крайне низкая эффективность трансфекции (число плазмид, включившихся в клетки реципиента) [4], отсутствие способов прекращения избыточного синтеза ангиогенного фактора трансфицированными клетками реципиента и высокий риск образования опухолей вследствие неконтролируемого поступления ангиогенных факторов в системный кровоток [24]. Не исключен и иммунный ответ организма на белок, синтезируемый в организме с помощью плазмиды [25].

Следующее направление реализации идей терапевтического ангиогенеза при ишемии конечностей — применение препаратов стволовых и других прогениторных клеток (далее СК) — базируется на выдающихся достижениях последних десятилетий в изучении биологии и «поведения» СК в тканях макроорганизма [3, 26, 27]. Начатые клинические испытания клеточных препаратов показали их безопасность. Однако эффективность такой терапии оказалась не столь впечатляющей, как в экспериментах на животных.

В связи с вышесказанным целью обзора были детальный анализ патогенетических предпосылок результатов доклинических и клинических исследований применения СК при ишемии нижних конечностей и определение на этой основе проблем и перспектив внедрения клеточных технологий в клиническую практику лечения КИНК.

Доклинические исследования механизмов действия, эффективности и безопасности стволовых клеток при лечении ишемии нижних конечностей

Механизмы репаративного действия стволовых клеток

Механизмы биологического действия СК обусловлены их свойствами пролиферации, миграции, тканеспецифической дифференцировки и способностью к синтезу комплекса трофических/ростовых факторов и других биологически активных молекул. Специфичность действия СК определяется их фенотипической принадлежностью к тому или иному виду ткани и молекулярно-клеточными характеристиками микроокружения. Реализация свойств СК происходит на основе существующих (физиологических) механизмов развития ткани и восстановления после повреждений. По современным представлениям, клеточная репарация повреждения в тканях осуществляется двумя способами: встраиванием СК в элементы тканевых структур (замещение клеток, утраченных вследствие повреждения) и саногенетическим паракринным действием на микроокружение биологически активных молекул.

Возможность замещения погибших клеток введенными в организм СК извне пока не получила достаточного экспериментального подтверждения. Прежде всего это касается высокоспециализированных клеток, таких как нейроны, хотя отдельные доказательства «клеточного замещения» были опубликованы [4]. Напротив, гипотеза трофической поддержки ишемизированной ткани СК представляется достаточно обоснованной ре-

зультатами многочисленных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, свидетельствующих о способностях СК к миграции в очаг повреждения (хоуминг), пролиферации и выделению трофических/ростовых факторов и других биологически активных молекул — цито- и хемокинов. Это выражается в феноменах цитопротекции, активации ангиогенеза и нейрогенеза, стимуляции резидентных (тканеспецифичных) СК и включении их в репаративные процессы, а также в противовоспалительном и иммуносупрессивном влиянии на микроокружение. В.И. Шумаков и Н.А. Онищенко считают, что СК устраняют дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов в поврежденной ткани [28].

Кинетика и сохранность стволовых клеток после их введения в организм

«Судьба» СК, имплантированных в организм, напрямую связана с их терапевтической эффективностью. Распределение клеток, меченных радиоактивным изотопом и введенных внутривенно, подробно исследовано в ряде экспериментальных работ [29–31]. С помощью интравитальной микроскопии мышц установлено, что после внутриартериального или внутривенного введения большая часть клеток задерживается в сосудистой сети на прекапиллярном уровне (для мезенхимальных СК — 92%) [29]. Это может привести к существенной блокаде кровотока (его снижению до 60%) [30].

D. Ноу и соавт. (2005) показали, что через 1 ч после имплантации меченных радиоактивным индием мононуклеарных клеток костного мозга в миокард лабораторным животным с воспроизведенным инфарктом у них в сердце обнаруживали 11% введенных клеток, а при инфузии в коронарную артерию — только 2–3% [32]. В последующем факт быстрого исчезновения из миокарда клеток после внутримиекардиального, внутриартериального и внутривенного введения был подтвержден в других лабораториях [33, 34].

В отличие от сердца, в скелетных мышцах имплантированные клетки сохраняются существенно дольше. Так, по данным М.В. Калашникова и А.В. Белявского (2009), сохранность мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани после введения их в икроножные мышцы мышшей и крыс, составляла 50–70% через 1 сут и 5–10% через 1 нед [4]. При этом ксенотрансплантация резко снижала этот показатель. Существенных различий в сохранности имплантированных клеток в нормальных и ишемизированных мышцах не обнаружено. Последнее обстоятельство может быть аргументом в пользу применения в клинической практике технологии введения СК непосредственно в мышцы пораженных нижних конечностей.

Патогенетические предпосылки применения клеточных технологий при лечении ишемии нижних конечностей

Ишемическое повреждение тканей конечности и естественная их репарация характеризуются несколькими феноменами, сочетающимися в себе патогенетические и соответствующие саногенетические механизмы. В частности, к ним можно отнести снижение объема магистрального кровотока и ангиогенез, уменьшение числа кровеносных капилляров и ангиогенез, дистрофические изменения и регенерацию тканей ишемизированной конечности [27]. Ниже рассмотрены все эти механизмы с точки зрения предпосылок для применения терапевтических клеточных технологий.

Ремоделирование коллатеральных артериол дистальнее мест окклюзии магистральных артерий

В ишемизированной конечности одновременно с облитерацией просвета магистральных артерий происходит трансформация существующих коллатеральных артериол в функционирующие коллатеральные артерии (артериогенез или коллатеральный рост). Исходный диаметр естественных коллатеральных артерий может возрастать до 20 раз [35] и до определенного предела увеличивать суммарный диаметр артериального русла. Это позволяет компенсировать функциональные потери [36] и даже полностью восстановить кровоснабжение в поврежденной конечности после значительной окклюзии магистральных артерий. Однако, когда кровоток сокращается до 40–50% от нормы, функционирование коллатералей не компенсирует недостаточность кровоснабжения конечности, и у пациентов развивается КИНК (III–IV стадия ишемии) [2, 37, 38].

Коллатеральный рост не зависит от локальной тканевой гипоксии. Он запускается «стрессом растяжения» существующих коллатеральных артериол. Такой стресс активирует экспрессию молекул адгезии (MCP-1, ICAM-1) на поверхности эндотелия, что приводит к рекрутированию из системного кровотока моноцитов и других клеток воспаления [36, 39], которые продуцируют ангиогенные трофические факторы (VEGF, FGF, PGF и др.), способствующие в свою очередь ремоделированию мелких артериол в широкие коллатерали [36].

Артериогенез активно протекает на начальных стадиях ишемии конечности (I–II стадии). Однако к моменту перехода патологии в финальные стадии (III–IV) он практически завершается, и терапевтическая стимуляция коллатерального роста артериол представляется патогенетически неоправданной [2]. Именно поэтому при поиске новых технологий лечения КИНК усилия исследователей сосредоточены на саногенетических факторах, ассоциированных с восстановлением микрососудистого русла (ангиогенеза) конечности и молекулярно-клеточных механизмах тканевой и внутриклеточной репарации.

