

## ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

© В. Г. Матвеева,\* Л. В. Антонова, О. Л. Барбараиш

*Институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, 650002;*

*\* электронный адрес: matveeva\_vg@mail.ru*

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЕРС) благодаря своим свойствам и возможности получения из периферической крови человека являются перспективным материалом для использования в регенеративной медицине и тканевой инженерии. К ЕРС относят гетерогенные по биологическим характеристикам популяции клеток. В настоящем обзоре представлены сведения о различных типах ЕРС, выделенных из крови. Особый акцент сделан на существующих принципиальных разногласиях ученых по ряду вопросов, касающихся гемопоэтической и негемопоэтической популяций ЕРС, а именно: происхождения, источника, фено- и генотипа, а также некоторых функциональных свойств, в том числе ангиогенных. Показано, что «поздние» ЕРС (LEPC) по своим свойствам наиболее соответствуют истинным ЕРС, тогда как «ранние» ЕРС (eEPC) имеют сходство с воспалительными иммунными клетками. Однако в преclinical и клинических исследованиях для терапевтических целей в основном используются eEPC, что объясняется рядом указанных в обзоре объективных причин. Сомнения ученых относительно терапевтической пользы клеточной терапии на основе eEPC при отсутствии данных по использованию LEPC определяют необходимость дальнейшего всестороннего изучения свойств этих популяций, особенностей поведения в сосудах различных органов и детальной оценки долгосрочных результатов имплантации.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, морфология, фенотип, культивирование, клеточная терапия.

Принятые сокращения: AcLDL — ацетилированный липопротеин низкой плотности, CFU-Hill — колониеформирующие клетки Hill, CXCL — хемокиновый лиганд CXCL, ЕРС — эндотелиальные прогениторные клетки, eEPC и LEPC — соответственно «ранние» и «поздние» ЕРС, G-CSF — гранулоцитарный-колониестимулирующий фактор, HAEC — эндотелиальные клетки аорты человека, HEPC — гемопоэтические эндотелиальные прогениторные клетки, HLA — лейкоцитарный антиген человека, HUVEC — эндотелиальные клетки пупочной вены человека, LEPC — «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки, UEA-1 — ulex *Europeus agglutinin I*, VEGFR2 — рецептор 2 к сосудистому эндотелиальному фактору роста, vWF — фактор фон Виллебранда.

Термин «эндотелиальные клетки-предшественники» или «эндотелиальные прогениторные клетки» (ЕРС) используют в основном для обозначения популяции клеток, способных дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки с предполагаемым физиологическим участием в ангиогенезе (прорастании новых кровеносных сосудов из существующих) и васкулогенезе (образовании сосудистых сетей *de novo*) (Sukmawati, Tanaka, 2015). Эти характеристики делают популяцию ЕРС ценным кандидатом для использования в регенеративной медицине (прямая клеточная трансплантация), тканевой инженерии, а также в экспериментальной медицине.

Однако для внедрения соответствующих технологий в клинику необходимо ответить на ряд вопросов, касающихся, в частности, происхождения, способов идентификации и основных функций ЕРС в организме, и решить ряд проблем, связанных с ограниченным количеством ЕРС и их клинической эффективностью. К настоящему времени эти вопросы исследованы в многочисленных ра-

ботах, накоплен большой объем данных, однако у исследователей нет единодушия в ответах на них. Это связано с тем, что к ЕРС относят довольно разнородные по биологическим свойствам популяции клеток. Считается, что ЕРС крови при культивировании дают начало двум типам колоний — гемопоэтическим «ранним» ЕРС (early EPC, или eEPC) и негемопоэтическим «поздним» ЕРС (Hir et al., 2004).

Колонии eEPC формируются в культуре через 3—5 сут культивирования мононуклеаров периферической крови в питательной среде, содержащей соответствующие ростовые факторы. Клетки eEPC имеют округлую и веретенообразную форму (рис. 1), максимальный рост колоний наблюдается в среднем через 2 нед, а далее примерно через 4 нед происходит их постепенная гибель. eEPC связывают лектин *ulex Europeus agglutinin I* (UEA-1) и поглощают ацетилированный липопротеин низкой плотности (AcLDL) (Tagawa et al., 2015), что ранее расценивали как специфичный признак эндотелиаль-

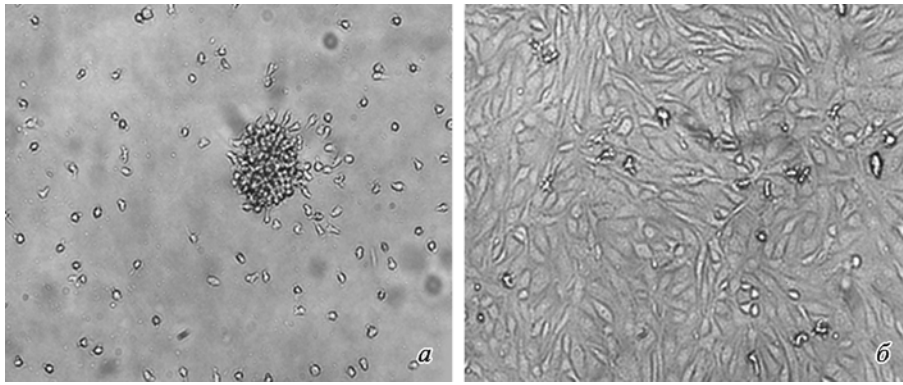


Рис. 1. Морфология колоний ЕРС: «ранних» (еЕРС, а) и «поздних» (LEPC, б).  
Фазово-контрастная микроскопия, об. 20×.

ных клеток. Различные авторы эту популяцию клеток называют по-разному: «early» EPC (Gulati et al., 2003; Hur et al., 2004) или «attaching cells» (прикрепляющиеся клетки) (Asahara et al., 1997). В крови эта популяция получила название гемопоэтические эндотелиальные прогениторные клетки (HEPC) (Asahara et al., 2011) или циркулирующие ангиогенные клетки (circulating angiogenic cells или CACs) (Lin et al., 2000; Rehman et al., 2003).

Колонии поздних ЕРС обладают иными свойствами. Они появляются в той же культуре мононуклеаров периферической крови спустя 2—3 нед культивирования, образуют монослой с типичной для эндотелиальных клеток морфологией, так называемой булыжной мостовой (рис. 1), в процессе пролиферации способны к почти полной конfluэнтности, их популяция может экспоненциально расти без старения более 4—8 нед и сохранять жизнеспособность до 12 нед (Ingram et al., 2004). В литературе эти клетки также имеют несколько названий: «поздние» EPC (Late EPC, или LEPC) (Hur et al., 2004), разрастающиеся клетки (outgrowth endothelial cells, или ОЕС) (Fuchs et al., 2006) и эндотелиальные колониобразующие клетки (ECFCs) (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007). Циркулирующие в крови родоначальницы этой популяции клеток определяют как негемопоэтические эндотелиальные прогениторные клетки (Asahara et al., 2011). Для удобства далее мы будем пользоваться терминами еЕРС и LEPC для обозначения ранних и поздних ЕРС соответственно. Несмотря на то что еЕРС экспрессируют частичный, а LEPC — практически полный набор эндотелиальных маркеров, клетки этих двух популяций имеют различную морфологию, скорость пролиферации, время жизни и механизм участия в неоваскуляризации. Рассмотрим более детально каждую из популяций.

