

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.717/.718-005.4-008-092.9:575.113:576

И.В. Саматошенков^{1, 2}, К.В. Алексеева³, М.Н. Журавлева⁴

Сравнение эффективности стимулирования ангиогенеза в ишемизированных конечностях крыс при доставке комбинации генов VEGF и Ang прямым и клеточно-опосредованным способами

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Бултерова, 49, Казань, 420012, Российская Федерация;

²ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», ул. Карбышева, 12а, Казань, 420101, Российская Федерация;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва, 121552, Российская Федерация;

⁴ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Российская Федерация

Саматошенков Игорь Валерьевич, аспирант, врач-кардиохирург;
orcid.org/0000-0002-6836-7285

Алексеева Ксения Витальевна, ординатор;

Журавлева Маргарита Николаевна, мл. науч. сотр. ;
orcid.org/0000-0001-8592-5325

Цель: на модели хронической ишемии задней конечности крыс исследовать влияние на стимулирование ангиогенеза аденовирусов V типа, несущих комбинацию рекомбинантных генов человека фактора роста эндотелия сосудов VEGF 165 и Ang (Ad5-VEGF+Ad5-Ang), как при прямой инъекции генной конструкции, так и при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП).

Материал и методы. Исследование было проведено на 45 крысах породы Wistar. Спустя 14 сут после создания ишемии путем иссечения фрагмента бедренной артерии крысы были разделены на три группы: 1-я группа – с прямым введением комбинации генов VEGF и Ang в дистальную часть икроножной мышцы (группа Ad5-VEGF + Ad5-Ang, $n = 15$), 2-я группа получала трансдуцированные той же комбинацией генов мононуклеарные клетки крови пуповины (группа МККП Ad5-VEGF + Ad5-Ang, $n = 15$), и 3-я – группа контроля – с введением физиологического раствора в том же объеме в те же точки (группа NaCl, $n = 15$). На 28-е сутки после введения генетических конструкций в области ишемии оценивали отношение капилляры/мышечные волокна, количество мышечных волокон и количество мышечных волокон с центральным расположением ядер.

Результаты. На 28-е сутки в группах Ad5-Ang и МККП Ad5-Ang наблюдали выраженное уменьшение количества мышечных волокон: в 2,1 и 1,7 раза соответственно ($p < 0,05$). Показатель отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон и количество мышечных волокон с центральным расположением ядер увеличилось в обеих экспериментальных группах, однако различие с контрольной группой не было достоверным.

Заключение. Введение генетических конструкций с аденовирусным вектором в большей степени стимулирует регенерацию скелетной мышцы, оказывая незначительный эффект на ангиогенез в области ишемии.

Ключевые слова: икроножная мышца; ишемия; мононуклеарные клетки крови пуповины; ангиогенез; фактор роста эндотелия сосудов.

Для цитирования: Саматошенков И.В., Алексеева К.В., Журавлева М.Н. Сравнение эффективности стимулирования ангиогенеза в ишемизированных конечностях крыс при доставке комбинации генов VEGF и Ang прямым и клеточно-опосредованным способами. *Креативная кардиология*. 2019; 13 (3): 250–62. DOI: 10.24022/1997-3187-2019-13-3-250-262

Для корреспонденции: Саматошенков Игорь Валерьевич, E-mail: mr.samatoshenkov@mail.ru

I.V. Samatoshenkov^{1, 2}, K.V. Alekseeva³, M.N. Zhuravleva⁴

Comparison of the effectiveness of angiogenesis stimulation in the ischemic limbs of rats when delivering a combination of VEGF and Ang genes in direct and cell-mediated ways

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ulitsa Butlerova, 49, Kazan, 420012, Russian Federation;

²Interregional Clinical and Diagnostic Center, ulitsa Karbysheva, 12a, Kazan, 420101, Russian Federation;

³National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, ulitsa Cherepkovskaya, 15a, Moscow, 121552, Russian Federation;

⁴Kazan (Volga Region) Federal University, ulitsa Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008, Russian Federation

Igor' V. Samatoshenkov, Postgraduate, Cardiac Surgeon,
orcid.org/0000-0002-6836-7285

Kseniya V. Alekseeva, Resident;

Margarita N. Zhuravleva, Junior Researcher,
orcid.org/0000-0001-8592-5325

Objective: in the model of chronic ischemia of the hind limb of the rat to investigate the effect on stimulation of angiogenesis adenovirus type V carrying the gene combination of recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF 165 and Ang (Ad5-VEGF + Ad5-Ang), as in the case of direct injection of the gene construct, and with the help of mononuclear cells umbilical cord blood (HUCB-MNC).

Material and methods. The study was conducted on 45 Wistar rats. On day 14 after creation of ischemia by excision of the fragment of the femoral artery, the rats were divided into 3 groups: 1 – the group with gene combination – VEGF and Ang – injection at the distal part of the gastrocnemius muscle (group Ad5-VEGF + Ad5-Ang, $n = 15$), 2 – the group with translation of the same gene combination of mononuclear cells in umbilical cord blood (group HUCB-MNC Ad5-VEGF + Ad5-Ang, $n = 15$) and 3 – control group, with the saline injection in the same volume at the same points (NaCl group, $n = 15$). On the 28th day after the genetic structures administration in the ischemic area, the ratio of capillaries/muscle fibers, the number of muscle fibers and the number of muscle fibers with a central location of nuclei (MCI) were estimated.

Results. In Ad5-Ang and HUCB-MNCAd5-Ang groups observed a marked decrease in muscle fibers number, 2.1 and 1.7 times respectively ($p < 0.05$). The ratio of the number of capillaries to the number of muscle fibers and the number of muscle fibers with centrally located nuclei increased in both experimental groups, but the difference was not significant.

Conclusion. The injection of genetic structures with adenovirus vector to a greater extent stimulates the regeneration of skeletal muscle, having a slight effect on angiogenesis in ischemia.

Keywords: calf muscle; ischemia; umbilical cord blood mononuclear cells; angiogenesis; vascular endothelial growth factor.

