

Биологические свойства эндотелиальных клеток–предшественниц и их репаративный потенциал для клеточной терапии

А.А. Кескинов¹, И.И. Ерёмин², А.Н. Щербюк¹, А.А. Рагимов¹,
Е.Л. Насонов², С.Н. Быковская²

¹ Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

² Институт Ревматологии РАМН, Москва

Biologic properties of endothelial cells–progenitors and their reparative potential for cell therapy

A.A. Keskinov¹, I.I. Eryemin², A.N. Shcherbyuk¹, A.A. Ragimov¹, E.L. Nasonov², S.N. Bykovskaya²

¹ I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

² Institute of Rheumatology RAMS, Moscow

Высокая распространенность заболеваний, связанных с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей, их прогрессирующее течение, часто приводящее к инвалидизации, обуславливает потребность в дальнейшем совершенствовании не только хирургической помощи, но и консервативной и малоинвазивной терапии пациентов с данной патологией. Среди консервативных и малоинвазивных методов особое место занимает терапия стволовыми клетками-предшественницами эндотелия как многообещающий метод для лечения пациентов, которым оперативное лечение не может быть предложено в силу характера поражения сосудистых бассейнов либо соматического статуса. В статье рассмотрены биологические свойства эндотелиальных клеток-предшественниц, патофизиологические основы их применения для терапии поражения эндотелия, приведен опыт клинических исследований.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки-предшественницы, перемежающаяся хромота, критическая ишемия нижних конечностей, трансплантация стволовых клеток, CD34⁺ стволовые клетки.

Эндотелий – важнейший компонент сосудистой стенки, состоящий примерно из 10^{13} эндотелиальных клеток и занимающий около 7 м^2 по площади в организме взрослого человека [1]. Эндотелий сосудов представляет собой динамическую структуру на границе между кровью и окружающими тканями и выполняет множество функций: регулирует питание, трафик компонентов крови, продуцирует ряд важнейших регуляторных факторов, таких как простагландины и оксид азота [NO], препятствует адгезии тромбоцитов и лейкоцитов, участвует во многих физиологических процессах, протекающих в организме, в том числе в гемостазе, воспалении и ангиогенезе [1, 2]. Повреждение эндотелия приводит к потере сосудистой стенкой антитромботических свойств, быстрому увеличению числа циркулирующих поврежденных эндотелиальных клеток, что может являться первоначальным критическим этапом, инициирующим развитие атеросклеротической бляшки [3, 4].

Таким образом, вопросы изучения, характеристики и поиска подходов к регенерации поврежденного эндотелия имеют исключительную значимость для терапии широкого спектра заболеваний, таких как ишемия нижних конечностей, инфаркт миокарда, системная склеродермия и др.

Процесс образования новых кровеносных сосудов носит название неоангиогенеза. По традиционным

High incidence of atherosclerotic disorders of lower extremity blood vessels, their progressive course leading to incapacitation make further improvement both surgical and conservative and less invasive treatment modalities of patients with such pathology very important. Among conservative and less invasive methods the usage of stem endothelial cells-precursors is a promising therapy for management of those patients who cannot be treated surgically because of the character of vascular impairment or their somatic status.

Biological properties of endothelial cells-precursors, pathophysiologic principles of their usage to treat endothelial lesions are characterized and results of clinical studies are given within the article.

Key words: endothelial cells-progenitors, intermittent claudication, critical ischemia of lower extremities, stem cell transplantation, CD34⁺ stem cells.