### Получение и свойства еЕРС и схожих с ними популяций клеток

В 1997 г. из периферической крови человека впервые получили колонии с признаками ЕРС (Asahara et al., 1997). С помощью магнитной сепарации из периферической крови человека были выделены две популяции клеток —  $CD34^+$  и  $VEGFR2^+$ . Фенотип для изоляции из крови клеток, способных формировать колонии с характерными признаками эндотелиальных, уточнялся и в настоящее время составляет комбинацию маркеров

$CD34^+$ ,  $CD133^+$  и  $VEGFR2^+$  (Gehling et al 2000; Peichev et al., 2000; Werner et al., 2005; Shaffer et al., 2006). Предположительно эти клетки после культивирования на покрытых фибронектином поверхностях в течение 5 сут образуют колонии еЕРС, состоящие из округлых клеток в центре и веретенообразных клеток на периферии. На мембране свежeweделенных клеток в 1-ю нед культивирования определяется общий лейкоцитарный антиген  $CD45$ , который при дальнейшем культивировании постепенно исчезает. В среднем через 2 нед культивирования формируются колонии еЕРС с характерными признаками незрелых эндотелиальных клеток, включая высокую экспрессию  $VEGFR2$ ,  $CD202b$ , Е-селектина и менее выраженную экспрессию  $CD34$ ,  $CD31$  и  $CD144$ . Клетки колоний связывают UEA-1, поглощают AcLDL, и в них определяется фактор фон Виллебранда (vWF). Исследования *in vivo* и *in vitro* демонстрируют, что циркулирующие клетки  $CD34^+$  и  $VEGFR2^+$  способствуют неоангиогенезу (Asahara et al., 1997; Bauer et al., 2006). Однако из еЕРС не удается получить колонии с фенотипом, присущим зрелым эндотелиальным клеткам. Показано, что промоторы генов, соответствующие зрелому эндотелию, метилированы и неактивны (Ohtani et al., 2011). Полногеномный анализ обнаружил поразительное сходство еЕРС с гемопоэтическими клетками иммунной и воспалительной направленности, о чем свидетельствует высокая экспрессия транскриптов Толл-подобных рецепторов,  $CD14$  и HLA (Medina et al., 2010).

Другой популяцией клеток с некоторыми характеристиками ЕРС является CFU-Hill. Первым в данном направлении начал работу Ито с коллегами (Ito et al., 1999), изменив протокол изоляции клеток, предложенный в 1997 г. (Asahara et al., 1997), за счет устранения этапа сортировки. Клетки разделяли по принципу адгезии к покрытым фибронектином поверхностям. После 24-часовой инкубации адгезированные клетки удаляли с намерением избавиться от моноцитов и макрофагов, а неадгезивные клетки переносили на планшеты, покрытые фибронектином. Через 7 сут в культуре наблюдали появление колоний, позитивных по  $CD31$ ,  $CD202b$  и  $VEGFR2$ . Другие авторы предложили дополнительно изменить условия культивирования, увеличив время предварительного культивирования на фибронектиновой подложке до 48 ч (Hill et al., 2003). После этого адгезированные клетки удаляли, а неадгезированные продолжали культивировать на покрытых фибронектином планшетах. Был выпущен коммерческий набор Endocult (Stem Cell Technologies) для

получения ЕРС по предложенному методу (Hill et al., 2003), а выделенные таким образом колонии получили название CFU-Hill. Было показано, что клетки CFU-Hill экспрессируют клеточные поверхностные антигены CD31, CD105, CD144, CD146, vWF и VEGFR2, что, безусловно, согласуется с фенотипом эндотелиальных клеток, хотя и не совсем специфично для ЕРС. Кроме того, клетки CFU-Hill способны поглощать AcLDL, что также характерно, но не специфично для поведения эндотелиальных клеток, поскольку функцией поглощения обладают все фагоциты (нейтрофилы, моноциты, различные виды макрофагов и др.).

Изучение количества клеток CFU-Hill в крови при различных заболеваниях показало, что содержание CFU-Hill ниже у пациентов с гиперхолестеринемией, гипертонией и диабетом. Кроме того, обнаружили обратную корреляцию между уровнем CFU-Hill в циркулирующей крови и риском сердечно-сосудистых заболеваний по Фремингемской шкале: пациенты с самым высоким риском имели наименьшее количество CFU-Hill (Hill et al., 2003). Позднее различными научными коллективами было поставлено под сомнение утверждение о том, что клетки CFU-Hill являются истинными ЕРС, что заставило пересмотреть предполагаемые в то время биологические механизмы их корреляции с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Показали, что популяция CFU-Hill обладает низким уровнем пролиферативного потенциала, а также экспрессирует универсальный гемопоэтический маркер CD45 и антигены, специфические для моноцитов и макрофагов (CD14 и CD115) (Yoder et al., 2007). Позднее в другой независимой работе (Rohde et al., 2007) приведены доказательства генетической связи CFU-Hill с примитивными гемопоэтическими клетками, представлен клеточный состав колоний, включающий в основном моноциты и Т-лимфоциты. Несмотря на данные об участии клеток CFU-Hill в стимуляции и регуляции ангиогенеза (Yoon et al., 2005; Asosingh et al., 2008), есть мнение (Hirschi et al., 2008) о том, что эти клетки являются кроветворными и никогда не смогут стать полноценными эндотелиальными клетками интими *in vivo*, что исключает их из категории истинных ЕРС.

В процессе активных поисков клеточных популяций, способных генерировать ЕРС, в качестве возможного источника рассматривали мононуклеарные клетки CD14<sup>+</sup> крови человека, которые в присутствии ангиогенных факторов роста способны формировать эндотелиоподобные клетки (Fernandez Pujol et al., 2000). Так, в этой работе показано, что популяция клеток CD14<sup>+</sup> через 1 нед культивирования демонстрировала экспрессию маркеров эндотелиальных клеток (vWF, CD144, CD105, VEGFR1, в более слабой степени — VEGFR2) и приобретала способность к поглощению AcLDL наряду с присутствием моноцитарно-макрофагальных маркеров (CD68, CD80, CD86, HLA-DR и CD36) (Fernandez Pujol et al., 2000). Представленные данные указывали на тесную связь между моноцитарно-макрофагальной системой и эндотелиальными клетками и позволили предположить, что эндотелиоподобные клетки могут дифференцироваться от клеток моноцитарной линии. Эти выводы были поставлены под сомнение в работе, в которой авторы (Urbich et al., 2003) доказывали, что моноцитарный линейный маркер CD14 не является определяющим для циркулирующих ЕРС, а моноцитоподобные клетки CD14<sup>+</sup> периферической крови не образуют ЕРС. Что касается ангиогенеза, то мононуклеарная фракция клеток CD14<sup>+</sup>, а также макрофаги

и дендритные клетки, введенные в ишемизированную область, не способствовали неоваскуляризации и улучшению функционального восстановления в зоне ишемии у подопытных животных (Urbich et al., 2003).

Однако многочисленные исследования подтверждают присутствие эндотелиальных маркеров на CFU-Hill и на колониях, полученных из клеток CD14<sup>+</sup>. При этом отмечено, что интенсивность экспрессии этих маркеров увеличивается при удлинении сроков культивации. Частичное объяснение этому феномену может дать понимание того, что в состав колоний из клеток CD14<sup>+</sup> и CFU-Hill входят моноциты и макрофаги, которые являются фагоцитами и способны поглощать фрагменты клеток, а также выделяемые ими микрочастицы и белки (Yoder et al., 2007; Prokopi et al., 2009). Поэтому поглощение фрагментов тромбоцитов и стволовых клеток приводит к простой передаче антигенов CD31, vWF и CD34. Кроме того, перенос эпигенетического материала, включая белки и нуклеиновые кислоты, является ранее недооцененным способом межклеточного взаимодействия и общения. Перенос может происходить при непосредственном контакте между клетками: так, трансдифференцировка eЕРС, совместно культивируемых с неонатальным кардиомиоцитами, зависела от переноса сложного клеточного материала через соединение нанотрубки (Koynagi et al., 2005; Rechavi et al., 2009; Collino et al., 2010). Перенос микроРНК также возможен через щелевые межклеточные контакты (Hosoda et al., 2011). На равных правах существует мнение о том, что обнаружение эндотелиальных маркеров может быть результатом загрязнения микрочастицами, высвобождающимися из других элементов культуры (например, тромбоцитов), что приводит к регистрации ложноположительных событий при проведении флуоресцентной сортировки клеток (Prokopi et al., 2009).

