บทบาทของเซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤต (Role of Stem Cell in Treatment of Critical Limb Ischemia)

ณัฐวุฒิ เสริมสาธนสวัสดิ์

ผู้ป่วยที่เป็นโรคขาขาดเลือดเรื้อรัง (chronic limb ischemia) พบได้ร้อยละ 3 ถึง ร้อยละ 10 ของประชากรทั่วไป และพบได้ถึงร้อยละ 30 ของผู้ป่วยในโรงพยาบาล[1,2] โรคนี้มีแนวโน้มที่จะพบได้มากขึ้นจากการที่ประชากรมีอายุยืนยาวมากขึ้นกว่าสมัยก่อน และอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานที่เพิ่มสูงขึ้นก็เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้พบโรคขาขาดเลือดเรื้อรังเพิ่มมากขึ้น ผู้ป่วยที่เป็นโรคขาขาดเลือดแบบเรื้อรังนั้นมักมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด ภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบ และโรคหลอดเลือดสมองตีบอีกด้วย ซึ่งจะทำให้ภาวะขาขาดเลือดมีอาการรุนแรงมากขึ้น[1,3-4]

โรคขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤต (critical limb ischemia) เป็นโรคขาขาดเลือดเรื้อรังที่มีอาการรุนแรง โดยผู้ป่วยจะมีอาการปวดเท้าขณะพัก (rest pain), แผลขาดเลือดที่ไม่หาย (non-healing ischemic ulcer) และภาวะนิ้วเท้าเน่าตาย (toe gangrene) ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีโอกาสที่จะถูกตัดขาได้สูง นอกจากนี้ยังมีอัตราตายที่สูงจากโรคร่วม เช่น โรคหัวใจขาดเลือด และ โรคสมองขาดเลือดอีกด้วย[5]

โดยทั่วไป การรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤต ประกอบด้วยการรักษาผ่านทางสายสวน (endovascular treatment) และ การผ่าตัดเปลี่ยนทางเดินหลอดเลือดแดง (arterial bypass surgery) แต่มีผู้ป่วย จำนวนกว่าร้อยละ 40 ที่ไม่สามารถรักษาได้โดยวิธีการข้างต้น เนื่องจากสภาพของหลอดเลือดแดงที่ตีบตันมากโดยเฉพาะหลอดเลือดแดงที่อยู่ส่วนปลายขา (distal artery run-off) มีสภาพที่แย่มาก ทำให้เลือดไปเลี้ยงขาส่วนปลายได้น้อยมาก หรือโรคร่วมของผู้ป่วยที่ทำให้ไม่สามารถทนต่อการผ่าตัดใหญ่ได้[6] ทำให้

ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มักจะลงเอยด้วยการถูกตัดขา หากมีอาการปวดมากจากอาการขาดเลือดรุนแรง หรือ มีเนื้อเยื่อเน่าตายลุกลามจนไม่สามารถรักษาขาไว้ได้ อย่างไรก็ดี ผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตที่ได้รับการตัดขานั้น พบว่าสามารถกลับไปใช้ดำเนินชีวิตได้ตามปกติ โดยการใส่ขาเทียมเพียงร้อยละ 25 ถึง 50 เท่านั้น แต่มีอัตราตายระหว่างผ่าตัดสูงถึงร้อยละ 5 ถึง 20 และผู้ป่วยมีโอกาสที่จะถูกตัดขาอีกข้าง สูงถึงร้อยละ 30[7] อีกด้วย ดังนั้น รักษาขาไว้ให้ได้ถือว่าเป็นเป้าหมายสูงสุดของการรักษา ผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตในระยะ 10 ปีนี้ การรักษาโดยการสร้างหลอดเลือดใหม่ (therapeutic neovascularization) จะได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้

กลไกการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) ในผู้ใหญ่

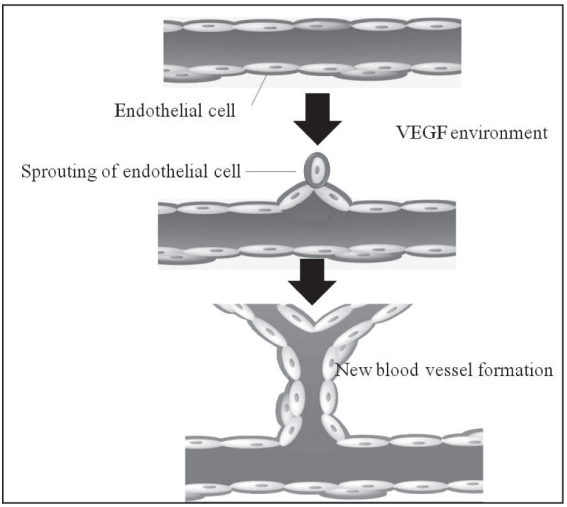
ประกอบไปด้วย 3 กระบวนการ ได้แก่ angiogenesis, arteriogenesis และ vasculogenesis

1. Angiogenesis

เป็นกระบวนการสร้างหลอดเลือดฝอย (capillary) ใหม่โดยหลอดเลือดที่สร้างใหม่นั้นจะงอกมาจากหลอดเลือดฝอยที่มีอยู่เดิม โดยจะเกิดในตำแหน่งที่มีภาวะขาดเลือด (ischemia) ผ่านกระบวนการกระตุ้นของ hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α) ทำให้บริเวณดังกล่าวมีการสร้าง vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเป็นสารที่จะกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดแดง (endothelial cells) ในหลอดเลือดฝอยที่มีอยู่แล้ว เกิดการแบ่งตัว แล้วงอกออกมาเป็นหลอดเลือดฝอยใหม่[8] ดังรูปที่ 1

2. Arteriogenesis

คือกระบวนการสร้าง collateral circulation โดยที่หลอดเลือด arteriole เดิมของผู้ป่วย ที่ทอดข้ามตำแหน่งที่มีการอุดตันของหลอดเลือดแดงมีขนาดใหญ่ ขึ้นเนื่องจากการกระตุ้นโดย shearing force จากการที่มีกระแสเลือดไหลผ่านมากขึ้น จะกระตุ้นให้ monocyte เข้ามาในบริเวณดังกล่าว และหลั่งสารหลายชนิดกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของ endothelial cells และ smooth muscle cells มากขึ้น รวมถึงมีการปรับรูปร่างของหลอดเลือดแดง arteriole ใหม่ ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เลือดผ่านมาทางช่องทางนี้มากขึ้นทำให้มีเลือดไปเลี้ยงขาที่อยู่ส่วนปลายกว่าตำแหน่งหลอดเลือดแดงที่ตีบตัน



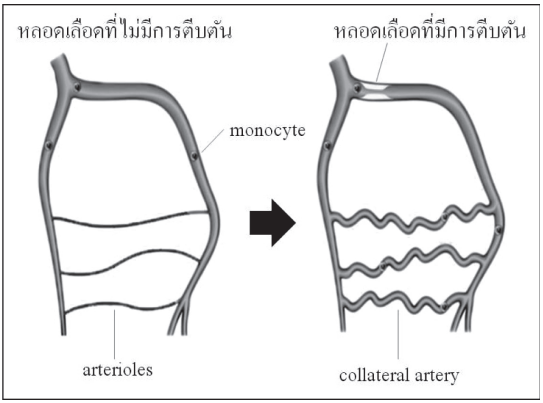
รูปที่ 1 กลไก การเกิด angiogenesis ในสภาวะขาขาดเลือดจะมีการสร้าง VEGF ให้เพิ่มขึ้นในบริเวณดังกล่าว กระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดแดง (endothelial cells) ในหลอดเลือดฝอยเดิมในบริเวณนี้มีการแบ่งตัว แล้วงอกออกมาเป็นหลอดเลือดฝอยใหม่เกิดขึ้น