представлениям считалось, что в постнатальный период ангиогенез идёт исключительно за счет пролиферации, миграции и трансформации полностью дифференцированных эндотелиальных клеток из стенки уже сформированных кровеносных сосудов [5, 6]. Однако зрелые эндотелиальные клетки – это терминально дифференцированные клетки с низким пролиферативным потенциалом, их способность замещать поврежденные эндотелиальные клетки и образовывать новые сосуды относительно ограничена. Следовательно, в процессах восстановления эндотелия и ангиогенеза должны принимать участие другие клетки. Накопленные за последнее десятилетие знания показывают, что в крови взрослых людей содержатся клетки костномозгового происхождения по своим свойствам схожие с эмбриональными ангиобластами [7–10]. Эти клетки обладают способностью к дифференцировке в зрелые эндотелиальные клетки. Они были названы эндотелиальными клетками-предшественницами (ЭКП), а процесс образования из них кровеносных сосудов – васкулогенезом. Получены экспериментальные доказательства того, что эндотелиальные клетки-предшественницы экспрессируют эндотелий-специфические поверхностные маркеры (VEGFR, CD144, CD146, CD31 и др), обладают функциональными свойствами эндотелиальных клеток, принимают участие в поддержании целостности эндотелиальной выстилки

Электронный адрес: SBykovk@mail.ru;

сосудов и сосудистого гомеостаза [2, 11, 12], а также постнатальной неоваскуляризации в условиях ишемии *in vivo* [7, 8, 13–17].

Помимо прямого включения этих клеток в стенку сосуда, ЭКП обеспечивают также неоваскуляризацию и регенерацию тканей посредством синтеза сосудистых ростовых факторов, усиливающих локальный ангиогенез и вызывающих их дополнительную мобилизацию из костного мозга [18]. Клетки-предшественницы участвуют как в микроваскулярном ангиогенезе, так и в восстановлении эндотелия крупных сосудов [19–21].

Клетки-предшественницы эндотелия могут быть как гемопозитического CD34⁺CD133⁺VEGFR⁺, так и мезенхимального происхождения. В терапевтических целях описано использование клеток обоих типов.

Гемопозитические эндотелиальные клетки-предшественницы CD34⁺CD133⁺VEGFR⁺ (ЭКП)

Эти клетки можно получить из фракции мононуклеарных клеток костного мозга. Впервые ЭКП были выделены Т. Asahara с соавт. в 1997 г. из мобилизованной крови путем магнитной селекции, либо клеточного сортирования по характерному поверхностному маркеру CD34⁺. Помимо CD34⁺ нативные ЭКП экспрессируют на своей поверхности CD133 и VEGFR (рецептор фактора роста эндотелия сосудов). Но даже в очищенной популяции CD34⁺ клеток здоровых доноров количество ЭКП (CD34⁺CD133⁺VEGFR⁺) составляет несколько сотых долей процента [8, 22]. Поэтому используется культивирование *in vitro* CD34⁺ клеток в условиях, способствующих их дифференцировке в ЭКП. После культивирования подавляющее большинство клеток дифференцируются в ЭКП: меняется их морфология (клетки становятся вытянутыми), появляется экспрессия специфических для эндотелия маркеров (CD31, VEGFR2, vWF, Tie-2, E-selectin, CD144, CD146, CD184) и клетки приобретают способность связывать липопротеины низкой плотности (DiI-Ac-LDL, UEA-1), что является специфическим свойством эндотелиальных клеток [7, 8].

Основные условия, необходимые для эндотелиальной дифференцировки CD34⁺ клеток, заключаются в обязательном наличии субстрата: фибронектина или коллагена [23], а также среды с набором ангиогенных ростовых факторов. Срок культивирования составляет от 10 до 30 сут.

Способность ЭКП (CD34⁺) участвовать в восстановлении поврежденного эндотелия сосудов, а также образовывать новые функционально активные капилляры доказана в многочисленных экспериментальных работах [7, 8, 13–17, 24]. Вместе с тем, получение достаточного для терапевтического использования количества CD34⁺ у взрослого человека — трудоемкая и дорогостоящая процедура. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется поиску клеток-предшественниц негемопозитического происхождения, способных дифференцироваться в эндотелий.

Мультипатентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)

С целью получения эндотелий-подобных (endothelial-like) клеток используются ММСК и общая фракция мононуклеарных клеток крови (МНК). Получение ММСК в необходимых для терапии количествах не представляет больших проблем. Кроме того, их довольно просто культивировать *in vitro* в течение достаточно длительного времени (более 20 пассажей), что позволяет увеличить их количество в 200–300 раз [25]. Срок культивирования

составляет от 10 до 30 сут. и зависит от количества клеток, которое необходимо получить.

В настоящее время становится все более очевидным, что нативные ММСК и предифференцированные в эндотелиальные клетки способны принимать участие в восстановлении миокарда, поврежденного в результате инфаркта, как за счет секреции проангиогенных цитокинов и антиапоптотических белков, так и за счет непосредственного замещения собой поврежденного эндотелия и мышечных клеток. В работе S.M. Nassiri с соавт. [26] сравнивается эффект трансплантации на восстановление миокарда после инфаркта недифференцированных ММСК и предифференцированных ММСК и их дифференцировка в клетки эндотелия. Инфаркт был смоделирован на кроликах путем перевязки передней левой коронарной артерии. Затем кроликам пересаживали дифференцированные и недифференцированные клетки. Контрольную группу составляли животные, которым вводили чистую культуральную среду. Через 28 сут. после трансплантации восстановление функции левого желудочка, усиление перфузии и уменьшение зоны инфаркта было обнаружено во всех группах, кроме контрольной. Статистически значимых отличий между группами, получившими дифференцированные или нативные ММСК, обнаружено не было.

Использование ММСК в терапевтических целях возможно сразу после экспансии. Но такой вариант может повлечь за собой осложнения. Поскольку ММСК — полипотентные клетки, в организме они могут дифференцироваться в различные ткани: хрящевую, костную или жировую. Чтобы избежать дифференцировки в нежелательных направлениях, после экспансии *in vitro* проводят предифференцировку ММСК в эндотелий-подобные клетки. Для этого в среду для экспансии добавляют ангиогенные ростовые факторы, включая VEGF, или полностью заменяют ее на специальную среду, содержащую набор факторов эндотелиальной дифференцировки. В большинстве случаев для культивирования достаточно 10–14 сут., после чего меняется морфология ММСК, клетки уплощаются, становятся более вытянутыми, начинают экспрессировать эндотелиальные (CD31, CD54, CD105, CD44, CD144, CD166, VEGFR) и гладкомышечные маркеры, такие как клеточный актин и десмин. Такая предифференцировка делает невозможной нежелательное развитие ММСК [25] и, следовательно, обеспечивает безопасность трансплантации эндотелий-подобных клеток больному.

Мононуклеарные клетки (МНК) костного мозга или мобилизованной крови

Трансплантация МНК — наиболее простой и доступный вариант клеточной терапии. Положительный эффект от такой терапии достигается при участии различных механизмов. Во-первых, МНК — это гетерогенная группа клеток, которые секретируют огромное количество цитокинов и ростовых факторов, что при локальном введении обеспечивает активацию и пролиферацию эндогенных стволовых клеток [18, 27]. Во-вторых, в составе МНК присутствуют в небольших количествах гемопозитические и мезенхимальные стволовые клетки (в большей степени в МНК костномозгового происхождения), которые при локальном введении способны дифференцироваться в клетки эндотелия под воздействием факторов микроокружения. Положительный эффект терапии МНК сохраняется в течение 9–18 мес. [28–30]. Наиболее вероятной причиной ограниченного срока позитивных изменений является недостаточное количество

стволовых клеток и клеток-предшественниц в составе МНК.