### Получение и свойства LEPC

Популяцией клеток, выделенной из крови *in vitro* и обладающей всеми свойствами ЕРС, являются LEPC (Lin et al., 2000). LEPC могут быть получены из периферической крови и из крови пупочной вены (Ingram et al., 2004). Многочисленные исследования подтверждают, что LEPC (в отличие от eЕРС) помимо типичной для эндотелиальных клеток морфологии («бульбозной мостовой») обладают практически полным набором эндотелиальных маркеров, включая маркеры зрелого эндотелия (CD146, CD144, VWF и CD141 (тромбомодулин), CD105 (эндоглин), VEGFR2, CD144, CD31 и vWF). Они синтезируют оксид азота (NO), при этом на их мембране полностью отсутствуют гемопоэтические маркеры, такие как CD45, CD11b, CD14 и HLA DR (Hur et al., 2004; Ingram et al., 2004; Reinisch et al., 2009; Medina et al., 2010). Колонии LEPC, так же как и eЕРС, связывают UEA-1 и поглощают AcLDL, однако эти показатели неспецифичны для эндотелия, поскольку характеризуют все фагоцитирующие клетки (Hur et al., 2004). Тестом *in vitro*, отражающим ангиогенную активность, является способность клеток к формированию трубчатых или капиллярноподобных структур при культивировании на Матригеле. LEPC как в чистой культуре, так и при сокультивировании с HUVEC на Матригеле образует хорошо оформленные капиллярноподобные структуры. eЕРС на Матригеле вытягиваются, приобретают веретеновидную форму без формирования трубчатых

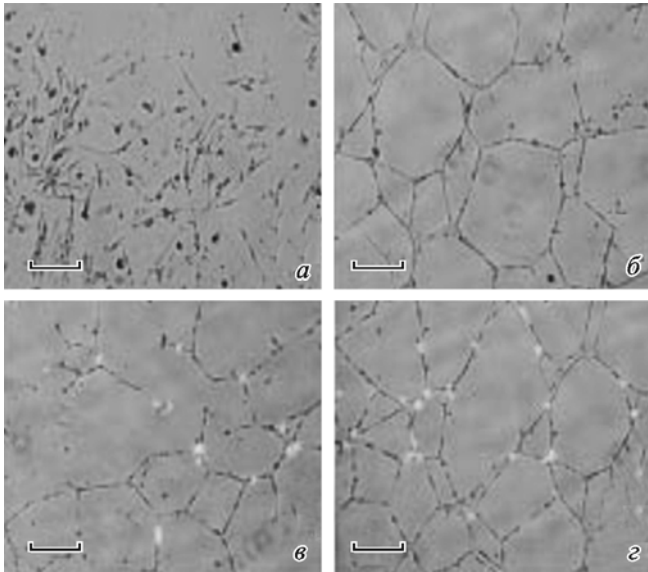


Рис. 2. Образование трубчатых структур на Матригеле *in vitro*. *а* — eEPC, *б* — LEPC. Результат сокультивирования на Матригеле HUVEC с eEPC (*в*) и LEPC (*г*). Масштабные отрезки — 100 мкм. Публикуется по: Hur et al., 2004, с любезного разрешения авторов.

структур, в условиях сокультивирования с HUVEC образуются трубчатые структуры незаконченной формы (рис. 2) (Hur et al., 2004).

Определяющим свойством клеток-предшественников является их клоногенный и пролиферативный потенциал. Разработанный и наиболее точный тест для определения клоногенной активности заключается в том, чтобы определить, сможет ли одна клетка образовать колонию в отсутствие других клеток (Ingram et al., 2005). Показано, что популяции LEPC из периферической и пуповинной крови действительно различаются по клоногенному и пролиферативному потенциалу. LEPC из крови пуповины обладают более высокой клоногенной и пролиферативной активностью по сравнению с LEPC из периферической крови взрослого человека. По данным тех же авторов, LEPC из пуповинной крови способны к 100-кратному удвоению популяции без проявлений признаков старения, формируют вторичные и третичные колонии, сохраняя при этом высокий уровень теломеразной активности (Ingram et al., 2004). Популяция LEPC из периферической крови может произвести до 30–40 удвоений, и с увеличением числа пассажей теломеразная активность клеток снижается. LEPC из пуповинной крови способны формировать вторичные и третичные клеточные колонии до достижения конfluence. LEPC из периферической крови образуют колонии, которые в своем большинстве содержат более 50 клеток, но не образуют вторичных колоний при повторных пассажах.

Колонии из разных источников различаются морфологически (колонии, полученные из пуповинной крови, значительно крупнее и содержат более мелкие клетки по сравнению с колониями из периферической крови), но не различаются по фенотипу, сохраняя экспрессию эндотелиальных антигенов при отсутствии гемопоэтических (Ingram et al., 2004, 2005). Доказана фенотипическая и геномная стабильность LEPC при длительной экспансии (3–4 мес культивирования) с высокой экспрессией маркеров дифференцированного эндотелия (Fuchs et al., 2006; Reinisch et al., 2009; Medina et al., 2010). Эти данные

позволили авторам сделать предположение об иерархическом распределении EPC, в котором более незрелыми являются EPC из крови пуповины.

### Фенотип циркулирующих в крови клеток, дающих начало колониям LEPC

Важным моментом является выяснение комбинации маркеров, безошибочно определяющих EPC в крови. С помощью магнитной сепарации из крови выделили (Asahara et al., 1997) фракции клеток  $CD34^+$  и  $VEGFR2^+$ , давшие начало eEPC, которые, по современным данным, не являются истинными EPC (Barclay et al., 2012). Долгое время исследователи идентифицировали EPC по наличию экспрессии клеточных поверхностных антигенов  $CD34$ ,  $CD133$  и  $VEGFR2$  как в отдельности, так и в их различных сочетаниях (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Reyes et al., 2003; Werner et al., 2005; Shaffer et al., 2006). Однако было показано (Case et al., 2007), что изолированные фракции клеток  $CD34^+CD133^+VEGFR2^+$  и  $CD34^+CD45^+$  не способны к формированию колоний EPC; эти популяции давали начало eEPC и экспрессировали специфический гемопоэтический антиген  $CD45$ . В то же время клетки с фенотипом  $CD34^+CD45^-$  образовывали колонии EPC с высоким пролиферативным потенциалом (Case et al., 2007). Дальнейшие поиски источника и предшественника EPC с обогащением и истощением мононуклеарных клеток крови показали, что формирование LEPC ограничено клеточной фракцией  $CD34^+CD133^+CD146^+$  (Tura et al., 2013). При этом LEPC могут быть изолированы из пуповинной крови и мононуклеарных клеток периферической крови, но не из костного мозга, а также стимуляция гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) не приводит к увеличению колоний LEPC в культуре периферической крови. Популяция этих клеток идентична зрелым эндотелиальным клеткам пупочной вены человека (HUVEC) по морфологии, фенотипу, уровню экспрессии генов и функциональной активности (метаболической, пролиферативной и ангиогенной). Эксперименты на животных подтвердили ангиогенный потенциал, зарегистрированный *in vitro*. Продемонстрирована способность LEPC, полученных из клеток  $CD34^+CD133^+CD146^+$ , напрямую участвовать в формировании кровеносных сосудов *de novo*, схожую с ангиогенной активностью HUVEC. Эти данные подтверждают, что LEPC образуются из мононуклеарных клеток с фенотипом  $CD34^+CD133^+CD146^+$ , которые аналогичны, если не идентичны, зрелым эндотелиальным клеткам (Tura et al., 2013).

