

doi: 10.17116/kardio20158691-97

Становление и развитие метода терапевтического ангиогенеза в российской сердечно-сосудистой хирургии

Н.Д. МЖАВАНАДЗЕ^{1*}, Р.Е. КАЛИНИН¹, А.А. ИСАЕВ², Р.В. ДЕЕВ^{2,3}

¹ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань, Россия;
²ОАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, Россия; ³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

Formation and development of therapeutic angiogenesis in cardiovascular surgery in Russia

N.D. MZHAVANADZE^{1*}, R.E. KALININ¹, A.A. ISAEV², R.V. DEEV^{2,3}

¹Ryazan State I.P. Pavlov Medical University, Ryazan, Russia; ²JSC Human Stem Cell Institute, Moscow, Russia; ³Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Современные достижения сердечно-сосудистой хирургии позволяют сохранить жизнь и здоровье миллионам пациентов со сложными врожденными и приобретенными пороками сердца, патологией аорты, коронарных, церебральных и периферических артерий. Тем не менее ишемическая болезнь сердца и ее осложнения являются ведущей причиной смертности населения. Конвенционные методы лечения пациентов с хронической ишемией миокарда и нижних конечностей, такие как реконструктивные операции, эндоваскулярные вмешательства, использование разнообразных фармакологических препаратов, в ряде случаев (анатомические особенности, сопутствующая патология, стадия заболевания и т.п.) не могут быть применены в полном объеме либо обладают недостаточной эффективностью для повышения качества жизни пациентов и улучшения прогнозов исхода заболевания. Более 25 лет ученые России и всего мира исследуют новые подходы к лечению пациентов с заболеваниями сердца и сосудов в ситуациях, когда стандартные хирургические и терапевтические методы неэффективны. Применение терапевтического ангиогенеза с использованием разнообразных генов, молекул и клеток призвано открыть новые горизонты в лечении вышеуказанной категории больных.

Ключевые слова: терапевтический ангиогенез, генная терапия, сердечно-сосудистая хирургия.

An enormous number of scientific discoveries and achievements in cardiovascular surgery helped save millions of patients' lives including those with severe congenital or acquired cardiac pathology, aortic, coronary and peripheral arterial disease. Nevertheless, ischemic heart disease and its complications remain the leading cause of death. Conventional methods of treatment in patients with chronic myocardial or lower limb ischemia such as reconstructive surgery, endovascular procedures or a variety of pharmacology therapies are not always able to provide for a better quality of life or improve clinical outcomes due to the patients' hostile anatomy, concomitant pathology, advanced stage of the disease etc. Scientists from Russia and all around the world have spent more than 25 years researching new methods of treatment in patients with cardiovascular pathology in cases when the conventional surgical and therapeutic techniques are not able to provide for satisfactory results. Therapeutic angiogenesis based on the major achievements in genetic, molecular and cellular medicine is expected to open new horizons in the treatment of the fore-mentioned patients.

Keywords: therapeutic angiogenesis, gene therapy, cardiovascular surgery.

За время, которое потребуется на прочтение данной статьи, у 15 пациентов в России будет зафиксирован острый коронарный синдром (ОКС), который закончится инфарктом миокарда у каждого третьего [24]; от 2 до 5 больным будет выполнена ампутация конечности [7, 49]. Распространенность ишемической болезни сердца (ИБС) и заболеваний периферических артерий крайне высока [8, 11, 60, 75]. На вооружении современной сердечно-сосудистой хирургии (ССХ) имеется широкий спектр медицинских средств оказания помощи пациентам с ИБС и хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК): «классическая» открытая фармакотерапия, а также бурно раз-

вивающаяся эндоваскулярная хирургия [14]. Тем не менее статистика не утешительна: риск большой ампутации у пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК) превышает 20%, а риск смерти в течение 30 дней после нее достигает 30%, в том числе в специализированных стационарах [10, 48]. Существует насущная потребность в поиске новых методов лечения пациентов с ИБС и ХИНК. В последние годы особое внимание уделяется возможностям терапевтического ангиогенеза (ТА), цель которого — улучшение кровоснабжения ишемизированной мускулатуры и других тканей конечностей. В узком смысле стратегия ТА применима для лечения ишемических за-

болеваний сердечно-сосудистой системы. ТА развивается по трем магистральным направлениям: использование постгеномных, клеточных и генных технологий [21]. Данная статья посвящена применению ТА с использованием рекомбинантных белков, разнообразных клеток и генной терапии в сфере ССХ в России.