For citation: Samatoshenkov I.V., Alekseeva K.V., Zhuravleva M.N. Comparison of the effectiveness of angiogenesis stimulation in the ischemic limbs of rats when delivering a combination of VEGF and Ang genes in direct and cell-mediated ways. *Creative Cardiology*. 2019; 13 (3): 250–62 (in Russ.). DOI: 10.24022/1997-3187-2019-13-3-250-262

For correspondence: Igor' V. Samatoshenkov, E-mail: mr.samatoshenkov@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 27, 2019
Accepted September 4, 2019

Введение

В XXI веке ишемия нижних конечностей у человека – распространенная патология, частота заболеваемости которой достигает 10% [1]. Число пациентов с заболеваниями периферических артерий за последние годы возросло более чем на 23% [1]. Распространенность данной патологии среди населения старше 50 лет составляет

около 5–8%, а при наличии таких факторов риска, как курение, гиперлипидемия, артериальная гипертензия или сахарный диабет, – 30% [2].

Несмотря на то что за последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении сердечно-сосудистых заболеваний, разработаны новые высокотехнологичные методы лечения, остановить эпидемию и изменить их вклад в структуру

смертности населения не удастся. Актуальность проблемы лечения ишемии нижних конечностей также обусловлена неуклонно растущим распространением атеросклероза и его последствий (инфаркты, инсульты и т. д.). Рост инвалидности по причине ишемии сосудов нижних конечностей диктует необходимость поиска более доступных, эффективных и малоинвазивных способов терапии. Следует отметить, что проведение хирургического лечения ишемии нижних конечностей не всегда возможно, так как примерно 30% пациентов имеют ограничения для прямой реваскуляризации конечности вследствие поражения дистального русла.

Несомненным прогрессом инновационных направлений в практической медицине является процесс интеграции в лечебную практику биотехнологических способов лечения, в том числе и метод «терапевтического ангиогенеза», то есть биологического шунтирования, основанного на введении в ишемизированные ткани различных ангиогенных факторов роста или генетических конструкций, кодирующих гены и стимулирующих ангиогенез [2]. Внедрение в терапевтическую практику малоинвазивных способов лечения заключается в стимулировании ангиогенеза с использованием генных и клеточных технологий, что в перспективе может составить полноценную альтернативу инвазивным методам и снизить риски осложнений, ведущих к инвалидизации.

Терапевтический ангиогенез представляет собой направленное стимулирование образования новых капилляров от посткапиллярных венул, активацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них протеаз, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также образование ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и созревание этих структур с привлечением перицитов и гладкомышечных клеток и в дальнейшем организацию их в сложную

трехмерную сосудистую сеть [3]. Стимулировать образование новых сосудов можно с применением различных методов и технологий: генных, клеточных и двух этих методов одновременно.

Основу лечебной тактики, предложенной М. Höckel в 1993 г., составляет стимулирование ангиогенеза в ишемизированных тканях ангиогенными факторами, например сосудистым эндотелиальным фактором роста (vascular endothelial growth factor – VEGF). Разработка технологии рекомбинантной ДНК в 1990-е годы положило начало исследованиям по генной терапии. Более 15 лет проводят экспериментальные и клинические исследования, посвященные возможности использования генетических конструкций в лечении хронической ишемии нижних конечностей [3]. Существуют две основные группы методов доставки генов в клетки: вирусные и невирусные векторы, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Например, аденовирусные векторы способны инфицировать широкий спектр как делящихся, так и неделящихся клеток [4]. Применение вирусных методов доставки генетического материала в клетки ограничено возможными иммунологическими и онкогенными побочными эффектами. Поэтому, несмотря на относительно более низкую эффективность трансфекции, невирусные системы обладают более высокой биобезопасностью трансгенеза, что существенно облегчает внедрение разрабатываемых генных технологий в клиническую практику. В настоящее время наиболее безопасными для клинического использования считаются невирусные способы доставки, в частности способ доставки с помощью плазмидного вектора. Существенным фактором, ограничивающим развитие этого направления, является низкая эффективность. Однако ныне разработаны технические подходы для улучшения доставки плазмидного вектора в клетку, например электропорация и микропорация [4].

Для разработки генно-терапевтических конструкций в лечении хронической ишемии используются гены наиболее известных в отношении проангиогенных свойств факторов, таких как: фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов (FGF); гепатоцитарный фактор роста (HGF); фактор, полученный из стромальных клеток, ангиопоэтин, индуцированный гипоксией фактора-1a. Наиболее исследованным как в экспериментальных, так и в клинических условиях геном является ген фактора VEGF. VEGF активирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов, то есть влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка). Более того, VEGF индуцирует экспрессию антиапоптозных белков bcl-2 и A1 в сосудистых эндотелиальных клетках. Таким образом, VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза [3]. Терапевтический ген можно вводить с помощью аденовируса (Ad-VEGF) путем инъекции в ишемизированную мышцу (прямая генная терапия). Показано значительное улучшение структуры мышцы при введении гена VEGF и FGF в варианте прямой генной терапии при критической ишемии конечности [5, 6]. К настоящему времени во всем мире предпринимаются попытки терапии данной группы заболеваний с использованием широчайшего спектра самых современных методов. Предложено использовать различные клетки (костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др.), проангиогенные факторы как отдельно, так и в виде различных конструкций и их комбинаций с клетками. Во многих работах отмечаются положительные эффекты применения клеточных технологий — усиление перфузии конечности по доплерографическому исследованию и увеличение количества капилляров по данным иммуногистохимии [7, 8].

В данном исследовании при введении генетических конструкций двумя способа-

ми были изучены такие параметры, как капилляры/мышечные волокна, количество мышечных волокон и количество мышечных волокон с центральным расположением ядер (МЦЯ), что позволило оценить ангиогенные и регенерирующие в отношении скелетной мышцы свойства комбинации генов.

