

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА

© 2012 г. О.В. Повещенко, А.Ф. Повещенко, В.И. Коненков

ФГБУ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной л
имфологии СО РАМН, Новосибирск

В обзоре обсуждается, что одним из важнейших направлений развития клеточной терапии является терапевтический ангиогенез. Прогресс в этой области связан с открытием эндотелиальных клеток-предшественников (эндотелиальных прогениторных клеток-ЭПК), которые играют важную роль в неоваскуляризации тканей взрослого организма. Список клеток-кандидатов для регенерации сердечно-сосудистой системы постоянно пополняется. Тем не менее, данные доклинических и клинических исследований по оценке возможности применения клеток для лечения, выделенных из различных источников, являются противоречивыми. К актуальным вопросам в области научных исследований клеточной терапии следует отнести отсутствие единой номенклатуры, а также недостаточная функциональная характеристика предполагаемых стволовых / прогениторных клеток. С учетом спорных результатов начальных клинических исследований, необходимы более точные знания биологических свойств используемых для трансплантации клеток.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, неоваскуляризация, клеточная терапия

ВВЕДЕНИЕ

Развитие нового научного направления – регенеративной медицины напрямую связано с широким внедрением в клиническую практику методов клеточной терапии для лечения различных дегенеративных, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваний. Учитывая роль стволовых/прогениторных клеток в развитии, поддержании и восстановлении стареющих или пораженных тканей взрослого организма, они представляют собой альтернативную регенеративную стратегию лечения сердечно-сосудистой патологии. В настоящее время для значительного числа пациентов не в полной мере эффективными оказываются традиционные методы повторной васкуляризации, такие, как ангиопластика или коронарное шунтирование [96]. Ограниченной эффективностью обладает один из подходов улучшения ревазуляризации органов, основанный на применении проангиогенных факторов роста [28]. Новые методы клеточной терапии в кардиоваскулярной медицине имеют высокую степень востребованности.

Более десяти лет назад Асахара и соавторы описали ЭПК, которые способны мобилизовываться из костного мозга и способствовать неоваскуляризации в местах ишемии [2]. С этим открытием связывают развитие нового направ-

ления клеточной терапии – терапевтического ангиогенеза. Ранние преclinical исследования в различных моделях на мелких и крупных животных продемонстрировали терапевтический потенциал клеток костного мозга (ККМ). ККМ способствуют регенерации сосудов при инфаркте миокарда, ишемии сосудов нижних конечностей [59, 83, 84]. В качестве клеток-кандидатов для клеточной терапии рассматриваются и изучаются также эмбриональные стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), стволовые клетки сердца [57, 75]. Указанные клетки потенциально способны регенерировать поврежденный миокард как путем дифференцировки в кардиомиоциты, так и способствуя неоваскуляризации. Пилотные клинические исследования с применением ККМ, начатые в 1999 г. [35, 92], показали безопасность и эффективность проводимой терапии, связанной с улучшением кровоснабжения и функционального состояния левого желудочка [3, 31, 55, 59, 79, 83, 101, 108]. Однако, дальнейшие масштабные клинические исследования, оценивающие эффективность трансплантируемых ККМ, выделенных различными способами, противоречат предыдущим исследованиям, демонстрируя незначительное улучшение функционального состояния миокарда [91], а некоторые из них отсутствие положительного результата [44, 60]. Эти противоречивые

клинические данные повторно вызвали интерес к нерешенным вопросам в отношении биологических свойств клеток-кандидатов для клинического применения и оптимизирования их для терапевтического ангиогенеза. До сих пор еще нет полного понимания клеточных механизмов процесса неоваскуляризации и выбора преимущественного типа клеточного материала, который наиболее подходит для терапевтического использования. Кроме того, нет еще единого мнения по определению ЭПК и методам их выделения [10, 26]. Поэтому данный обзор посвящен выяснению биологических особенностей, свойств, преимуществ различных типов клеток-кандидатов для терапевтического ангиогенеза.

ИЕРАРХИЯ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

Стволовые клетки характеризуются способностью к самообновлению и возможностью дифференцироваться в клетки различных функциональных типов. Тотипотентность направлена на способность клеток формировать клетки всех линий дифференцировки, включая внезародышевые ткани. У млекопитающих тотипотентные клетки содержатся в зиготе и бластомере [43]. Плюрипотентность характеризует клетки, которые имеют возможность дифференцироваться во все типы клеток, за исключением экстаэмбриональной ткани (плаценты). Плюрипотентные клетки, также как индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК), в последнее время исследуются на предмет их потенциального использования в регенерации сердечно-сосудистой системы [8, 54, 71, 85, 120, 125]. Мультипотентными являются те клетки, которые имеют возможность дифференцироваться в ограниченное число различных типов клеток. Они иногда определяются как “взрослые стволовые клетки” или “стволовые клетки взрослого организма”, являются более специализированными или коммитированными и могут дифференцироваться во все клеточные типы данной линии дифференцировки [43]. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), как говорит название этих клеток, изолируются из внутренней клеточной массы эмбриона, тогда как взрослые стволовые клетки выделяются из постнатальной ткани, как например костный мозг, жировая ткань или кровь пуповины. Самое главное различие между ЭСК и взрослыми стволовыми клетками – их потенциалы. ЭСК являются плюрипотентными клетками и способны к самообновлению, тогда как взрослые стволовые клетки имеют низкую самообновляющую

способность. Примером мультипотентной взрослой стволовой клетки является гемопоэтическая стволовая клетка, которая может дифференцироваться во все клетки крови [9]. Другими стволовыми клетками являются унипотентные стволовые клетки, которые имеют способность образовывать только один вид клеток. Например, унипотентными стволовыми клетками являются сперматогониальные клетки.

Существует некоторая путаница в отношении терминологии взрослых стволовых и прогениторных клеток, и, зачастую, они используются как взаимозаменяемые. Однако эти два типа клеток могут быть разграничены по их способности к самообновлению и потенциальным возможностям [93]. То есть, стволовые клетки обладают большими возможностями для самообновления и мультипотентны, а прогениторные клетки имеют ограниченные возможности для самостоятельного обновления и монопотентны.

В многочисленных исследованиях показано, что различные плюрипотентные стволовые клетки и мультипотентные стволовые/прогениторные клетки могут способствовать репарации сердечно-сосудистой системы посредством неоваскуляризации и /или восстановления мышцы сердца.