Постгеномные технологии терапевтического ангиогенеза: рекомбинантные факторы роста

Знания, накопленные в сфере сосудистой биологии, позволили понять тонкие сигнальные механизмы, лежащие в основе процессов васкуло-, артерио- и ангиогенеза, что помогло выявить медиаторы, ответственные за новообразование сосудов. Многочисленные эксперименты показали, что применение рекомбинантных ангиогенных факторов роста (ФР), таких как основной ФР фибробластов (FGF) [28] и сосудистый эндотелиальный ФР (VEGF) [66], в значительной степени способствовало неоваскуляризации ишемизированных тканей, однако сложности возникли в создании и поддержании эффективной концентрации ФР в тканях [37]. Основные исследования в сфере постгеномных технологий были посвящены VEGF-165, FGF-1, FGF-2, а также ФР гепатоцитов (HGF) [27]. Исследования VIVA и FIRST не выявили значимых положительных результатов применения рекомбинантных VEGF и FGF-2 в лечении пациентов с ИБС [63, 70]. Исследование TRAFFIC позволило сделать вывод, что зафиксированное в первые 3 мес увеличение дистанции безболевой ходьбы (ДБХ) у получавших FGF-2 пациентов с ХИНК полностью нивелировалось через 6 мес. Исследование RAVE (регионарный ангиогенез с помощью VEGF) также не оправдало возложенных на него ожиданий [53]. Возможно, неудачи связаны с тем, что указанные рекомбинантные белки имели короткий период полужизни в кровотоке и лишь крайне незначительное количество введенных ФР задерживалось и функционировало в мышечной ткани [40]. Эти обстоятельства указывают на то, что требуются дополнительные исследования возможности применения рекомбинантных ФР в индукции ангиогенеза, а также разработка оптимальных комбинаций, способов, режимов дозирования и введения.

Клеточные технологии терапевтического ангиогенеза

Использование клеточных технологий в сфере ССХ наиболее перспективно в лечении ИБС, хронической сердечной недостаточности и ХИНК [42, 73]. В нашей стране пионерами интеграции клеточной трансплантации различных типов клеток, кардио- и ангиохирургических методов терапии были врачи-клиницисты, повседневно нуждающиеся в новых способах лечения тяжелой категории своих пациентов: акад. Л.А. Бокерия (Научный центр ССХ им. А.Н. Бакулева, Москва) [30], акад. Ю.Л. Шевченко (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург) [22, 23], акад. В.И. Шумаков (Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, Москва) [25], акад. А.М. Караськов (Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск) [20].

В настоящее время в клинической практике апробируется применение различных видов клеток, обладающих различным ангиогенным и гистопротекторным потенци-

алом. Многочисленные исследования посвящены применению прогениторных эндотелиальных клеток (ПЭК). С момента первых испытаний ПЭК в сфере индукции ангиогенеза, проведенных Т. Asahara в 1997 г. [26], к настоящему моменту опубликовано внушительное количество статей о возможностях использования данного вида клеточной терапии [65, 68]. Изучение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток показало, что они обладают высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению и продукции необходимых для ангиогенеза ФР: VEGF, FGF, HGF [54, 71, 76]. Научный интерес медиков вызывает перспектива применения стромальных клеток жировой ткани, способных дифференцироваться в адипоциты и эндотелиоциты, секретировать разнообразные ФР, такие как HGF, VEGF, ФР тромбоцитов, а также тканевый ФР и ангиогенин-1 (ANG-1) [16, 43, 77]. Большие надежды связаны с применением аутогенной клеточной трансплантации мононуклеаров костного мозга [67]. В качестве одного из наиболее перспективных подходов в клеточной терапии в ССХ рассматривается использование мобилизованных мононуклеаров периферической крови, клеток CD133⁺ или высокоочищенной фракции мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором клеток периферической крови CD34⁺ [41]. Успех I и II фаз клинического исследования применения аутоконцентрата клеток костного мозга у пациентов с КИНК [32] позволил ученым Cesca Therapeutics в 2015 г. приступить к III фазе исследования (CLIRST III), в которой клетки подготовлены к применению с помощью технологии SurgWerk [33]. Изучение возможности использования в ССХ другого вида клеток — скелетных «миобластов» — велось в начале 2000-х годов (Н. Haider, 2004), однако к настоящему времени данный вид клеточной терапии не нашел своего применения в лечении заболеваний сердца и сосудов [46]. Работы проводятся в отношении выделяемых из пуповинной крови клеток CD34⁺, CD133⁺ [45, 69], плацентарных клеток (PLX, Pluristem), представляющих собой мезенхимальные стромальные клетки, прошедшие особую обработку [52]. В настоящее время клинические испытания I и II фаз, посвященные применению PLX-клеток в виде внутримышечных инъекций в лечении пациентов с КИНК и ХИНК соответственно, призваны определить эффективность и безопасность данного вида ТА в улучшении качества жизни и прогноза у лиц с заболеванием периферических артерий [55, 58]. Активно исследуется использование эндометриальных регенеративных клеток [74], применение которых может способствовать реваскуляризации ишемизированной мускулатуры в связи с их высокой конституциональной способностью продуцировать ангиогенные ФР. Специалистами компании Medistem/Regen BioPharma в настоящее время проводятся I и II фазы клинических исследований применения клеточной терапии эндометриальных регенеративных клеток у пациентов с КИНК [50].