Исследование и поиск способов стимуляции ангиогенеза при помощи ангиогенных факторов или генно-клеточных конструкций является весьма перспективным направлением в лечении ишемии нижних конечностей, а также, потенциально, иных сердечно-сосудистых заболеваний, связанных со стенозом или окклюзией артериального русла вследствие атеросклероза (например, ишемическая болезнь сердца) путем создания нового коллатерального русла, которое может осуществлять перфузию ткани, испытывающую ишемию [9].

Цель исследования: оценить эффективность реваскуляризации ишемизированной скелетной мышцы крыс при доставке комбинации генов, стимулирующих ангиогенез, как в условиях прямой инъекции, так и при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины.

Материал и методы

Создание аденовирусных векторов

Для получения рекомбинантного аденовируса Ad5-VEGF + Ad5-Ang была линеаризована аденовирусная векторная плаزمиды с использованием фермента рестрикции PacI. Очищенную линейную плазмиду использовали для генетической модификации клеток HEK293A с помощью трансфекционного реагента TurboFect. После трансфекции заменяли среду каждые 2–3 сут свежей средой до появления цитопатических изменений в морфологии клеток. На 10-е сутки после трансфекции клеточные суспензии собирали в стерильные пробирки по 2 мл и подвергали их нескольким циклам замораживания/оттаивания, а затем центрифугировали для получения сырого вирусного лизата. Вирусный запас хранили

при -80°C . Для получения препаративных количеств аденовируса, несущего VEGF и Ang, клетки HEK293A инфицировали сырым вирусным лизатом. Через 72 ч клеточные лизаты собирали в пробирки по 15 мл и подвергали нескольким циклам замораживания/оттаивания, а затем центрифугировали для получения вирусного сырья. Супернатант фильтровали и далее очищали с использованием двух раундов изопикового градиентного центрифугирования хлорида цезия, диализировали против 50 мм Трис-HCl, pH 7,5, 150 мм NaCl, а затем титровали в соответствии с рекомендациями производителя для системы pAd/CMV/V5-Dest (Invitrogen).

Выделение и генетическая модификация мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека

Выделение ядросодержащих клеток крови проводили в пробирках объемом 50 мл. В каждую пробирку помещали по 25 мл раствора фикола плотностью 1,077 г/мл («ПанЭко», Россия), на который аккуратно при помощи автоматического дозатора наслаивали равный объем пуповинной крови с антикоагулянтом (соотношение крови и антикоагулянта варьировало в пределах 1:1–3:1). Проводили центрифугирование при 720 оборотах в течение 20 мин и получали четкое разделение крови на четыре фракции: эритроциты, фикола, лейкоциты и плазму. Лейкоцитарную фракцию отбирали в отдельную пробирку, ресуспендировали в растворе Дульбекко (DPBS) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 305 оборотах в течение 15 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл раствора DPBS и повторно центрифугировали при 305 оборотах в течение 15 мин. Для удаления эритроцитов клетки ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере (0,168 М NH_4Cl , 0,1 М KHCO_3 , 1,27 мМ ЭДТА pH 7,3). На заключительном этапе клетки отмывали раствором DPBS. Клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови

человека после выделения культивировали в чашке (диаметр 10 см) в среде RPMI-1640 («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (HyClone) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) («ПанЭко»). Генетическую модификацию мононуклеарных клеток рекомбинантными аденовирусами Ad5-VEGF165, Ad5-Ang осуществляли непосредственно после выделения. Клетки инфицировали диализованным аденовирусом с MOI 10 и выдерживали в течение 12–16 ч во влажной среде при температуре 37°C с 5% содержанием CO_2 .

Лабораторные животные

Исследования были проведены на 45 крысах линии Wistar (гетерогенной популяции с массой особи 180–250 г). Все вмешательства соответствовали правилам, утвержденным локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (выписка из протокола заседания № 2 ЛЭК КГМУ от 20.02.2018 г.). Все крысы получали стандартный лабораторный корм и имели свободный доступ к воде и пище. Животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией раствора хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г, Sigma, США). Ишемию задней конечности создавали путем наложения на бедренную артерию диаметром 1 мм двух лигатур из проленовой нерассасывающейся нити Ethicon (4/0) на расстоянии 3 мм между лигатурами. Участок между лигатурами рассекали. Проводили визуальный контроль гемостаза. Рану ушивали наглухо рассасывающимся шовным материалом Vicril Ethicon (3/0).

После операции животные получали инъекцию 1 мл разведенного в физиологическом растворе цефтриаксона (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) в мышцу бедра на контралатеральной конечности. Для контроля наступления ишемии проводили замеры, выраженные в перфузионных единицах (ару) в конечности до операции, на следующий день

и на 5-е сутки после операции при помощи аппарата для измерения микроциркуляторного русла Easy LDI (Англия).

В экспериментах использовали аденовирусный вектор V типа с встроенной экспрессионной конструкцией, несущей комбинацию генов VEGF+Ang (Ad5-VEGF + Ad5-Ang). Для проведения клеточно-опосредованной терапии использовали трансдуцированные той же комбинацией генов МККП (МККП Ad5-VEGF + Ad5-Ang).

Через 14 сут после операции крыс разделили на три группы. Животным 1-й группы однократно вводили 60 мкл Ad5-VEGF + Ad5-Ang в 4 точки дистальной части икроножной мышцы, по 15 мкл в каждую точку, с общим количеством вирусных частиц 2×10^{10} ($n = 15$). Животным 2-й группы однократно вводили 2×10^6 МККП, трансдуцированные Ad5-VEGF + Ad5-Ang, в 4 точки дистальной части икроножной мышцы, по 15 мкл в каждую точку ($n = 15$). Животным 3-й, контрольной, группы инъецировали NaCl в том же объеме и в те же точки ($n = 15$).