Ради краткости, в этом обзоре уделяется внимание тем стволовым/прогениторным клеткам, которые могут быть вовлечены в терапевтический неоангиогенез.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ НЕОАНГИОГЕНЕЗ. НЕОБХОДИМЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК

До недавнего времени считалось, что формирование новых сосудов в постнатальном периоде осуществляется за счет двух процессов: ангиогенеза – развития коллатеральных сосудов, и ангиогенеза – развития новых капилляров путем миграции и пролиферации пресуществующих дифференцированных эндотелиальных клеток [11]. Но открытие в 1997 году [2] ЭПК позволило высказать предположение, что тем же путем, каким гемопоэтические клетки восстанавливают свой пул из гемопоэтических стволовых клеток, могут быть подобные стволовые/прогениторные клетки, которые обеспечивают регенерацию эндотелия и участвуют в формировании сосудов [97]. Если такие клетки способны участвовать в терапевтическом ангиогенезе, то какие обязательные свойства клеток потребуются? Во-первых, они должны обладать способностью мобилизовываться из мест локализации (например, из ко-

стного мозга) в ответ на внешние стимулы, такие как тканевая ишемия, во-вторых, успешно достигают мест ишемии [100] и, в-третьих, принимают участие в образовании сосудов (III) [123]. Все эти три процесса рассматриваются ниже.

I. МОБИЛИЗАЦИЯ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

Ниша стволовых клеток костного мозга служит специальным местом, где стволовые/прогениторные клетки находятся и в недифференцированном, покоящемся состоянии, и в дифференцированной форме [90]. Вспомогательные клетки ниши взаимодействуют со стволовыми клетками и регулируют их самоподдержание и дифференцировку. Выход клеток из ниши и поступление в циркуляцию происходит под влиянием различных стимулов, основным из которых является гипоксия [16]. Клетки в местах ишемии секретируют ростовые факторы, хемокины, матриксные металлопротеиназы, которые способствуют рекрутированию стволовых клеток. Этот процесс находится под контролем фактора индукции гипоксии (HIF-1), что приводит к активированию проангиогенных пептидов, в том числе стромального фактора 1 (*SDF-1*) и его рецептора *CXCR4* [15]. Высокая конститутивная экспрессия *SDF-1* в гипоксических условиях костного мозга [56] позволяет поддерживать стволовые клетки в стабильном состоянии [77]. Другими важными HIF-регулируемыми факторами являются фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) и эритропоэтин (*Epo*), которые, как показано, также способствуют мобилизации ЭПК [36, 45, 68].

II. ХОМИНГ И МИГРАЦИЯ

Хоминг представляет собой процесс перемещения циркулирующих клеток к тканям-мишеням (например, в сердце после инфаркта миокарда) или в костный мозг. Рекрутирование стволовых клеток в очаг ишемии имеет сходство с воспалительным ответом. Прогениторные клетки взаимодействуют с поврежденным монослоем эндотелия подобно тому, как лейкоциты взаимодействуют с активированными эндотелиальными клетками. Молекулы адгезии, вовлеченные в движение и адгезию лейкоцитов, идентифицированы как ключевые регуляторы хоминга ЭПК. Начальная стадия хоминга прогениторных клеток в ишемическую ткань включает адгезию прогениторных клеток к эндотелиальным клеткам и трансмиграцию через

эндотелиальный монослой, обусловленную интегринами [43]. Селектины (*P-selectin*, *E-selectin*) обуславливают начальный процесс, интегрин (*b2-integrins*), молекулы адгезии (*ICAM-1*, *VCAM-1*) способствуют адгезии и миграции ЭПК к поврежденному эндотелиальному монослою, катепсины (*cathepsin L*) и металлопротеиназы (*MMP-2*) способствуют деградации матрикса и инвазии ЭПК [18]. ЭПК клетки начинают дифференцироваться в эндотелиальные клетки еще по мере движения к поврежденным тканям. Иницируют этот каскад цитокины (*VEGF* и *SDF-1*) и механическое давление, оказываемое током крови [113].

III. НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ

К обобщенному термину неоваскуляризация относится образование новых сосудов, как правило, в пролиферирующих, поврежденных или ишемических тканях. Таким образом, этот термин потенциально включает в себя все элементы классической схемы новообразования сосудов: ангиогенез, артериогенез и, возможно, васкулогенез в постнатальном периоде [53]. Как таковые, эндогенно мобилизованные стволовые клетки и их хоминг или искусственно введенные клетки в места ишемии, нуждаются в гипоксических, цитотоксических условиях микроокружения [93]. Точный вклад различных стволовых/прогениторных клеток в формирование сосудов все еще находится в процессе интенсивного исследования.

КЛЕТКИ-КАНДИДАТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СОСУДОВ

В настоящее время неуклонно пополняется список клеток разного происхождения и с различными свойствами, которые потенциально могут удовлетворять задачам терапевтической неоваскуляризации.

Взрослые стволовые/прогениторные клетки *Эндотелиальные прогениторные клетки*

До недавнего времени считалось, что во взрослом организме неоваскуляризация осуществляется за счет двух процессов: артериогенеза – развития коллатеральных сосудов, и ангиогенеза – развития новых капилляров путем миграции и пролиферации пресуществующих дифференцированных эндотелиальных клеток [11]. Но в 1997 г. Асахара [2] показал, что популяция гемопоэтических CD^{34+} (*CD*-кластер дифференцировки) клеток костномозгового происхождения, выделенных из

периферической крови человека, способна дифференцироваться *in vitro* в клетки с фенотипом зрелых эндотелиальных клеток и приводить к ревазуляризации *in vivo* в ответ на острую тканевую ишемию. Таким образом, во взрослом организме образование новых сосудов может происходить не только путем ангиогенеза, но и васкулогенеза. Вслед за Асахара в 1998 г. Ши [97] выделил из циркулирующих мононуклеарных клеток популяцию незрелых эндотелиальных клеток. Клетки-предшественники, участвующие в васкулогенезе у взрослых, были названы эндотелиальными прогениторными клетками. Для идентификации ЭПК из периферической крови Асахара использовал 2 маркера: антиген гемопоэтических предшественников – *CD34* и зрелых эндотелиальных клеток – рецептор фактора роста эндотелия сосудов (*VEGFR-2/kinase insert domain – containing receptor – KDR*). С этих классических фундаментальных работ началось исследование и определение роли циркулирующих ЭПК в регенерации поврежденного эндотелия и формировании новых кровеносных сосудов.

Тем не менее, вопросы точного определения ЭПК и их роль в неоваскуляризации продолжают широко обсуждаться. В настоящее время методом идентификации ЭПК является проточная цитометрия, которая на основании иммунного мечення клеток, позволяет идентифицировать определенные экстраклеточные маркеры [26].

