

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)**

**Применение метода генно-клеточной терапии в лечении больных с хронической
ишемией нижних конечностей**

Санкт-Петербург
2015

Методические рекомендации посвящены методу лечения хронической ишемии IIb-IIIa по Покровскому-Фонтейну нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе. Предлагаемый методический подход важен для улучшения перфузии тканей дистального сосудистого ложа пораженной конечности.

Область применения: сердечно-сосудистая хирургия.

Предназначены для врачей сосудисто-сердечной хирургии, ангиологов. Уровень внедрения: специализированные центры и отделения сосудистой хирургии.

Авторы: В.Д. Каргин, В.Е. Солдатенков, А.В. Чечеткин, С.С. Бессмельцев, Л.П. Папаян, С.В. Волошин, О.Г. Головина, Т.В. Глазанова, О.Е. Розанова, И.Е. Павлова, В.А. Кобилянская, Л.Р. Тарковская, Ж.В. Чубукина, В.В. Бураков, О.А. Смирнова, Т.В. Морозова, А.Г. Титов

Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор И.Г. Дуткевич
доктор медицинских наук А.А. Ганапиев

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства Е.Ю. Хавкиной.22.10.2015, Рег. № 50-2015

Содержание

Введение	4
Область применения.....	6
Обозначения и сокращения.....	7
Основные нормативные положения	8
1 Методики проведения исследований	8
1.1 Критерии отбора больных для лечения	8
1.2 Этапы проведения генно-клеточной терапии	8
1.2.1 Реагенты для проведения иммунологических исследований	9
1.2.2 Методика имплантации стволовых клеток и введения препарата эндотелиального ростового фактора	11
1.3 Материалы и оборудование для обеспечения выполнения генно-клеточной терапии у больных с ХИНК	12
1.4 Оценка результатов.....	13
Заключение	15
Библиография	16
Список исполнителей	17

Введение

Актуальность проблемы лечения прогрессирующей ишемии нижних конечностей обусловлена растущей заболеваемостью атеросклерозом сосудов конечностей и их социальной значимостью. Частота критической ишемии нижних конечностей, свидетельствующей о полной декомпенсации регионарного кровообращения, составляет 500-1000 больных на 1 млн. населения в год [1]. По прогнозам ВОЗ, в ближайшие годы число пациентов с окклюзионными заболеваниями артерий нижних конечностей будет возрастать в год на 5-7% с увеличением смертности с 25% до 60-70% [2]. Высокий процент инвалидизации лиц трудоспособного возраста вследствие заболеваний периферических артерий конечностей свидетельствует о высокой медико-социальной и экономической значимости лечения такой патологии. До настоящего времени реконструктивно-восстановительные операции являются единственным эффективным видом лечения данной категории больных. Однако адекватная хирургическая реваскуляризация артериального русла нижних конечностей оказывается возможной лишь у 37-58% пациентов [3].

У пациентов с прогрессирующей ишемией конечностей при отсутствии показаний для хирургической реваскуляризации стандартная консервативная терапия малоэффективна. В ближайшие сроки от начала лечения положительный результат отмечается лишь у половины пациентов, треть больных является кандидатами на ампутацию, так как не решается главная проблема – отсутствие адекватного кровоснабжения в дистальных отделах пораженной конечности. Поэтому необходим поиск более эффективных методов лечения хронической ишемии нижних конечностей. Перспективным направлением является стимуляция кровообращения дистального русла конечности с применением клеточных и генных технологий за счет развития коллатералей [4, 5, 6].