กระบวนการนี้ไม่ได้เกิดในบริเวณที่มีการขาดเลือด (ischemia) แต่มักจะเกิดขึ้นในตำแหน่งที่หลอดเลือดแดงตีบ ซึ่งอยู่ proximal กว่าบริเวณที่มีภาวะขาดเลือด[9] และไม่ได้เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น HIF-1α เหมือนในกระบวนการเกิด angiogenesis ดังรูปที่ 2

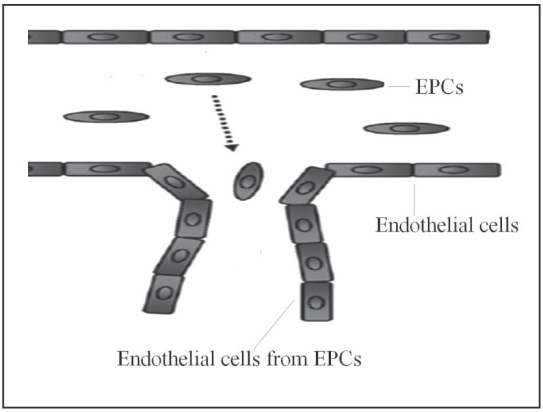
3. Vasculogenesis

เป็นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่จากเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ของหลอดเลือด ก็คือ endothelial progenitor cells (EPCs) ซึ่งสร้างมาจากไขกระดูก เซลล์ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนตัวเองไปเป็น endothelial cells ได้ในตำแหน่งที่มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ในตำแหน่งที่มีภาวะขาดเลือดได้ ดังรูปที่ 3

ทั้งสามกระบวนการมักเกิดขึ้นพร้อมๆกัน ในผู้ป่วยที่มีหลอดเลือดแดงตีบตันหลอดเลือด arteriole ข้างเคียง ก็จะเกิดกระบวนการ arteriogenesis ทำให้หลอดเลือด arteriole ขยายขนาดขึ้นกลายเป็น collateral circulation เพื่อที่จะส่งเลือดไปยังส่วน



รูปที่ 2 กระบวนการเกิด arteriogenesis ซึ่งเกิดในตำแหน่งหลอดเลือดที่มีการตีบตัน ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเลือดที่ไหลผ่านหลอดเลือด arteriole ที่ทอดข้ามตำแหน่งหลอดเลือดแดงที่ตีบตัน shearing force ที่เพิ่มมากขึ้นจะกระตุ้นให้ monocyte เข้ามาในบริเวณนี้ หลั่งสารหลายชนิดกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดทำให้หลอดเลือด arteriole มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงในตำแหน่งที่อยู่ distal กว่าตำแหน่งที่หลอดเลือดแดงตีบตันได้เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 3 กระบวนการเกิด vasculogenesis โดย EPCs ที่ออกมาจากไขกระดูก เข้ามาในบริเวณที่มีภาวะขาดเลือด EPCs จะเปลี่ยนตัวเองไปเป็นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) ในหลอดเลือดใหม่ที่มีการสร้างขึ้น

ปลายที่มีภาวะขาดเลือดรุนแรง ส่วนในบริเวณที่มีภาวะขาดเลือดรุนแรงก็มีการกระตุ้น HIF-1α ให้มีการหลั่ง VEGF กระตุ้นให้ endothelial cells ในหลอดเลือด เกิดการงอกเป็นหลอดเลือดใหม่ จากกระบวนการ angiogenesis นอกจากนี้ EPCs จาก bone marrow ก็จะเข้ามาในบริเวณที่มีการขาดเลือด มีการหลั่งสารกระตุ้นให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่โดย endothelial cells ข้างเคียงก็สามารถ migration และมีการเพิ่มจำนวนเพื่อมาบุหลอดเลือดใหม่ที่สร้าง และตัว EPCs เองก็สามารถ differentiate ไปเป็น endothelial cells ในหลอดเลือดใหม่ที่สร้างได้ด้วย

การรักษาโดยกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Therapeutic neovascularization)

การรักษาภาวะขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤตโดยกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่นี้มักจะทำในผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาได้โดยวิธีมาตรฐานได้แก่ วิธีการรักษาผ่านสายสวน (endovascular treatment) และการผ่าตัดเปลี่ยนทางเดินหลอดเลือดแดง (surgical arterial bypass) ทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักจะลงเอย ด้วยการถูกตัดขาหากไม่ได้รับการรักษาเพิ่มเติม โดยทั่วไปสามารถแบ่งการรักษาชนิดนี้ได้เป็นสองชนิด

1. การรักษาโดย angiogenic growth factor
2. การรักษาโดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (EPCs)

การรักษาโดย angiogenic growth factor

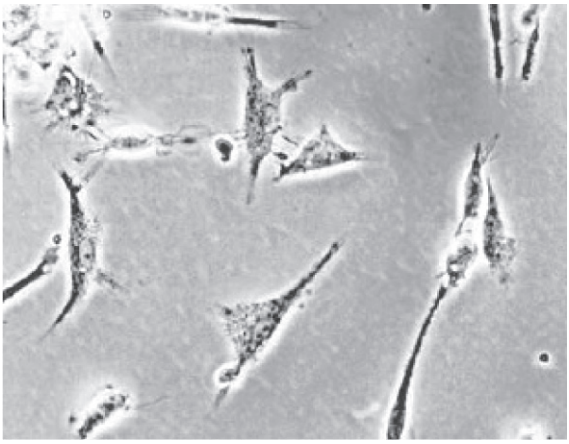
มี angiogenic growth factor หลายชนิดเช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF) ถูกนำมาใช้ในการรักษาภาวะขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤต เช่น ฉีดโดยตรงเข้าไปในกล้ามเนื้อของขาข้างที่ขาดเลือด หรือ ผ่านกระบวนการ gene therapy เพื่อหวังว่าจะมีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ angiogenesis เกิดขึ้นแม้ว่าการรักษาโดยวิธีนี้จะมีรายงานถึงผลสำเร็จในระยะแรก แต่จากผลการรักษาที่ผ่านมา มีผลสรุปออกมาว่าการรักษานี้ได้ผลไม่ดีในการรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤตไม่ได้ลดอัตราการถูกตัดขาจากหลายๆ การศึกษา การรักษาชนิดนี้จึงได้รับความนิยมในการศึกษาลดลง[10,11]

การรักษาโดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (EPCs)

EPCs ถูกรายงานครั้งแรกโดย Asahara และคณะ[12] ซึ่งได้บรรยายลักษณะของเซลล์ชนิดนี้ว่าเป็นเซลล์ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง peripheral blood mononuclear cells โดยเซลล์ชนิดนี้มี endothelial cell marker, CD34 และ VEGF receptor 2 expression นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า EPCs สามารถที่จะกระตุ้นให้เกิด angiogenesis โดยมีการสร้างหลอดเลือดฝอยใหม่ขึ้น ทำให้เพิ่มเลือดไปเลี้ยงขาที่ขาดเลือดได้ทั้งในสัตว์ทดลองและในคน[12,13] ดังรูปที่ 4

กลไกการสร้างหลอดเลือดใหม่จาก EPCs มีได้ 2 กลไกสำคัญคือ EPCs สร้าง angiogenic factor หลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้ endothelial cells ในหลอดเลือดแดงที่อยู่ข้างเคียงเกิดการแบ่งตัวและงอกเป็นหลอดเลือดฝอยใหม่ได้จากกระบวนการ angiogenesis นอกจากนี้ EPCs เองยังสามารถ differentiate ไปเป็น endothelial cells ในหลอดเลือดใหม่ที่สร้างเองได้ในกระบวนการ vasculogenesis อีกด้วย[14]

มีความพยายามที่จะนำ EPCs มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตที่ไม่มีทางรักษาใดๆ เนื่องจาก EPCs นั้นเตรียมได้มาจาก mononuclear cells ซึ่งพบ