Гибель значительного количества клеток после трансплантации, трудности в получении достаточного количества материала для клинических целей и ряд организационных и экономических сложностей препятствуют внедрению клеточной терапии в широкую клиническую практику. Возможно, часть указанных проблем будет решена при помощи применения генных технологий [12, 72].

Мировой опыт и основные тенденции развития генных технологий в российской сердечно-сосудистой хирургии

В ходе многолетних исследований процессов неоваскуляризации было выявлено, что следующие ФР являются ключевыми в образовании сосудов: VEGF, FGF, HGF, ANG, фактор, полученный из стромальных клеток (SDF) и индуцированный гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α). Знание патологических процессов, лежащих в основе реакции скелетной мускулатуры на артериальную недостаточность, и понимание механизмов адаптации к острой и хронической ишемии играют важнейшую роль в поиске оптимальных подходов к лечению заболеваний, ведущим звеном в которых является нарушение перфузии тканей [36].

Большинство исследований в сфере геннотерапевтической индукции ангиогенеза посвящены гену *VEGF*, пионером в этой области стал Д. Иснер [38]: в исследовании, проведенном в 1995 г. и включавшем пациентов с язвенно-некротической стадией ХИНК, изучался прототип препарата на основе плазмидного вектора VEGF165 на фоне ангиопластики. Результаты оказались обнадеживающими: у части пациентов было зарегистрировано образование сосудов в целевой конечности [39]. Схожие результаты были получены в последующих зарубежных исследованиях гена *VEGF* при внутримышечном его введении, однако среди испытуемых были и не-респондеры.

Основоположником ТА в сфере ССХ в России является акад. РАН Л.А. Бокерия. Наряду с зарубежными специалистами, Л.А. Бокерия и другие именитые российские ученые, включая акад. РАН В.А. Ткачука и Е.И. Чазова, на рубеже 1990–2000-х годов проявили интерес к возможностям применения индукции ангиогенеза. В печати появляются первые отечественные статьи, посвященные генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе с использованием гена *VEGF* [17].

В 2004 г. в нашей стране были опубликованы данные о возможностях применения генных и клеточных технологий для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [2], а также результаты 4-летнего исследования безопасности и эффективности плазмидной конструкции, содержащей ген *VEGF165* человека под названием ангиостимулин, проведенного на базе НЦССХ им. А.Н. Бакулева. Препарат-кандидат вводился 10 пациентам с ХИНК II–IV стадий заболевания по А.В. Покровскому—Фонтейну при невозможности проведения реконструктивного вмешательства и/или анатомо-функциональной недостаточности коллатерального кровотока. По данным Л.А. Бокерии, В.С. Аракеяна, О.А. Демидовой, после однократного введения 1000 мкг ангиостимулина внутриартериально в магистральную артерию проксимальнее зоны окклюзии либо внутримышечно путем обкалывания области икроножной мышцы у всех пациентов зафиксирована положительная динамика в отношении лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), транскутанного напряжения кислорода (ТКНК), качества жизни, показателей свертывающих свойств крови. Исследователи установили, что при внутримышечном введении ангиостимулина эффект наступает быстрее. При ангиографии отмечено увеличение числа вновь образованных коллатералей [3]. Позже Л.А. Бокерия, Е.З. Голухова, М.В. Еремеева опубликовали результаты исследования индукции ангио- и миогенеза

