

РОЛЬ РЕЦЕПТОРА-2 VEGF (KDR/Flk-1) В КАРДИОМИОГЕНЕЗЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНЫХ РЕАКЦИЯХ

Мешков И.О., Новоселова Е.И., Бушманова Г.М., Семенов Д.Е.

ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

Представлены современные данные о роли рецептора-2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2, KDR/Flk-1) в кардиомиогенезе и цитопротекторных реакциях. Показано, что функционирование рецептора VEGFR-2 на протяжении эмбриогенеза является критическим для развития организмов, поскольку нокаут гена Flk-1, кодирующего белок-рецептор VEGFR-2, на ранних стадиях эмбриогенеза приводит к гибели эмбрионов мышей из-за недостаточного образования в зародыше гемопоэтических и эндотелиальных клеток и отсутствия нормально сформированных кровеносных сосудов. На более поздних стадиях эмбриогенеза доказано участие VEGFR-2 в формировании предсердно-желудочковых клапанов сердца. Усиление регенераторного потенциала и кардиомиогенной направленности культивируемых мезенхимальных стволовых клеток достигается путем повышения в них экспрессии VEGFR-2. В экспериментах на крысах показано, что введение животным таких клеток предотвращает выраженные постинфарктные структурные изменения левого желудочка. Усиление экспрессии VEGFR-2 в кардиомиоцитах выявлено и в других моделях повреждения миокарда, в частности при моделировании антрациклиновой кардиомиопатии.

Ключевые слова: миокард, кардиомиогенез, регенерация, VEGFR-2/KDR/Flk-1, клеточная терапия

ROLE OF VEGFR-2 (KDR/Flk-1) IN CARDIOMYOGENESIS AND CYTOPROTECTIVE REACTIONS

Meshkov I.O., Novoselova E.I., Bushmanova G.M., Semenov D.E.

Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

Contemporary data on the role of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2, KDR/Flk-1) in cardiomyogenesis and cytoprotective reactions are presented. It is shown that the functioning of VEGFR-2 during embryogenesis is critical for the development of organisms, since the Flk-1 gene knockout in the early stages of embryogenesis leads to the death of mouse embryos due to the lack of formation of hematopoietic and endothelial cells in the fetus and the absence of normally formed blood vessels. In the later stages of embryogenesis the involvement of VEGFR-2 in the formation of the atrioventricular valves of the heart was proved. Enhancing the regenerative potential and cardiomyogenic lineage of cultured mesenchymal stem cells is done by increasing in them the expression of VEGFR-2. In experiments on rats it was shown that the injection of such cells into animals prevents post-infarction pronounced structural changes of the left ventricle. An increased expression of VEGFR-2 in cardiomyocytes also was identified in other models of myocardial damage, in particular, when modeling anthracycline cardiomyopathy.

Keywords: myocardium, cardiomyogenesis, regeneration, VEGFR-2/KDR/Flk-1, cell therapy

Белок VEGFR-2 (другие названия – Flk-1, KDR) является основным рецептором, опосредующим передачу сигнала от лиганда VEGF как в эндотелиальных клетках, так и в клетках других типов. Функционирование рецептора VEGFR-2 на протяжении эмбриогенеза является критическим для развития организмов. Нокаут гена *Flk1*, кодирующего белок-рецептор VEGFR-2, приводит к гибели эмбрионов мышей в период между 8,5–9,5 днями. Причиной гибели эмбрионов является образование в зародыше недостаточного количества гемопоэтических и эндотелиальных клеток-предшественников. Более того, у эмбрионов с выключенной экспрессией гена Flk-1 вплоть до момента гибели не наблюдаются нормально сформировавшиеся кровеносные сосуды [15, 18].