Через 28 сут после введения генетических конструкций животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4 °C). Икроножную мышцу забирали и обрабатывали по стандартной методике для последующего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимические и морфологические методы

Иммуногистохимическое исследование с антителами против маркеров эндотелиальных клеток было выполнено с целью детекции кровеносных сосудов. Иммунофлуоресцентные реакции проводили на продольных и поперечных срезах икроножной мышцы толщиной 20 мкм, полученных на криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific). Срезы промывали в PBS (фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4, «Биолот», Россия) с 1% Тритоном X-100 в течение 5 мин 3 раза, далее блокировали неспецифическое связывание в PBS, содержа-

щем 1% Тритон X-100 и 5% сыворотку осла в течение 1 ч при комнатной температуре. Для идентификации антигена срезы инкубировали с первичными антителами против белка CD 31 (ab182981, abcam) в течение одних суток при 4 °C. Для визуализации использовали вторичные антитела осла к IgG кролика, конъюгированные с флюорохромом AlexaFluor 555 (Invitrogen, A-31572). Ядра окрашивали DAPI.

Для морфометрического анализа мышечных волокон и подсчета центрально-ядерных волокон применяли окрашивание поперечных срезов гематоксилином. Флуоресцентные изображения получены с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 630$. Световые изображения оцифровывали с помощью сканера Argeo CS2. Морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Image Score. Подсчет количества кровеносных сосудов и мышечных волокон с центральным расположением ядер осуществляли в области ишемии и на расстоянии в пределах 500 мкм от области введения генной или генно-клеточной конструкции (рис. 1).

В области ишемии скелетной мышцы оценивали отношение капилляры/мышечные волокна, количество мышечных волокон и количество мышечных волокон с центральным расположением ядер. Капилляры идентифицировали по локализации эндотелиальных клеток, выявляемых при помощи иммуногистохимической реакции с антителами против CD31. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с $p < 0,05$ в качестве уровня достоверности (см. таблицу).

Результаты

В исследуемых задних конечностях крыс после операции было зарегистрировано стойкое снижение кровотока на 45% по сравнению с уровнем до операции. Кровоток в прооперированной конечности уменьшился с $123 \pm 0,8$ до $56 \pm 0,5$ ар.

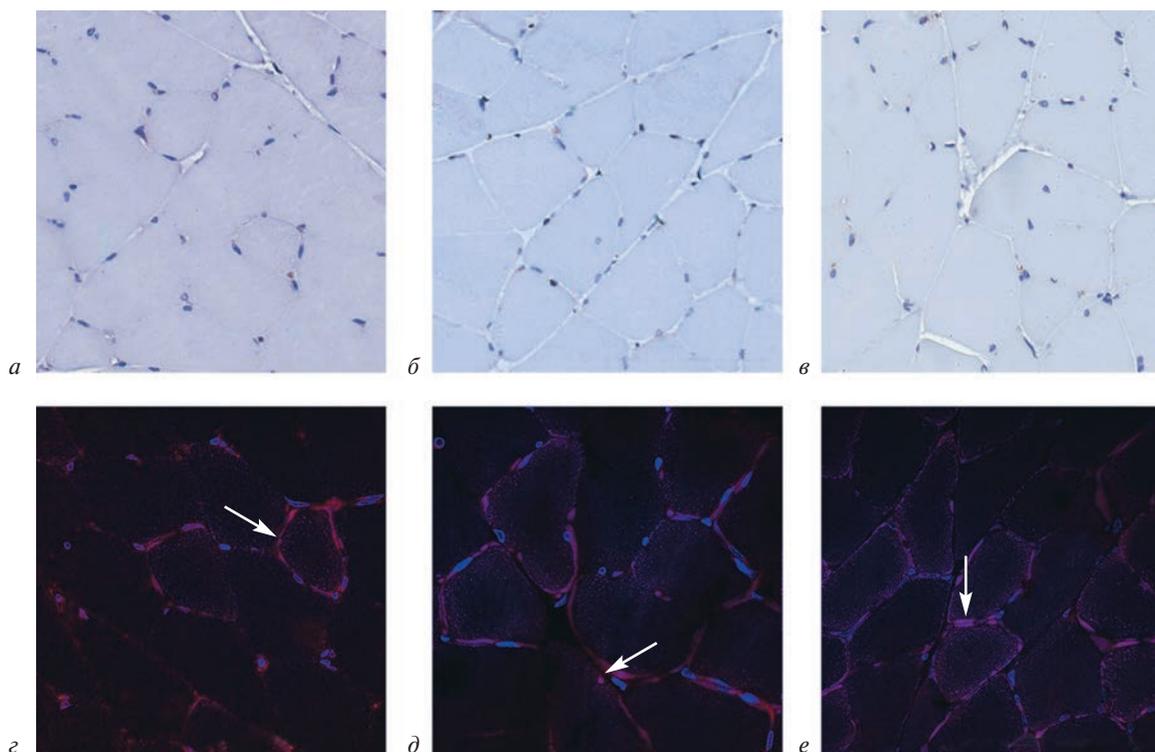


Рис. 1. Иммунофлюоресцентная реакция с антителами против CD 31 на 28-е сутки после введения в область ишемии скелетной мышцы крыс Ad5-VEGF + Ad5-Ang и МККП + Ad5-VEGF + Ad5-Ang. Ядра окрашены DAPI (синий). Стрелкой указаны кровеносные сосуды. Масштаб 100 мкм:

a, z – группа контроля (NaCl); *б, д* – группа Ad5-VEGF+Ad5-Ang; *в, e* – группа МККП Ad5- VEGF +Ad5-Ang

**Количество кровеносных сосудов, мышечных волокон
и мышечных волокон с центральным расположением ядер**

Показатель	1-я группа (Ad5-VEGF + Ad5-Ang)	2-я группа (МККП Ad5-VEGF + Ad5-Ang)	3-я группа (NaCl)
Количество кровеносных сосудов	2,61 ± 0,84	2,38 ± 0,50	2,08 ± 0,42
Количество мышечных волокон	379,17 ± 24,22*	466,95 ± 33,54*	813,48 ± 89,76
Количество МЦЯ	1,61 ± 1,72	2,09 ± 2,11	0,59 ± 1,44

* Статистически значимые различия, $p < 0,05$.