Активация синтеза ангиогенных факторов роста является естественной реакцией организма на ишемию, призванную восстановить кровоснабжение ткани за счет ремоделирования существующих артериоларных соединений и образования новых сосудов. Тканевая ишемия приводит к включению эндотелиального сосудистого фактора и фактора роста фибробластов, которые связываясь с рецепторами указанных сосудистых факторов клеток, обеспечивают миграцию стволовых клеток в зону ишемии и активацию коллатерального кровотока. Однако терапевтический эффект этих эндогенных белков ограничен по времени из-за короткого периода их жизни. Поэтому для устойчивого и продолжительного действия ангиотрофических факторов целесообразно в зону ишемии

вводить гены указанных факторов, которые будут кодировать их биосинтез в целевой области, потенцируя как миграцию стволовых клеток, так и индуцируя паракринное трофическое действие. Отсюда обоснованным является использование индукторов эндотелиального фактора для активации стволовых эндотелиальных клеток в процессе развития коллатерального кровообращения [7, 8].

Результаты проводимых в настоящее время клинических исследований по оценке эффективности клеточной терапии хронической ишемии с использованием стволовых клеток свидетельствуют о перспективности выбранной лечебной стратегии [7, 8]. Однако окончательных выводов об эффективности клеточной монотерапии сделать не представляется возможным из-за недостаточного материала исследований отдаленных результатов, противоречивости результативности метода. Не изучено сочетанное комплексное применение трансплантаций стволовых клеток периферической крови и сосудистых ростовых факторов [9, 10].

Нами предложен новый метод регенеративной терапии хронической ишемии, обусловленной заболеваниями периферических артерий нижних конечностей, включающий сочетанное применение аутологичных стволовых клеток и генного индуктора эндотелиального сосудистого фактора.

Применение разработанного метода генно-клеточной терапии в лечении атеросклероза артерий нижних конечностей позволит существенно снизить риск развития критической ишемии, риск ампутаций и частоту госпитализаций больных в лечебные учреждения здравоохранения, подведомственных ФМБА России.

Обозначения и сокращения

- АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время
Г-КСФ – гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор
ДБХ – дистанция безболевого ходьбы
ЗБА – задне-большеберцовая артерия
ЗПА – заболевание периферических артерий
ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
СКПК – стволовые клетки периферической крови
ТКНК – транскутанное напряжение кислорода
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФК – функциональный класс
ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей ХСН
ХСН – хроническая сердечная недостаточность
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

Основные нормативные положения

1. Методики проведения исследований

1.1 Критерии отбора пациентов для применения данного метода лечения

пациенты старше 18 лет; клинические проявления ишемии конечности (атеросклероз, тромбангиит) не менее 1 месяца ПА–ШВ стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну; проходимость проксимального артериального русла; наличие неоперабельного (для выполнения открытой или чрезкожной реваскуляризации) дистального поражения артерий нижних конечностей или анатомо-функциональной недостаточности коллатеральных путей кровотока. Обязательно подписание информированного согласия, пациент должен быть способен понять и выполнять суть предлагаемого метода лечения.

Критерии исключения:: острый коронарный синдром или ОНМК в предшествующий месяц; стенокардия IV ФК; ХСН IV ФК Нью-Йоркской Ассоциации Кардиологов NYHA; неконтролируемая инфекция; онкологические заболевания, в т.ч. в анамнезе; тяжелая почечная и печеночная недостаточность; дыхательная недостаточность III ст; нефротический синдром; полиорганная недостаточность; наличие алкогольной или наркотической зависимости. Выраженность ишемии определяется с помощью дуплексного ангиографического сканирования и на основании параметров лопаточного-плечевого индекса, равного от 0,7-0,6 (ПА ст.) до 0,4-0,5 (ШВ), а также дистанции безболевой ходьбы.

1.2 Этапы проведения генно-клеточной терапии

1. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга пациента.
2. Оценка эффективности процедуры стимуляции.
3. Проведение операции эксплантации мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови пациента.
4. Иммунологическая характеристика и выделение концентрата моноклеарных стволовых клеток с маркером CD34+.
5. Введение полученных стволовых клеток периферической крови (СКПК) больному с хронической ишемией нижних конечностей.

С целью профилактики тромботических осложнений показано применение антикоагулянтных препаратов - клексан 0,4-0,6 мл / фраксипарин 0,3-0,6 мл подкожно 1 раз в сутки в течение всего срока проводимого лечения.