Длительное время считалось, что VEGF, являющийся сильным митогеном, влияет

преимущественно на инициацию ангиогенеза/васкулогенеза. Однако в последнее время получила развитие концепция о критической роли сигналинга через рецептор VEGFR-2 для широкого спектра физиологических и патологических процессов, включая канцерогенез, сердечно-сосудистую патологию, офтальмологические проблемы [4]. Образование комплекса VEGFR/VEGFR-2 необходимо для активации основных звеньев морфогенеза сосудов – стимуляции пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [2]. В разных тканях и разных видах опухолей регистрируется различный уровень экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2, что открывает новые возможности для таргетной терапии [22].

Детальные исследования роли рецептора VEGFR-2 в эмбриональном развитии проводились с помощью химерных эмбрионов, у которых присутствовали эмбриональные стволовые клетки с генотипом *Flk1*^{-/-}. Показано, что проведение сигналов через VEGFR-2 необходимо для миграции гемангиобластов из области примитивной полоски в желточный мешок, где они формируют островки кроветворения [16]. В экспериментах с эмбриональными стволовыми клетками с генотипом *Flk1*^{-/-} установлено, что их дифференцировка *in vitro* в гемопоэтические и эндотелиальные клетки существенно замедлена по сравнению с интактными стволовыми клетками [15]. На более поздних стадиях эмбриогенеза доказано участие VEGFR-2 в формировании предсердно-желудочковых клапанов [23]. Проведение сигнала через рецептор необходимо для превращения эндокардиальных валиков, расположенных в предсердно-желудочковом канале, в зрелые удлиненные пластинки сердечного клапана.

Параллельно с изучением роли VEGFR-2 в эмбриональном развитии проводились исследования по выяснению роли этого рецептора в дифференцировке клеток и гистогенезе. В конце 1990-х – начале 2000-х гг. был разработан метод, позволявший вызывать экспрессию рецептора VEGFR-2 на поверхности недифференцированных стволовых клеток. Из таких эмбриональных стволовых клеток в особых условиях культивирования образовывались Flk-1⁺-клетки (т.е. несущие на своих мембранах рецептор VEGFR-2), способные к дифференцировке в перициты и эндотелиоциты. После преобразования эмбриональных стволовых клеток в Flk-1⁺-клетки стало возможным также получение из одной такой клетки популяции кардиомиоцитов [26, 27]. Эти результаты неоднократно подтверждались другими исследователями, проводившими опыты со стволовыми клетками, которые были получены из различных источников. Так, при сравнении дифференцировочных потенциалов мультипотентных стволовых клеток зародышевой линии, эмбриональных стволовых и эмбриональных половых клеток в возможностях их направленной дифференцировки в кардиомиоциты и эндотелиальные клетки через 4 дня после индукции дифференцировки *in vitro* у 30–40% клеток каждого исследуемого типа на мембранах обнаруживались рецепторы

VEGFR-2 [3]. В дальнейшем в клетках с VEGFR-2 отмечались признаки дифференцировки в кардиомиоциты и эндотелиальные клетки.

В настоящее время VEGFR-2 (Flk-1) наряду с другими транскрипционными факторами, такими как Isl-1 и Nkx2.5, относят к ранним маркерам кардиомиогенеза [7] или к ранним мезодермальным маркерам [13]. Показано, что субпопуляция прогениторных клеток с фенотипом CXCR4(+)/Flk-1(+) в отличие от CXCR4(-)/Flk-1(-) активно экспрессирует такие транскрипционные факторы кардиомиогенной дифференцировки, как Mef2C, Myocardin, Nkx2.5. На этом основании авторы полагают, что наличие такой пары биомаркеров, как CXCR4/Flk-1, в плюрипотентных стволовых клетках свидетельствует об их вероятной дифференцировке в направлении кардиомиоцитов [13].