Считается, что ЭПК характеризует триада маркеров – *CD34*, *CD133* и *VEGFR-2*. *CD34* и *CD133* являются антигенами незрелых стволовых клеток, а *VEGFR-2* характеризует зрелые эндотелиальные клетки. ЭПК должны экспрессировать по крайней мере один антиген незрелых стволовых клеток (например, *CD34* или *CD133*), а также по крайней мере один эндотелиальный антиген (обычно *VEGFR-2*, иногда *CD31*). *CD34*, маркер гемопоэтических стволовых клеток, используется для идентификации и эндотелиальных прогениторных клеток, поскольку оба типа клеток происходят из общего предшественника, названного гемангиобластом [61, 78]. *CD34⁺* клетки периферической крови способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки – при культивировании в течение 7 дней в специальных условиях на фибронектине они экспрессируют маркеры зрелых эндотелиальных клеток – *VEGFR-2*, *CD31* и *eNOS* [3]. В то же время, *CD34* экспрессируется в незначительном количестве и на зрелых эндотелиальных клетках. Другим маркером гемопоэтических и эндотелиальных клеток является *CD133*, он является более примитивным маркером и в отличие от *CD34* экспрессируется

только на незрелых типах клеток [30, 76]. *VEGFR-2* является маркером зрелых эндотелиальных клеток, опосредует сигнал фактора роста эндотелия сосудов. Зрелые эндотелиальные клетки также экспрессируют *CD31*. Таким образом, *CD34 + VEGFR-2⁺*, *CD133 + VEGFR-2⁺*, *CD34 + CD133 + VEGFR-2⁺*, *CD34⁺ CD31⁺*, *CD133 + CD31* и *CD34 + CD133 + CD31* являются теоретически возможными фенотипами ЭПК [20]. Эти популяции клеток перекрещиваются частично и могут иметь различный биологический смысл. Например, *CD133* антиген экспрессируется на более незрелых клетках, чем *CD34*, а *CD31* экспрессируется на более поздних этапах эндотелиальной дифференцировки, чем *VEGFR-2*. Однако, некоторые авторы считают, что ЭПК происходят из клеток, не экспрессирующих *CD133* [12, 106], другие выделяют 2 субпопуляции ЭПК – более примитивные *CD133⁺CD34⁺VEGFR-2⁺* и более зрелые *CD133⁻CD34⁺VEGFR-2⁺* [50]. Некоторые исследователи полагают, что из анализируемой популяции должны быть исключены *CD45⁺* лейкоциты [12]. Тем не менее, подавляющее большинство (> 90%) *CD34⁺* клеток являются *CD45⁺*, а *CD34 + CD45⁻* и *CD133 + CD45⁻* – популяции крайне редки в кровотоке. Только 0,1%–0,4% *CD34⁺* клеток костного мозга и периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колоние-стимулирующим фактором (*G-CSF*) экспрессируют маркер *VEGFR-2* [54].

Таким образом, точный поверхностный фенотип ЭПК не известен, и ни одно сочетание поверхностных маркеров не может однозначно определить ЭПК и отличить их от циркулирующих эндотелиальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток. Поэтому правильнее говорить о предполагаемом фенотипе ЭПК или сравнении субпопуляций ЭПК с разными фенотипами. Тем не менее, среди возможных фенотипов, ЭПК, коэкспрессирующие антигены *CD34 + VEGFR-2⁺*, являются наиболее предпочтительными для анализа взаимосвязи их с клиническими показателями [26].

Периферическая кровь содержит также эндотелиальные прогениторные клетки миелоидного (моноцитарного) происхождения, не экспрессирующие маркер гемопоэтических клеток *CD34* и имеющие фенотип *CD14⁺CD34⁻*, которые также могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки *in vitro* и образовывать сосудистую сеть *in vivo* [4].

Таким образом, ЭПК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, с различными фенотипическими характеристиками, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Ранние или поздние ЕРС?

Существует два основных метода изучения ЭПК, которые включают в себя как определение количества, так и функциональных способностей ЭПК [25]. В дополнение к экспрессии поверхностных маркеров, ЭПК могут быть охарактеризованы при культивировании, в основном это метод культивирования мононуклеарных клеток периферической крови в специальной эндотелиальной ростовой среде. Культивирование мононуклеарных клеток на обработанном фибронектином или коллагеном культуральном пластике приводит к выявлению двух различных популяций ЭПК, определяемых в различное время в культуре. Это ранние и поздние ЭПК [41, 64, 118].

При первом способе изолированные мононуклеарные клетки культивируют в посуде, обработанной фибронектином в присутствии факторов роста, что приводит к формированию эндотелиальных колоний (колониеобразующие единицы эндотелиальных клеток) через 5–7 дней. Следует отметить, что некоторые методы краткосрочных культур, используемых для изоляции ЭПК (в том числе и метод, используемый Асахара), не позволяют проводить селекцию чисто эндотелиальной клеточной популяции, при культивировании популяция клеток является гетерогенной и включает моноциты / макрофаги и Т-лимфоциты [20, 42, 88]. Метод длительной культуры клеток (14–21 дней) на обработанном коллагене пластике в специальной эндотелиальной среде приводит к изоляции более чистой популяции клеток с эндотелиальным фенотипом, которые могут быть отнесены к “поздним” ЭПК [25].

Эти две популяции клеток различны по фенотипическим характеристикам. Ранние ЕРС экспрессируют поверхностный антиген *CD14*, отличаются низкой экспрессией маркеров эндотелиальных клеток и имеют форму удлинённых, вытянутых клеток. Поздние ЕРС не экспрессируют *CD14* маркер и имеют форму “булыжной мостовой”. Растущие в ранние и поздние сроки ЭПК отличаются пролиферативным потенциалом. Ранние ЭПК, полученные из моноцитарных клеток, имеют низкую пролиферативную активность. Хотя эти клетки могут встраиваться в монослой эндотелия, они недостаточно способствуют перфузии *in vivo*. Альтернативой служат поздние ЭПК, которые обладают большим пролиферативным потенциалом и могут в значительной степени поддерживаться в культуре [42]. Они играют ключевую роль в неоангиогенезе *in vivo* и являются сосудеформирующими ЭПК. Последние исследования идентифицируют эти клетки как *CD34⁺CD45⁻* ЭПК [53].

CD14⁺ клетки дают начало ранним ЭПК, тогда как поздние ЭПК развиваются исключительно из *CD14⁻* субпопуляции [34].

Костный мозг является основным источником ЭПК и других прогениторных клеток. Однако, различные ткани, в том числе, жировая ткань, сосудистая стенка, селезенка, адвентиция также могут быть источниками ЭПК [114, 121, 122]. Выявлен высокий уровень прогениторных клеток и в кишечнике и печени [1].

Быстрое восстановление поврежденного или обнаженного эндотелия является важным фактором в поддержании целостности сосуда и предотвращении гиперплазии интимы. Особая роль ЭПК в репарации сосудов продолжает широко обсуждаться в научной литературе. Появляется все больше свидетельств того, что ЕРС значительно повышают реэндартализацию поврежденных артерий. В различных моделях на животных показано, что регенерация сосудов осуществляется не только за счет эндотелиальных клеток реципиентов [39, 117], но и что при введении клеток костного мозга эндотелиализация может происходить исключительно клетками донора [97]. В моделях острой ишемии как введенные ЭПК, так и мобилизованные эндогенные ЭПК способствуют восстановлению монослоя эндотелия и снижению гиперплазии интимы [33, 52, 114, 115].