Этап 1. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга пациента.

Процедура мобилизации СКПК у данной категории пациентов проводится в соответствии со стандартным монорежимом с использованием гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ), например филграстима, используемого для доноров аллогенных СКПК и реципиентов аутологичных стволовых клеток периферической крови. Филграстим в дозе 10 мкг на килограмм массы тела больного вводится подкожно в течение 3-х последовательных дней.

Этап 2. Оценка эффективности процедуры стимуляции.

Гематологический ответ больного на стимуляцию оценивается по показателям гемограммы и содержанию CD34+-клеток по данным проточной цитометрии. Исследование проводится на проточном лазерном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («BeckmanCoulter», США или другого производителя со сходными характеристиками) с использованием набора реагентов «Stem-KIT Reagents» («BeckmanCoulter», США или другого производителя со сходными характеристиками). Последний включает в себя моноклональные антитела CD45-FITC / CD34-PE, CD45-FITC / ISOCLONIC CONTROL – PE, витальный краситель 7-AAD, суспензию счётных частиц Stem-CountFluorospheres, лизирующий буфер. CD45-панлейкоцитарный маркер, его использование позволяет детектировать лейкоциты и исключать из рассмотрения тромбоциты и эритроциты. Краситель 7-AAD (7-аминоактиномицин D) проникает в ядра повреждённых (нежизнеспособных) клеток, что дает возможность отличить жизнеспособные клетки от погибших. Анализ учета CD34+-клеток проводится в модифицированном протоколе ISHAGE (определяет процентное содержание, абсолютное и клеточность) содержания гемопоэтических стволовых клеток в периферической и пуповинной крови, костном мозге, лейкоцитаферезном концентрате и включает: моноклональные антитела CD45-FITC/CD34-PE для определения CD34+ клеток; CD45-FITC/ISOCLONIC CONTROL-PE для исключения неспецифического связывания; счетные частицы Stem-Count Fluorospheres для определения абсолютного содержания CD34+клеток в пробе; 7AAD-витальный краситель, с помощью которого из анализа исключаются все поврежденные клетки (клетки, находящиеся в апоптозе и некрозе); лизирующий буфер.

1.2.1 Реагенты для проведения иммунологических исследований

1. Моноклональные антитела CD45-FITC/CD34-PE Reagent (45/34) – 1 флакон
2. Моноклональные антитела CD45-FITC/IsoClonic Control-PE Reagent (45/CTRL) – 1 флакон
3. Счетные частицы Stem-Count Fluorospheres – 1 флакон
4. Витальный краситель 7AAD Viability Dye – 1 флакон

5. Лизирующий буфер 10 x NH₄Cl Lysing Solution – 2 флакон

Хранение. Набор реагентов следует хранить при температуре 2-8° С.

Материалом исследования являются клетки венозной периферической крови и лейкоциты, полученные путем афереза, стабилизированные антикоагулянтом (гепарин(25 Ед/мл) или EDTA).

Методика включает следующие этапы:

- В 3 стандартные цитометрические пробирки объемом 5 мл вносили по 20 мкл моноклональных антител в следующих сочетаниях:

(1) CD45-FITC / CD34-PE ; (2)CD45-FITC / CD34-PE; (3)CD45-FITC / ISOCLONIC CONTROL – PE.

- В каждую пробирку добавляли по 20 мкл 7-AAD.

- В каждую пробирку вносили по 100 мкл хорошо перемешанного образца (концентрация лейкоцитов не должна превышать 15-30x10⁹клеток/л).

- Инкубировали 20 мин при комнатной температуре (20-22° С) в темноте.

- После инкубации во все пробирки добавляли по 2 мл рабочего лизирующего раствора, тщательно перемешав на вортексе.

- Инкубировали 10 мин при комнатной температуре (20-22° С) в темноте.