Сигнал, проходящий через VEGFR-2, влияет на многие стороны жизнедеятельности клетки, его дальнейшее распространение происходит сразу по нескольким независимым путям. Особый интерес представляет реализация цитопротекторной функции VEGF, которая осуществляется через внутриклеточный сигнальный путь Flk-1/PI3K/Akt, участвующий в регуляции роста, дифференцировки и выживания клеток [20]. Показано, что для многих клеточных типов активация Akt-сигналинга является достаточным условием для блокирования апоптоза благодаря взаимодействию этой киназы с белками семейства Bad, транскрипционными факторами семейства FKHR и IKK α [19]. Кроме того, Akt способствует поступлению глюкозы в клетку, индуцируя мембранную транслокацию транспортного белка GLUT4, и усиливает синтез гликогена, взаимодействуя с гликогенсинтазой GSK-3, т.е. участвует в обеспечении внутриклеточного энергетического гомеостаза [29]. Наконец, Akt регулирует клеточный цикл и старение клеток через модулирование активности таких факторов, как E2F, p21, MDM2 и обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT) [19].

Добавление некоторых сигнальных молекул (в частности, активина A) к культуре эмбриональных клеток, которые культивируются совместно со стромальными клетками, стимулирует развитие клеток с фенотипами Flk-1(+)/PDGFR α (+) (ранние мезодермальные клетки) и Flk-1(+)/PDGFR α (-) (клетки боковой мезодермы) [8]. Flk-1(+)-мезодермальные клетки в дальнейшем дифференцируются в CD41(+) эндотелиальные клетки, которые обладают преимущественно гемопозитическим потенциалом. Более того, именно Flk-1(+)/PDGFR α (+)-клетки (но не Flk-1(+)/PDGFR α (-)-клетки) генерируют гемопозитические с бимодальными характеристиками. Некоторые из клеток-предшественников, коэкспрессирующих эти маркеры, могут селективно вовлекаться в кардиогенез, а выделение клеток, произошедших от эмбриональных клеток с такими маркерами, будет способствовать более эффективному кардиомиогенезу при клеточной терапии.

Трансплантация Flk-1-положительных мультипотентных стволовых клеток

зародышевой линии в поврежденный миокард мышей (инъекции в пограничную область между нормальной и зарубцевавшейся тканью), у которых была вызвана ишемическая сердечная недостаточность, через 4 недели обуславливала выраженное увеличение толщины стенки левого желудочка в области инфаркта, повышение фракции выброса и максимальной систолической скорости миокарда левого желудочка [10]. Несмотря на то что число кардиомиоцитов, произошедших из Flk-1-положительных клеток, оказалось недостаточным для существенных изменений функции сердца, у животных с трансплантированными клетками наблюдался более интенсивный ангиогенез вокруг зон ишемии по сравнению с таковым у контрольных животных.

При исследовании Flk-1-положительных клеток, которые получали из плюрипотентных стволовых клеток человека и эмбрионов мыши, установлено, что на поверхности некоторых из них присутствует рецептор к вирусу Коксаки и аденовирусу (coxsackievirus and adenovirus receptor – CAR) [14]. Этот рецептор является белковой молекулой, отвечающей за межклеточные контакты. Выделены клеточные популяции с фенотипами Flk-1(+)CAR(-) и Flk-1(+)CAR(+), эффективно формирующие популяции гемопоэтических клеток и кардиомиоцитов соответственно. Следовательно, по результатам исследований был выявлен новый маркер, по которому можно отделять Flk1-положительные мезодермальные клетки, способные давать начало колониям кардиомиоцитов.

Результаты представленных работ свидетельствуют о важности оценки уровня экспрессии VEGFR-2 в клеточных культурах, которые подготавливают в качестве материала для трансплантата в пораженное сердце [21]. Наличие на поверхности клеток рецептора VEGFR-2 позволяет отбирать их с целью последующего воспроизводства популяции клеток — предшественников кардиомиоцитов.