Не смотря на то, что степень реэндартализации у животных выше, чем у человека, даже в отсутствии механического повреждения сосудов, до 25% введенных человеку ЭПК визуализируются в эндотелиуме аорты [102]. А ЭПК, введенные в зону экспериментального миокарда, активно функционируют, приводя к развитию коллатералей и повышению плотности капилляров, уменьшению размера зоны инфаркта и снижению апоптоза кардиомиоцитов, что сопровождается увеличением фракции выброса левого желудочка и улучшением функционального состояния миокарда [47, 50, 51, 59]. В моделях ишемии конечностей, ЭПК также способствуют увеличению плотности капилляров, перфузии мышечной ткани и в некоторых исследованиях образованию новых сосудов [21, 46].

Однако конкретный вклад ЭПК в неоваскуляризацию по-прежнему обсуждается. Некоторые авторы считают, что ЭПК могут напрямую встраиваться в стенки сосудов, другие полагают, что ЭПК проникают в периваскулярные пространства и способствуют неоваскуляризации секретацией паракринных факторов [86, 126]. По сути эти противоречия могут быть связаны с гетерогенностью ЭПК и использованием в терапевтических

целях неселектированных клеточных популяций. В недавних исследованиях показано, что ранние ЭПК непосредственно напрямую не участвуют в формировании сосудистой сети, а обладают паракринным действием, продуцируя высокий уровень проангиогенных пептидов, таких как *VEGF*, фактор роста гепатоцитов (*HGF*), *G-CSF* и *IL-8*. Эти клетки являются циркулирующими ангиогенными клетками. В отличие от них, поздние ЭПК не обладают паракринным действием, но обладают высокой пролиферативной активностью, формируют тубулярные структуры *in vitro* [98, 118]. Ранние и поздние ЭПК способствуют неангиогенезу синергичным путем, обеспечивая “программное обеспечение” и “техническое оснащение” соответственно [119].

Различные свойства ранних и поздних ЭПК говорят о том, что эти клетки оказывают различное воздействие на эндотелиогенез, и для использования их в терапевтических целях, возможно, требуются различные стратегии. С другой стороны методы клеточных культур, используемые для изоляции ЭПК, не стандартизированы [37, 94] и результаты, полученные с применением культивируемых ЭПК, не могут точно отражать патофизиологические механизмы в организме.

Клетки костного мозга (ККМ)

ККМ представляют гетерогенную клеточную популяцию и содержат гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки, ММСК, гемангиобласты и ЭПК [92]. Трансплантация CD34+ клеток способствует неоваскуляризации поврежденных тканей [19], а введение даже одной единственной клетки, экспрессирующей антиген стволовой клетки, как было показано, может способствовать эндотелиогенезу [5].

В многочисленных экспериментах на животных показано, что трансплантация как нефракционированных ККМ, так и различных популяций (*CD34+*, *CD133+*, ММСК и ЭПК) улучшает функциональное состояние миокарда при остром инфаркте и хронической ишемии миокарда [19, 99]. ККМ способны мобилизовываться в кровеносное русло и проникать в поврежденные органы и ткани. Одним из препаратов, способствующих мобилизации ККМ в периферическую кровь является *G-CSF*, который повышает уровень стволовых/прогениторных клеток у больных с ИБС [73, 81, 110]. К сожалению, два самых крупных плацебо-контролируемых исследования, в которых *G-CSF* вводился путем нескольких последовательных инъекций, не подтверждают данные доклинических исследований. Не зарегистрировано улучшения ремоделирования миокарда и уменьшение

размера инфарктированной зоны по сравнению с контрольной группой пациентов [74, 87, 128]. Эти данные свидетельствуют о том, что одной только стимуляции мобилизации стволовых/прогениторных клеток недостаточно для обеспечения репаративных процессов.

Немало споров о механизмах, с помощью которых ККМ способствуют регенерации. В более ранних работах высказывается мнение о возможности дифференцировки кроветворных предшественников в кардиомиоциты [72]. Но последующие исследования не подтвердили полученные экспериментальные данные [19, 69]. В некоторых исследованиях рассматриваются механизмы дифференцировки ККМ в эндотелиальные клетки, слияния трансплантируемых клеток с клетками хозяина. Несмотря на возможные разные пути регенерации органов и тканей под влиянием стволовых /прогениторных клеток, в настоящее время общепризнанным механизмом действия считается паракринный через продукцию ростовых факторов, в том числе проангиогенных [27, 69].

В конечном счете, не смотря на противоречивые результаты исследований, продолжают развиваться новые подходы к терапевтическому применению ККМ. ККМ представляют гетерогенную популяцию, содержащую только небольшой процент “идеальных” стволовых / прогениторных клеток. Эти исследования заставляют нас идентифицировать и понимать и изучать биологические свойства костномозговых предшественников предназначенных для реваскуляризации.

Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки

Мезенхимальные стромальные клетки представляют собой мультипотентные клетки костного мозга, которые могут дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миобласты [40]. Они, подобно ЭПК, экспрессируют маркеры, ни один из которых не является специфическим. Тем не мене ММСК характеризуются экспрессией *CD73*, *CD90*, *CD105* маркеров и отсутствием маркеров гемопоэтических клеток *CD45*, *CD34*, *CD14*. ММСК представляют большой интерес для терапевтического применения, так как они являются неиммуногенными, на них отсутствуют молекулы гистосовместимости 2 класса, поэтому они могут трансплантироваться от одного индивида другому без иммуносупрессивной терапии. И, кроме того, ММСК возможно нарастить *in vitro* до необходимого количества для последующей терапии [17]. Роль ММСК в регенерации миокарда активно изучается [82]. В экспериментальных моделях инфаркта показано, что

введение ММСК приводит к уменьшению зоны инфаркта и рубца, увеличению сократительной способности миокарда и повышению плотности сосудов [107]. ММСК, также, как ранние ЭПК, могут способствовать кардиоваскулярной репарации паракринным механизмом. ММСК, как было показано, способны секретировать различные проангиогенные пептиды, включая *HGF*, инсулиноподобный фактора роста-1 (*IGF-1*), фактор роста фибробластов (*FGF*), *VEGF*, ангиопоэтин-1 (*Ang-1*) [49]. Кроме того, хотя механизмы еще не до конца поняты, показано, что ММСК способны активно мигрировать в органы и ткани, особенно при ишемии и воспалении [17]. ММСК могут служить вектором для генной терапии [63].