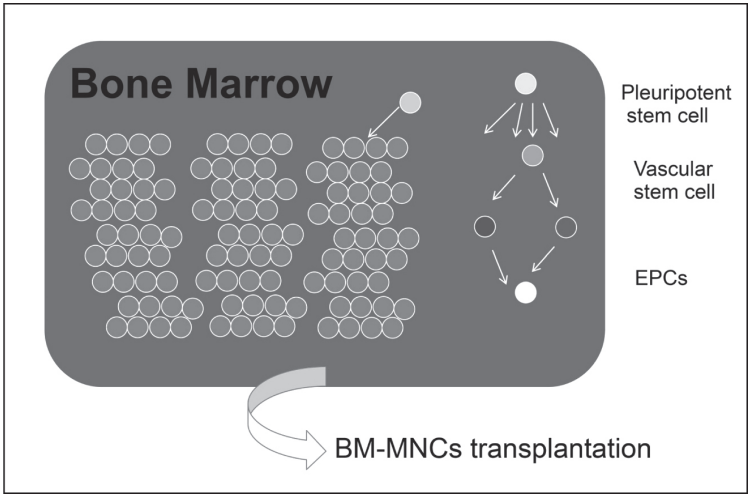


รูปที่ 4 Endothelial progenitor cells (EPCs) ที่ได้มาจากการนำ mononuclear cells ในเลือดไปเพาะเลี้ยง

มากในไขกระดูกในระยะแรกของการศึกษา ได้มีความพยายามในการเจาะไขกระดูกของผู้ป่วยเพื่อนำ mononuclear cells ในไขกระดูก (Bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs) ซึ่งคาดว่าจะมี EPCs อยู่ใน mononuclear cells นั้นด้วย นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตโดยการฉีดเซลล์เข้าไปที่กล้ามเนื้อของขาข้างที่ขาดเลือด ดังรูปที่ 5

รายงานการศึกษาแรกที่ใช้การรักษาโดยวิธีนี้ จาก Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation(TACT) trial พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด BM-MNCs มีการเพิ่มขึ้นของค่าดัชนีความดันหลอดเลือดแดงที่ข้อเท้าเมื่อเทียบกับแขน (ankle brachial index, ABI), อาการปวดเท้าขณะพัก (rest pain) และอาการปวดขาขณะเดิน (Intermittent claudication) ลดลง, ระดับ oxygen ที่ผิวหนัง $TcPO_2$ เพิ่มขึ้นและแผลขาดเลือดสามารถหายได้ภายหลังได้รับการฉีดเซลล์[15]

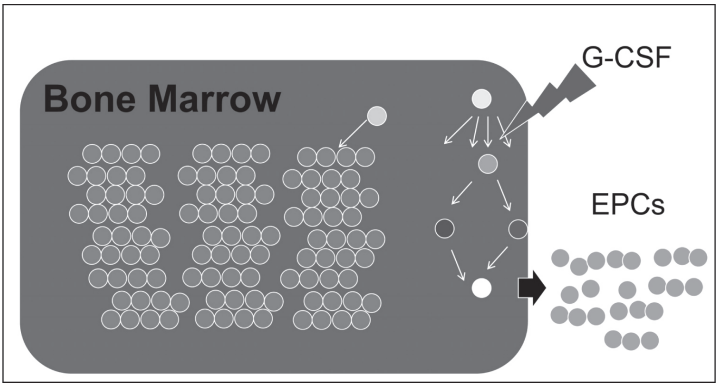
มีรายงานการศึกษาต่อมาอีกหลายฉบับ ที่ได้นำ BM-MNCs มาใช้ในการรักษาขาขาดเลือดเรื้อรังขั้นวิกฤต ซึ่งก็ได้ผลการรักษาไปในแนวทางเดียวกัน คือ มีการเพิ่มขึ้นของค่า ABI, $TcPO_2$, ลด rest pain และลดการถูกตัดขาภายหลังได้รับการฉีดเซลล์[16]