В последующем значения кровотока сохранялись в пределах $62 \pm 1,3$ ари до конца исследования, что свидетельствует о наличии ишемии.

Забранные на 14 и 28-е сутки после оперативного вмешательства образцы мышечной ткани животных исследовали с помощью стандартной гистологической методики и окраски срезов гематоксилином и эозином. Отмечено некоторое расслоение

мышечных волокон. Вытянутые ядра расположены вблизи сарколеммы. Отдельные ядра округлены и деформированы, некоторые из них смещены вглубь мышечного волокна, что характерно для мышцы, испытывающей ишемию.

Васкуляризация

На 28-е сутки в двух экспериментальных группах с введением терапевтических

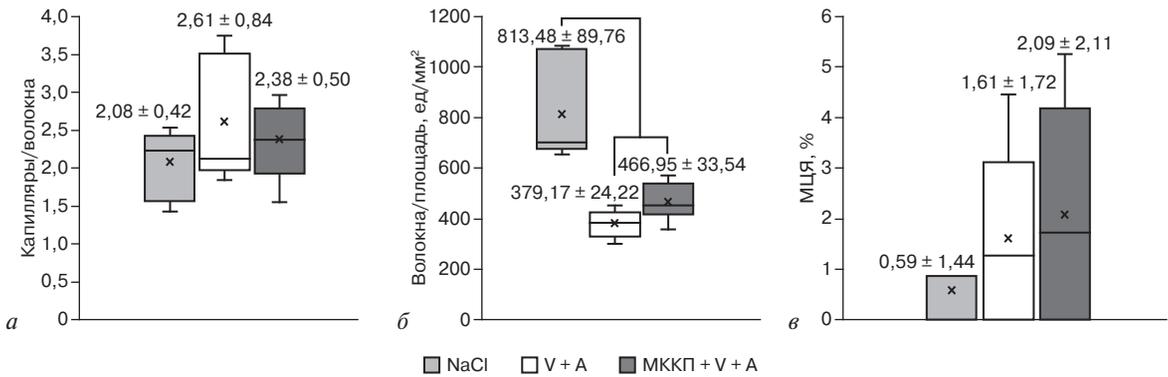


Рис. 2. Оценка васкуляризации (а), количества типичных (б) и мышечных волокон с центральным расположением ядер (в) на 28-е сутки.

NaCl – группа контроля; V+A – группа Ad5-VEGF+Ad5Ang; MKKP+V+A – группа MKKP Ad5-VEGF +Ad5-Ang

генов показатель отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон достоверно не увеличивается по сравнению контрольной группой ($2,08 \pm 0,42$ (контроль) против $2,61 \pm 0,84$ (Ad5-Ang) и $2,38 \pm 0,50$ (MKKP Ad5-Ang), $p > 0,05$).

Количество мышечных волокон

На 28-е сутки количество мышечных волокон в исследуемой области в группах Ad5-Ang и MKKP Ad5-Ang уменьшается ($813,48 \pm 89,76$ (контроль) против $379,17 \pm 24,22$ (Ad5-Ang) и $466,95 \pm 33,54$ (MKKP Ad5-Ang), $p < 0,05$).

Количество МЦЯ

На 28-е сутки количество МЦЯ увеличивается в обеих экспериментальных группах с применением генетических конструкций, но между этими группами статистически достоверных различий не обнаружено ($0,59 \pm 1,44$ (контроль) против $1,61 \pm 1,72$ (Ad5-Ang) и $2,09 \pm 2,11$ (MKKP Ad5-Ang), $p > 0,05$).

Данные по всем вышеуказанным параметрам представлены на рисунках 1, 2.

Обсуждение

За последние десятилетия появился новый, инновационный подход к лечению многих заболеваний – генная терапия. По данным литературы, за длительный период развития этой области медицины

и биологии был накоплен как положительный, так и отрицательный опыт использования генной терапии. В настоящее время генную терапию можно ограниченно использовать для лечения наследственных и ненаследственных заболеваний путем введения различных генов и комбинаций генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генетических дефектов или придания различным клеткам новых функций.

В данном исследовании не было получено достоверных данных по увеличению количества капилляров при инъекции генетических конструкций прямым и клеточно-опосредованным способом. Новизна исследования заключается в непосредственном сравнении этих двух способов доставки комбинации рекомбинантных генов, также оценивали эффект комбинации ангиогенных генов. В настоящее время наиболее эффективным способом доставки ангиогенного вещества является передача гена через аденовирусный вектор. К сожалению, иммунитет к аденовирусам значительно различается у различных видов организмов, что существенно снижает эффект от введения генетических конструкций. Кроме того, активация иммунной реакции может снизить эффективность последующих введений. Вероятно, подобные результаты были получены вследствие особенностей иммунной системы крыс.

Уменьшение количества мышечных волокон под действием трансгена может свидетельствовать об ускорении их замещения новыми мышечными волокнами в результате интенсификации обменных процессов вследствие усиления перфузии в области ишемии. Этот эффект отмечается на 28-е сутки наблюдения, то есть сохраняется в течение длительного периода и является достаточно устойчивым. Стимулирование репаративного миогенеза под влиянием комбинацией генов VEGF и Ang может быть результатом прямого действия фактора на миогенные клетки-предшественники или следствием усиления перфузии и активации обменных процессов в области ишемического повреждения. Следует рассмотреть вопрос использования иных векторов или способов доставки трансгенов в ишемизированные ткани в эксперименте.

Результаты исследования частично могут быть соотнесены с данными литературы. Согласно этим данным, введение одного рекомбинантного гена Ang при помощи аденовирусного вектора Ad5 оказывает выраженное стимулирующее влияние на ангиогенез в ишемизированной скелетной мышце (у человека), что проявляется в усилении перфузии ишемизированной скелетной мышцы и увеличении количества капилляров [10, 11]. Согласно этим исследованиям, генетические конструкции с Ang вводили в комбинации с выполнением оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей. Ввиду этого объективная оценка причины улучшения состояния у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК) представляется затруднительной.