у больных ИБС и ХИНК. Новое клиническое испытание вышеуказанного препарата включало 58 пациентов с ИБС и ХИНК. Больные ИБС были разделены на группы в зависимости от вида проведенного лечения: коронарное шунтирование в сочетании с интракардиальным введением ангиостимулина и/или трансмиокардиальной лазерной реваскуляризацией. Больным ХИНК с неудовлетворительным периферическим руслом было проведено лечение препаратом в дозировке 1000 мкг, введенным внутриартериально либо внутримышечно в область икроножной мышцы пораженной конечности. Применение ангиостимулина повысило эффективность хирургического лечения при ИБС за счет поддержания высокого уровня экспрессии факторов, требующихся для ангиогенеза [35]. В группе пациентов с ХИНК объективное улучшение состояния конечности отмечалось в 80% случаев к концу 1-го месяца после начала лечения и в 100% случаев к 3-му месяцу [4]. В 2013 г. тот же коллектив авторов сообщил о положительном воздействии препарата ангиостимулин на реологические свойства крови у пациентов с ХИНК [5].

Значительный интерес представляют работы коллектива авторов Российского кардиологического научно-производственного комплекса (РКНПК) (Москва). В 2011 г. проф. Е.В. Парфенова и соавт. представили результаты клинического исследования, проведенного с включением в протокол 30 больных ХИНК атеросклеротической этиологии II–IV стадий заболевания по классификации А.В. Покровского—Фонтейна, которым не планировалось выполнение реваскуляризации. Пациентам в ишемизированные мышцы вводилась конструкция на основе плазмидной ДНК, включающей кодирующую часть гена *VEGF165* — корвиан, в дозе 28,6 мкг/кг, 2 раза, с промежутком 1 нед либо трижды в рамках I и II фаз клинических исследований. Через 3 мес от начала лечения объективное улучшение перфузии пораженной конечности отмечено у 50% пациентов, в то время как в группе контроля сколько-нибудь значимой динамики исследуемых показателей выявлено не было. Серьезных осложнений на фоне проводимого лечения не зафиксировано. Оптимальные результаты лечения были зарегистрированы у пациентов с проходимым проксимальным артериальным сегментом и более высоким ЛПИ [15]. В последние годы на базе РКНПК ведется исследование эффективности и безопасности метода комбинированной генной терапии VEGF165 и HGF. В работе, проведенной учеными РКНПК совместно с исследователями МГУ им. М.В. Ломоносова, на моделях ишемии задних конечностей и инфаркта миокарда у мышей выявлены аддитивный ангио- и артериогенный эффекты VEGF165 и HGF, способствовавшие максимальному восстановлению перфузии пораженных тканей (до 70%) [44]. Помимо исследований вышеуказанных конструкций авторы работают над созданием генномодифицированных клеток, которые, возможно, будут способствовать индукции ангиогенеза и реперфузии ишемизированных тканей [61].

Акад. РАМН Н.П. Бочковым и специалистами Российского научного центра хирургии им. Б.В. Петровского А.В. Гавриленко и Д.А. Вороновым выполнен ряд работ, посвященных изучению вирусных конструкций, несущих гены *VEGF* и/или *ANG*, в комплексном лечении пациентов с ХИНК. Исследование, результаты которого опубликованы в 2011–2013 гг., включало 134 пациента с ХИНК II–

III стадий по классификации А.В. Покровского—Фонтейна, диффузным атеросклеротическим поражением артерий голени. В зависимости от выбранного вида лечения пациентам клинической группы в икроножные мышцы ишемизированной конечности вводились нативные плазмиды с генами *VEGF* и *ANG* либо вирусные векторные конструкции CELO-ANG, Ad5-ANG и Ad5-(ANG+VEGF). Генная терапия проводилась как самостоятельно, так и в сочетании с хирургическими реконструктивными вмешательствами. При изолированном применении генных индукторов ангиогенеза лучшие результаты были получены у пациентов со IIВ стадией заболевания. При комбинации генной терапии с хирургическим лечением сохранность конечности в клинической группе превысила аналогичный показатель в группе контроля. Авторы выявили, что статистически значимо лучшие показатели критериев эффективности (увеличение ДБХ, ЛПИ, перфузии мышц по данным скинтиграфии) отмечались у всех пациентов, кому вводились любые векторные конструкции, однако применение вирусных конструкций сопровождалось развитием системной воспалительной реакции, особенно на основе вируса CELO [6].