Определение уровня экспрессии VEGFR-2 целесообразно не только в клеточных популяциях, проходящих трансдифференцировку в кардиомиоциты, но и в пораженном патологическим процессом миокарде, в который вводят стволовые клетки. При моделировании инфаркта миокарда у крыс путем перевязки передней левой нисходящей артерии с введением в пораженную ишемией зону клеток костного мозга через 1, 3, 7, 14 и 28 суток выявлена экспрессия VEGF и VEGFR-2 в очаге инфаркта и пограничной зоне [28].

С помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии показано, что экспрессия VEGF и VEGFR-2 возрастает в кардиомиоцитах, расположенных в зонах инфаркта и пограничной области. Методом ОТ-ПЦР установлено, что уровень экспрессии мРНК VEGF и VEGFR-2 выше в сердцах животных экспериментальной группы по сравнению с аналогичным показателем животных контрольной группы. Причем в экспериментальной группе экспрессия мРНК и белка VEGFR-2 с 1-го по 7-й день после трансплантации была

выше, чем в контрольной группе. На 14-й день уровни экспрессии мРНК и белка VEGFR-2 в экспериментальной группе выросли по сравнению с предыдущими днями и тем более по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. На 28-й день после трансплантации в обеих группах наблюдалось снижение экспрессии мРНК и белка VEGFR-2. При этом на 7-й, 14-й и 28-й день у животных, перенесших трансплантацию, значения показателя dp/dt были достоверно выше, чем у контрольных. Эти данные свидетельствуют о том, что пересадка клеток способствует частичному восстановлению нормальной функции пораженного сердца. После 14-го дня в пересаженных клетках костного мозга начинали обнаруживаться специфические маркеры, характерные для кардиомиоцитов или эндотелия сосудов [28]. Результаты этого исследования ясно указывают на то, что по уровню экспрессии VEGFR-2 на поверхности кардиомиоцитов и клеток трансплантата можно судить об эффективности клеточной терапии.

В исследовании с использованием мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга мыши, геном которой был модифицирован геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок, культуры одних клеток выдерживали в условиях гипоксии (0,5% содержание кислорода) в течение 24 ч, другие – при нормальном содержании кислорода [9]. У подопытных крыс вызывался инфаркт миокарда, затем в область миокарда, пограничную с пораженным участком, вводили «экспериментальные» и «контрольные» популяции клеток. Состояние и размеры очага инфаркта, функцию сердца оценивали спустя 6 недель после трансплантации. Выдерживание клеток в условиях недостатка кислорода привело к повышению в них выработки VEGF, VEGFR-2 и ряда белков, отвечающих за усиление жизнеспособности клеток. В образцах ткани, куда пересаживались клетки из «экспериментальных» популяций, обнаруживались более интенсивный ангиогенез и лучшее заживление поврежденного участка миокарда по сравнению с образцами, в которые пересаживали клетки из «контрольных» популяций. Данные функциональных исследований свидетельствовали о том, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток предотвращала выраженные структурные изменения левого желудочка.

При оценке регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток и CD34-положительных клеток у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда значимое уменьшение очагов инфаркта и амплитуды зубца Т на электрокардиограмме выявлено только при использовании CD34-положительных клеток [17]. В обеих группах крыс после клеточной терапии очаги инфаркта и кардиосклероза были меньше, чем у нелеченых особей. С помощью ОТ-ПЦР показано, что введение CD34-положительных клеток сопровождалось значительным повышением уровня экспрессии генов *VEGF* и *VEGFR-2*, а также генов, кодирующих ангиопоэтин-1 и белок-рецептор к нему. Эти показатели были ниже у крыс,

которым вводили мезенхимальные стволовые клетки; еще более низкими эти показатели были у нелеченых животных с инфарктом миокарда [17]. Полученные данные указывают на то, что эффективность клеточной терапии ассоциирована с повышением экспрессии VEGFR-2 в миокарде реципиентов.