### Возможен ли переход «ранних» EPC в «поздние»?

В культуре колонии eEPC в LEPC могут существовать как изолированно, так и совместно. Активно дискутируется вопрос о возможности перехода eEPC в LEPC. В ряде исследований показано, что долгосрочная культура eEPC дала перерастание в более зрелый фенотип эндотелиальных клеток с высоким пролиферативным потенциалом, так называемые LEPC (Hur et al., 2004; Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007; Geng et al., 2017). Однако данные работ последних лет позволяют с высокой долей вероятности исключить возможность такого перехода, а

полученные положительные результаты отнести к последствию недостаточной чистоты выделенной популяции eEPC и ее контаминации активно пролиферирующими клетками LEPC. Подробное изучение молекулярного паттерна eEPC и LEPC (Medina et al., 2010) доказывает их принадлежность к различным клеточным линиям. Сравнительный геномный и протеомный анализ указывает на гемопозитическое моноитарное происхождение eEPC, тогда как LEPC демонстрируют принадлежность к эндотелиальной линии с активной экспрессией транскриптов сигнальных путей, участвующих в развитии сосудов и ангиогенезе. Ультраструктурное исследование также подтверждает значительные отличия LEPC от eEPC: в частности, в LEPC обнаружены кавеолы и контакты адгезии, характерные для эндотелия, в eEPC подобных микроструктур не выявлено (Medina et al., 2010).

Таким образом, согласно многочисленным публикациям, выделенная и описанная LEPC соответствует EPC эндотелиального происхождения (негемопозитического), тогда как противоречивые данные о свойствах и функциональных характеристиках eEPC не позволяют с уверенностью отнести ее к истинным гемопозитическим EPC.

### Существующие концепции происхождения EPC

Точное происхождение EPC по-прежнему неизвестно и активно обсуждается. Есть обоснованное мнение о том, что EPC возникают из циркулирующих ангиобластов, имеющих костномозговое происхождение (Lin et al., 2000; Jiang et al., 2004). Так, у пациентов, перенесших трансплантацию аллогенных стволовых клеток костного мозга или периферической крови, не совпадающей по половому признаку, через 1 мес после процедуры отдельные эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды реципиента, были химерными по происхождению (т. е. обладали генотипом как реципиента, так и донора). Это свидетельствует о существовании циркулирующих клеток в крови и в костном мозге (по предположению авторов — циркулирующие ангиобласты), которые способны к перемещению и встраиванию в эндотелий сосудистой стенки (Lin et al., 2000; Jiang et al., 2004).

Ряд исследователей придерживаются мнения об эндотелиальном предшественнике EPC. В пользу этой теории говорит соответствие морфологии, фенотипа, генотипа и ультраструктуры LEPC (представителя истинных EPC в культуре) зрелым эндотелиальным клеткам, что бросает вызов концепции костномозгового предшественника циркулирующих эндотелиальных клеток (Prokopi et al., 2009; Medina et al., 2010). В качестве веского аргумента представляют доказательства присутствия в стенке сосудов (аортальных и венозных) полной иерархии EPC, включая прародителей, в том числе с высоким клоногенным потенциалом (Ingram et al., 2005), что формирует самодостаточную систему поддержания сосудистой целостности. Ранее считали, что все HUVES и HAES, полученные из стенок сосудов, являются дифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками (Auerbach et al., 2003; Vompais et al., 2004). Однако Инграм с коллегами доказали, что отдельные клетки HUVES и HAES, изолированные из стенки сосудов, способны к пролиферации и образовывали колонии (Ingram et al., 2005). Доля одиночных делений HUVES и HAES через 2 нед культивирования практически не отличалась от LEPC из пуповинной кро-

ви. Более 25 % одиночных HUVES и одиночных HAES обладали высоким пролиферативным потенциалом и формировали колонии, содержащие более 2000 клеток. Кроме того, HUVES и HAES дали начало более мелким колониям (до 500 клеток) (Ingram et al., 2005).

Присутствие резидентных эндотелиальных прогениторных клеток в сосудистой стенке подтверждают и другие авторы (Kovacac, Boehm, 2009). Кроме того, существует теория наличия «васкулогенной зоны» в стенке кровеносных сосудов взрослого человека, которая содержит EPC (Zengin et al., 2006). Косвенным доказательством сосудистой локализации EPC является факт, что при моделировании острого инфаркта миокарда у животных сразу после раздувания баллонного катетера и индуцирования коронарного повреждения в крови увеличивается количество LEPC с потенциально высоким пролиферативным потенциалом (Huang et al., 2007).

### Ангиогенная и васкулогенная активность LEPC

Если учесть, что EPC определяется как незрелая клетка-предшественник, которая демонстрирует постнатальную васкулогенную активность, тогда любая клетка, называемая EPC, должна быть способна формировать новые эндотелиальные клетки и кровеносные сосуды в естественных условиях. На основании множества публикаций известно, что оба вида EPC вносят вклад в ангиогенез и репарацию сосудистых повреждений, но механизмы их влияния различны. Популяция eEPC действует паракринно, оказывая непрямой ангиогенный эффект (Krenning et al., 2009; Barclay et al., 2012) за счет активной секреции проангиогенных факторов, таких как CXCL12, CXCL1, VEGF, IL8, фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF), что помогает рекрутировать резидентные зрелые эндотелиальные клетки из прилежащих областей и индуцировать их пролиферацию, дифференцировку и выживание (Hur et al., 2004; Kanzler et al., 2013).

Многочисленными исследованиями показано, что eEPC не интегрируют во вновь образованные сосуды и не замещают поврежденный эндотелий (Hur et al., 2004; Ziegelhoeffer et al., 2004; Zentilin et al., 2006; Mukai et al., 2008; Barclay et al., 2012; Hagensen et al., 2012). По мнению этих авторов, eEPC не соответствует кандидату на роль истинной EPC из-за неспособности напрямую участвовать в ангиогенезе и значительной приверженности гемопозитической линии. Однако в отдельных публикациях указывается, что eEPC обладают прямым ангиогенным эффектом и могут сами образовывать новые кровеносные сосуды (Asahara et al., 1997; Takahashi et al., 1999; Murayama et al., 2002; Bauer et al., 2006). Эти расхождения могут быть связаны с отсутствием у различных исследовательских групп общих подходов в отношении источника клеток, варианта очистки популяции клеток, используемой модели *in vivo* и *in vitro*, метода обнаружения, анализа и интерпретации данных. Очевидна значительная гетерогенность участвующих в этих экспериментах eEPC. Авторы работ использовали либо нефракционированный костный мозг (Murayama et al., 2002; Bauer et al., 2006), либо популяции, выделенные на основании мономаркеров (CD34 и VEGFR2) (Asahara et al., 1997; Takahashi et al., 1999). Неудивительно, что свойства полученных при культивировании клеток, в том числе ангиогенные,