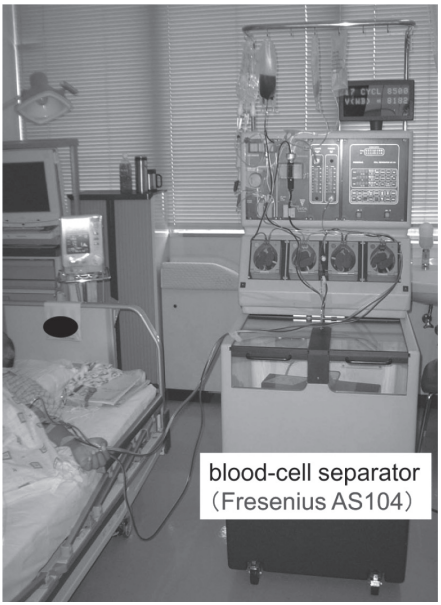
รูปที่ 5 หลักการเตรียม bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) เพื่อนำ mononuclear cells ซึ่งมี EPCs อยู่ในนั้นด้วย นำกลับมาฉีดที่กล้ามเนื้อขาข้างที่ขาดเลือด

ในระยะต่อมามีการพัฒนาในการเก็บ mononuclear cells ที่ได้จากเลือดของผู้ป่วย (peripheral blood mononuclear cell; PB-MNCs) ภายหลังการกระตุ้นไขกระดูกโดยการฉีด granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) ใต้ผิวหนังเป็นเวลา 4 ถึง 5 วันเพื่อให้ mononuclear cells ออกจากไขกระดูกมาอยู่ใน peripheral blood เป็นจำนวนมาก แล้วใช้เครื่อง blood cell separator เพื่อคัดแยกเฉพาะ PB-MNCs ออกมาแล้วนำไปฉีดกล้ามเนื้อขาข้างที่ขาดเลือดโดยวิธีการเช่นเดียวกับ การฉีด BM-MNCs[17] ดังรูปที่ 6-7 มีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่รายงานผลสำเร็จของการรักษาโดยวิธีนี้ โดยมีการเพิ่มขึ้นของค่า ABI, $TcPO_2$, การหายของแผล,การลดอัตราการถูกตัดขาเป็นต้น[18]

การรักษาทั้งสองวิธีนี้ได้ผลดี มี meta-analysis ยืนยันว่าการรักษาโดย BM-MNCs และ PB-MNCs นั้น สามารถเพิ่ม ABI, $TcPO_2$, ระยะทางที่เดินได้โดยไม่มีอาการปวด, ลดอาการ rest pain, ช่วยให้แผลหายเร็วขึ้นและลดการถูกตัดขา[19] การศึกษาล่าสุดมีความพยายามที่ฉีดเฉพาะ CD34+ cells เข้าไปที่กล้ามเนื้อขาข้างที่ขาเลือดโดยตรง



รูปที่ 6 หลักการเตรียม peripheral blood mononuclear cell (PB-MNCs) ภายหลังจากการฉีดยา G-CSF ในชั้นใต้ผิวหนังของผู้ป่วย เป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน เพื่อกระตุ้นให้ไขกระดูกหลั่ง stem cells หลายชนิดเข้ามาในกระแสเลือด แล้วใช้เครื่อง blood cell separator แยกเฉพาะ mononuclear cells ออกมาก่อนนำกลับไปฉีดที่กล้ามเนื้อขาข้างที่ขาดเลือด



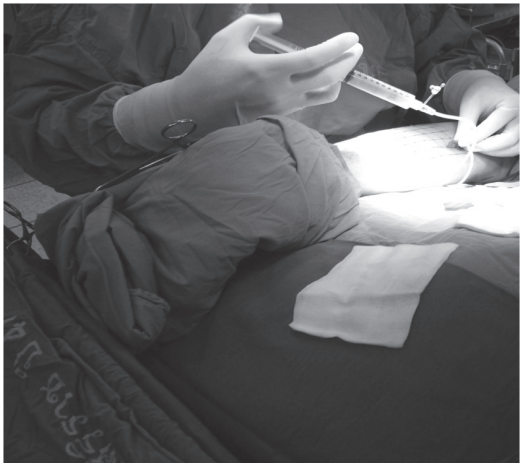
รูปที่ 7 การคัดแยก mononuclear cells โดยเครื่อง blood-cell separator จากกระแสเลือดผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตที่ได้รับการกระตุ้นไขกระดูกโดยการฉีด G-CSF มา 4-5 วัน