В 2009—2010 гг. на базе 3 крупных центров (РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва; Ярославской государственной медицинской академии; РязГМУ им. акад. И.П. Павлова) проведено исследование эффективности и безопасности применения конструкции на основе плазмидной ДНК с геном, кодирующим VEGF165, в составе комплексной терапии пациентов с ХИНК атеросклеротической этиологии. IIВ—III фазы исследования включали 100 пациентов с диффузным поражением артериального русла, особенно сосудов голени. Вышеуказанная конструкция внутримышечно двукратно в дозе 1,2 мг с интервалом 14 дней вводилась 75 пациентам клинической группы. Первичным критерием эффективности была выбрана динамика ДБХ. Оценка результатов, полученных от 3 центров, показала значимое увеличение ДБХ на 110% через 6 мес от начала лечения ($p < 0,05$). Положительная динамика отмечалась и в отношении вторичных критериев эффективности (ЛПИ, ТКНК, линейной скорости кровотока). По данным контрольной ангиографии зарегистрировано усиление контрастирования сосудистого русла целевой конечности за счет новообразованных коллатеральных артерий. В группе контроля значимой динамики по вышеуказанным критериям не наблюдалось. Нежелательных явлений и осложнений применения геннотерапевтической конструкции зафиксировано не было [21]. Результаты, полученные в рамках исследования, послужили основанием к регистрации вышеуказанной плазмидной конструкции в качестве лекарственного препарата для лечения ХИНК на территории России в 2011 г. и Украины в 2012 г. под названием неоваскулген. Известны отдаленные результаты (3—4 года) наблюдения за пациентами, включенными во IIВ—III фазы исследования: у большинства больных сохранилась положительная динамика ДБХ, новообразований не зафиксировано [18, 19, 51]. Гистологическое исследование мышечной ткани у части пациентов показало значимое увеличение сосудов микроциркуляторного русла [9]. В настоящее время проводятся пострегистрационные исследования препарата различной направленности: применение его в комбинации с хирургическим лечением у пациентов с сахарным диабетом и др. [1].

Пристальное внимание возможностям ТА уделяется в Казани. В 2013 г. коллектив специалистов в составе генетиков и клиницистов представил результаты пилотного клинического исследования применения сложной плазмидной конструкции, несущей гены *VEGF* и *bFGF*, при лечении пациентов с ХИНК на фоне атеросклероза либо тромбангиита. На малой выборке пациентов А.В. Максимов и соавт. [13] исследовали возможности применения 2-кассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 и получили обнадеживающие результаты: к 6 мес после начала лечения ЛПИ в среднем увеличился на 19% по сравнению с исходным (0,6 против 0,47), время восстановления ЛПИ снизилось на 38% (563 с против 860 с исходно), ДБХ увеличилась почти в 2 раза (108 м против 58 м исходно). По данным иммуногистохимического исследования зарегистрировано увеличение плотности капиллярной сети на 47,9% по сравнению с исходными показателями.

За рубежом проведено исследование эффективности генной терапии HIF-1 α у 289 пациентов с перемежающейся хромотой, в ходе которого не было выявлено статистически значимых различий в показателях основных критериев эффективности между пациентами клинической и контрольной групп [31]. Другими широко исследуемыми генами являются *FGF* и *HGF*. В ряде работ выявлены безопасность и умеренная эффективность конструкций на основе плазмидной ДНК с FGF-1 при внутримышечном введении в ишемизированную конечность при ХИНК и КИНК [47]. Авторский коллектив включил в исследование пациентов с язвенно-некротическими стадиями заболевания, в связи с чем в качестве критериев эффективности были определены жесткие точки, например количество ампутаций за время наблюдения. С участием внушительного числа пациентов с КИНК в более чем 30 странах проведена III фаза клинических испытаний препарата на основе FGF-1, однако результаты исследования показали отсутствие статистически значимых различий между клинической и контрольной группами в отношении сохранности конечности [29]. Сейчас проводится III фаза исследования ASPIRE — многоцентрового клинического испытания интракоронарного введения конструкции с аденовирусным вектором и геном, кодирующим FGF-4, у пациентов с ИБС [34]. В Корее в 2013 и 2014 г. соответственно завершены клинические исследования препарата на основе плазмидной ДНК с геном *HGF* (ViroMed Co., Ltd.; VM Biopharma), который применялся у пациентов с КИНК [57] и ИБС [59] при шунтирующих операциях на коронарных сосудах. II фаза клинического испытания препарата Collategene на основе HGF (AnGes Inc.) у пациентов с КИНК выявила положительные результаты в 70% случаев [62]. В настоящее время проводится III фаза исследования эффективности и безопасности применения данной конструкции у пациентов с КИНК [56]. Перспективной считается индукция ангиогенеза при помощи гена, кодирующего SDF, способствующего рекрутингу проангиогенных ПЭК костного мозга и периферической крови (JVC-100) [64]. Результаты последних клинических испытаний SDF к настоящему времени не опубликованы.