При культивировании МНК периферической крови можно выделить две популяции эндотелиальных клеток-предшественниц: ранние ЭКП и поздние (зрелые) ЭКП [1, 31, 32]. Обе субпопуляции происходят из мононуклеарных клеток и экспрессируют эндотелиальные маркеры, но отличаются по своей морфологии и динамике роста [32, 33]. Ранние ЭКП имеют веретеновидную форму и большинство из них происходит из моноцитов (CD14⁺) [1, 18, 33, 34]. Поздние ЭКП, называемые так из-за позднего (20–30 сут.) их появления в культуре, формируют характерный вид культуры — «булыжную мостовую» и происходят из фракции CD14⁺CD34⁺ [31, 33]. Обе эти популяции характеризуются выработкой VEGF, экспрессией VEGF-рецептора (VEGFR), секрецией цитокинов и формированием капиллярноподобных структур *in vitro* и *in vivo* [33].

Результаты пилотных испытаний безопасности и эффективности применения ЭКП для лечения заболеваний периферических сосудов

Основным симптомом поражения периферических артерий является перемежающаяся хромота (ПХ). Преvalентность ПХ составляет 3–10% в популяции, возрастая до 15–20% среди пациентов старше 70 лет. Факторами риска данного заболевания являются курение, диабет и артериальная гипертензия. У 40–60% пациентов с заболеваниями периферических артерий имеются сочетанная цереброваскулярная патология, что увеличивает риск осложнений при оперативных вмешательствах.

Данные, полученные из крупных международных исследований, показывают, что в год на 1 млн людей производится 120–500 ампутаций конечностей. Около 1–3,3% от общего числа пациентов с ПХ нуждаются в таком виде лечения в течение 5 лет с момента постановки диагноза. В среднем у 25% пациентов заболевание носит прогрессивно-злокачественный характер — т.е. имеется высокий риск развития критической ишемии нижних конечностей.

Следует отметить, что способы общепринятой консервативной терапии не затрагивают основное патогенетическое звено заболевания — поражение эндотелия. Поэтому в последнее время все большее внимание уделяется методам, направленным на восстановление эндотелия, возобновление его функций и развитие коллатерального кровообращения. Таким методом является трансплантация аутогенных стволовых клеток, содержащих клетки-предшественницы эндотелия.

В целях терапевтического ангиогенеза используются как гемопоэтические, так и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и мобилизованной крови. Также рядом авторов сообщается об успешном применении фракции мононуклеарных клеток [29, 35–37].

Е. Tateshi-Yuuyama с соавт. [35] было проведено пилотное исследование эффективности и безопасности применения аутогенных костномозговых мононуклеаров на 25 пациентах с ишемией одной конечности и 22 пациентах с ишемией обеих конечностей. По прошествии 4-х нед. у всех пациентов, которым были трансплантированы МНК, значительно повысился лодыжечно-плечевой индекс, чрескожное давление кислорода, уменьшились боли покоя и увеличилась дистанция безболевой ходьбы.

С помощью трансплантации стволовых клеток мононуклеарной фракции периферической крови возможно успешное лечение пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей [38]. По

данным обследования 64 пациентов (34 из которых имели синдром диабетической стопы) в 87,1% случаев наблюдалось исчезновение болей в покое, у 40% пациентов отмечалось улучшение заживления язв стопы, лодыжечно-плечевой показатель увеличивался у 34,3% больных, чрескожное напряжение кислорода повысилось в 42,3% случаев.

Даже при наличии у больного тяжелой сочетанной патологии (почечной недостаточности, сахарного диабета) возможно успешное лечение серьезных атеросклеротических поражений периферических артерий [39]. После обследования 92 больных исследователи пришли к выводу о высокой эффективности применения аутогенных стволовых клеток мононуклеарной фракции периферической крови как средства лечения критической ишемии и стимуляции неоангиогенеза при III и более ранних стадиях заболевания по Фонтейн — Покровскому, отметив, однако, что в IV стадии эффективность метода снижалась.