- Перемешивали суспензию счётных частиц Stem-Count Fluorospheres в течение 10-12 секунд и после инкубации вносили в каждую пробирку по 100 мкл.

- Анализ проводили на проточном цитофлуориметре сразу после завершения пробоподготовки.

Этап 3. Проведение операции эксплантации мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови пациента.

Процедура лейкоцитафереза осуществляется на 4-й день от начала введения филграстима на аппарате Haemonetics® MCS® + LN 900-220E (далее “Аппарат”) с использованием протокола PBSC (стволовые клетки периферической крови) и стандартными параметрами сбора через венозный доступ (кубитальная вена). На основании параметров вводимых в гемокалькулятор Аппарата (пол, рост и вес пациента, гематокрит) и полученного на нем (расчетного) объема циркулирующей крови (ОЦК) необходимо установить максимальный экстракорпоральный объем, составляющий 15% ОЦК. Должен быть установлен минимальный для данного Аппарата объем удаляемой плазмы – 30 мл. В качестве антикоагулянта используется стандартный раствор АСD-А, соотношение антикоагулянта к объему крови – 1:9. Технические параметры протокола PBSC (давление в манжете, скорость забора крови, скорость рециркуляции, скорость сбора, скорость возврата, окно

сбора) должны соответствовать стандартным требованиям Руководства по использованию Аппарата.

Окончанием процедуры лейкоцитафереза считается рециркуляция, а соотношение рециркуляция/циклы устанавливается как 1:4 или 1:5. Конечный объем продукта, содержащего СКПК и удовлетворяющий целям исследования, должен быть задан интервалом 50-60 мл. По окончании инвазивной процедуры накладывается асептическая повязка. Для каждого пациента составляется индивидуальный протокол операции лейкоцитафереза в соответствии с типовым.

Этап 4. Тестирование гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в лейкоцитаферезном концентрате: методика учета CD34+-клеток выполняется с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии. Проводится подсчет общего количества лейкоцитов, абсолютного содержания CD34+ в расчете $\times 10^9/\text{л}$, а также относительно их содержания в %. Определяется процент витальности ст-воловых клеток. Среднее содержание эксплантируемых СК составляет $2,337 \times 10^7/\text{л}$ CD34+ клеток.

1.2.2 Методика имплантации стволовых клеток и введения препарата эндотелиального ростового фактора

Этап 5. Методика введения полученных стволовых клеток периферической крови (СКПК) больному с хронической ишемией нижних конечностей. Премедикация – кетонал 1,0 мл внутримышечно. Процедура осуществляется в условиях операционной, с соблюдением требований асептики и антисептики. Положение пациента на животе, валик по голеностопный сустав. Обработка кожи стопы, голени и коленного сустава. Производится маркировка проекции малой подкожной вены, точек пункций области головок икроножных мышц числом до 30-35 для введения суспензии стволовых клеток CD4+. Введение взвеси СКПК осуществляется внутримышечно в область икроножных мышц проблемной конечности. Процедура выполняется инъекцией клеточной суспензии по 1 мл, под контролем ультразвукового сканирования (УЗИ, Aloka 1700, программа MS, линейный датчик 7,5 МГц). Расстояние между пункциями и их глубина определяется под контролем УЗИ. Применяются инъекционные иглы G29 без лазерного усиления эхосигнала. Введение взвеси СКПК производится строго субфасциально, на глубину введения (от 10 мм до 15 мм), распределяя СКПК в мышечной ткани. Средняя доза введения пациенту составляет $2,337 \times 10^7/\text{л}$ CD34+ клеток. С учетом данных экспериментальных исследований, показавших, что сохранность имплантированных стволовых клеток к 5 дню составляет лишь 5-10% и, следовательно, резко снижается уровень эндотелиального сосудистого ростового фактора (VEGF) в зоне ишемии, для

продолжения ангиотрофического эффекта через 3-4 суток после клеточной операции показано введение препарата VEGF «Неоваскулген» в дозе 1,2 мг.