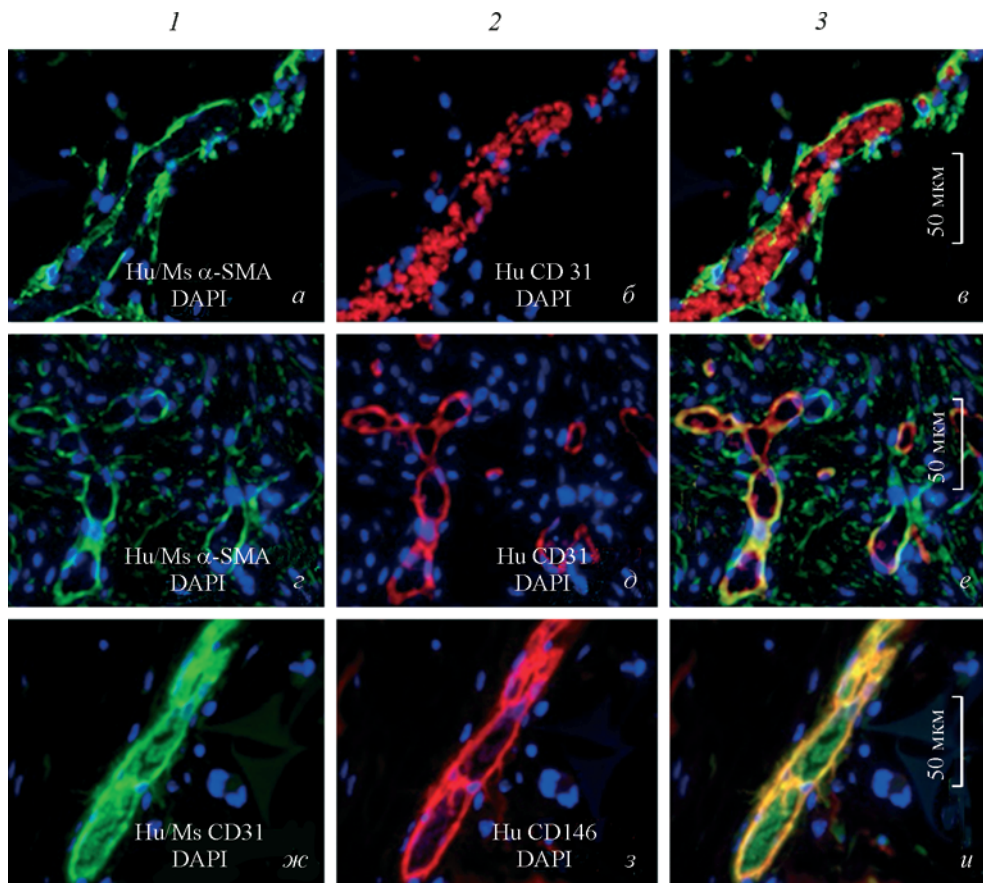


Рис. 3. Примеры сосудов, обнаруженных в участках имплантации мононуклеарной фракции из пуповинной крови человека, обогатенной клетками CD34<sup>+</sup> (а–е) и LEPС (г–и).

Столбцы — комбинация изображения зеленого флуоресцентного канала и синего ядерного красителя DAPI (1), красного флуоресцентного канала и DAPI (2) и совмещенное изображение (3). Использованы пары антител: кросс-реактивный Human/Mouse анти- $\alpha$ -гладкомышечный актин (Hu/Ms  $\alpha$ -SMA) с зеленой флуоресценцией (а, г), специфичный анти-Human-CD31 (Hu CD31) с красной флуоресценцией (б, д), Human/Mouse анти-CD31 (Hu/Ms CD31) с зеленой флуоресценцией (ж) и анти-Human-CD146 (Hu CD146) с красной флуоресценцией (з). В стенке сосуда определяются только клетки мыши, связавшиеся с кросс-реактивными антителами с зеленой флуоресценцией (а); красная флуоресценция анти-Human-CD31 (Hu CD31) обнаруживается только в просвете сосуда, но не в стенке (б). Антитела, специфичные к эндотелиальным клеткам человека CD31 (д) и CD146 (з) с красной флуоресценцией, локализуются вместе со связавшимися кросс-реактивными антителами с зеленой флуоресценцией к  $\alpha$ -SMA (г) и Hu/Ms CD31 (ж), что свидетельствует о формировании сосудов с клетками человека. Публикуется по: Barclay et al., 2012, с любезного разрешения авторов.

значительно отличались от чистых культур (Asahara et al., 1997; Takahashi et al., 1999; Gehling et al., 2000; Urbich, Dimmeler, 2004).

Однако существует полное единодушие исследователей относительно роли LEPС в ангиогенезе. В Матригеле LEPС образуют полноценные трубчатые структуры, аналогичные структурам HUVEC. Известна способность LEPС мигрировать в направлении трубчатых структур, сформированных HUVEC, с последующим включением LEPС в состав структуры. В то же время eEPС случайно мигрируют и трубчатых структур не формируют (рис. 2). На модели *in vivo* показано, что LEPС непосредственно участвуют в восстановлении сосудов путем формирования неососудов с хорошей перфузией (Yoder et al., 2007; Reinisch et al., 2009). В ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* приведены доказательства прямого участия LEPС в ангио- и васкулогенезе путем непосредственного встраивания LEPС в резидентную сосудистую сеть (Hur et al., 2004; Mukai et al., 2008; Barclay et al., 2012). На рис. 3 представлен фрагмент рисунка из работы Барклай и соавторов (Barclay et al., 2012), где изображены сосуды, обнаруженные в участках имплантации и доказывающие встраивание LEPС в сосудистую стенку.

### Возможности и проблемы использования EPC в клинике

LEPС по своим характеристикам являются более перспективной популяцией для терапевтической сосудистой регенерации, однако практически во всех преклинических и клинических исследованиях изучали и использовали с терапевтической целью прогениторные клетки из костного мозга или G-CSF-мобилизованной периферической крови пациентов (Leistner et al., 2011).

Большой блок клинических испытаний посвящен изучению прогностической и диагностической ценности гемопоэтических EPC (HEPC) с различными фенотипами (CD34<sup>+</sup> изолированно и в различных сочетаниях с CD133<sup>+</sup> и VEGFR2) при ряде заболеваний сердечно-сосудистой системы. Показано, что содержание циркулирующих HEPC является маркером эндотелиальной дисфункции (Diller et al., 2010; Lee, Poh, 2014). Значительное снижение циркулирующих HEPC регистрируется у пациентов с ишемической болезнью сердца (Eizawa et al., 2004), а их растущее количество в случае острых коронарных событий или инфаркта миокарда может расцениваться как физиологический ответ на повреждение, поскольку им отво-

дят роль посредников сосудистых репаративных процессов (Wojakowski et al., 2004; Massa et al., 2005). Активные клинические исследования ведутся по изучению содержания НЕРС в периферической крови при различных цереброваскулярных заболеваниях. Показано, что количество циркулирующих НЕРС снижено у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями, а отсутствие циркулирующих ЕРС связано с повышенным риском будущих сосудистых событий после ишемического инсульта (Martí-Fabregas et al., 2015). Высокий уровень НЕРС в крови у пациентов с острым ишемическим инсультом указывает на обширность поражения и может служить маркером тяжести патологического процесса (Vogoslovsky et al., 2010).

В научной среде нет единодушия в вопросах безопасности и пользы от использования eЕРС с целью проведения клеточной терапии (терапевтической сосудистой регенерации). По мнению одних исследователей, eЕРС являются более предпочтительными для клеточной терапии и усиления сосудистой регенерации, поскольку обладают наиболее мощным проангиогенным действием (Barclay et al., 2012). Другие подчеркивают, что eЕРС должны использоваться с крайней осторожностью, поскольку относятся к гемопоэтическим клеткам с типичным моноцитарным фенотипом, соответственно обогащены генами, участвующими в воспалении и иммунном ответе, и при введении в область повреждения могут запускать воспалительную реакцию или усиливать уже имеющийся патологический процесс, связанный с воспалением (Medina et al., 2010).

Действительно, доклинические и клинические исследования по использованию eЕРС в клеточной терапии дали противоречивые результаты с точки зрения терапевтической пользы. Показано, что применение eЕРС способствовало нейрососудистому ремоделированию и функциональному восстановлению после инсульта и травмы головного мозга (Nayakawa et al., 2012). В условиях ишемии и реперфузии миокарда eЕРС осуществляли протекцию кардиомиоцитов (Chang et al., 2013), индуцировали неоангиогенез и активировали живые резидентные стволовые клетки миокарда, способствуя заживлению и (или) регенерации поврежденного миокарда (Urbich et al., 2005; Iwasaki et al., 2006; Kamata et al., 2014). Влияние на восстановление функции левого желудочка пациентов с инфарктом миокарда интракоронарного введения (в установленный стент) гетерогенной популяции собственных прогениторных клеток из костного мозга и из периферической крови в целом расценено исследователями как благоприятное. Данные подкреплены исследованиями через 1 год и через 5 лет после процедуры (Schachinger et al., 2004; Leistner et al., 2011). Однако следует отметить случай дистальной эмболизации перед клеточной терапией, развития инфаркта миокарда и смерти от кардиогенного шока. Кроме того, в цитируемых работах отсутствует группа сравнения, в которой пациенты не получали бы клеточную трансплантацию, поэтому опубликованные данные сложно интерпретировать.