Японские ученые [40] провели трансплантацию мононуклеарных клеток периферической крови дважды с разницей в 1 мес. 29 пациентам с облитерирующим атеросклерозом и облитерирующим тромбангиомом. Восемидесяти процентам больных была рекомендована ампутация из-за длительно незаживающих язв, рефрактерных к проводимой терапии. У 50% пациентов имелась хроническая почечная недостаточность, в связи с чем им проводился гемодиализ 3 раза в нед. Результаты проведенного через год контрольного обследования выявили увеличение и сохранение на новом «позитивном» уровне дистанции безболевой ходьбы, практически полное исчезновение ишемических болей покоя у всех пациентов, улучшение заживления ишемических язв у 16 из 24 пациентов, увеличение лодыжечно-плечевого показателя в 31% случаев. Только трем пациентам (11,1%) пришлось произвести ампутацию.

Заживление трофических язв отмечено после аутологичной трансплантации МНК у 7 больных с критической ишемией нижних конечностей [29]. Для трансплантации были использованы МНК костного мозга, которые вводились внутримышечно в ишемизированные конечности. Оценка эффективности терапии проводилась с использованием субъективного индекса боли, пальце-плечевого индекса давления и заживления трофических язв по прошествии 6 мес. после терапии. Среднее количество введенных МНК составило $3,7 \times 10^9$ клеток. Осложнений отмечено не было. Через 6 мес. после трансплантации у всех больных значительно увеличился пальце-плечевой индекс, снизился болевой индекс и частично зажили язвы.

По похожей схеме было проведено исследование S. Durdu с соавт. в 2006 г. [36]. В исследование были включены 28 пациентов с облитерирующим тромбангиомом, страдающих критической ишемией нижних конечностей. У всех пациентов отмечались боли покоя и незаживающие ишемические язвы конечностей. После аутогенной трансплантации МНК костного мозга, в течение $16,6 \pm 7,8$ мес. только одному больному потребовалась ампутация пальца ноги. У 8 пациентов по прошествии 3 мес. и 14 пациентов по прошествии 6 мес. наблюдалось достоверное повышение лодыжечно-плечевого индекса. Через 6 мес. после трансплантации у всех больных объективно уменьшились болевые ощущения, увеличилась дистанция безболевой ходьбы и повысилось качество жизни. Заживление трофических язв конечностей было отмечено в 83%, а у 78,5% больных наблюдалось развитие коллатеральных сосудов.

Авторы исследования сделали заключение об эффективности и безопасности применения аутогенных МНК костного мозга в целях терапевтического ангиогенеза.

Вопросу о различии в эффективности введения стволовых клеток мононуклеарной фракции периферической крови и стволовых клеток, полученных из костного мозга, посвящена работа Р.Р. Huang с соавт. [41]. В данном исследовании было задействовано 150 пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Равным по количеству группам больных вводили аутогенные стволовые клетки, полученные одним из упомянутых способов. При детальной оценке через 12 нед. после имплантации было выявлено, что в группе больных, где проводилась трансплантация аутогенных стволовых клеток костного мозга, отмечался более выраженный рост таких параметров, как лодыжечно-плечевой показатель, температура кожи, уменьшение болей в покое, однако при сравнении показателей чрескожного напряжения кислорода, скорости заживления язв, дистанции безболевого ходьбы и частоты ампутаций, существенного различия между двумя группами не наблюдалось. Это позволило авторам сделать вывод о целесообразности применения трансплантации аутогенных стволовых клеток, полученных из мононуклеарной фракции периферической крови как клинически более практичного метода.

В отдельных случаях улучшения клинического состояния тяжелых больных достичь не удается [37]. При сравнении результатов применения аутогенных МНК при облитерирующем тромбангите и облитерирующем атеросклерозе по прошествии 4 нед. после трансплантации положительные изменения в клинической картине (ослабление болей, заживление язв) были отмечены только у больных с облитерирующим тромбангитом, тогда как у больных, находящихся длительное время на гемодиализе, никаких изменений состояния отмечено не было. Наличие в анамнезе процедур гемодиализа, исходно тяжелое состояние таких больных вместе с небольшим ($4-70 \times 10^6$) количеством вводимых клеток явились основой для несостоятельности клеточной терапии у больных с облитерирующим атеросклерозом, находящихся на хроническом гемодиализе.