При введении плазмиды с комбинацией генов VEGF + HGF отмечены сдерживание роста постинфарктного рубца, улучшение сокращения левого желудочка и усиление перфузии миокарда [12]. Данные исследования свидетельствуют о более высокой эффективности комбинации генов, стимулирующих ангиогенез. Однако в вышеуказанных исследованиях не было

проведено сравнения прямой генной и клеточно-опосредованной терапии.

Ниже описаны эффекты прямого введения генов проангиогенных факторов в область ишемии скелетной мышцы. Результаты обследований пациентов с критической ишемией нижних конечностей после инъекции фактора роста эндотелия сосудов VEGF свидетельствуют об отсутствии достоверного улучшения заживления язв и переносимости физической нагрузки, уменьшения частоты проведения ампутаций, хотя по данным ангиографии отмечено усиление васкуляризации пораженной конечности. Одной из причин невысокой эффективности данного метода является быстрое разрушение ангиогенных факторов в организме, а повторное их введение вызывает ряд побочных эффектов, таких как гипотензия и возникновение гемангиом [13, 14]. Так, генетическая конструкция с геном фактора роста фибробластов FGF, по результатам клинических исследований TRAFFIC и TALISMAN, оказалась полностью неэффективной [15, 16]. В более раннем аналогичном исследовании отмечена высокая частота развития побочных эффектов [17]. В исследовании RAVE (регионарный ангиогенез с помощью VEGF) положительных результатов получено не было [14]. Требуются дополнительные исследования безопасности и эффективности применения рекомбинантных ангиогенных факторов роста, а также оптимизация сочетаний и режимов введения ангиогенных белков, что может в конечном итоге способствовать повышению их эффективности в лечении хронической ишемии нижних конечностей. В вышеуказанных исследованиях факторы роста вводились напрямую, без вектора.

Следует также отметить, что прямая генная терапия имеет определенные недостатки, такие как относительно низкая эффективность трансфекции, отсутствие способов прекращения избыточного синтеза ангиогенного фактора трансфицированными клетками реципиента и высокий

риск образования опухолей вследствие неконтролируемого поступления ангиогенных факторов в системный кровоток. Кроме того, не исключен и иммунный ответ на белок, синтезируемый в организме с помощью вирусного вектора. Следующим направлением реализации терапевтического ангиогенеза при ишемии конечностей представляется применение препаратов стволовых и других прогениторных клеток – оно базируется на выдающихся достижениях последних десятилетий в изучении биологии и «поведения» стволовых клеток в тканях макроорганизма [18–20].

Многочисленные исследования продемонстрировали положительные результаты применения клеточных технологий – улучшение перфузии ишемизированных тканей, причем это было отмечено при ишемии как нижних конечностей, так и миокарда [3]. Экспериментальная терапия с использованием стволовых клеток имела различные векторы развития. В 2004 г. сообщалось об эффективности скелетных миобластов в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, однако, несмотря на положительные результаты, широкого распространения скелетные миобласты в лечении хронической ишемии нижних конечностей не получили [3]. Более 700 исследований в экспериментальных и клинических условиях по лечению хронической ишемии нижних конечностей базировались на использовании прогениторных эндотелиальных клеток. В условиях экспериментальной ишемии доказано увеличение числа циркулирующих прогениторных эндотелиальных клеток с их внедрением в капилляры и артериолы с дальнейшей дифференцировкой в эндотелиальные клетки с последующим индуцированием роста сосудов [3]. В условиях ишемии ангиогенные факторы роста (VEGF, FGF) связываются с соответствующими рецепторами и обеспечивают миграцию прогениторных эндотелиальных клеток в зону ишемии.

Определенную перспективу в использовании имеют мультипотентные мезен-

химальные стволовые клетки, обладающие высоким потенциалом пролиферации и самообновления, а также высокой способностью секретировать широкий спектр как ангиогенных, так и антиапоптозных факторов роста. Одним из перспективных направлений терапии с использованием клеток является применение жировой ткани, полученной при выполнении липосакции, с выделением из нее клеток стромально-васкулярной фракции – стромальных клеток жировой ткани, способных дифференцироваться в клетки различных типов – адипоциты, эндотелиальные клетки, хондробласты, остеобласты и миобласты [3].

Положительные результаты были получены при использовании мононуклеаров костного мозга, но, в свою очередь, при выборе мононуклеаров периферической крови были получены обратные результаты. Весьма перспективным является использование стволовых клеток-предшественников пуповинной крови, обладающих высокой способностью к пролиферации, а также эндотелиальных регенеративных клеток [3]. Следует также отметить важное свойство многих стволовых клеток – миграцию в очаг повреждения (хоуминг), пролиферацию и выделение трофических факторов и иных биологически активных молекул, таких как цито- и хемокины. Вышеуказанные свойства реализуются в явлениях цитопротекции, стимулирования ангиогенеза и нейрогенеза, индуцирования резидентных тканеспецифичных стволовых клеток к включению их в репаративные процессы в организме. Помимо этого, выявлены противовоспалительное и иммуносупрессивное влияния на микроокружение [21].

В настоящее время терапия хронической ишемии нижних конечностей с использованием стволовых клеток различных типов не вошла в рутинную клиническую практику, что связано с гибелью значительного количества клеток после трансплантации в поврежденную и ишемизированную ткань, а также трудностями в получении достаточного количества клеток для

клинических целей и отсутствием данных о безопасности в отдаленном периоде.

В настоящее время проводятся экспериментальные исследования по созданию оптимальных генетически модифицированных клеток для лечения ХИНК, что предполагает получение и использование клеток, экспрессирующих и гиперэкспрессирующих различные комбинации ангиогенных факторов. Это позволит в будущем уменьшить необходимую для трансплантации терапевтическую дозу клеток и повысить эффективность клеточной терапии. Увеличить секреторную активность стволовых клеток возможно не только путем трансфекции их генами факторов роста, но и воздействуя на внутриклеточные сигнальные пути. Не исключено, что сверхэкспрессия генов ангиогенных факторов на основе вирусных векторов в мононуклеарных клетках крови пуповины увеличит продолжительность действия продуцируемых молекул на клетки-мишени.