Во многих клинических исследованиях использовали гетерогенную и недостаточно охарактеризованную популяцию НЕРС, что помимо потенциальной опасности для пациента затрудняет анализ и сравнение уже полученных результатов (Beeres et al., 2008; Peng et al., 2016). Например, в некоторых клинических исследованиях пациентам внутривенно вводили нефракционированный костный мозг или свежeweделенные клетки CD34<sup>+</sup> (Rafii, Lyden,

2003; Sekiguchi et al., 2009). Кроме того, использовали мононуклеарную фракцию костного мозга (Strauer et al., 2002) и нефракционированные клетки костного мозга (Wollert et al., 2004) для интракоронарного введения пациентам с инфарктом миокарда, при этом регистрировали улучшение функциональных показателей левого желудочка. Однако исследования *in vivo* на модели инфаркта миокарда показали, что даже простое использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) не дает очевидных преимуществ перед применением ЕРС и снижает постинфарктное ремоделирование, улучшает сердечные функции и повышает выживаемость после инфаркта. Кроме того, G-CSF активирует ангиогенез и снижает количество апоптотически измененных клеток в периинфарктной зоне (Ohtsuka et al., 2004).

Имеются сообщения о явно негативных последствиях использования eЕРС в терапевтических целях, что выражается в ускорении атеросклеротического процесса и гиперплазии интимы сосудов. Так, в эксперименте на нокаутированных по аполипопротеину E (ApoE) мышцах, которым вводили eЕРС, в отсроченном периоде зарегистрировано формирование атеросклеротических бляшек со сниженной стабильностью (George et al., 2005). Показано, что последствием лечения eЕРС может стать повышение экспрессии проангиогенных генов, что предрасполагает к формированию аномальной гиперплазии интимы и далее — к сосудистому стенозу (Decano et al., 2013), а это подтверждает опасения ученых относительно активизации воспалительного ответа после введения eЕРС.

Имеются объективные причины для предпочтительного использования НЕРС и eЕРС в клинических и пре-клинических исследованиях. Во-первых, процедура получения НЕРС и eЕРС проще, требует меньше времени и соответственно более дешевая по сравнению с выделением LЕРС. Во-вторых, не всегда возможно получить культуру LЕРС из крови пациента из-за крайне низкого содержания в крови циркулирующих негемопоэтических ЕРС. По сообщениям различных авторов, в крови пуповины содержание негемопоэтических ЕРС низкое, а в периферической крови оно еще меньше. Поскольку для иммунной совместимости должны быть использованы аутологичные клетки, пуповинная кровь как источник ЕРС в большинстве случаев может быть исключена.

Количественные данные из литературы, касающиеся содержания НЕРС и негемопоэтических ЕРС в периферической крови, зависят от способа идентификации (количество, сочетание и варианты используемых маркеров; стратегия гейтирования и т. д.). Поскольку для получения eЕРС использовали различные популяции, данные об их количестве сильно различаются. Содержание клеток CD34<sup>+</sup> в периферической крови здоровых молодых людей (33 ± 8 лет) составляет примерно 0.02 % от всех лейкоцитов, у здоровых пожилых людей (66 ± 8 лет) — около 0.01 % (Shaffer et al., 2006), количество клеток CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> находится в пределах 50—100 на 1 млн лейкоцитов (0.005—0.01 %), что составляет около 350—700 кл./мл (Hagensen et al., 2012). Циркулирующих клеток с комбинацией антигенов CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> содержится в 10 раз меньше, чем CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>, что соответствует примерно 0.0005 % от общего числа лейкоцитов (Shaffer et al., 2006).

Содержание клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>, дающих начало LЕРС, в пуповинной и периферической крови значительно ниже, чем предшественников eЕРС, и составляет менее

Сравнительная характеристика двух типов ЕРС

Показатель	eEPC	LEPC
Морфология колоний	В центре клетки округлые, по периферии веретенообразные	Колонии из клеток типа «бульжной мостовой»
Маркеры для детекции в крови	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR <sup>2+</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>-</sup> CD146 <sup>+</sup>
Количество в крови	0.0005 % от числа лейкоцитов	0.01 % от клеток CD34 <sup>+</sup>
Время появления в культуре	До 2 нед	От 2 до 3 нед
Время гибели в культуре	Около 4 нед	Около 12 нед
Клоногенный потенциал	Низкий	Высокий
Пролиферативный потенциал	»	»
Способность связывать UEA-1 и поглощать AcLDL	Да	Да
Общие эндотелиальные маркеры	»	»
Маркеры зрелого эндотелия	Нет	»
Гемопозитические маркеры	Да	Нет
Способность строить трубчатые структуры в Матригеле	Нет	Да
Способность к встраиванию в эндотелий сосудов	»	»
Проангиогенная активность	Да	Нет

0.01 % от клеток гейтированных по CD34<sup>+</sup> (Estes et al., 2010; Tura et al., 2013). В итоге количество клеток CD34<sup>+</sup>CD133<sup>-</sup>CD146<sup>+</sup> среди мононуклеаров пуповинной крови составляет примерно 1 из 5 млн, а в мононуклеарной фракции нормальной периферической крови — приблизительно 1 из 30 млн (Barclay et al., 2012). В настоящее время такое количество находится на границе возможности обнаружения, и поэтому такую клетку можно идентифицировать только после того, как она выросла в культуре.

Основные свойства eEPC и LEPC представлены в таблице.

### Заключение

По-видимому, истинным ЕРС в крови соответствует популяция CD34<sup>+</sup>CD133<sup>-</sup>CD146<sup>+</sup>, которая имеет эндотелиальный фенотип и генотип, обладает значительным пролиферативным и клоногенным потенциалом, *in vivo* может встраиваться в резидентный эндотелий сосудов, способствуя восстановлению сосудистых повреждений. Так называемые eEPC являются гематогенными клетками с иммунной и воспалительной активностью, обладают фенотипом CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR<sup>2+</sup> и оказывают опосредованный ангиогенный эффект, что не позволяет с уверенностью отнести их к ЕРС. Переход eEPC в LEPC при удлинении сроков культивирования невозможен, поскольку они принадлежат к различным клеточным линиям.

Наибольшее количество принципиальных разногласий по основным вопросам (происхождение, источники, фенотип, функциональные свойства, в том числе ангиогенные) касается популяции eEPC. Требуются более четкие критерии для определения ЕРС, основанные на широком диапазоне молекулярных, генетических и функциональных характеристик. Существующие сомнения относительно терапевтической пользы клеточной терапии на основе eEPC при отсутствии данных по использованию в этих целях LEPC определяют необходимость даль-

нейшего всестороннего изучения свойств этих популяций, их поведения в различных органах и на различных моделях с детальной оценкой долгосрочных результатов имплантации. eEPC в клинических исследованиях должны использоваться с крайней осторожностью, согласно основному принципу медицины «не навреди».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-20004).

### Список литературы

- Asahara T., Kawamoto A., Masud H. 2011. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 29 : 1650—1655.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J. M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275 : 964—967.
- Asosingh K., Aldred M. A., Vasanji A., Drazba J., Sharp J., Farver C., Comhair S. A., Xu W., Licina L., Huang L., Anand-Apte B., Yoder M. C., Tudor R. M., Erzurum S. C. 2008. Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Amer. J. Pathol.* 172 : 615—627.
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., Akhtar N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 49 : 32—40.
- Barclay G. R., Tura O., Samuel K., Hadoke P. W., Mills N. L., Newby D. E., Turner M. L. 2012. Systematic assessment in an animal model of the angiogenic potential of different human cell sources for therapeutic revascularization. *Stem Cell Res. Ther.* 3 : 23. Doi: 10.1186/scrt114.
- Bauer S. M., Goldstein L. J., Bauer R. J., Chen H., Putt M., Velazquez O. C. 2006. The bone marrow-derived endothelial progenitor cell response is impaired in delayed wound healing from ischemia. *J. Vasc. Surg.* 43 : 134—141.
- Beeres S. L., Atsma D. E., van Ramshorst J., Schali J. M. J., Bax J. J. 2008. Cell therapy for ischaemic heart disease. *Heart*. 94 : 1214—1226.
- Bogoslovsky T., Chaudhry A., Latour L., Maric D., Luby M., Spatz M., Frank J., Warach S. 2010. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology*. 75 : 2059—2062.