В экспериментах с использованием Flk-1-положительных и Flk-1-отрицательных клеток (селектированных при культивировании клеток из перикардиальной жировой ткани) у крыс с воспроизведенным инфарктом миокарда установлено, что трансплантация Flk1-положительных клеток приводила к более выраженной структурной регенерации миокарда по сравнению с трансплантацией Flk-1-отрицательных клеток или отсутствием клеточной терапии [12, 25]. Другими словами, Flk-1-положительные клетки обладают более выраженными потенциями в отношении кардиомиогенеза и восстановления пораженных участков миокарда, чем Flk-1-отрицательные клетки. Результаты этого и других исследований свидетельствуют о том, что перикард и его жировая ткань являются одними из депо Flk-1-положительных клеток и играют важную роль в регенерации ишемизированного миокарда [25].

Применение ресвератрола (полифенола), как показано при моделировании инфаркта миокарда у крыс, значительно усиливает экспрессию VEGF и его тирозинкиназного рецептора Flk-1 [6]. Предварительное использование ресвератрола сопровождается также увеличением продукции NO-синтазы (индуцибельной и эндотелиальной NOS) и антиапоптотического и проангиогенного факторов – ядерного фактора NF-κB и белка специфичности (SP)-1. На фоне этого происходит увеличение плотности капиллярной сети и улучшение функции левого желудочка.

Цитопротекторная роль сигналинга через Flk-1 была подтверждена в экспериментах с изолированными сердцами, полученными от мышей дикого типа (WT) и гетерозигот Flk-1(+/-) и подвергнутыми ишемическому воздействию в течение 30 мин с последующей реперфузией в течение 2 ч [24]. В миокарде мышей-гетерозигот с фенотипом Flk-1(+/-) на 50% была снижена экспрессия мРНК Flk-1 по сравнению с контрольными животными и замедлено восстановление функциональной активности левого желудочка через 2 ч реперфузии. Более того, у нокаутных мышей Flk-1(+/-) были увеличены размеры очага инфаркта (38,4% против 28,4% в контроле, $p < 0,05$), регистрировалось большее количество апоптотических кардиомиоцитов (495 против 213). Установлено также, что цитопротекторный эффект preconditionирования у нокаутных мышей был заметно снижен по сравнению с животными дикого типа.

Усиление экспрессии VEGFR-2 (KDR/Flk-1) в кардиомиоцитах выявлено и в других моделях повреждения миокарда, в частности при моделировании антрациклиновой

кардиомиопатии [1]. По данным иммуногистохимического исследования развитие антрациклиновой кардиомиопатии сопровождается усилением экспрессии KDR/Flk-1 в кардиомиоцитах (индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов возрастает в 7 раз по сравнению с контролем). Предполагается, что усиление экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах связано с активацией цитопротекторных реакций в ответ на повреждающее воздействие доксорубицина.

Следует особо отметить, что кардиотоксичность различных схем химио- и радиотерапии по-прежнему остается очень серьезной проблемой. В последнее время стало появляться большое количество новых лекарственных препаратов с так называемым таргетированным действием, которые представляют собой преимущественно моноклональные антитела и тирозинкиназные ингибиторы [5]. Цитотоксические свойства таких препаратов существенно отличаются от традиционных химиотерапевтических препаратов. Среди нового класса лекарственных веществ представлены ингибиторы лиганда VEGF и его рецептора VEGFR-2, терапевтическая эффективность которых проявляется в угнетении ангиогенеза («сосудистой токсичности»). Кардиотоксические эффекты таких препаратов проявляются в аритмиях, ишемических расстройствах (возможно, в инфарктах), гипертензии, тромбоэмболиях, дисфункции левого желудочка и развитии сердечной недостаточности [11]. Кроме того, как уже было упомянуто выше, VEGF и активируемый им сигнальный путь играют важную роль в поддержании кардиоваскулярного гомеостаза.