Ангиогенез

Триггером ангиогенеза служит тканевая гипоксия, приводящая к активации в эндотелии микрососудов ключевого фактора гипоксии (*hypoxia inducible factor*, HIF) [5, 39] и усилению синтеза проангиогенных факторов (VEGF, ангиопоэтин, индуцибельная синтетаза оксида азота) [5, 36]. Эти стимулы инициируют рост (ветвление) имеющихся капилляров за счет пролиферации их зрелых эндотелиальных клеток.

Относительно недавно во взрослом организме был обнаружен механизм ангиогенеза, характерный для эмбрионального периода, — васкулогенез (неоангиогенез), представляющий собой формирование капилляров *de novo* при непосредственном участии CD34+–гемопоэтических эндотелиальных клеток-предшественников, мигрирующих в зону ишемии из системного кровотока. Показано также, что МСК негемопоэтического происхождения способны трансдифференцироваться в клетки с характеристиками эндотелиальных клеток-предшественников [40–45] и участвовать в процессах постнатальной неоваскуляризации с помощью паракринных эффектов и секреции ангиогенных факторов [46, 47]. Все эти данные положены в основу разработки стратегий терапевтического ангиогенеза и неоваскуляризации при лечении ишемических повреждений [44, 48–53].

Проблемы тканевой репарации ишемических повреждений

Снижение кровотока на участке периферического сосудистого русла приводит к нарушениям иннервации, венозного оттока, лимфодинамики и к дистрофическим изменениям всех тканей конечности. Регенерация этих повреждений осуществляется с помощью системных и локальных иммуновоспалительных реакций.

В исследованиях J.G. Tidball показано, что острое повреждение мышц в экспериментах *in vivo* приводит к активации клеток иммунного воспаления: Th₁ лимфоцитов, нейтрофилов и CD68⁺ M₁ макрофагов [54]. Макрофаги типа M₁, экспрессируя провоспалительные цитокины фактор некроза опухолей (ФНО) α и интерлейкин (IL) 6, стимулируют пролиферацию Th₁ лимфоцитов и вызывают дальнейшее повреждение мышечной ткани через высвобождение оксида азота. Практически одновременно с этим включаются механизмы стимуляции и регенерации мышц. Важную роль здесь играют M₂ макрофаги, которые экспрессируют противовоспалительные цитокины, включая IL 4, 10 и 13 [55], активируют Th₂ лимфоциты и ингибируют цитотоксическую активность M₁ макрофагов, что приводит к уменьшению степени повреждения мышц и активации их регенерации. M₂ макрофаги имеют 3 фенотипические подкатегории — А, В и С, которые характеризуются функциональной специализацией [56]. M₂A CD206⁺ макрофаги экспрессируют IL 4 и 13, способствуют заживлению ран и восстановлению тканей. M₂B активируют иммунные комплексы или Toll-подобные рецепторы и высвобождают Th₂. M₂C CD163⁺ CD206⁺ макрофаги активируют Th₂ лимфоциты, экспрессируют IL 10 и ингибируют функциональную активность M₁ макрофагов. Активность регенерации мышц напрямую связана с функцией макрофагов M₂A и M₂C [54].

Такие механизмы характерны и для хронического повреждения мышц. Однако в этом случае наблюдается определенная последовательность смены фенотипов макрофагов M₂: на ранней стадии хронического повреждения цитотоксичность макрофагов M₁ подавляют макрофаги фенотипа M₂A, а затем активируются макрофаги M₂C. Смена фенотипов макрофагов с M₁ на M₂A и M₂C является ключевым патогенетическим моментом перехода фазы повреждения мышечных волокон в фазу их регенерации. Механизм такой смены фенотипов неизвестен. Экспериментальные данные свидетельствуют о возможной важной роли микросреды: в частности, удалении посредством фагоцитоза продуктов распада мышц из межклеточного пространства. Хотя общие механизмы репарации мышц с участием иммунной системы и были сформулированы на основании исследований мышечной дистрофии Дюшенна, авторы относят их к повреждениям любого типа [54].

О патогенетической роли иммунного воспаления при ишемии нижних конечностей свидетельствуют и результаты клинических исследований. В частности, J. De Naro и соавт. (2009) проследили связь концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови (неспецифический показатель острого воспаления) с клинической выраженностью заболеваний периферических артерий у 3370 больных [57]. Оказалось, что в тяжелых случаях хронической ишемии нижних конечностей (пациенты с неоднократными хирургическими вмешательствами на сосудах нижних конечностей) содержание С-реактивного белка было достоверно выше, чем у пациентов, которые еще не нуждались в хирургической реканализации артерий конечности. По данным В.Д. Самодай и соавт. при облитерирующем атеросклерозе ма-

гистральных артерий у пациентов с КИНК имеет место супрессия Т-зависимых иммунных реакций на фоне лимфопении, а при облитерирующем тромбангите — подавление клеточного и дисбаланс гуморального звена иммунитета [2].

Представленные выше молекулярно-клеточные механизмы перехода повреждения мышечных волокон в регенерацию стоит рассматривать в качестве патогенетических точек приложения возможного саногенетического действия СК, поскольку они обладают противовоспалительным и иммуносупрессивным действием на тканевое микроокружение.

Результаты экспериментальных исследований механизмов действия и эффективности применения стволовых клеток на животных моделях ишемии нижних конечностей

По современным представлениям, наиболее перспективными в плане практического клинического применения, в т.ч. и при заболеваниях периферических артерий, представляются МСК и гемопоэтические СК [26].

Мезенхимальные стволовые клетки

МСК — это мультипотентные клетки стромы различных тканей [58]. Хотя костный мозг остается до сих пор наиболее часто используемым источником МСК, они могут быть получены из скелетных мышц [59], жировой ткани [60], пульпы зуба [61] и др. МСК обладают рядом особенностей влияния на иммунную систему, которые делают их предпочтительными для практического применения в лечении многих заболеваний. В частности, это противовоспалительное действие, подавление созревания дендритных клеток, пролиферации и дифференцировки Т лимфоцитов, снижение активности естественных киллеров и активация Т-регуляторных клеток. МСК уменьшают секрецию Т-клетками провоспалительных цитокинов (IL 10 и ФНО α) и увеличивают интенсивность секреции противовоспалительного IL 4 [62]. МСК любого происхождения не экспрессируют МНС II класса (*HLA-DR*) и обладают иммуносупрессивными свойствами [62], поэтому они весьма перспективны для аллогенной имплантации [58, 63–66].

Усиление ревазуляризации конечности после трансфузии МСК, полученных из костного мозга, в системный кровоток или после введения клеток непосредственно в мышцы неоднократно продемонстрировано на мышечной модели острой ишемии [67–69]. Получены сходные ангиогенные эффекты после внутримышечного и внутриартериального введения клеток [70]. Внутриартериальная инфузия МСК, преинкубированных в 1% O₂, или внутримышечная имплантация клеток, преобработанных 2% O₂, усиливали ревазуляризацию ишемизированных задних лап крыс [71].