- Bompais H., Chagraoui J., Canron X., Crisan M., Liu X. H., Anjo A., Tolla-Le Port C., Leboeuf M., Charbord P., Bikfalvi A. 2004. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 103 : 2577—2584.
- Case J., Mead L. E., Bessler W. K., Prater D., White H. A., Sadatzadeh M. R., Bhavsar J. R., Yoder M. C., Haneline L. S., Ingram D. A. 2007. Human CD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 35 : 1109—1118.
- Chang Z. T., Hong L., Wang H., Lai H. L., Li L. F., Yin Q. L. 2013. Application of peripheral-blood-derived endothelial progenitor cell for treating ischemia-reperfusion injury and infarction: a preclinical study in rat models. *J. Cardiothor. Surg.* 8 : 33. Doi: 10.1186/1749-8090-8-33.
- Collino F., Deregis M. C., Bruno S., Sterpone L., Aghe-mo G., Viltono L., Tetta C., Camussi G. 2010. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of mirnas. *PLoS ONE*. 5 : e11803.
- Decano J. L., Moran A. M., Giordano N., Ruiz-Opazo N., Herrera V. L. 2013. Analysis of CD45<sup>+</sup>[CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>] endothelial progenitor cells as juvenile protective factors in a rat model of ischemic-hemorrhagic stroke. *PLoS ONE*. 8 : e55222.
- Diller G. P., Thum T., Wilkins M. R., Wharton J. 2010. Endothelial progenitor cells in pulmonary arterial hypertension. *Trends Cardiovasc. Med.* 20 : 22—29.
- Eizawa T., Ikeda U., Murakami Y., Matsui K., Yoshioka T., Takahashi M., Muroi K., Shimada K. 2004. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart*. 90 : 685—686.
- Estes M. L., Mund J. A., Ingram D. A., Case J. 2010. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr. Protoc. Cytom.* 9 : 1—11.
- Fernandez Pujol B., Lucibello F. C., Gehling U. M., Lindemann K., Weidner N., Zuzarte M. L., Adamkiewicz J., Elsässer H. P., Müller R., Havemann K. 2000. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differ.* 65 : 287—300.
- Fuchs S., Hermanns M. I., Kirkpatrick C. J. 2006. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res.* 326 : 79—92.
- Gehling U. M., Ergün S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schäfer B., Hossfeld D. K., Fiedler W. 2000. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 95 : 3106—3112.
- Geng J., Wang L., Qu M., Song Y., Lin X., Chen Y., Mamtilahun M., Chen S., Zhang Z., Wang Y., Yang G. 2017. Endothelial progenitor cells transplantation attenuated blood-brain barrier damage after ischemia in diabetic mice via HIF-1 $\alpha$ . *Stem Cell Res. Ther.* 8 : 163.
- George J., Afek A., Abashidze A., Shmilovich H., Deutsch V., Kopolovich J., Miller H., Keren G. 2005. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 2636—2641.
- Gulati R., Jevremovic D., Peterson T. E., Witt T. A., Kleppe L. S., Mueske C. S., Lerman A., Vile R. G., Simari R. D. 2003. Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury. *Circulation*. 108 : 1520—1526.
- Hagensen M. K., Raarup M. K., Mortensen M. B., Thim T., Nyengaard J. R., Falk E., Bentzon J. F. 2012. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc. Res.* 93 : 223—231.
- Hayakawa K., Pham L. D., Katusic Z. S., Arai K., Lo E. H. 2012. Astrocytic high-mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodeling during stroke recovery. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : 7505—7510.
- Hill J. M., Zalos G., Halcox J. P., Schenke W. H., Waclawiw M. A., Quyyumi A. A., Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 348 : 593—600.
- Hirschi K. K., Ingram D. A., Yoder M. C. 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 : 1584—1595.
- Hosoda T., Zheng H., Cabral-da-Silva M., Sanada F., Ide-Iwata N., Ogorek B., Ferreira-Martins J., Arranto C., D'Amario D., del Monte F., Urbanek K., D'Alessandro D. A., Michler R. E., Anversa P., Rota M., Kajstura J., Leri A. 2011. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a microRNA mechanism. *Circulation*. 123 : 1287—1296.
- Huang L., Hou D., Thompson M. A., Baysden S. E., Shelley W. C., Ingram D. A., March K. L., Yoder M. C. 2007. Acute myocardial infarction in swine rapidly and selectively releases highly proliferative endothelial colony forming cells (ECFCs) into circulation. *Cell Transplant.* 16 : 887—897.
- Hur J., Yoon C. H., Kim H. S., Choi J. H., Kang H. J., Hwang K. K., Oh B. H., Lee M. M., Park Y. B. 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 : 288—293.
- Ingram D. A., Mead L. E., Moore D. B., Woodard W., Fenoglio A., Yoder M. C. 2005. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 105 : 2783—2786.
- Ingram D. A., Mead L. E., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz M. J., Gilley D., Yoder M. C. 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 104 : 2752—2760.
- Ito H., Rovira I. I., Bloom M. L., Takeda K., Ferrans V. J., Quyyumi A. A., Finkel T. 1999. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiotensin. *Cancer Res.* 59 : 5875—5877.
- Iwasaki H., Kawamoto A., Ishikawa M., Oyama A., Nakamori S., Nishimura H., Sadamoto K., Horii M., Matsumoto T., Murasawa S., Shibata T., Suehiro S., Asahara T. 2006. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 113 : 1311—1325.
- Jiang S., Walker L., Afentoulis M., Anderson D. A., Jauron-Mills L., Corless C. L., Fleming W. H. 2004. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 101 : 16 891—16 896.
- Kamata S., Miyagawa S., Fukushima S., Nakatani S., Kawamoto A., Saito A., Harada A., Shimizu T., Daimon T., Okano T., Asahara T., Sawa Y. 2014. Improvement of cardiac stem cell sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: analysis of layer-specific regional cardiac function. *Cell Transpl.* 23 : 1305—1319.
- Kanzler I., Tuchscheerer N., Steffens G., Simsekylmaz S., Korschalla S., Kroh A., Simons D., Asare Y., Schober A., Bucala R., Weber C., Bernhagen J., Liehn E.A. 2013. Differential roles of angiogenic chemokines in endothelial progenitor cell-induced angiogenesis. *Basic Res. Cardiol.* 108 : 310. Doi: 10.1007/s00395-012-0310-4.
- Kovacic J. C., Boehm M. 2009. Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Res.* 2 : 2—15. Doi: 10.1016/j.scr.2008.05.005.
- Koyanagi M., Brandes R. P., Haendeler J., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2005. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.* 96 : 1039—1041.
- Krenning G., van der Strate B. W., Schipper M., van Seijen X. J., Fernandes B. C., van Luyn M. J., Harmsen M. C. 2009. CD34<sup>+</sup> cells augment endothelial cell differentiation of CD14<sup>+</sup> endothelial progenitor cells *in vitro*. *J. Cell Mol. Med.* 13 : 2521—2533.
- Lee P. S., Poh K. K. 2014. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J. Stem Cells*. 6 : 355—366.
- Leistner D. M., Fischer-Rasokat U., Honold J., Seeger F. H., Schachinger V., Lehmann R., Martin H., Burck I., Urbich C., Dim-