Таким образом, экспрессию VEGFR-2/Flk-1 в малодифференцированных клетках можно рассматривать в качестве одного из ранних маркеров их дифференцировки в направлении кардиомиоцитов или эндотелиоцитов. На основании этих данных многие исследователи полагают, что успех клеточной терапии при острых и хронических патологических процессах в сердце зависит от того, насколько активно экспрессируется VEGFR-2/Flk-1 в популяции недифференцированных клеток, подготовленных для трансплантации в поврежденный орган. Об успехе клеточной терапии можно также судить по динамике уровня экспрессии VEGFR-2/Flk-1 в миокарде реципиентов. Усиление экспрессии VEGFR-2/Flk-1 в кардиомиоцитах при ишемии/реперфузии миокарда и при других цитопатических воздействиях отражает усиление цитопротекторных реакций в кардиомиоцитах и может служить одним из маркеров для оценки жизнеспособности мышечных клеток сердца.

Список литературы

1. Колдышева Е.В., Клиникова М.Г., Ивлева Е.К., Листвягова Н.А., Лушникова Е.Л.

Экспрессия KDR/Flk-1 (VEGFR2) в миокарде при моделировании антрациклиновой кардиомиопатии // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25208>.

2. Кушлинский Д.Н., Терешкина И.В., Дегтярь В.Г., Лактионов К.П., Адамян Л.В. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы при раке яичников // Молекулярная медицина. – 2013. – № 1. – С. 3–11.

3. Baba S., Heike T., Umeda K., Iwasa T., Kaichi S., Hiraumi Y., Doi H., Yoshimoto M., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T. Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, № 6. – P. 1375–1383.

4. Corti F., Simons M. Modulation of VEGF receptor 2 signaling by protein phosphatases // Pharmacol. Res. – 2016. – Vol. 115. – P. 107–123.

5. Di Lisi D., Madonna R., Zito C., Bronte E., Badalamenti G., Parrella P., Monte I., Tocchetti C.G., Russo A., Novo G. Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond // Int. J. Cardiol. – 2016. – Vol. 227. – P. 11–17.

6. Fukuda S., Kaga S., Zhan L., Bagchi D., Das D.K., Bertelli A., Maulik N. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1 // Cell Biochem. Biophys. – 2006. – Vol. 44 (1). – P. 43–49.

7. Gao L.R., Zhang N.K., Ding Q.A., Chen H.Y., Hu X., Jiang S., Li T.C., Chen Y., Wang Z.G., Ye Y., Zhu Z.M. Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and embryonic stem cells // Cell Transplant. – 2013. – Vol. 22 (10). – P. 1883–1900.

8. Hirota S., Ogawa M. Activin A in combination with OP9 cells facilitates development of Flk-1(+) PDGFR α (-) and Flk-1(+) PDGFR α (+) hematopoietic mesodermal cells from murine embryonic stem cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2015. – Vol. 467 (3). – P. 583–588.

9. Hu X., Yu S. P., Fraser J. L., Lu Z., Ogle M. E., Wang J. A., Wei L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2008. – Vol. 135, № 4. – P. 799–808.

10. Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Mima T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T., Heike T. Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 400, № 1. – P. 27–33.

11. Maurea N., Coppola C., Piscopo G., Galletta F., Riccio G., Esposito E., De Lorenzo C., De Laurentiis M., Spallarossa P., Mercurio G. Pathophysiology of cardiotoxicity from target therapy

and angiogenesis inhibitors // *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. – 2016. – Vol. 17, Suppl. 1. Special issue on Cardiotoxicity from Antiplastic Drugs and Cardioprotection. – P. e19–e26.

12. Mauritz C., Martens A., Rojas S.V., Schnick T., Rathert C., Schecker N., Menke S., Glage S., Zweigerdt R., Haverich A., Martin U., Kutschka I. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction // *Eur. Heart J.* – 2011. – Vol. 32 (21). – P. 2634–2641.