В работе W. Li et al. (2007 г.) показаны улучшенные в отношении выживаемости биологические свойства генетически модифицированных стволовых клеток [22]. По сравнению с прямой генной терапией, предполагающей непосредственную инъекцию ДНК-содержащих векторов в организм, клеточно-опосредованная доставка терапевтических генов имеет определенные преимущества. Предполагается, что такой способ доставки генов является более продуктивным [23, 24] и позволит повысить эффективность восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях [25].

В недалеком будущем значимая доля больных на разных стадиях ишемии нижних конечностей, у которых хирургическая реконструкция артерий не может быть выполнена ввиду наличия технических сложностей — многоэтажного поражения сосудов или вследствие тяжелой соматической патологии, обуславливающей невозможность проведения оперативного вмешательства, может проходить лечение генными и генно-клеточными препара-

тами с высокой степенью трансфекции в организме. Кроме того, в ряде случаев может быть отсрочено хирургическое лечение или сняты показания к ампутации. Следует также отметить, что для определенных категорий больных сочетание хирургического и генно-инженерного подхода является весьма многообещающим и перспективным [26].

Заключение

При доставке комбинации генов VEGF и Ang посредством аденовирусного вектора выявлен выраженный регенераторный эффект в отношении скелетной мышцы. Это может быть результатом прямого действия генов на миогенные клетки-предшественники или следствием усиления обменных процессов в области ишемического повреждения, однако стимулирование ангиогенеза в мышце проходило с меньшей интенсивностью.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Fowkes G., Rudan D., Rudan I., Aboyans V. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013; 382: 1329–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0
2. Булгин Д.В., Андреева О.В. Терапевтический ангиогенез с использованием факторов роста и клеток костного мозга: биологические основы и перспективы клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2015; XVII (3): 7–12. DOI: 10.15825/1995-1191-2015-3-89-111
3. Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д. Основные тенденции терапевтического неоангиогенеза в лечении хронической ишемии нижних конечностей (обзор литературы). *Наука молодых*. 2013; 3: 103–9.
4. Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В., Киселев С.Л., Исаев А.А. Мировой опыт и тенденции генотерапии ишемических заболеваний. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2011; 17 (2): 145–54.
5. Jazwa A., Tomczyk M., Taha H.M., Nytonen E., Stoszko M., Zentilin L. et al. Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. *Vasc. Cell*. 2013; 5: 13. DOI: 10.1186/2045-824X-5-13

6. Sanada F., Taniyama Y., Azuma J., Yuka I., Kanbara Y., Iwabayashi M. et al. Therapeutic angiogenesis by gene therapy for critical limb ischemia: Choice of biological agent. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 2014; 14 (1): 32–9. DOI: 10.2174/1871522213999131231105139
7. Chen H., Hung H., Shyu K., Wang B., Sheu J., Liang Y. et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35 (11): 677–86. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2005.01565
8. Ikeda Y., Fukuda N., Wada M., Matsumoto T., Satomi A., Yokoyama S. et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens. Res.* 2004; 27 (2): 119–28. DOI: 10.1291/hyres.27.119
9. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogen therapy. *Circ. Res.* 2009; 105: 724–36. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200386
10. Воронов Д.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. Изучение возможности применения генно-терапевтических методов для лечения пациентов с ишемией нижних конечностей. *Вестник РАМН.* 2006; 9–10: 6–11.
11. Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. Экспериментальные и клинические результаты использования генно-инженерных конструкций с геном ангиогенина в лечении хронической ишемии нижних конечностей. *Медицинская генетика.* 2005; 4 (7): 327–31.
12. Makarevich P.I., Dergilev K. V., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Shevchenko E.K., Glukhanyuk E.V. et al. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One.* 2018; 13 (5): e0197566. DOI: 10.1371/journal.pone.0197566. eCollection 2018: 1–25.
13. Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 2002; 6: 127–33. DOI: 10.1006/mthe.2002.0638
14. Rajagopalan S., Mohler E.R., Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Saucedo J.F., Goldman C.K. et al. 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: 1933–8. DOI: 10.1161/01.CIR.0000093398.16124.29
15. Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E., Diehm C., Visona A., Capogrossi M.C. et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NVIFGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008; 16 (5): 972–8. DOI: 10.1038/mt.2008.33
16. Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Anderson R.D., Saucedo J.F., Tenaglia A.N., Hermiller J.B. et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet.* 2002; 359 (9323): 2053–8. DOI: 10.1016/s0140-6736(02)08937-7
17. Comerota A.J., Throm R.C., Miller K.A., Henry T., Chronos N., Laird J. et al. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J. Vasc. Surg.* 2002; 35: 930–6. DOI: 10.1067/mva.2002.123677
18. Bosiers M., Schneider P.A. Critical limb ischemia. N.-Y.: Informa Healthcare USA; 2009.
19. Armstrong L., Lako M., Buckley N., Lappin T.R., Murphy M.J., Nolte J.A. et al. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells.* 2012; 30 (1): 2–9. DOI: 10.1002/stem.1007
20. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 696–709. DOI: 10.1160/TH09-10-0688
21. Шумаков В.И., Онищенко М.А. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр; 2009.
22. Li W., Ma N., Ong L. et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells.* 2007; 78–82. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0771
23. Xie N., Li Z., Adesanya T.M., Guo W., Liu Y., Fu M. et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells enhances angiogenesis after ischemic limb injury in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 2016; 20 (1): 29–37. DOI: 10.1111/jcmm.12489
24. Zhe L., Guo L.Z., Kim T., Han S., Kim S. Angio-vasculogenic properties of endothelial-induced mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Circ. J.* 2016; 80: 998–1007. DOI: 10.1253/circj.CJ-15-1169
25. Шевченко Е.К., Талицкий К.А., Парфенова Е.В. Перспективы повышения эффективности генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически-модифицированные клетки. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2010; 5: 215–8.
26. Воронов Д.А. Использование генных индукторов неангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: фундаментальные аспекты и клинические результаты. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* 2009; 5: 44–8.