- meler S., Zeiher A. M., Assmu B. 2011. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCAREAMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin. Res. Cardiol.* 100 : 925—934.
- Lin Y., Weisdorf D. J., Solovey A., Hebbel R. P. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 105 : 71—77.
- Martí-Fàbregas J., Delgado-Mederos R., Crespo J., Peña E., Marín R., Jiménez-Xarrié E., Fernández-Arcos A., Pérez-Pérez J., Martínez-Domeño A., Camps-Renom P., Prats-Sánchez L., Casoni F., Badimon L. 2015. Circulating endothelial progenitor cells and the risk of vascular events after ischemic stroke. *PLoS ONE.* 10 : e0124895.
- Massa M., Rosti V., Ferrario M., Campanelli R., Ramajoli I., Rosso R., De Ferrari G. M., Ferlini M., Goffredo L., Bertoletti A., Klersy C., Pecci A., Moratti R., Tavazzi L. 2005. Increased circulating hem atopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105 : 199—206.
- Medina R. J., O'Neill C. L., Sweeney M., Guduric-Fuchs J., Gardiner T. A., Simpson D. A., Stitt A. W. 2010. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics.* 3:18. Doi: 10.1186/1755-8794-3-18.
- Mukai N., Akahori T., Komaki M., Li Q., Kanayasu-Toyoda T., Ishii-Watabe A., Kobayashi A., Yamaguchi T., Abe M., Amagasa T., Morita I. 2008. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 314 : 430—440.
- Murayama T., Tepper O. M., Silver M., Ma H., Losordo D. W., Isner J. M., Asahara T., Kalka C. 2002. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization *in vivo*. *Exp. Hematol.* 30 : 967—972.
- Ohtani K., Vlachojannis G. J., Koyanagi M., Boeckel J. N., Urbich C., Farcas R., Bonig H., Marquez V. E., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2011. Epigenetic regulation of endothelial lineage committed genes in proangiogenic hematopoietic and endothelial progenitor cells. *Circ. Res.* 109 : 1219—1229.
- Ohtsuka M., Takano H., Zou Y., Toko H., Akazawa H., Qin Y., Suzuki M., Hasegawa H., Nakaya H., Komuro I. 2004. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J.* 18 : 851—853.
- Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M. C., Hicklin D. J., Witte L., Moore M. A., Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 95 : 952—958.
- Peng X. G., Bai Y., James J. R., Shlapak D. P., Ju S. 2016. Transplanted endothelial progenitor cells improve ischemia muscle regeneration in mice by diffusion tensor mr imaging. *Stem Cells Int.* Article ID: 3641401, 10 p.
- Prokopi M., Pula G., Mayr U., Devue C., Gallagher J., Xiao Q., Boulanger C. M., Westwood N., Urbich C., Willeit J., Steiner M., Breuss J., Xu Q., Kiechl S., Mayr M. 2009. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood.* 114 : 723—732.
- Rafii S., Lyden D. 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 9 : 702—712.
- Rechavi O., Erlich Y., Amram H., Flomenblit L., Karginov F. V., Goldstein I., Hannon G. J., Kloog Y. 2009. Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small rnas. *Genes Develop.* 23 : 1971—1979.
- Rehman J., Li J., Orschell C. M., March K. L. 2003. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 107 : 1164—1169.
- Reinisch A., Hofmann N. A., Obenauf A. C., Kashofer K., Rohde E., Schallmoser K., Flicker K., Lanzer G., Linkesch W., Speicher M. R., Strunk D. 2009. Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function *in vitro* and *in vivo*. *Blood.* 113 : 6716—6725.
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P. H., Verfaillie C. M. 2003. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.* 109 : 337—346.
- Rohde E., Bartmann C., Schallmoser K., Reinisch A., Lanzer G., Linkesch W., Guelly C., Strunk D. 2007. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies *in vitro*. *Stem Cells.* 25 : 1746—1752.
- Schächinger V., Assmus B., Britten M. B., Honold J., Lehmann R., Teupe C., Abolmaali N. D., Vogl T. J., Hofmann W. K., Martin H., Dimmeler S., Zeiher A. M. 2004. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J. Amer. College Cardiol.* 44 : 1690—1699.
- Sekiguchi H., Ii M., Losordo D. W. 2009. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *J. Cell. Physiol.* 219 : 235—242.
- Shaffer R. G., Greene S., Arshi A., Supple G., Bantly A., Moore J. S., Mohler E. R. 2006. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70 : 56—62.
- Strauer B. E., Brehm M., Zeus T. 2002. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 106 : 1913—1918.
- Sukmawati D., Tanaka R. 2015. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine. *Amer. J. Transl. Res.* 7 : 411—421.
- Tagawa S., Nakanishi C., Mori M., Yoshimuta T., Yoshida S., Shimojima M., Yokawa J., Kawashiri M., Yamagishi M., Hayashi K. 2015. Determination of early and late endothelial progenitor cells in peripheral circulation and their clinical association with coronary artery disease. *Int. J. Vasc. Med.* : 2015. Article ID: 674213, 7 p.
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J. M., Asahara T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5 : 434—438.
- Tura O., Skinner E. M., Barclay G. R., Samuel K., Gallagher R. C., Brittan M., Hadoke P. W., Newby D. E., Turner M. L., Mills N. L. 2013. Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells.* 31 : 338—348.
- Urbich C., Aicher A., Heeschen C., Dernbach E., Hofmann W. K., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2005. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 : 733—742.
- Urbich C., Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* 95 : 343—353.
- Urbich C., Heeschen C., Aicher A., Dernbach E., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2003. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108 : 2511—2516.
- Werner N., Kosiol S., Schiegl T., Ahlers P., Walenta K., Link A., Böhm M., Nickenig G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med.* 353 : 999—1007.
- Wojakowski W., Tendera M., Michalowska A., Majka M., Kucia M., Maślankiewicz K., Wyderka R., Ochała A., Ratajczak M. Z. 2004. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 110 : 3213—3220.
- Wollert K. C., Meyer G. P., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H. 2004. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocar-

dial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 364 : 141—148.

Yoder M. C., Mead L. E., Prater D., Krier T. R., Mroueh K. N., Li F., Krasich R., Temm C. J., Prchal J. T., Ingram D. A. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 109 : 1801—1809.

Yoon C. H., Hur J., Park K. W., Kim J. H., Lee C. S., Oh I. Y., Kim T. Y., Cho H. J., Kang H. J., Chae I. H., Yang H. K., Oh B. H., Park Y. B., Kim H. S. 2005. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 112 : 1618—1627.

Zengin E., Chalajour F., Gehling U. M., Ito W. D., Treede H., Lauke H., Weil J., Reichenspurner H., Kilic N., Ergun S. 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 133 : 1543—1551.

Zentilin L., Tafuro S., Zacchigna S., Arsic N., Pattarini L., Sinigaglia M., Giacca M. 2006. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*. 107 : 3546—3554.

Ziegelhoeffer T., Fernandez B., Kostin S., Heil M., Voswinckel R., Helisch A., Schaper W. 2004. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ. Res.* 94 : 230—238.

Поступила 18 XII 2017

#### ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS: IDENTIFICATION, PROPERTIES AND USE POSSIBILITIES: MODERN CONDITION OF THE PROBLEM

V. G. Matveeva,\* L. V. Antonova, O. L. Barbarash

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease, Kemerovo, 650002;

\* e-mail: matveeva\_vg@mail.ru

Endothelial progenitor cells (EPC), which can be obtained from the human peripheral blood, are capable to both active proliferation and differentiation into mature endothelial cells and therefore have been suggested as the promising tool in regenerative medicine and tissue engineering. EPC encompass heterogeneous cell populations; here we focus on the blood-derived EPC. We particularly consider source, differentiation, gene expression profile, phenotype, and functional properties of hematopoietic and non-hematopoietic EPC populations. While the «late» EPC correspond to the angiogenic populations of EPC, «early» EPC resemble immune cells, yet the latter are widely used in both preclinical and clinical studies. Therefore, there is an active discussion on the efficacy of therapy with «early» EPC. Both «early» and «late» EPC populations still require comprehensive functional characterization. For the implementation of EPC therapy and proper evaluation of the long-term results, there is an urgent need in the investigation of EPC-mediated endothelialization and angiogenesis in the blood vessels of different organs.

Key words: endothelial progenitor cells, morphology, phenotype, cultivation, cell therapy.