С другой стороны, ММСК, наряду с проангиогенными свойствами, способны дифференцироваться в кардиомиоциты *in vitro* [6]. Однако, свидетельства дифференцировки ММСК в мышечные клетки *in vivo* скромны и предполагается, что наблюдаемые терапевтические эффекты обусловлены также паракринными воздействиями [82, 107].

Тем не менее, проводимые в настоящее время клинические исследования применения ММСК при остром инфаркте и хронической ишемии говорят о безопасности данной терапии и ее высоком потенциале [116].

Стволовые клетки жировой ткани

Стволовые клетки, выделенные из жировой ткани (стромальные васкулярные клетки) в настоящее время активно исследуются для возможности их клинического использования [Planat-Benard -105]. Эти клетки экспрессируют как гемопоэтические, так и эндотелиальные маркеры, способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки и способствовать неоваскуляризации. Проангиогенный эффект этих клеток может быть связан как с секрецией цитокинов, предотвращающих апоптоз эндотелиальных клеток, так и внедрением их в сосудистую сеть. В моделях инфаркта миокарда интракоронарное введение стромально-васкулярной фракции жировой ткани улучшает функцию сердечной мышцы и перфузию миокарда [89, 111].

Стволовые/прогениторные клетки сердца

Мультипотентные кардиоваскулярные стволовые клетки, способные дифференцироваться в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки, были идентифицированы в сердце эмбрионов [67, 124]. Самовозобновляющиеся мультипотентные клетки выделены и из взрослого сердца [7]. Введение этих клеток в поврежденный миокард мышцей приводит к улучшению функцио-

нального состояния миокарда [65]. Предварительная активация клеток сердца факторами роста способствует развитию сосудистой сети, уменьшению размера инфаркта и улучшению функционального состояния миокарда [105]. Стволовые/прогениторные клетки сердца являются кандидатами для терапевтического ангиогенеза, так как способны формировать не только капиллярную сеть, но и большие проводящие артерии.

Эмбриональные стволовые клетки и репрограммированные соматические клетки

Как упоминалось выше, ЭСК способны к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток. Они были выделены у животных и человека немногим более 10 лет назад [104]. ЭСК теоретически способны репарировать все органы и ткани. Но при использовании человеческих эмбрионов возникает много этических проблем. Недавно был предложен способ получения плюрипотентных клеток путем репрограммирования зрелых фибробластов [23, 114]. Двумя группами ученых независимо друг от друга были получены индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК). Авторы вызывали трансдукцию генов, кодирующие четыре фактора транскрипции стволовых клеток, что необходимо в поддержании плюрипотентности (*c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* и *Sox220* или *Nanog*, *Lin 28*, *Oct4* и *Sox219*) во взрослых фибробластах.

Плюрипотентные стволовые клетки, такие как ЭСК и ИПК, являются перспективными источниками клеток для кардиоваскулярной регенерации, поскольку они могут подвергнуться дифференцировке как в кардиомиоциты, так и в гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки [75, 125]. Трансплантация кардиомиоцитов, полученных из ЭСК, в экспериментальной модели инфаркта миокарда у грызунов улучшает функциональную активность миокарда, по крайней мере в краткосрочной перспективе [13, 54]. Эндотелиальные клетки, полученные из ЭСК, при введении в организм способны интегрировать в циркуляторное русло [29], способствуют ревазуляризации в моделях ишемии нижних конечностей и инфаркта [14, 58]. В недавней работе, отслеживающей судьбу трансплантированных в инфарктированный миокард эндотелиальных клеток, полученных из ЭСК, показано, что эти клетки визуализируются в течение 8 недель после инфаркта, повышая плотность сосудов [58]. Но у плюрипотентности ЭСК / ИПК есть и негативная сторона - способность к образованию тератом. И не смотря на успешные доклинические исследования по применению ИПК, внедрение этих клеток в клиническую практику требует многих технических манипуляций [70].

ОТ БИОЛОГИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К ИХ КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

Пути введения

Эффективность клеточной терапии будет зависеть как от успешной мобилизации и хоминга клеток к поврежденным органам и тканям, так и последующего фиксирования введенных клеток в очаге повреждения для участия в процессе неоваскуляризации. Способ и путь введения клеточного материала предопределяет, по крайней мере, частично, результат клеточной терапии. Существует 2 основных пути введения клеток в ишемические ткани – интраваскулярное и прямое внутримышечное введение. Для прямого введения клеток в сердце применяют интракоронарные артериальные и интерстициальные ретроградные венозные инфузии, трансэндокардиальные и трансэпикардиальные внутримышечные инъекции [38].

Сравнительное изучение перечисленных способов введения радиоактивно-меченных ККМ показало, что интрамиокардиальное введение позволяет локализовать введенные клетки и избежать системного распределения клеток. В клинических исследованиях чаще используется интракоронарное введение, что является малоинвазивной процедурой и позволяет использовать большую дозу клеток. С другой стороны при интракоронарном способе имеется угроза тромбоэмболических осложнений, особенно при применении более крупных клеток- ММСК костного мозга и жировой ткани [111, 112]. Интрамиокардиальные инъекции позволяют напрямую вводить клеточный материал в поврежденные ткани, в которых практически не возможна перфузия и следовательно хоминг клеток. С другой стороны, введение клеток в некротизированные ткани, которые ощущают недостаток кровотока и паракринной поддержки кардиомиоцитов, снижает их выживание и дифференцировку [100]. Альтернативным новым способом для повышения эффективности локального удержания клеток является рециркулирующая система замкнутого цикла перфузии миокарда [48]. Одной из проблем системного введения клеток является их быстрый хоминг по кровотоку в легкие, где и оседает практически 90–95% введенных клеток.

Модификации ex vivo

В настоящее время показано, что стадия заболевания, возраст и другие факторы риска оказывают влияние на функциональную активность ЭПК и ККМ [24].

Это проявляется в виде снижения способности к миграции по направлению к VEGF и SDF-1, образования колоний, образования сосудистой сети *in vitro* и неоваскуляризации *in vivo*. Успех клеточной терапии может быть предопределен путем различных модификаций клеток-кандидатов *ex vivo*, например, культивированием или генетическими модификациями [54]. Среди первых, кто сделал попытку этого подхода, был Манги, который показал, что ММСК, экспрессирующие антиапоптотический ген Akt1, становятся резистентны к апоптозу *in vitro* и *in vivo* [62], и секретируют паракринные факторы, которые оказывают протективное действие на ишемический миокард [32].