References

1. Fowkes G., Rudan D., Rudan I., Aboyans V. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet.* 2013; 382: 1329–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0
2. Bulgin D.V., Andreeva O.V. Therapeutic angiogenesis using growth factors and bone marrow cells: the biological basis and the prospects for clinical use. *Kletchnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya (Cellular Transplantation and Tissue Engineering).* 2015; XVII (3): 7–12 (in Russ.). DOI: 10.15825/1995-1191-2015-3-89-111
3. Deev R.V., Mzhavanadze N.D. The main trends of therapeutic neoangiogenesis in the treatment of chronic lower limb ischemia (literature review).

- Nauka Molodykh (Science Young)*. 2013; 3: 103–9 (in Russ.).
4. Deev R.V., Grigoryan A.S., Potapov I.V., Kiselev S.L., Isaev A.A. World experience and trends in gene therapy of ischemic diseases. *Angiologiya i Sosudistaya Khirurgiya (Angiology and Vascular Surgery)*. 2011; 17 (2): 145–54 (in Russ.).
 5. Jazwa A., Tomczyk M., Taha H.M., Hytonen E., Stoszko M., Zentilin L. et al. Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. *Vasc. Cell*. 2013; 5: 13. DOI: 10.1186/2045-824X-5-13
 6. Sanada F., Taniyama Y., Azuma J., Yuka I., Kanbara Y., Iwabayashi M. et al. Therapeutic angiogenesis by gene therapy for critical limb ischemia: Choice of biological agent. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem*. 2014; 14 (1): 32–9. DOI: 10.2174/1871522213999131231105139
 7. Chen H., Hung H., Shyu K., Wang B., Sheu J., Liang Y. et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest*. 2005; 35 (11): 677–86. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2005.01565
 8. Ikeda Y., Fukuda N., Wada M., Matsumoto T., Satomi A., Yokoyama S. et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens. Res*. 2004; 27 (2): 119–28. DOI: 10.1291/hyres.27.119
 9. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogen therapy. *Circ. Res*. 2009; 105: 724–36. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200386
 10. Voronov D.A., Bochkov N.P., Gavrilenko A.V. Study of the possibility of using gene therapy methods for the treatment of patients with lower limb ischemia. *Vestnik RAMS (Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences)*. 2006; 9–10: 6–11 (in Russ.).
 11. Konstantinov B.A., Bochkov N.P., Gavrilenko A.V. Experimental and clinical results of the use of genetically engineered structures with the angiogenin gene in the treatment of chronic lower limb ischemia. *Meditsinskaya Genetika (Medical Genetics)*. 2005; 4 (7): 327–31 (in Russ.).
 12. Makarevich P.I., Dergilev K. V., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Shevchenko E.K., Glukhanyuk E.V. et al. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One*. 2018; 13 (5): e0197566. DOI: 10.1371/journal.pone.0197566. eCollection 2018: 1–25.
 13. Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther*. 2002; 6: 127–33. DOI: 10.1006/mthe.2002.0638
 14. Rajagopalan S., Mohler E.R., Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Saucedo J.F., Goldman C.K. et al. 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: 1933–8. DOI: 10.1161/01.CIR.0000093398.16124.29
 15. Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E., Diehm C., Visona A., Capogrossi M.C. et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther*. 2008; 16 (5): 972–8. DOI: 10.1038/mt.2008.33
 16. Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Anderson R.D., Saucedo J.F., Tenaglia A.N., Hermiller J.B. et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*. 2002; 359 (9323): 2053–8. DOI: 10.1016/s0140-6736(02)08937-7
 17. Comerota A.J., Throm R.C., Miller K.A., Henry T., Chronos N., Laird J. et al. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J. Vasc. Surg*. 2002; 35: 930–6. DOI: 10.1067/mva.2002.123677
 18. Bosiers M., Schneider P.A. Critical limb ischemia. N.-Y.: Informa Healthcare USA; 2009.
 19. Armstrong L., Lako M., Buckley N., Lappin T.R., Murphy M.J., Nolte J.A. et al. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells*. 2012; 30 (1): 2–9. DOI: 10.1002/stem.1007
 20. Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 696–709. DOI: 10.1160/TH09-10-0688
 21. Shumakov V.A., Onishchenko M.A. Biological reserves of bone marrow cells and correction of organ dysfunctions. Moscow; 2009 (in Russ.).
 22. Li W., Ma N., Ong L. et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007: 78–82. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0771
 23. Xie N., Li Z., Adesanya T.M., Guo W., Liu Y., Fu M. et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells enhances angiogenesis after ischemic limb injury in mice. *J. Cell. Mol. Med*. 2016; 20 (1): 29–37. DOI: 10.1111/jcmm.12489
 24. Zhe L., Guo L.Z., Kim T., Han S., Kim S. Angio-vasculogenic properties of endothelial-induced mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Circ. J*. 2016; 80: 998–1007. DOI: 10.1253/circj.CJ-15-1169
 25. Shevchenko E.K., Talitsky K.A., Parfenova E.V. Prospects for improving the effectiveness of gene and cell therapy of cardiovascular diseases: genetically modified cells. *Kletochnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya (Cell Transplantation and Tissue Engineering)*. 2010; 5: 215–8 (in Russ.).
 26. Voronov D.A. The use of gene inducers of neoangiogenesis in the complex treatment of patients with chronic lower limb ischemia: fundamental aspects and clinical results. *Kardiologiya i Serdechno-Sosudistaya Khirurgiya (Cardiology and Cardiovascular Surgery)*. 2009; 5: 44–8 (in Russ.).