К перспективным технологиям восстановления поврежденных тканей относят трансплантации одного из видов тканевых МСК — человеческих стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) [34, 72]. СКЖТ локализованы в стенках капилляров и артериол [73]. Они имеют фибробластоподобную морфологию и экспрессируют на поверхности те же антигены, что и МСК костного мозга: CD105⁺, CD73⁺, CD146⁺, STRO-1 [61, 74, 75]. СКЖТ обладают выраженной мультипотентностью, способны дифференцироваться как в клетки мезодермального ряда (адипоциты, миоциты, остециты, хондроциты), так и в нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты и эндотелиальные клетки. Эти клетки участвуют в физиологическом обновлении жировой ткани, образуя адипозо-

ангиогенные кластеры, стимулируют рост сосудов и нервов в ишемизированных тканях [4, 34].

В экспериментах *in vitro* показано, что СКЖТ выделяют в культуральную среду широкий спектр различных факторов, включая как ангиогенные факторы VEGF, HGF, FGF, ТФР β, ГМ-КСФ, ангиопоэтин и другие, так и ингибиторы ангиогенеза (эндостатин, тромбоспондин, ингибитор активатора плазминогена 1) [34, 76]. Культуральная среда, кондиционированная СКЖТ, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных структур. При культивировании СКЖТ в условиях гипоксии уровень экспрессии генов ангиогенных факторов существенно повышается. Эти данные подтверждены в опытах *in vivo* при имплантации СКЖТ человека под кожу интактной мыши [69].

В ряде лабораторий на животных моделях ишемии задних конечностей (иссечение бедренной артерии) зафиксирован достоверный терапевтический эффект (улучшение кровотока, отсутствие некроза стопы, увеличение числа капилляров и др.) при локальном (внутримышечном) и внутривенном введении препаратов СКЖТ. При этом полученный эффект был сопоставим с таковым при использовании МСК из костного мозга [69, 77, 78]. Экспериментальные данные указывают на 2 механизма активации ангиогенеза при имплантации СКЖТ: встраивание их в сосуды с дифференцировкой в эндотелиальном направлении [77, 78] и паракринный эффект за счет секреции ангиогенных факторов [79, 80].

В экспериментах *in vivo* показано участие СКЖТ в регенерации поврежденных скелетных мышц [81]. СКЖТ, благодаря своей способности синтезировать помимо ангиогенных ряд нейротрофических факторов (BDNF, NGF и GDNF), рассматривают как адекватный материал для стимуляции роста нервных волокон и окончаний, без чего невозможен ангиогенез [34]. Поскольку СК жировой ткани, как и костного мозга, не экспрессируют МНС II (*HLA-DR*) и обладают иммуносупрессивными свойствами, их также считают перспективными для аллогенной имплантации. Кроме того, следует отметить ряд преимуществ практического плана, существенно упрощающих технологию клеточной терапии СКЖТ: доступность получения жировой ткани, выделения из нее стромальных клеток, возможность достаточно быстрого наращивания их *ex vivo* в необходимых количествах.

Гемопоэтические стволовые клетки

Изучение механизмов проангиогенного действия СК было расширено после открытия в составе CD34⁺ гемопоэтических клеток моноклеарной фракции костного мозга относительно небольшой популяции эндотелиальных клеток-предшественников [44]. Полагают, что при структурной перестройке сосудистой сети в поврежденной ткани, в основе которой лежит развитие коллатеральных артериол и ветвление капилляров, возможно формирование микрососудов *de novo* с участием эндотелиальных клеток-предшественников, мигрирующих из костного мозга в периферический кровоток и далее в зоны ишемии [44, 48, 52, 82]. Показано, что в ответ на ишемию увеличивается число циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников [38]. Имеются доказательства возможности встраивания этих клеток в стенку капилляра с последующей дифференцировкой в зрелые эндотелиоциты. Однако доля клеток костномозгового происхождения, интегрированных в новообразованные сосуды скелетных мышц, пока не установлена, хотя она может быть весьма существенной в других тканях (например, в микрососудах головного мозга она составля-

ет 26–42%). Эндотелиальные клетки-предшественники, как и другие CD34⁺ гемопоэтические клетки, способны активировать резидентные эндотелиальные клетки действием ангиогенных факторов [53]. Существуют данные об усилении неоваскуляризации после трансплантации эндотелиальных клеток-предшественников на моделях ишемии конечностей животных [38, 70, 83, 84].

Таким образом, в экспериментальных исследованиях механизмов действия и эффективности СК получены результаты, свидетельствующие о перспективности клеточных технологий для лечения ишемии нижних конечностей. Вместе с тем остается нерешенным ряд теоретических и методических вопросов, определяющих стратегию терапевтического ангиогенеза, выбор клеточных препаратов и тактику их применения в зависимости от стадий ишемии и других клинических особенностей течения заболевания.

В частности, идея терапевтического ангиогенеза базируется на представлениях о том, что в тканях конечности, ишемизированной вследствие окклюзии просвета магистральных артерий, число функционирующих кровеносных капилляров уменьшается, и постулируется необходимость его увеличения [3]. Трактовка такого механизма саногенеза весьма затруднительна с физической точки зрения. Согласно закону Пуазейля, увеличение площади сечения за счет сосудов меньшего диаметра приводит к росту сопротивления тока жидкости в системе и не результирует в увеличении объемной скорости кровотока, т.е. в усилении кровоснабжения конечности.

Неясен и общий механизм восстановления микроциркуляции при КИНК, поскольку неизвестно, имеет ли место частичная гибель капилляров, или некая их часть перестает функционировать из-за недостатка кровоснабжения. Резервные возможности мышц, как и других тканей, во многом определяются наличием т.н. молчащих, т.е. запасных, микрососудов и артериальных коллатералей, включающихся в кровоток при усилении нагрузки и репарации повреждений, что приводит в соответствие объем кровоснабжения потребностям тканей конечности. По-видимому, этот физиологический механизм работает и в патологических условиях, в частности при ишемии. Однако литературные данные на этот счет также отсутствуют.

Регенерация поврежденных мышечных волокон инициируется воспалением [54]. Однако известно, что СК оказывают противовоспалительное и локальное иммуносупрессивное действие, устраняя дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов в поврежденной ткани [34, 85]. С учетом этого факта, а также данных о том, что при КИНК имеют место подавление клеточного и дисбаланс гуморального звена иммунитета [2], в каждом конкретном случае применение СК для лечения КИНК должно быть аргументировано результатами исследований соотношения воспалительных и противовоспалительных (репаративных) процессов в пораженной конечности. На сегодняшний день такая методология не разработана ни в эксперименте, ни в клинической практике.

Окончательно не решены и вопросы безопасности применения СК. Так, известно, что увеличение их концентрации в препарате усиливает адгезивность клеток [86], а активация неоангиогенеза может иметь негативные последствия в виде васкуляризации атеросклеротических бляшек и риска тромбообразования [87].