Предположительно геннотерапевтические агенты, несущие FGF и HGF, более перспективны в лечении пациентов с ИБС, в то время как гены, ответственные за

синтез VEGF и SDF, имеют большую эффективность в отношении лечения ХИНК.

Заключение

Исследования нескольких российских научно-исследовательских коллективов, индуцированные явной клинической необходимостью, позволили создать опережающий научно-технический задел в части разработки и клинического внедрения геннотерапевтических препаратов

для лечения пациентов с ишемической сердечно-сосудистой патологией. Эффективное и безопасное лечение пациентов с ИБС и периферическим атеросклерозом, осложненным развитием ХИНК и КИНК, является одним из наиболее приоритетных направлений практической медицины в связи с крайне высокими морбидностью, инвалидизацией, летальностью и стоимостью лечения. Успешные результаты исследований ТА в сфере ССХ дают основания для использования данного подхода в лечении ишемических заболеваний сердца и сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Е.Ю., Сорока В.В., Нохрин С.П., Рязанов А.Н. Опыт использования ангиогенной терапии в лечении больных с хронической ишемией нижних конечностей. Трудный пациент. 2014;10:40-43.
2. Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З. и др. Возможности использования генных и клеточных технологий для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». 2004;3:19-38.
3. Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др. Первый опыт клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена VEGF165 человека. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». 2004;4:134-142.
4. Бокерия Л.А., Демидова О.А., Еремеева М.В., Аракелян В.С. Использование стимуляторов ангиогенеза в лечении хронической ишемии нижних конечностей. Всероссийский XIII съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». 2007;6:296.
5. Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Самсонова Н.Н. Динамика показателей гемореологии у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей в результате стимуляции ангиогенеза. Креативная кардиология. 2013;1:66-73.
6. Гавриленко А.В., Воронов Д.А., Бочков Н.П. Комплексное хирургическое лечение пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013;2:25-29.
7. Гостищев В.К., Липатов К.В., Асатрян А.Г., Введенская О.В. Прогнозирование риска гнойно-некротических осложнений ампутированной культы бедра. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013;11:4-8.
8. Клименков А. Экстренная помощь: как выиграть время? Новости кардиологии. 2013;4:4.
9. Мавликеев М.О., Плотников М.В., Максимов А.В., Гафятуллина Г.Р., Муртазин А.И., Тергулов Ю.Э., Шамсутдинова И.И., Гумерова А.А., Ризванов А.А., Киясов А.П. Патогистологическая оценка состояния скелетной мышцы после прямой генной терапии vegf165 пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. Гены и клетки. 2014;9(3):105-111.
10. Национальные рекомендации по ведению пациентов с патологией артерий нижних конечностей. Ангиология и сосудистая хирургия. 2013;19(2 прил):1-67.
11. Оболенский В.Н., Яншин Д.В., Исаев Г.А. Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей — диагностика и тактика лечения. Русский медицинский журнал. 2010;17:1049-1054.
12. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. Кардиологический вестник. 2007;2:5-15.
13. Плотников М.В., Ризванов А.А., Масгутов Р.Ф., Мавликеев М.О., Салафутдинов И.И., Газизов И.М., Романова Ю.Д., Шамсутдинова И.И., Богов А.А., Максимов А.В., Киясов А.П. Первые результаты клинического применения прямой генной терапии VEGF и bFGF при лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Кардиология — кардиохирургия, Практическая медицина. 2013;2:123-127.
14. Сапелкин С.В., Харазов А.Ф. Современные позиции в консервативной терапии пациентов с заболеваниями периферических артерий. Хирургия. 2013;4:68-73.
15. Талицкий К.Т., Булкина О.С., Арефьева Т.И., Воробьева О.Н., Левицкий И.В., Федорович А.А., Макаревич П.И., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011;6(3):89-98.
16. Трактеев Д.О., Марч К.П., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. Стромальные клетки жировой ткани — мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей. Кардиология. 2006;48(2):53-63.
17. Чазов Е. И., Ткачук В. А., Ширинский В. П. Перспективы генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Вестник Российской академии наук. 1999;69(1):16-31.
18. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсисян Е.Г. Терапевтический ангиогенез в лечении больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. Ближайшие и отдаленные результаты. Ангиология и сосудистая хирургия. 2012;18(3):19-27.
19. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсисян Е.Г., Власенко О.Н., Исаев А.А., Деев Р.В. Возможности генной терапии при хронических облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей. Хирургия. 2014;4:40-45.
20. Чернявский А.М., Ларионов П.М., Караськов А.М. Направленный ангиоваскулогенез при хирургическом лечении ишемической болезни сердца. Новосибирск: Дизайн науки. 2011;151.
21. Швальб П.Г., Гавриленко А.В., Калинин Р.Е., Червяков Ю.В., Воронов Д.А., Староверов И.Н., Грязнов С.В., Мжаванадзе Н.Д., Нерсисян Е.Г., Киселев С.Л., Исаев А.А., Деев Р.В. Эффективность и безопасность применения препарата неоваскулген в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (ПВ—III фаза