13. Nelson T.J., Faustino R.S., Chiriac A., Crespo-Diaz R., Behfar A., Terzic A. CXCR4+/FLK-1+ biomarkers select a cardiopoietic lineage from embryonic stem cells // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26 (6). – P. 1464–1473.

14. Okada A., Tashiro K., Yamaguchi T., Kawabata K. Selective Differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1341. – P. 181–195.

15. Schuh A.C., Faloon P., Hu Q. L., Bhimani M., Choi K. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1^{-/-} embryonic stem cells and embryos // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – Vol. 96, № 5. – P. 2159–2164.

16. Shalaby F., Ho J., Stanford W.L., Fischer K.D., Schuh A.C., Schwartz L., Bernstein A., Rossant J. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis // *Cell*. – 1997. – Vol. 89, № 6. – P. 981–990.

17. Shalaby S.M., El-Shal A.S., Zidan H.E., Mazen N.F., Abd El-Haleem M.R., Abd El Motteleb D.M. Comparing the effects of MSCs and CD34⁺ cell therapy in a rat model of myocardial infarction // *IUBMB life*. – 2016. – Vol. 68, № 5. – P. 343–354.

18. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., Schuh A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice // *Nature*. – 1995. – Vol. 376, № 6535. – P. 62–66.

19. Shiojima I., Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20, № 24. – P. 3347–3365.

20. Shiojima I., Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 1243–1250.

21. Singla D.K., Abdelli L.S. Embryonic stem cells and released factors stimulate c-kit(+)/FLK-1(+) progenitor cells and promote neovascularization in doxorubicin-induced cardiomyopathy // *Cell Transplant.* – 2015. – Vol. 24 (6). – P. 1043–1052.

22. Spannuth W.A., Nick A.M., Jennings N.B., Armaiz-Pena G.N., Mangala L.S., Danes C.G., Lin Y.G., Merritt W.M., Thaker P.H., Kamat A.A., Han L.Y., Tonra J.R., Coleman R.L., Ellis L.M., Sood A.K. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells // *Int. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 124 (5). – P. 1045–1053.

23. Stankunas K., Ma G.K., Kuhnert F.J., Kuo C.J., Chang C.P. VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development // *Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 347, № 2. – P. 325-336.
24. Thirunavukkarasu M., Addya S., Juhasz B., Pant R., Zhan L., Surrey S., Maulik G., Menon V.P., Maulik N. Heterozygous disruption of Flk-1 receptor leads to myocardial ischaemia reperfusion injury in mice: application of affymetrix gene chip analysis // *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 12 (4). – P. 1284-1302.
25. Wang X., Liu X., Zhang H., Nie L., Chen M., Ding Z. Reconstitute the damaged heart via the dual reparative roles of pericardial adipose-derived flk-1+ stem cells // *Int. J. Cardiol.* – 2016. – Vol. 202. – P. 256-264.
26. Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K., Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors // *Nature.* – 2000. – Vol. 408, № 6808. – P. 92-96.
27. Yamashita J. K., Takano M., Hiraoka-Kanie M., Shimazu C., Peishi Y., Yanagi K., Nakano A., Inoue E., Kita F., Nishikawa S. Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19, № 11. – P. 1534-1536.
28. Zhang S., Jia Z., Guo J., Zhang P., Ma K., Wang S., Liu Y., Li L., Zhou C. Transplantation of bone marrow cells upregulated vascular endothelial growth factor and its receptor and improved ischemic myocardial function // *Beijing da xue xue bao.* – 2003. – Vol. 35, № 4. – P. 429-433.
29. Zhu Y., Pereira R.O., O'Neill B.T., Riehle C., Ilkun O., Wende A.R., Rawlings T.A., Zhang Y.C., Zhang Q., Klip A., Shiojima I., Walsh K., Abel E.D. Cardiac PI3K-Akt impairs insulin-stimulated glucose uptake independent of mTORC1 and GLUT4 translocation // *Mol. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 172-184.