Выбор клеток-кандидатов

В ряде исследований, в том числе рандомизированных, проведена оценка эффективности интракоронарного введения аутологических клеток костного мозга у пациентов с острым инфарктом миокарда [23, 44, 60, 66, 91]. В исследованиях, названных *BOOST* и *REPAIR-AMI*, показан краткосрочный эффект на функциональное состояние левого желудочка, однако эти данные не были подтверждены в исследовании *ASTAMI*. Оценка функции левого желудочка через 18 месяцев (*BOOST*) не выявила никакой разницы с группой контроля. Однако сравнение результатов клинической эффективности этих и других исследований не является корректным, поскольку исследования различаются как по методам выделения клеток, так и по времени введения после перенесенного инфаркта. Эти противоречивые результаты обусловлены и использованием клеток с разным фенотипом и функциональным состоянием [95]. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости характеристики клеточных популяций с ангиогенными свойствами, а также необходимости уточнения протоколов выделения, культивирования и хранения. Очевидно, разные популяции клеток осуществляют различное терапевтическое воздействие. Как отмечалось, некоторые клеточные популяции способствуют неоваскуляризации паракринным способом, в то время как другие клетки-кандидаты непосредственно содействуют образованию сосудистой сети.

Вполне вероятно, что, учитывая низкое содержание ЭПК, проангиогенный паракринный эффект ККМ обусловлен гетерогенностью популяции ККМ. В этой связи требуются дальнейшие исследования для идентификации и характеристики проангиогенных факторов, секретируемых этими клетками. Остается открытым вопрос относительно того, сами клетки или только секретируемые

ими факторы оказывают регенеративное воздействие. Кроме того, с открытием незрелых резидентных клеточных популяций в различных тканях, особенно в сердце, процесс репарации рассматривается как активирование этих популяций паракринными воздействиями введенных клеток [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее десятилетие наблюдается широкое внедрение клеточной терапии для терапевтического ангиогенеза несмотря на ограниченное понимание биологических свойств стволовых/прогениторных клеток. Противоречивые результаты клинических исследований диктуют необходимость доклинической оценки и оптимизации выбора клеток-кандидатов для ангиогенеза до начала клеточной терапии.

Во-первых, необходимо выяснение точных механизмов неоваскуляризации и роли различных стволовых/прогениторных клеток в образовании новых сосудов. ЭПК могут претендовать на роль активных участников ангиогенеза, в том числе путем секреции ангиогенных факторов.

Во-вторых, мобилизация и/или хоминг стволовых/прогениторных клеток к тканям-мишеням являются необходимым условием для эффективной терапии. Действительно, выяснение этих процессов, возможно, приведет нас к решению парадокса, что стволовые/прогениторные клетки существуют в сердце (и других взрослых тканях), но не в состоянии способствовать достаточной регенерации после повреждения.

В-третьих, в то время как многие клетки могут являться кандидатами для лечения, необходимы исследования *in vitro* и *in vivo*, определяющие наиболее предпочтительные, с точки зрения биологических свойств, клеточные популяции, способствующие ангиогенезу.

И наконец, такие аспекты, как способ, сроки введения и количество клеток, ткани-мишени и повышение удержания вводимых клеток, улучшения их выживания.

В конечном счете накопленные знания биологических особенностей клеток позволят сделать широкой клинической практикой стратегию терапевтического неоангиогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aicher A., Rentsch M., Sasaki K. et al. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia // *Circ. Res.* 2007. V. 100. P. 581–589.
2. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science.* 1997. V. 275. P. 964–967.
3. Assmus B., Schachinger V., Teupe C. et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI) // *Circulation.* 2002. V. 106. P. 3009–3017.
4. Awad Q., Dedkov E., Jiao G. et al. Differential Healing Activities of CD34⁺ and CD14⁺ Endothelial Cell Progenitors // *Arterioscler Thromb, Vase. Biol.* 2006. V. 26. P. 758–764.
5. Bailey A.S., Jiang S., Afentoulis M. et al. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells // *Blood.* 2004. V. 103. P. 13–19.
6. Balana B., Nicoletti C., Zahanich I. et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells // *Cell Res.* 2006. V. 16. P. 949–960.
7. Beltrami A.P., Barlucchi I., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell.* 2003. V. 114. P. 763–776.
8. Bilic J., Izpisua Belmonte J.C. Concise review: induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? // *Stem Cells.* 2012. V. 30. P. 33–41.
9. Bryder D., Rossi D.J., Weissman I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissuespecific stem cell // *Am J. Pathol.* 2006. V. 169. P. 338–346.
10. Capobianco S., Chennamaneni V., Mittal M. et al. Endothelial progenitor cells as factors in neovascularization and endothelial repair // *World J. Cardiol.* 2010. V. 26. P. 411–420.
11. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine // *Nature.* 2005. V. 438. P. 932–936.
12. Case J., Mead L.E., Bessler W.K., et al. Human CD34⁺AC133⁺VEGF-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors // *Exp. Hematol.* 2007. V. 35. P. 1109–1118.
13. Caspi Q., Huber I., Kehat I. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007. V. 50. P. 1884–1893.
14. Caspi O., Lesman A., Basevitch Y. et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells // *Circ. Res.* 2007. V. 100. P. 263–272.
15. Ceradini D.J., Gurtner G.C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator cell recruitment to injured tissue // *Trends Cardiovasc Med.* 2005. V. 15. P. 57–63.
16. Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic

- gradients through *HIF-1* induction of *SDF-1* // *Nat Med.* 2004. V. 10. P. 858–864.
17. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 2739–2749.
18. Chavakis E., Aicher A., Heeschen C., et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells // *J. Exp. Med.* 2005. V. 201. P. 63–72.
19. Cogle C.R., Madlambayan G.J., Hubsher G. et al. Marrow cell therapies for cardiovascular diseases // *Exp Hematol.* 2008. V. 36. P. 687–694.
20. Critser P.J., Yoder M.C. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair // *Curr Opin Organ Transplant.* 2010. V. 15. P. 68–72.
21. Crosby J.R., Kaminski W.E., Schatteman G. et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation // *Circ. Res.* 2000. V. 87. P. 728–730.
22. Daley G.Q., Scadden D.T. Prospects for stem cell-based therapy // *Cell.* 2008. V. 132. P. 544–548.
23. Dimmeler S., Burchfield J., Zeiher A.M. Cell-based therapy of myocardial infarction // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 208–216.
24. Dimmeler S., Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 1319–1330.
25. Fadini G.P., Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology // *Cardiovasc. Res.* 2010. V. 87. P. 12–21.
26. Fadini G.P., Baesso I., Albiero M. et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau // *Atherosclerosis.* 2008. V. 197. P. 496–503.
27. Fazel S., Cimini M., Chen I. et al. Cardioprotective *c-kit+* cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. P. 1865–1877.
28. Ferrara N., Kerbel R.S. Angiogenesis as a therapeutic target // *Nature.* 2005. V. 438. P. 967–974.
29. Ferreira L.S., Gerecht S., Shieh H.F. et al. Vascular progenitor cells isolated human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks in vivo // *Circ. Res.* 2007. V. 101. P. 286–294.
30. Friedrich E.B., Walenta K., Scharlau J. et al. *CD34-/CD133+/VEGFR-2+* endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities // *Circ. Res.* 2006. V. 98. P. 20–25.
31. Fuchs S., Satler L.F., Kornowski R. et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in nooption patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003. V. 41. P. 1721–1724.
32. Gneocchi M., He H., Liang O.D. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // *Nat. Med.* 2005. V. 11. P. 367–368.
33. Griese D.P., Ehsan A., Melo L.G. et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cellbased vascular therapy // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 2710–2715.
34. Gulati R., Jevremovic D., Peterson T.E. et al. Diverse origin and functin of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood // *Circ. Res.* 2003. V. 93. P. 1023–1025.
35. Hamano K., Nishida M., Hirata K., Mikamo A. et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results // *Jpn. Circ J.* 2001. V. 65. P. 845–847.
36. Hattori K., Heissig B., Wu Y. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR(+) stem cells from bone-marrow microenvironment // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 841–849.
37. Hirschi K.K., Ingram D.A., Yoder M.C. Assessing identity, phenotype, and progenitor cells // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 1584–1595.
38. Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J. et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials // *Circulation.* 2005. V. 112. P. 1150–1156.
39. Hu Y., Davison F., Zhang Z., Xu Q. Endothelial replacement and angionenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cell // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 3122–3127.
40. Hughey C.C., Johnsen V.L., Ma I. et al. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: a role in minimizing abnormalities in cardiac-specific energy metabolism // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 302. P. 163–172.
41. Hur J., Yoon C.H., Kim H.S. et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. V. 24. P. 288–293.
42. Ingram D.A., Mead L.E., Moore D.B. et al. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells // *Blood.* 2005. V. 105. P. 2783–2786.
43. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell.* 2008. V. 132. P. 567–582.
44. Janssens S., Dubois C., Bogaert J. et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with *ST*-segment elevation myocardial infarction:

- double-blind, randomised controlled trial // *Lancet*. 2006. V. 367. P. 113–121.
45. Jie K.E., van der Putten K., Bergevoet M.W., Doevendans P.A. et al. Short- and long-term effects of erythropoietin treatment on endothelial progenitor cell levels in patients with cardiorenal syndrome // *Heart*. 2011. V. 97. P. 60–65.
 46. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 3422–3427.
 47. Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J. et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia // *Circulation*. 2003. V. 107. P. 461–468.
 48. Kaye D.M., Prevolos A., Marshall T. et al. Percutaneous cardiac recirculation-mediated gene transfer of an inhibitory phospholamban peptide reverses advanced heart failure in large animals // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2007. V. 50. P. 253–260.
 49. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M. et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // *Circulation*. 2004. V. 109. P. 1543–1549.
 50. Kobayashi T., Hamano K., Li T.S. et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model // *J. Surg. Res*. 2000. V. 89. P. 189–195.
 51. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function // *Nat. Med*. 2001. V. 7. P. 430–436.
 52. Kong D., Melo L.G., Gnechchi M. et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries // *Circulation*. 2004. V. 110. P. 2039–2046.
 53. Kovacic J.C., Moore J., Herbert A. et al. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis – old terms reconsidered from a current perspective // *Trends Cardiovasc. Med*. 2008. V. 18. P. 45–51.
 54. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts // *Nat. Biotechnol*. 2007. V. 25. P. 1015–1024.
 55. Leistner D.M., Fischer-Rasokat U., Honold J. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy // *Clin. Res. Cardiol*. 2011. V. 100. P. 925–934.
 56. Levesque J.P., Winkler I.G., Hendy J. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow // *Stem. Cells*. 2007. V. 25. P. 1954–1965.
 57. Li T.S., Cheng K., Malliaras K. et al. Expansion of human cardiac stem cell in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair // *Cardiovascular Research*. 2011. V. 89. P. 157–165.
 58. Li Z., Wu J.C., Sheikh A.Y. et al. Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease // *Circulation*. 2007. V. 116. P. 146–154.
 59. Losordo D.W., Henry T.D., Davidson C. et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina // *Circ. Res*. 2011. V. 109. P. 428–436.
 60. Lunde K., Solheim S., Forfang K. et al. Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2008. V. 51. P. 674–676.
 61. Mackie A.R., Losordo D.W. CD34-Positive Stem Cells in the Treatment of Heart and Vascular Disease in Human Beings // *Tex. Heart. Inst. J*. 2011. V. 38. P. 474–485.
 62. Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., He H. et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts // *Nat. Med*. 2003. P. 1195–1201.
 63. Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M. et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005. V. 25. P. 1168–1173.
 64. Medina R.J., O'Neill C.L., Sweeney M. et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities // *BMC Med. Genomics*. 2010. V. 13. P. 3–18.
 65. Messina E., De Angelis L., Frati Q. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart // *Circ. Res*. 2004. V. 95. P. 911–921.
 66. 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 // *Circulation*. 2006. V. 113. P. 1287–1294.
 67. Moretti A., Caron I., Nakano A. et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification // *Cell*. 2006. V. 127. P. 1151–1165.
 68. Mueller C., Wodack K., Twelker K. et al. Darbepoetin improves endothelial function and increases circulating endothelial progenitor cell number in patients with coronary artery disease // *Heart*. 2011. V. 97. P. 1474–1478.
 69. Murry C.E., Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development // *Cell*. 2008. V. 132. P. 661–680.
 70. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H. et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into