Исследования ряда авторов [33, 42] показывают, что проангиогенный эффект, получаемый от введения мононуклеарных и $CD34^+$ клеток-предшественниц эндотелия, обусловлен не их дифференцировкой в зрелые эндотелиоциты, а способностью модулировать состояние уже существующих сосудов. ЭКП и МНК активируют синтез NO по зависимому от эндотелиальной-NO-синтазы пути, вызывая вазодилатацию и диссоциацию комплекса эндотелий сосуда-кадгерин/ β -катенин. В локусе ишемии данный процесс существенно увеличивает проницаемость стенки сосуда и приводит к насыщению ишемизированных тканей циркулирующими в крови факторами роста и восстановлению активности неполноценной (у данной категории пациентов) системы обратного регулирования

ангиогенеза. В составе МНК присутствуют стволовые клетки из костного мозга (гемопозитивские и мезенхимальные), которые могут дифференцироваться в различные ткани, но их количество ничтожно мало (0,01–1%).

Непосредственное введение истинных ЭКП и/или фракции гемопозитивских стволовых клеток $CD34^+$ (обогащенной ЭКП), является наиболее безопасным и терапевтически наиболее эффективным, несмотря на трудоемкость и высокую стоимость процедуры выделения и/или культивирования $CD34^+$.

Впервые трансплантация $CD34^+$ клеток при критической ишемии нижних конечностей была успешно проведена F.A. Kudo [43]. В группу исследования были включены двое больных, не поддающихся традиционным методам лечения. Суспензию $CD34^+$ клеток получали из мобилизованной крови и вводили в ишемизированное бедро и икроножную мышцу в 50 точках. Концентрация $CD34^+$ клеток составляла 1×10^5 на мл и $1,6 \times 10^5$ на мл соответственно. Никаких осложнений после трансплантации отмечено не было. По прошествии двух недель было отмечено небольшое повышение чрескожного давления ангиографии. Этот метод был использован и в исследовании, проведенном в 2005 г. немецкими учеными из Лейпцигского университета [44]. Семь пациентов с критической ишемией, обусловленной окклюзивным поражением периферических артерий подверглись внутриартериальным трансфузиям аутогенных циркулирующих клеток-предшественниц, взятых из периферической крови после стимуляции гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Согласно результатам исследования, функциональные показатели динамически улучшились. В частности, дистанция безболевого ходьбы увеличилась с 6 ± 13 метров до 195 ± 196 метров. У одного пациента в начале исследования имелся некроз стопы, в связи с чем ему была произведена ампутация на 3-й нед. лечения, однако отмечено успешное заживление тканей. У остальных 6 пациентов отмечено значительное улучшение состояния тканей и явный регресс трофических изменений.

В настоящее время авторами (на базе Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова) проводится пилотное исследование по лечению облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей путем имплантации аутологичных $CD34^+$ клеток мононуклеарной фракции мобилизованной крови.

Использование $CD34^+$ и ММСК является новым перспективным направлением в клинической практике, уже принесшим определенные обнадеживающие результаты. Безусловно, необходимо дальнейшее проведение крупномасштабных рандомизированных исследований для структурирования показаний и выявления противопоказаний к данному методу лечения, который со временем способен занять достойное место в арсенале средств современного врача.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A. et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 71–7.
2. Hristov M., Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell Mol. Med.* 2004; 8: 498–508.
3. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in Circulation. 2004; 109(23) Suppl 1: III 27–32.
4. Dignat-George F., Sampol J. Circulation endothelial in vascular disorders: new insights into an old concept. *Euv. J. Haematol.* 2000; 65: 215–20.
5. Folkman J., Shing Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; 313: 355–64.

6. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9: 653–60.

7. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–7.
8. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human $CD34^+$ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 3106–12.

9. Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U. et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106–12.

10. Quirici N., Soligo D., Caneva L. et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow $CD133^+$ cells. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 186–94.

11. Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 2002; 8: 403–9.
12. Lagaaij E.L., Cramer-Knijenburg G.F., van Kemenade F.J. et al. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 2001; 357: 33–7.
13. Szmítko P.E., Fedak P.W., Weisel R.D. et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circul.* 2003; 107: 3093–100.
14. Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circul.* 2001; 103: 634–7.
15. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J. et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat. Med.* 2001; 9: 1035–40.
16. Urbich C., Aicher A., Heeschen C. et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005; 39: 733–42.
17. Young P.P., Vaughan D.E., Hatzopoulos A.K. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007; 49: 421–9.
18. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* 2004; 95: 343–53.
19. Takahashi T., Kaka C., Masuda H. et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 1999; 5: 434–8.
20. Murohara T., Asahara T., Silver M. et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2567–78.
21. Suzuki T., Nishida M., Futami S. et al. Neointimalization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim. *Cardiovasc. Res.* 2003; 58: 487–92.
22. Powell T.M., Paul J.D., Hill J.M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 296–301.
23. Wijelath E.S., Rahman S., Murray J. et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* 2004; 39: 655–60.
24. Schdchinger V., Assmus B., Britten M.B. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44: 1690–9.
25. Liu J.W., Dunoyer-Geindre S., Serre-Beinier V. et al. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 826–34.
26. Nassiri S.M., Khaki Z., Soleimani M. et al. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction. *J. Biomed. Sci.* 2007; 14: 745–55.
27. Rafii S., Avezilla S., Shmelkov S. et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003; 996: 49–60.
28. Meyer G.P., Wollert K.C., Lotz J. et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST [Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration] trial. *Circul.* 2006; 113: 1287–94.
29. Koshikawa M., Shimodaira S., Yoshioka T. et al. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr. Med. Res. Opin.* 2006; 22: 793–8.
30. Obradović S., Rusović S., Balint B. et al. Autologous bone marrow-derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction. *Vojnosanit. Pregl.* 2004; 61: 519–29.
31. Gulati R., Jevremovic D., Peterson T.E. et al. Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury. *Circul.* 2003; 108: 1520–6.
32. Hur J., Yoon C.H., Kim H.S. et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 288–93.
33. Yoon C.H., Hur J., Park K.W. et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circul.* 2005; 112: 1618–27.
34. Rehman J., Li J., Orschell C.M. et al. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circul.* 2003; 107: 1164–9.
35. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation [TACT] Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427–35.
36. Durdu S., Akar A.R., Arat M. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II–III thromboangiitis obliterans. *J. Vasc. Surg.* 2006; 44: 732–9.
37. Kajiguchi M., Kondo T., Izawa H. et al. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ. J.* 2007; 71: 196–201.
38. Yang X.F., Wu Y.X., Wang H.M. et al. Autologous peripheral blood stem cells transplantation in treatment of 62 cases of lower extremity ischemic disorder. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2005; 44: 95–8.
39. Kawamura A., Horie T., Tsuda I. et al. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J. Artif. Organs* 2006; 9: 226–33.
40. Tateno K., Minamino T., Toko H. et al. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ. Res.* 2006; 98: 1194–202.
41. Huang P.P., Yang X.F., Li S.Z. et al. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb. Haemost.* 2007; 98: 1335–42.
42. Dong Y.Y., Wu M., Yim A.P. et al. Effect of hypoxia-reoxygenation on endothelial function in porcine cardiac microvessels. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 81: 1708–14.
43. Kudo F.A., Nishibe T., Nishibe M. et al. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells CD34⁺ for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int. Angiol.* 2003; 22: 344–8.
44. Lenk K. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *European. Heart J.* 2005; 26: 1903–9.

Поступила 26.10.2008