- клинических испытаний). Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011;3(6):76-83.
22. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. СПб.: Наука. 2006;287.
 23. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А., Махнев Д.А. и др. Первый опыт имплантации эмбриональных кардиомиоцитов человека в комплексном лечении больных с ишемической болезнью сердца. Тезисы 4-го Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. М. 1998;85.
 24. Шляхто Е.В. Острый коронарный синдром. Новости кардиологии. 2013;4:1.
 25. Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А., Гуреев С.В., Остроумов Е.Н., Честухин В.В., Крашенинников М.Е., МIRONKOV Б.Л., Хубутия А.Ш. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда. *Российский кардиологический журнал*. 2003;5:42-50.
 26. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzensbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
 27. Aviles RJ, Annex BH, Lederman RJ. Testing clinical therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor (FGF-2). *J Br J Pharmacol*. 2003;140(4):637-646.
 28. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg*. 1992;16:181-191.
 29. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E; TAMARIS Committees and Investigators. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*. 2011;377(9781):1929-1937.
 30. Bokeriia LA, Buziashvili IuI, Matskeplishvili ST, Kamardinov DKH. First experience with the use of bone marrow stem cells for regeneration therapy of ischemic heart disease. *Kardiologiia*. 2004;44(9):16-22.
 31. Creager MA, Olin JW, Belch JJ, Moneta GL, Henry TD, Rajagopalan S, Annex BH, Hiatt WR. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication. *Circulation*. 2011;124(16):1765-1773.
 32. Critical limb ischemia. Режим доступа: <http://cescatherapeutics.com/therapeutic-pipeline/clinical-pipeline/critical-limb-ischemia-cli>.
 33. Critical limb ischemia rapid delivery by SurgWerks-CLI Kit and VXP system (CLIRST III). Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02538978?term=cesca&rank=1>.
 34. Efficacy and safety of Ad5FGF-4 for myocardial ischemia in patients with stable angina due to coronary artery disease (ASPIRE). Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01550614?term=FGF-4&rank=3>.
 35. Golukhova EZ, Bokeriia LA, Ereemeeva MV, et al. *VEGF165 gene in therapy the treatment of patients with ischemic heart disease*. 16th World Congress of cardio-thoracic surgeons. Canada (Ottawa) 2006;82.
 36. Grundmann J, Piek J, Pasterkamp G, Hoefer IE. Arteriogenesis: basic mechanisms and therapeutic stimulation. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(10):755-766.
 37. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human Studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res*. 2009;105(8):724-736.
 38. Isner JM. Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;30(1-3):185-197.
 39. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rossow S, Rosenfield K, Weir L, Brogi E. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995;91(11):2687-2692.
 40. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*. 2000;101(4):454-458.
 41. Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34⁺) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol*. 2003;22(4):344-348.
 42. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb Haemost*. 2010;103(4):696-709.
 43. Madonna R, Geng YJ, De Caterina R. Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1723-1729.
 44. Makarevich P, Tsokolaeva Z, Shevelev A, Rybalkin I, Rybalkin I, Shevchenko E, Beloglazova I, Vlasik T, Tkachuk V, Parfyonova Y. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(6):e38776.
 45. Murohara T., Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki Ki, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1527-1536.
 46. Niagara MI, Haider HKh, Ye L, Koh VS, Lim YT, Poh KK, Ge R, Sim EK. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia *J Vasc Surg*. 2004;40(4):774-785.
 47. Niebuhr A, Henry T, Goldman J, Baumgartner I, van Belle E, Gerss J, Hirsch AT, Nikol S. Long-term safety of intramuscular gene transfer of non-viral FGF1 for peripheral artery disease. *Gene Ther*. 2012;19(3):264-270.
 48. Norman PE, Eikelboom JW, Hankey GJ. Peripheral arterial disease prognostic significance and prevention of atherothrombotic complications. *Med J Aust*. 2004;181(3):150-154.
 49. Owings M, Kozak LJ. National Center for Health S. *Ambulatory and Inpatient Procedures in the United States, 1996*. Hyattsville, Md. 1998.
 50. Phase I/II Trial of Endometrial Regenerative Cells (ERC) in patients with critical limb ischemia. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01558908>.
 51. Plaksa I, Deev R, Bozo I, Isaev A. Three-year results of an International, Multicenter, Randomized Clinical Trial of a Pcmv-vegf165 in progressive ischemia caused by atherosclerotic peripheral arterial disease: results from 216 participants. *Tissue Engineering: Part A*. 2015;21:Suppl 1:S53-S54.
 52. Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, Tschope C, Horwitz EM. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2009;11(4):427-434.
 53. Rajagopalan S, Mohler III ER, Lederman RJ. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*. 2003;108:1933-1938.
 54. Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic

- tic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(8):2173-2182.
55. Safety and efficacy of allogeneic cells for the treatment of intermittent claudication (IC). Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01679990?term=pluristem&rank=4>.
 56. Safety and efficacy of subjects with critical limb ischemia (AG-CLI-0206). Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02144610?term=AnGes&rank=2>.
 57. Safety and efficacy study using gene therapy for critical limb ischemia. Режим доступа: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01064440>.
 58. Safety of intramuscular injections (IM) of allogeneic PLX-PAD cells for the treatment of critical limb ischemia (CLI). Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00951210?term=pluristem&rank=1>.
 59. Safety study of gene therapy for IHD in Korea. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01422772>.
 60. Shammass NW. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(2):229-234.
 61. Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY, Tkachuk VA, Parfyonova YV. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med*. 2013;11:138.
 62. Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, Sasajima T, Ishimaru S, Ohashi Y, Yamaguchi T, Ogihara T, Morishita R. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther*. 2010;17(9):1152-1161.
 63. Springer ML. A balancing act: therapeutic approaches for the modulation of angiogenesis. *Curr Opin Invest Drugs*. 2006;7(3):243-250.
 64. Study to Evaluate the Safety and Efficacy of JVS-100 Administered to Adults With Critical Limb Ischemia. Режим доступа: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01410331>.
 65. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5(4):434-438.
 66. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994;93(2):662-670.
 67. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Author information. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427-435.
 68. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2009;13(1):87-102.
 69. Tsafirir A, Brautbar C, Nagler A, Elchalal U, Miller K, Bishara A. Alloreactivity of umbilical cord blood mononuclear cells: specific hyporesponse to non-inherited maternal antigens. *Hum Immunol*. 2000;61(6):548-554.
 70. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(10):1015-1026.
 71. Yoshida M, Horimoto H, Mieno S, Nomura Y, Okawa H, Nakahara K, Sasaki S. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. *Eur Surg Res*. 2003;35(2):86-91.
 72. Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, Xiao LB, Wang SM. Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg*. 2009;50(3):608-616.
 73. Raval Z, Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease. From experimental findings to clinical trials. *Circulation Research*. 2013;112(9):1288-1302.
 74. Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, Riordan NH, Wang H, Min WP, Woods EJ, Reid M, Mansilla E, Marin GH, Drago H, Murphy MP, Mineev B. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med*. 2009;7:15.
 75. Ziegler-Graham K, MacKenzie EJ, Ephraim PL, Trivison TG, Brookmeyer R. Estimating the prevalence of limb loss in the United States: 2005 to 2050. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(3):422-429.
 76. Zou Z, Zhang Y, Hao L, Wang F, Liu D, Su Y, Sun H. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(2):215-230.
 77. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.