В условиях чистой перевязочной после обработки антисептиком препарат после разведения 5,0 мл 0,9% раствором натрия хлорида в прилагаемом фирменном флаконе инъецируется из приблизительно 6 вколов в область икроножных мышц по методике проведения клеточной имплантации. По окончании инвазивной процедуры аспетическая повязка.

1.3 Материалы и оборудование для обеспечения выполнения генно-клеточной терапии у больных с ХИНК

Лекарственные препараты, расходные материалы, наборы для иммунологического типирования, необходимые для обеспечения комплекса мероприятий по выполнению клеточной терапии приведены в таблице 1.

Таблица 1 Перечень материалов и оборудования, рекомендованный для реализации предлагаемой методики.

	Наименование	Характеристика (каталожный номер или ГОСТ, модель, производитель)
1	2	3
1	Клексан, раствор для инъекций 40 мг, № 10	Sanofi Aventis, регистр.№ П№01462/01
2	Лейкострим (филграстим) 480 мкг	ЗАО «Бокад», Россия
3	Расходные системы для сепарации стволовых клеток перифрической крови	REF 971 E
4	Цитофлуориметр «Cytomics FC 500»	«BeckmanCoulter», США или другого производителя со сходными характеристиками
5	Аппарат Haemonetics® MCS®	LN 900-220E
6	Набор реагентов «Stem-KIT Reagents»	«BeckmanCoulter», США или другого производителя со сходными характеристиками
7	Раствор ACD-A, 500 мл	LN 900-220E
8	Спирт этиловый, этанол	ГОСТ 18300-87
9	Шприц стерильный, одноразовый с иглой 26G× ¹ / ₂ , №30.	SFM, Германия
10	Перчатки стерильные, латексные	Medical SDN, Малайзия
11	«Неоваскулген» 1,2 мг, лиофилизат для приготовления раствора	ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

12	Набор для типирования стволовых клеток, исследования VEGF	Stem-kit Reagents 50 tests
----	---	----------------------------

Продолжение таблицы №1 Перечень материалов и оборудования, рекомендованный для реализации предлагаемой методики

1	2	3
13	Расходные материалы к транскутанным мониторам серии TCM4	Фирма «Радиометр» (Дания)

1.4. Оценка результатов

Применение Г-КСФ филграстима с целью мобилизации стволовых клеток из костного мозга в периферическую кровь может быть сопряжено с активацией гемостаза и риском возникновения тромботических осложнений. Этот риск усугубляется проведением последующих операций лейкоафереза и пересадкой взвеси моноклеарных стволовых клеток. Данные коагуляционных изменений у пациентов с ХИНК после применения аутологичных стволовых клеток указаны в таблице 2.

Таблица 2 Скрининговые показатели коагулограммы у больных после аутоклеточной терапии. (Me, 25 й и 75 й перцентили) оценку достоверности различий между двумя независимыми проводили с использованием критерия Манна-Уитни, различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Показатель	Значения до терапии	Значения после терапии	p
Фактор Виллебранда, %	155,0 (140,0 – 195,0)	260,0 (230,0 – 300,0)	0,0004
Индекс АПТВ	0,9 (0,87 – 1,0)	0,89 (0,82 – 0,9)	0,03
Концентрация фибриногена, г/л	3,2 (2,3 – 3,4)	3,4 (3,2 – 4,7)	0,03
Число активных форм тромбоцитов	28,8 (28,0 – 33,5)	30,0 (27,0 – 34,0)	0,4

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что общим для пациентов с хронической ишемией нижних конечностей является достоверное увеличение по сравнению с нормой активности фактора Виллебранда, повышение показателей внутрисосудистой активации тромбоцитов. Однако знаковым изменением следует считать значимое ($p=0,0004$)

повышение значений активности фактора Виллебранда непосредственно после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, как маркера эндотелиальных клеток. Логично предположить, что это обусловлено увеличением количественного потенциала эндотелиальных предшественников за счет пересадки стволовых клеток с маркером CD 34+ и является предпосылкой ожидаемой эффективности аутоклеточной терапии. Выявленная активация гемостаза подтверждает необходимость применения антикоагулянтов (низкомолекулярных гепаринов) в период выполнения всех этапов генно-клеточной терапии.