С точки зрения объективной экспериментальной практики, оценка результатов доклинических исследований эффективности СК при КИНК, их воспроизводи-

мость оказалась крайне затруднительной, прежде всего из-за неадекватности моделей КИНК на лабораторных животных. Эксперименты в основном выполнены на моделях острого, полного нарушения кровотока по магистральным сосудам конечности (коагуляция, перевязка, иссечение и пр.), а не при моделировании хронической ишемии нижних конечностей. Известно, что с возрастом в костном мозге прогрессивно уменьшается общее число гемопоэтических СК, в особенности МСК [34]. Большинство исследований лечебных эффектов СК проведено на молодых и взрослых грызунах, тогда как пациенты с КИНК относятся преимущественно к старшей возрастной категории и, как правило, страдают сопутствующими заболеваниями. Имеются и другие негативные аспекты: ориентация исследователей преимущественно на измерение объема кровотока в поврежденной конечности, а не на показатели интегральных (двигательных) функций; существенные различия в дизайне экспериментов, к примеру, по составу испытуемых препаратов, срокам и способам их введения, длительности лечения. Из-за недостаточной продолжительности мониторинга остается неясным, какое время сохраняется достигнутый терапевтический эффект, и есть ли необходимость в повторном введении клеточных препаратов. Неизвестно, является ли селективное использование изолированных популяций клеток более эффективным, чем их комбинация.

Клинические исследования безопасности и эффективности применения клеточных препаратов для лечения ишемии нижних конечностей

Клинические исследования клеточной терапии при лечении заболеваний периферических артерий, в т.ч. КИНК, впервые были проведены в японском университете Кансаи коллективом Е. Tateishi-Yuyama (2002). У наблюдаемых пациентов через 4 недели после введения в ишемизированные мышцы пораженной конечности аутологичных гемопоэтических СК уменьшилась интенсивность боли, улучшилось кровоснабжение, увеличилось парциальное давление кислорода в тканях конечности и дистанция безболевого ходьбы, а также значительно повысилось качество жизни. Эти результаты сохранялись не менее 6 мес. Осложнений после имплантации клеток зарегистрировано не было [88, 89]. К настоящему времени опубликовано более 120 работ, посвященных применению клеточной терапии при заболеваниях периферических артерий, из них более 30 контролируемых клинических исследований закончены [57, 90, 91]. Наиболее подробный мета-анализ опубликован G.P. Fadini и соавт. в 2010 г. В нем проанализировано 108 публикаций, 42 из которых — контролируемые клинические исследования, в т.ч. 38 — клеточная терапия, 3 — применение только гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и 1 — сравнение применения СК и Г-КСФ [92].

Дизайн и методы оценки клеточной терапии ишемии нижних конечностей

Испытывали преимущественно мононуклеарную фракцию клеток аутологичного костного мозга или периферической крови. Первую получали путем центрифугирования аспирата костного мозга в градиентной среде. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли методом афереза после курса применения Г-КСФ для мобилизации СК из костного мозга в периферическую кровь. Суммарные дозы Г-КСФ существенно ва-

рировали у различных авторов: от 200 до 4900 мг (5 мг/кг в течение 4–5 сут подряд) [92].

По данным метаанализа G.P. Fadini и соавт. среднее число введенных пациентам с КИНК мононуклеарных клеток составило $3,56 \pm 2,81 \times 10^9$, при применении CD34+ клеток — $5,0 \pm 1,48 \times 10^7$ [92].

Принято считать, что альтернативой имплантации/трансфузии клеточных препаратов является т.н. непрямая клеточная терапия с помощью ростовых и трофических факторов. В частности, используют метод мобилизации в кровотоки гемопоэтических СК из костного мозга с помощью инъекций Г-КСФ без каких-либо других процедур [93].

Для лечения пациентов с ишемией нижних конечностей применяли 3 способа введения СК: чаще — инъекции клеточных препаратов непосредственно в ишемизированные мышцы конечностей в 10–30 точек [94], реже — инфузии в бедренную артерию [95] и их сочетание [96].

Эффективность лечения оценивали путем измерения лодыжечно-плечевого индекса систолического артериального давления, транскутанного парциального давления кислорода ($TcPO_2$), локальной температуры, определения показателей кровотока (ультразвуковое доплеровское исследование), визуализации артериального русла с применением контрастных веществ (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография и др.). Решающее значение для принятия заключения об эффективности клеточной терапии имело состояние интегральных функций ишемизированной конечности, таких как наличие болей в покое, дистанция безболевого ходьбы, показатели тредмил-теста, сроки заживления язв и сохранение конечности (устранение угрозы ампутации) [2, 3]. Безопасность клеточных технологий терапии заболеваний периферических артерий оценивали по наличию ближайших и отдаленных осложнений имплантации или трансфузии клеточных препаратов.

Результаты клинических исследований клеточной терапии ишемии нижних конечностей

Несмотря на относительно большое число исследований безопасности и эффективности клеточной терапии КИНК, рациональное обобщение их результатов не всегда продуктивно, поскольку имеют место существенные различия в дизайне исследований, числе пациентов, уровне статистической верификации, типах применяемых клеток, их количестве, способах введения препаратов и комбинациях последних.

Результаты практических всех клинических исследований демонстрируют сходные данные по показателям уменьшения интенсивности болевого синдрома в покое, увеличения дистанции безболевого ходьбы, лодыжечно-плечевого индекса, $TcPO_2$ [97]. Это касается применения мононуклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга или периферической крови [98] и высокоочищенных фракций эндотелиальных клеток-предшественников (CD133+ клетки) и CD34+ гемопоэтических СК [99, 100]. Терапия заболеваний периферических артерий мононуклеарными фракциями клеток костного мозга или периферической крови (после мобилизации Г-КСФ) оказалась более успешной, чем использование вышеупомянутых высокоочищенных гемопоэтических СК [100]. В отдельных исследованиях отмечена аналогичная эффективность клеточной терапии (мононуклеарной фракцией клеток аутологичного костного мозга) и монотерапии Г-КСФ по показателям лодыжечно-плечевого индекса и TcO_2 [93].

Имеются лишь единичные публикации, посвященные системному введению клеточных препаратов при КИНК. Так, в исследованиях D.H. Walter (2011) пациентам с КИНК (20 наблюдений + 20 — контрольная группа) внутриаартериально вводили клетки мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга. Через 3 мес был установлен достоверный эффект уменьшения интенсивности болевого синдрома в покое и размеров язв [95]. Детальный мета-анализ клинических исследований [92], как и плацебоконтролируемое исследование N. Van Royen и соавт. (2005) [101], показали, что улучшение показателя лодыжечно-плечевого индекса, увеличение дистанции безболевого ходьбы, уменьшение боли в покое и ускорение заживления язв пораженной конечности статистически не различаются при внутримышечном и внутриаартериальном пути введения.

Следует упомянуть и сообщения об отсутствии эффекта клеточной терапии. В частности, применение мононуклеарной фракции клеток периферической крови пациента не привело к достоверному улучшению заживления язв на ишемизированной конечности [89], а введение только гемопоэтических СК с фенотипом CD34⁺, выделенных из мононуклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга, не улучшало эффективности клеточной терапии КИНК [97].

Обобщенный анализ эффективности клеточной терапии КИНК аутологичными препаратами мононуклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга или периферической крови, по материалам законченных рандомизированных плацебоконтролируемых клинических исследований, представлен в табл. В качестве критериев включения в анализ мы использовали: наличие контрольной группы пациентов, внутримышечное введение клеточного препарата в ишемизированную конечность однократно, в несколько точек, определение интегральных показателей эффективности, наличие статистической достоверности различия показателей с группами контроля, сроки оценки результатов более 6 месяцев от начала лечения (см. табл.).