- cardiac myocytes in myocardial infarcts // *Nature*. 2004. V. 428. P. 664–668.
71. Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Terzic A. Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine // *Nat. Rev. Cardiol.* 2010. V. 7. P. 700–710.
72. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S.L. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 10344–10349.
73. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 938. P. 221–229.
74. Overgaard M., Ripa R.S., Wang Y. et al. Timing of granulocyte-colony stimulating factor treatment after acute myocardial infarction and recovery of left ventricular function: results from the *STEMMI* trial // *Int. J. Cardiol.* 2010. V. 140. P. 351–355.
75. Passier R., van Laake L.W., Mummery C.L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart // *Nature*. 2008. V. 453. P. 322–329.
76. 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. V. 95. P. 952–958.
77. Peled A., Kollet O., Ponomarev T. et al. The chemokine *SDF-1* activates the integrins *LFA-1*, *VLA-4*, and *VLA-5* on immature human *CD34(+)* cells: role in transendothelial / stromal migration and engraftment of *NOD/SCID* mice // *Blood*. 2000. V. 95. P. 3289–3296.
78. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S. et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life // *Blood*. 2002. V. 100. P. 3203–3208.
79. Perin E.C., Dohmann H.F., Boroevic R. et al. Transcendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure // *Circulation*. 2003. V. 107. P. 2294–2302.
80. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives // *Circulation*. 2004. V. 109. P. 656–663.
81. 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. V. 25. P. 296–301.
82. Psaltis P.J., Zannettino A., Worthley S.G., Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair // *Stem. Cells*. 2008. V. 26. P. 2201–2210.
83. Quyyumi A.A., Waller E.K., Murrow L. et al. *CD34+* cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent // *Am. Heart. J.* 2011. V. 161. P. 98–105.
84. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 702–712.
85. Rajasingh J., Lambers E., Hamada H., Bord E. et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from *NIH3T3* fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 107–117.
86. Rehman J., Traktuev D., Li J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells // *Circulation*. 2004. V. 109. P. 1292–1298.
87. Ripa R.S., Jørgensen E., Wang Y. et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute *ST-* elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (*STEMMI*) trial // *Circulation*. 2006. V. 113. P. 1983–1992.
88. Rohde E., Malischnik C., Thaler D. et al. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells // *Stem. Cells*. 2006. V. 24. P. 357–367.
89. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A. et al. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation // *Tissue. Eng. Part. A*. 2009. V. 15. P. 2039–2050.
90. Scadden D.T. The stem-cell niche as an entity of action // *Nature* 2006. V. 441. P. 1075–1079.
91. Schächinger V., Assmus B., Erbs S. et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodeling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction (*REPAIR-AMI*) trial // *Eur. J. Heart. Fail.* 2009. V. 11. P. 973–979.
92. Schatteman G.C., Dunnwald M., Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2007. V. 292. P. H1–H18.
93. Seaberg R.M., van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions // *Trends. Neurosci.* 2003. V. 26. P. 125–131.
94. Seeger F.H., Tonn T., Krzossok N. et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction // *Eur. Heart. J.* 2007. V. 28. P. 766–772.
95. Seeger F.H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Cell-enhancement strategies for the treatment of ischemic heart disease // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007. V. 4. P. S110–S113.
96. Sellar C. The human coronary collateral circulation // *Heart*. 2003. V. 89. P. 1352–1357.
97. Shi Q., Rafii S., Wu M.H. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells // *Blood*. 1998. V. 92. P. 362–367.

98. Sieveking D.P., Buckle A., Celermajer D.S., Ng M.K. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008. V. 51. P. 660–668.
99. Silva G.V., Fernandes M.R., Cardoso C.O. et al. A dosing study of bone marrow mononuclear cells for transendocardial injection in a pig model of chronic ischemic heart disease // *Tex. Heart. Inst. J.* 2011. V. 38. P. 219–224.
100. Smart N., Riley P.R. The stem cell movement // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 1155–1168.
101. Strauer B.E., Brehm M., Zeus T. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans // *Circulation.* 2002. V. 106. P. 1913–1918.
102. Suzuki T., Nishida M., Futami S. et al. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim // *Cardiovasc. Res.* 2003. V. 58. P. 487–492.
103. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* 2007. V. 131. P. 861–872.
104. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.* 1998. V. 282. P. 1145–1147.
105. Tillmanns J., Rota M., Hosoda T. et al. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 1668–1673.
106. Timmermans F., Van Hauwermeiren F., De Smedt M. et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from *CD133+* cells or *CD45+* hematopoietic precursors // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. P. 1572–1579.
107. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation.* 2002. V. 105. P. 93–98.
108. Tse H.F., Kwong Y.L., Chan I.K. et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation // *Lancet.* 2003. V. 361. P. 47–49.
109. Vajkoczy P., Blum S., Lamparter M. et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. P. 1755–1765.
110. Valgimigli M., Rigolin G.M., Fucili A. et al. *CD34+* and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure // *Circulation.* 2004. V. 110. P. 1209–1212.
111. Valina C., Pinkernell K., Song Y.H. et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction // *Eur. Heart. J.* 2007. V. 28. P. 2667–2677.
112. Vulliamy P.R., Greeley M., Halloran S.M. et al. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs // *Lancet.* 2004. V. 363. P. 783–784.
113. Wang H., Riha G.M., Yan S. et al. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. V. 25. P. 1817–1823.
114. Wassmann S., Werner N., Czech T., Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells // *Circ. Res.* 2006. V. 99. P. e74–e83.
115. Werner N., Priller J., Laufs U. et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. V. 22. P. 1567–1572.
116. Williams A.R., Hare J.M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease // *Circ. Res.* 2011. V. 109. P. 923–940.
117. Xu Q., Zhang Z., Davison F., Hu Y. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice // *Circ. Res.* 2003. V. 93. P. e76–e86.
118. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D. et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals // *Blood.* 2007. V. 109. P. 1801–1809.
119. 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 // *Circulation.* 2005. V. 112. P. 1618–1627.
120. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
121. Zengin E., Chalajour F., Gehling U.M. et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis // *Development.* 2006. V. 133. P. 1543–1551.
122. Zhang P., Moudgil N., Hager E. et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. P. 977–988.
123. Zhang S., Ge J., Zhao L. et al. Host vascular niche contributes to myocardial repair induced by intracoronary transplantation of bone marrow

- CD34+* progenitor cells in infarcted swine heart // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 1195–1203.
124. Zhou B., Ma Q., Rajagopal S., et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart // *Nature*. 2008. V. 454. P. 109–113.
125. Zhu W.Z., Van Biber B., Laflamme M.A. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells // *Methods Mol Biol*. 2011. V. 767. P. 419–431.
126. Ziegelhoeffer T., Fernandez B., Kostin S. et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature // *Circ. Res*. 2004. V. 94. P. 230–238.
127. Ziegler B.L., Valtieri M., Porada G.A. et al. KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells // *Science*. 1999. V. 285. P. 1553–1558.
128. Zohlnhofer D., Ott I., Mehilli J. et al. Stem cell mobilization by granulocyte colonystimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial // *JAMA*. 2006. V. 295. P. 1003–1010.

Поступила в редакцию 20.02.2012 г.

Physiological and Cytological Bases of Cellular Regulation of Angiogenesis

O.V. Poveshchenko, A.F. Poveshchenko, V.I. Konenkov

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS, Novosibirsk

One of the major directions of development of cell therapy is a therapeutic angiogenesis. Progress in this area is associated with the discovery of endothelial progenitor cells, which play an important role in neovascularization of adult tissues. The list of candidate cells for the regeneration of the cardiovascular system is constantly updated. Nevertheless, these preclinical and clinical studies to assess the possibility of using cells for therapy, isolated from different sources are contradictory. For urgent issues in the research of cell therapy include lack of uniform nomenclature, as well as the lack of functional characteristics expected of stem / progenitor cells. Given the controversial results of initial clinical trials, require more accurate knowledge of the biological properties of cells used for transplantation.

Key words: endothelial progenitor cells, neovascularization, cell therapy