Показатели, иллюстрирующие эффективность рекомендуемой методики стимуляции ангиогенеза, представлены в таблице 2, в которой дано сравнение исходных показателей функции конечности и результатов 3-х летних наблюдений больных с ХИНК.

Таблица 3 Клинико-инструментальные данные результатов применения методики клеточной терапии.

Показатели	ДБХ	ЛПИ	ЗБА
Исходные	(n=18) 186,66±128,0 м	(n=18) 0,46±0,26	(n=18) 7,97±9,65 см/с (p=0,0328)
Результаты клеточной терапии через 3года наблюдения	632,77±467,21 м (p=0,0007) □	0,60±0,19 м (p=0,011) □	10,40±7,98 см/с (p=0,0324) □

□ □ достоверное отличие от исходных показателей;

Представленные данные (таблица 3) иллюстрируют более чем 3 кратное достоверное увеличение дистанции без болевой ходьбы через 3 года после клеточной терапии, свидетельствующее об улучшении интегральной функции конечности. Несомненный интерес среди полученных результатов представляет положительная динамика сонографических показателей кровотока в дистальных отделах проблемной конечности. Увеличение на 23% значения ЛПИ можно рассматривать как признак повышения коллатерального кровообращения. Этот вывод подтверждается возрастанием на 23,3% кровотока по задне-большеберцовым артериям, причем у 4-х из 18 пациентов этот показатель до лечения был нулевым.

Заключение

Предложен новый метод ангиотропной терапии хронической ишемии, обусловленной заболеваниями периферических артерий нижних конечностей, включающий сочетанное применение аутологичных стволовых клеток и генного индуктора эндотелиального сосудистого фактора.

Применение разработанного метода генно-клеточной терапии в лечении атеросклероза артерий нижних конечностей позволит существенно снизить риск развития критической ишемии, больших ампутаций и частоту госпитализаций больных в лечебные учреждения здравоохранения, подведомственных ФМБА России.

Библиография

- [1] Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. – М.: Медицина, 1997. – 40 с.
- [2] European working group on leg ischemia. Second european consensus document on chronic leg ischemia // *Circ.* – 1991. – Vol. 84. – P. 1-26.
- [3] Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) / С.В. Лебедев, А.В. Карасев, В.В. Кунгурцев и др. // *Вестник РАМН.* – 2013. – №3. – С. 1-44.
- [4] Therapeutic angiogenesis for patient with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and randomized controlled trial/ E. Tateishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara et al. // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360. – P. 427- 435.
- [5] Шойхет Я.Н., Хореев Н.Г. Клеточные технологии в лечении заболеваний периферических артерий // *КТТИ.* – 2011. – №3. – С. 15-23 .
- [6] Clinical study of therapeutic angiogenesis bu autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs / A. Kawamura, H. Horie, Isuda et al. // *J. Artif. Organs.* – 2006. – Vol. 9. – P. 226-233.
- [7] Autologous transplantat in of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lover extremity / P.P. Huang, S.Z. Li, M.Z. Ha et al. // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 791. – P. 606-609.
- [8] Fadini G.P., C. Agostini C., Avogaro A.. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 209, № 1. – P. 10-17.
- [9] Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (the TAMPAD study) / T. Bartsch, M. Brehm, T. Zeus et al. // *Clin. Res. Cardiol.* – 2007. – Vol. 96 – P. 891-899.
- [10] Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial inpatients with advanced limb ischemia / R.B. Van Tongeren, J.F. Hamming, W.E. Fibbe et al. // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino).* – 2008 – Vol. 49. – P. 51-58.