Данные таблицы свидетельствуют о доказанной эффективности клеточной терапии КИНК в случае использования внутримышечного введения в большую конечность аутологичного клеточного препарата, включающего мононуклеарную фракцию клеток аутологичного костного мозга и/или периферической крови.

Практически во всех публикациях по клеточной терапии КИНК (контролируемые и неконтролируемые испытания) с применением аутологичных препаратов

мононуклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга и периферической крови указывают на безопасность данного метода. Вместе с тем имеются сообщения о некоторых негативных аспектах. Так, процедура забора костного мозга нередко сопровождается локальными болями ощущениями, иногда после процедуры появляется анемия легкой степени. Введение Г-КСФ в большинстве случаев вызывает озноб, миалгии, лихорадку и боли в костях, могут возникать боли за грудиной и даже анафилактические реакции [102], сообщается о случае развития фибрилляции желудочков [93], а также о кровоизлиянии в сетчатку сразу после введения Г-КСФ [103].

В литературе пока отсутствует систематический анализ безопасности, равно как и полноценные исследования, в которых бы оценивали уровень смертности при проведении клеточной терапии КИНК. В работах А.Т. Hirsch (2006) и К. Miyamoto и соавт. (2006) дана оценка безопасности клеточной терапии КИНК в отдаленном периоде (несколько лет после лечения) [104, 105]. Однако они выполнены на небольшом числе пациентов и не позволяют сделать обоснованное заключение. Важно иметь в виду, что пациенты, нуждающиеся в терапевтической неоваскуляризации, часто имеют сопутствующие кардиоваскулярные факторы риска, и применение у них клеточной терапии может сопровождаться негативными реакциями, такими как кровотечения или тромбообразование [98]. Клеточная терапия у таких больных может не оказать ожидаемого положительного эффекта вследствие снижения числа СК или их регенераторного потенциала [106–108].

Заключение. Основные проблемы и перспективы клеточной терапии критической ишемии нижних конечностей

Актуальность проблемы разработки новых технологий оказания медицинской помощи пациентам с КИНК определяется самим фактом наступления финальной стадии заболевания и необходимостью срочного врачебного вмешательства, чтобы исключить или хотя бы отсрочить ампутацию ишемизированной конечности.

Анализ патогенетических и саногенетических механизмов при КИНК позволяет сделать несколько обобщений, касающихся терапевтической активации роста коллатеральных артерий (артериогенез) и кровеносных капилляров (ангиогенез и неоангиогенез), а также достижений в области клеточной терапии КИНК.

Таблица. Эффективность клеточной терапии критической ишемии нижних конечностей по результатам контролируемых клинических исследований

Интегральные клинические показатели	Результаты лечения в сравнении с контрольной группой		Число исследований	Ссылки
	Изменение показателей	Уровень достоверности, p		
Дистанция безболевого ходьбы	Увеличение на 312 м	0,02	6	Fadini G.P. и соавт., 2010 [91]
Боль в конечности в покое	Уменьшение по субъективной 10-балльной шкале на 2,4 балла	0,02	6	Fadini G.P. и соавт., 2010 [91]
Заживление язв	OR =7,23; 95% ДИ 1,09–11,54	0,04	4	Fadini G.P. и соавт., 2010 [91]
	Полное заживление у 31% после лечения и у 13% наблюдаемых контрольной группы	—	1	Powell R.J. и соавт., 2011* [101]
Ампутация конечности	OR =0,09; 95% ДИ 0,02–0,44	0,0005	2	Fadini G.P. и соавт., 2010 [91]
	Уменьшение числа случаев более чем в 2 раза	<0,05	1	Powell R.J. и соавт., 2011* [101]

Примечание. * — многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое исследование. OR — отношение рисков, ДИ — доверительный интервал.

Результаты исследований с помощью методов контрастирования сосудистого русла у пациентов с КИНК после клеточной терапии свидетельствуют о том, что в финальной стадии ишемии конечности еще возможно увеличение объема коллатерального кровообращения за счет резерва функционально незадействованных коллатеральных артерий. По-видимому, коллатеральный рост в данной ситуации обусловлен паракринным действием имплантированных СК на те коллатерали, которые потеряли способность к расширению в ответ на «стресс» гидродинамического растяжения из-за повышения артериального давления над местом окклюзии магистральной артерии, что имело место на ранних стадиях окклюзии магистральных артерий конечности.

Вместе с тем объяснение терапевтического действия СК стимуляцией ветвления кровеносных капилляров, т.е. ангиогенезом, пока не получило прямых подтверждений для условий хронической ишемии конечности, поскольку доклинические исследования проводились, как правило, на животных моделях острой окклюзии магистральных артерий. Быстрое увеличение числа микрососудов в ишемизированных конечностях (не позднее 5-х сут), описанное, например, в экспериментах Е.В. Парфеновой и соавт. (2006), могло быть вызвано развитием артериальных коллатералей и вследствие этого восстановлением тока крови по сохранным микрососудам [4]. Также не существует прямых доказательств наличия феномена неоангиогенеза в виде встраивания экзогенных эндотелиальных клеток-предшественников в стенку капилляра с последующей дифференцировкой в зрелые эндотелиоциты при хронической ишемии конечности.

При трактовке результатов клеточной терапии недооценивается роль иммуновоспалительных реакций в репарации ишемических повреждений. Физиологически число функционирующих микрососудов должно соответствовать потребностям в кровоснабжении, которое в свою очередь определяется морфофункциональным состоянием клеток ишемизированной ткани и активностью репарации дистрофических изменений в ней. Репарация таких повреждений осуществляется в виде саморегуляции интенсивности воспалительных реакций и активности восстановления, в частности поврежденных мышечных волокон, с помощью смены фенотипов провоспалительных макрофагов M_1 на противовоспалительные макрофаги M_2 . Регенерация мышечных волокон инициируется воспалением. Без активации воспаления структурного восстановления ткани не происходит. Усиление воспалительного ответа стимулирует регенерацию в зоне по-

вреждения [54]. Эти механизмы можно рассматривать в качестве патогенетических точек приложения терапевтической имплантации СК, обладающих способностью поддерживать баланс про- и противовоспалительных цитокинов.

В клинических испытаниях получены доказательства безопасности и эффективности внутримышечного введения в пораженную конечность клеточных препаратов аутологичных мононуклеарных фракций костного мозга и периферической крови по физиологическим и, что главное, по интегральным показателям восстановления функций конечности и здоровья пациентов с КИНК (увеличение дистанции безболевого ходьбы, ускорение заживления язв, отсрочка ампутаций и сохранение конечности). Однако остается нерешенным ряд методических проблем, определяющих тактику клеточной терапии КИНК, выбор клеточных препаратов, а также особенности их применения в зависимости от стадий ишемии и течения заболевания; не разработаны критерии подбора дозы (концентрации клеток и число клеток на одну инъекцию). В частности, МСК, СКЖТ, эндотелиальные клетки-предшественники, несмотря на положительные результаты доклинических исследований, пока не стали предметом систематических клинических контролируемых исследований при КИНК. Такая же ситуация складывается с применением аллогенных СК, определением оптимальных путей введения клеточных препаратов и показаний к повторному курсу клеточной терапии.

Ближайшие перспективы внедрения клеточных технологий лечения КИНК в реальную клиническую практику напрямую связаны с результатами многоцентровых контролируемых исследований, которые закончатся в 2013 и 2014 гг. Отдаленные перспективы во многом зависят от успехов фундаментальных исследований, касающихся, в частности, поиска оптимальных вариантов клеточной терапии, разработки протоколов раннего ее применения, комбинирования факторов роста и СК [109], использования СК как средства доставки генов, ответственных за синтез ростовых и трофических факторов [110, 111], технологии *ex vivo* обработки СК некоторыми фармакологическими препаратами для лечения сердечно-сосудистой патологии (статины, антигипертензивные препараты) [112]. По-видимому, может оказаться перспективной и комплексная клеточная терапия многокомпонентными препаратами, включающими прогениторные клетки и клетки иммунной системы, с целью активации репаративных процессов в ишемизированных тканях.

REFERENCES

1. Bell P.F., Charlesworth D., DePalma R.G. The definition of critical ischemia of a limb. *Brit. J. Surg.* 1982; 69: 2.
2. Samodai V.D., Parkhisenko Yu.A., Ivanov A.A. Nestandartnaya khirurgiya kriticheskoj ishemii nizhnikh konechnostei. *M.: MIA.* 2009. 240 s.
3. Bosiers M., Schneider P.A. Critical limb ischemia. *N.-Y.: Informa Healthcare USA.* 2009. 352 p.
4. Autologichnye stvolovye kletki. Eksperimental'nye issledovaniya i perspektivy klinicheskogo primeneniya. Rukovodstvo dlya vrachei. Pod red. V.A. Tkachuka. *M.: Litterra.* 2009. 448 s.
5. Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzner N.R., Bakal C.W., Creager M.A., Halperin J.L., Hiratzka L.F., Murphy W.R., Olin J.W., Puschett J.B., Rosenfield K.A., Sacks D., Stanley J.C., Taylor L.M. Jr., White C.J., White J., White R.A., Antman E.M., Smith S.C. Jr., Adams C.D., Anderson J.L., Faxon D.P., Fuster V., Gibbons R.J., Hunt S.A., Jacobs A.K., Nishimura R., Ornato J.P., Page R.L., Riegel B. Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease); endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; Transatlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation.* 2006; 113: 463–654.
6. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Circulation.* 1991; 84 (4): 16–26.

7. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 696–709.
8. Adam D.J., Beard J.D., Cleveland T., Bell J., Bradbury A.W., Forbes J.F., Fowkes F.G., Gillespie I., Ruckley C.V., Raab G., Storkey H. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2005; 366: 1925–1934.
9. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A., Nehler M.R., Harris K.A., Fowkes F.G., Bell K., Caporusso J., Durand-Zaleski I., Komori K., Lammer J., Liapis C., Novo S., Razavi M., Robbs J., Schaper N., Shigematsu H., Sapoval M., White C., White J., Clement D., Creager M., Jaff M., Mohler E. 3rd, Rutherford R.B., Sheehan P., Sillesen H., Rosenfield K. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2007; 33 (1): 1–75.
10. Guidelines for percutaneous transluminal angioplasty. Standards of practice committee of the society of cardiovascular and interventional radiology. *Radiology.* 1990; 177: 619–626.
11. Valentine R.J., Myers S.I., Inman M.H., Roberts J.R., Clagett G.P. Late outcome of amputees with premature atherosclerosis. *Surgery.* 1996; 119: 487–493.
12. Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 1999; 85: 221–228.
13. Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 2002; 6: 127–133.
14. Rajagopalan S., Mohler E.R., Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Saucedo J.F., Goldman C.K., Blebea J., Macko J., Kessler P.D., Rasmussen H.S., Annex B.H. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation.* 2003; 108: 1933–1938.
15. Isner J.M., Walsh K., Symes J., Pieczek A., Takeshita S., Lowry J., Rosenfield K., Weir L., Brogi E., Juraj D. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7 (8): 959–988.
16. Khan T.A., Sellke F.W., Laham R.J. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Ther.* 2003; 10: 285–291.
17. Maulik N. NV1FGF, a pCOR plasmid-based angiogenic gene therapy for the treatment of intermittent claudication and critical limb ischemia. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2009; 10 (3): 259–268.
18. Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E., Diehm C., Visona A., Capogrossi M.C., Ferreira-Maldent N., Gallino A., Wyatt M.G., Wijesinghe L.D., Fusari M., Stephan D., Emmerich J., Pompilio G., Vermassen F., Pham E., Grek V., Coleman M., Meyer F. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008; 16 (5): 972–978.
19. Belch J., Hiatt W.R., Baumgartner I., Driver I.V., Nikol S., Norgren L., Van Belle E. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. TAMARIS Committees and Investigators. *Lancet.* 2011; 377 (9781): 1929–1937.
20. Kusumanto Y.H., Van Weel V., Mulder N.H., Smit A.J., Van den Dungen J.J., Hooymans J.M., Sluiter W.J., Tio R.A., Quax P.H., Gans R.O., Dullaart R.P., Hospers G.A. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum. Gene Ther.* 2006; 17: 683–691.
21. Testa U., Pannitteri G. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J. Cardiovasc. Med.* 2008; 9 (12): 1190–1221.
22. Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Anderson R.D., Saucedo J.F., Tenaglia A.N., Hermiller J.B., Hillegass W.B., Rocha-Singh K., Moon T.E., Whitehouse M.J., Annex B.H. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet.* 2002; 359 (9323): 2053–2058.
23. Comerota A.J., Throm R.C., Miller K.A., Henry T., Chronos N., Laird J., Sequeira R., Kent C.K., Bacchetta M., Goldman C., Salenius J.P., Schmieder F.A., Pilsudski R. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J. Vasc. Surg.* 2002; 35: 930–936.
24. Leppanen P., Kholova I. Short and long-term effects of hVEGF-A (165) in Creactivated transgenic mice. *PLoS One.* 2006; 1: 13.
25. Tang, D.C., DeVit, M., Johnston S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992; 356: 152–154.
26. Armstrong L., Lako M., Buckley N., Lappin T.R., Murphy M.J., Nolte J.A., Pittenger M., Stojkovic M. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells.* 2012; 30 (1): 2–9.
27. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 696–709.
28. Biologicheskie rezervy kletok kostnogo mozga i korektsiya organnykh disfunktsii. Pod red. V.I. Shumakova, N.A. Onishchenko. *M.: Lavr.* 2009. 308 s.
29. Toma C., Wagner W.R., Bowry S., Schwartz A., Villanueva F. Fate of cultured-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ. Res.* 2009; 104 (3): 398–402.
30. Furlani D., Ugurlucan M., Ong L., Bieback K., Pittermann E., Westien I., Wang W., Yerebakan C., Li W., Gaebel R., Li R.K., Vollmar B., Steinhoff G., Ma N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (3): 370–376.
31. Konoplyannikov A.G., Petriev V.M., Konoplyannikova O.A. Effects of (60)Co whole-body gamma-irradiation in different doses on the distribution of (188)Re-labeled autologous mesenchymal stem cells in wistar rats after intravenous (systemic) transplantation during different periods after exposure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (4): 520–525.
32. Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J., Zhang P., Rogers P., Price E.T., Yeung A.C., Johnstone B.H., Yock P.G., March K.L. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation.* 2005; 112 (Suppl.9): 1150–1156.
33. Li S.H., Lai T.Y. Tracking cardiac engraftment and distribution of implanted bone marrow cells: Comparing intra-aortic, intravenous and intramyocardial delivery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 137 (5): 1225–1233.
34. Pal'tsev M.A. Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii. Pod red. M.A. Pal'tseva. *M.: Meditsina.* 2009. 728 s.
35. Buschmann I., Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J. Pathol.* 2000; 190: 338–342.
36. Voskuil M., Van Royen N., Hoefler I., Buschmann I., Schaper W., Piek J.J. Angiogenesis and arteriogenesis; the long road from concept to clinical application. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2001; 145: 670–675.
37. Zhou B., Poon M.C., Pu W.T., Han Z.C. Therapeutic neovascularization for peripheral arterial diseases: advances and perspectives. *Histol. Histopathol.* 2007; 22: 677–686.
38. Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka-Moll W.M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner J.M., Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 3422–3427.

39. Hirota K., Semenza G.L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006; 59: 15–26.
40. Harraz M., Jiao C., Hanlon H.D., Hartley R.S., Schatteman G.C. CD34⁺ blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 2001; 19: 304–312.
41. Fernandez P.B., Lucibello F.C., Gehling U.M., Lindemann K., Weidner N., Zuzarte M.L., Adamkiewicz J., Elsasser H.P., Muller R., Havemann K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation.* 2000; 65: 287–300.
42. Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003; 107: 1164–1169.
43. Urbich C., Heeschen C., Aicher A., Dernbach E., Zeiher A.M., Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003; 108: 2511–2516.
44. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., Van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275: 964–967.
45. Rookmaaker M.B., Verhaar M.C., Loomans C.J., Verloop R., Peters E., Westerweel P.E., Murohara T., Staal F.J., Van Zonneveld A.J., Koolwijk P., Rabelink T.J., Van Hinsbergh V.W. CD34⁺ cells home, proliferate, and participate in capillary formation, and in combination with. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1843–1850.
46. Ziegelhoeffer T., Fernandez B., Kostin S., Heil M., Voswinckel R., Helisch A., Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ. Res.* 2004; 94: 230–238.
47. Heil M., Ziegelhoeffer T., Mees B. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ. Res.* 2004; 94 (5): 573–574.
48. Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 1999; 5: 434–438.
49. Crosby J.R., Kaminski W.E., Schatteman G. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ. Res.* 2000; 87: 728–730.
50. Capla J.M., Ceradini D.J., Tepper O.M., Callaghan M.J., Bhatt K.A., Galiano R.D., Levine J.P., Gurtner G.C. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 117: 836–844.
51. Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998; 92: 362–367.
52. Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Sasaki K., Duan J., Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation.* 2001; 103: 897–903.
53. Kamihata H., Matsubara H., Nishiue T., Fujiyama S., Tsutsumi Y., Ozono R., Masaki H., Mori Y., Iba O., Tateishi E., Kosaki A., Shintani S., Murohara T., Imaizumi T., Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001; 104: 1046–1052.
54. Tidball J.G., Villalta S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010; 298 (5): 1173–1187.
55. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 23–35.
56. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677–686.
57. De Haro, Acin F., Medina F.J., Lopez-Quintana A., March J.R. Relationship between the plasma concentration of C-reactive protein and severity of peripheral arterial disease. *Clin. Med. Cardiol.* 2009; 3: 1–7.
58. Tolar J., Le Blanc K., Keating A., Blazar B.R. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 2010; 28: 1446–1455.
59. Williams J.T., Southerland S.S., Souza J., Calcutt A.F., Cartledge R.G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* 1999; 65: 22–26.
60. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Engl.* 2001; 7: 211–228.
61. Gronthos S., Arthur A., Bartold P.M., Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *J. Methods Mol. Biol.* 2011; 698: 107–121.
62. Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C, Corre J., Bousquet C., Taureau C., Cousin B., Abbal M., Laharrague P., Penicaud L., Casteilla L., Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cell: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Brit. J. Haematol.* 2005; 129 (1): 118–129.
63. Singer N., Caplan A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Ann. Rev. Pathol.* 2011; 6: 457–478.
64. Salem H. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010; 28: 585–596.
65. Bunnell B., Betancourt A., Sullivan D. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010; 1: 34.
66. Prockop D. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells [MSCs]: controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.* 2009; 17: 939–946.
67. Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C.A., Busse R., Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004; 110: 349–355.
68. Miyahara Y., Nagaya N. Monolayered mesenchymal stem cells repair system scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 2006; 12 (4): 459–465.
69. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Conside R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109: 1292–1298.
70. Yoshida M., Horimoto H., Mieno S. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. *Eur. Surg. Res.* 2003; 35: 86–91.
71. Rosova I. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 2173–2182.
72. 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; 13: 4279–4295.
73. Lin G., Garcia M., Ning H., Banie L., Guo Y.L., Lue T.F., Lin C.S. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008; 17 (6): 1053–1063.
74. Lee R.H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H.S., Suh K., Bae Y.C., Jung J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol. Biochem.* 2004; 14: 311–324.
75. Gimbl J.M., Katz A.J., Bunnell B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 2007; 100: 1249–1260.

76. Peroni D., Scambi I., Pasini A., Lisi V., Bifari F., Krampera M., Rigotti G., Sbarbati A., Galie M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp. Cell Res.* 2008; 314: 603–615.
77. Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R.C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 332: 370–379.
78. Planat-Benard V., Menard C., Andre M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J.M., Penicaud L., Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stromal cell. *Circ. Res.* 2004; 94: 223–229.
79. Moon M.H., Kim S.Y., Kim Y.J., Kim S.J., Lee J.B., Bae Y.C., Sung S.M., Jung J.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol. Biochem.* 2006; 17: 279–290.
80. Nakagami H., Maeda K., Morishita R., Iguchi S., Nishikawa T., Takami Y., Kikuchi Y., Saito Y., Tamai K., Ogihara T., Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 2542–2547.
81. Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A., Straino S., Zacheo A., Germani A., Crea F., Capogrossi M.C. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J. Cell Sci.* 2009; 119: 2945–2952.
82. Chu K., Kim M., Chae S.H., Jeong S.W., Kang K.S., Jung K.H., Kim J., Kim Y.J., Kang L., Kim S.U., Yoon B.W. Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Res.* 2004; 50 (4): 459–465.
83. Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1527–1536.
84. Finney M.R., Greco N.J., Haynesworth S.E., Martin J.M., Hedrick D.P., Swan J.Z., Winter D.G., Kadereit S., Joseph M.E., Fu P., Pompili V.J., Laughlin M.J. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2006; 12: 585–593.
85. Waterman R.S., Betancourt A.M. et al. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued investigation. *J. Stem Cell Res. & Ther.* 2011; S2:1–9.
86. Ogawa R., Oki K., Hyakusoku H. Vascular tissue engineering and vascularized 3D tissue regeneration. *Regenerative Medicine.* 2007; 2 (5): 831–837.
87. Dimmler S., Zeiher A.M. Vascular repair by circulation endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* 2005; 82: 671–677.
88. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T., Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002; 360 (9331): 427–35.
89. Sugihara S., Yamamoto Y., Matsubara K. et al. Autoperipheral blood mononuclear cell transplantation improved giant ulcers due to chronic arteriosclerosis obliterans. *Heart Vessels.* 2006; 21: 258–262.
90. Matoba S., Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery diseases by autologous bone marrow cell transplantation. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15 (24): 2769–2777.
91. Di Stefano R., Limbruno U., Barone D. Therapeutic angiogenesis of critical lower limb ischemia. Review of the literature and prospects of research on stem cells. *Italian Heart J. Suppl.* 2004; 5 (1): 1–13.
92. Fadini G.P., Agostini C., Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis.* 2010; 209 (1): 10–17.
93. Arai M., Misao Y., Nagai H., Kawasaki M., Nagashima K., Suzuki K., Tsuchiya K., Otsuka S., Uno Y., Takemura G., Nishigaki K., Minatoguchi S., Fujiwara H. Granulocyte colony-stimulating factor: a noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ. J.* 2006; 70: 1093–1098.
94. Bartsch T., Brehm M., Zeus T., Strauer B.E. Autologous mononuclear stem cell transplantation in patients with peripheral occlusive arterial disease. *J. Cardiovasc. Nurs.* 2006; 21: 430–432.
95. Walter D.H., Krankenberg H., Balzer J.O., Kalka C., Baumgartner I., Schluter M., Tonn T., Seeger F., Dimmeler S., Lindhoff-Last E., Zeiher A.M. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2011; 4 (1): 26–37.
96. Van Tongeren R.B., Hamming J.F., Fibbe W.E., Van Weel V., Frerichs S.J., Stiggelbout A.M., Van Bockel J.H., Lindeman J.H. Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino).* 2008; 49: 51–58.
97. Fadini G.P., Agostini C., Sartore S., Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007; 194: 46–54.
98. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J. Vasc. Surg.* 2011; 53 (2): 445–453.
99. Kudo F.A., Nishibe T., Nishibe M., Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34⁺) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int. Angiol.* 2003; 22: 344–348.
100. Canizo M.C., Lozano F., Gonzalez-Porras J.R., Barros M., Lopez-Holgado N., Briz E., Sanchez-Guijo F.M. Peripheral endothelial progenitor cells (CD133⁺) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia (One year follow-up). *Cytotherapy.* 2007; 9: 99–102.
101. Van Royen N., Schirmer S.H., Atasever B., Behrens C.Y., Ubbink D., Buschmann E.E., Voskuil M., Bot P., Hoefler I., Schlingemans R.O., Biemond B.J., Tijssen J.G., Bode C., Schaper W., Oskam J., Legemate D.A., Piek J.J., Buschmann I. START Trial: a pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of granulocytemacrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation.* 2005; 112: 1040–1046.
102. Powell R.J., Comerota A.J., Berceli S.A., Guzman R., Henry T.D., Tzeng E., Velazquez O., Marston W.A., Bartel R.L., Longcore A., Stern T., Watling S. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 2011; 54 (4): 1032–1041.
103. Arai M., Misao Y., Nagai H., Sogawa Y., Suwabe T., Higa Y., Nakanishi S., Sawa N., Katori H., Takemoto F., Fujimoto Y., Ohta E., Ohara K., Takaichi K. Quality of life improvement and longterm effects of peripheral blood mononuclear cell transplantation for severe arteriosclerosis obliterans in diabetic patients on dialysis. *Circ. J.* 2007; 71: 1193–1198.
104. Hirsch A.T. Critical limb ischemia and stem cell research: anchoring hope with Informed adverse event reporting. *Circulation.* 2006; 114: 2581–2583.
105. Miyamoto K., Nishigami K., Nagaya N., Akutsu K., Chiku M., Kamei M., Soma T., Miyata S., Higashi M., Tanaka R., Nakatani T., Nonogi H., Takeshita S. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation.* 2006; 114: 2679–2684.
106. Fadini G.P., Sartore S., Albiero M., Baesso I., Murphy E., Menegolo M., Grego F., Vigili de Kreutzenberg S., Tiengo A., Agostini C.,

- Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2140–2146.
107. Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* 2001; 89: 1–7.
108. Heeschen C., Lehmann R., Honold J., Assmus B., Aicher A., Walter D.H., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004; 109: 1615–1622.
109. Chen F., Tan Z., Dong C. Y., Li X., Xie Y., Wu Y., Chen X., Guo S. Combination of VEGF(165)/Angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 568: 222–230.
110. Bivalacqua T.J., Deng W., Kendirci M., Usta M.F., Robinson C., Taylor B.K., Murthy S.N., Champion H.C., Hellstrom W.J., Kadowitz P.J. Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene-modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2007; 292: 1278–1290.
111. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Ishii K., Kobune M., Hirai S., Uchida H., Sasaki K., Ito Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Date I., Hamada H. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.* 2005; 11: 96–104.
112. Sasaki K., Heeschen C., Aicher A., Ziebart T., Honold J., Urbich C., Rossig L., Koehl U., Koyanagi M., Mohamed A., Brandes R.P., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 14537–14541.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Клейменова Елена Борисовна, доктор медицинских наук, заведующая Центром доказательной медицинской практики и инновационных технологий стационара Медицинского центра Банка России

Адрес: 117593, Москва, Севастопольский проспект, д. 66; **тел.:** (495) 676-80-11; **e-mail:** e.kleymenova@gmail.com

Кунгурцев Вадим Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, сердечно-сосудистый хирург Медицинского центра Банка России

Адрес: 117593, Москва, Севастопольский проспект, д. 66; **тел.:** (495) 676-83-16; **e-mail:** kung-vadim@yandex.ru

Лебедев Сергей Васильевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, врач Центра доказательной медицинской практики и инновационных технологий стационара Медицинского центра Банка России

Адрес: 117593, Москва, Севастопольский проспект, д. 66; **тел.:** (495) 676-80-50; **e-mail:** lebedsv@mail.ru

Лохонина Анастасия Вячеславовна, биолог Центра доказательной медицинской практики и инновационных технологий стационара Медицинского центра Банка России

Адрес: 117593, Москва, Севастопольский проспект, д. 66; **тел.:** (495) 676-83-74; **e-mail:** anastasia.cell@gmail.com

Карасев Александр Владимирович, заведующий отделением молекулярно-клеточных технологий Медицинского центра Банка России

Адрес: 117593, Москва, Севастопольский проспект, д. 66; **тел.:** (495) 676-80-50; **e-mail:** stemcell@inbox.ru