เนื่องจากมีรายงานว่าผลสำเร็จของการรักษานั้นขึ้นกับระดับของ CD34+ ที่อยู่ใน BM-MNCs หรือPB- MNCs[20] วิธีการเตรียมนั้นเหมือนกับการเตรียม PB-MNCs แต่จะใช้เครื่องมือที่ทำการคัดแยกเฉพาะ cells ที่มี CD34+ marker อยู่เท่านั้นแล้วนำ CD34+ cells ไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาข้างที่ขาดเลือด พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ toe brachial pressure index (TBPI), transcutaneous partial oxygen pressure ($TcPO_2$) และ ระยะทางที่เดินได้โดยไม่ปวด, ขนาดของแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ[20] อย่างไรก็ดี ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการรักษานี้ต่อไป

นอกจากวิธีดังกล่าวข้างต้น ที่สาขาศัลยศาสตร์หลอดเลือด ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้นำเอา EPCs ที่เตรียมได้จากการเพาะเลี้ยง mononuclear cells จากเลือดของผู้ป่วยประมาณ 250 มิลลิลิตร ในห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อแล้วนำกลับมาฉีดในขาข้างที่ขาดเลือดในผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตจำนวน 6 รายได้

ผลการรักษาที่ค่อนข้างดี คือแผลสามารถหายได้เอง และผู้ป่วยไม่ต้องถูกตัดขา 67%[21] ดังรูปที่ 8 และ 9

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การรักษาโดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (EPCs) นี้คงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้ผลค่อนข้างดี ในการรักษาผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤต ที่ไม่สามารถรักษาโดยวิธีการใดๆ ได้อีก แต่ในปัจจุบัน การรักษาวิธีนี้ยังคงอยู่ในงานวิจัยในวงจำกัดเท่านั้น ในอนาคตจะมีการพัฒนาการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด, การคัดแยกเซลล์กำเนิดหลอดเลือด,การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือดเพื่อที่จะเพิ่มจำนวน,



รูปที่ 8 การฉีด EPCs ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายไปยังขาข้างที่ขาเลือดขั้นวิกฤต

รูปที่ 9 ลักษณะ toe gangrene ของนิ้วหัวแม่เท้าของผู้ป่วยขาขาดเลือดขั้นวิกฤตที่ได้รับการรักษาโดยการฉีด EPCs จากการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย จากซ้ายไปขวา เป็นรูปก่อนการรักษา, 2 สัปดาห์, 1 เดือน, 3 เดือน, 5 เดือน และ 6 เดือนภายหลังการรักษา แผลสามารถหายได้สนิท

เทคนิคการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือดให้สร้างหลอดเลือดใหม่ในปริมาณที่มากยิ่งขึ้น และสามารถพัฒนาเป็นวิธีการรักษามาตรฐานได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007;33 Suppl 1:S1-75.
2. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. JAMA 2001;286(11):1317-24.
3. Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, et al. One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. JAMA 2007;297(11):1197-206.
4. Sprengers RW, Janssen KJ, Moll FL, Verhaar MC, van der Graaf Y. Prediction rule for cardiovascular events and mortality in peripheral arterial disease patients: data from the prospective Second Manifestations of ARTerial disease (SMART) cohort study. J Vasc Surg 2009;50(6):1369-76.
5. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). J Vasc Surg 2007;45 Suppl S:S5-67.
6. Guidelines for percutaneous transluminal angioplasty. Standards of Practice Committee of the Society of Cardiovascular and Interventional Radiology. Radiology 1990;177(3):619-26.
7. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. Circulation 1991;84(4 Suppl):IV1-26.
8. Phelps EA, Garcia AJ. Update on therapeutic vascularization strategies. Regen Med 2009;4(1):65-80.
9. Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. Heart 2009;95(3):191-7.
10. Ghosh R, Walsh SR, Tang TY, Noorani A, Hayes PD. Gene therapy as a novel therapeutic option in the treatment of peripheral vascular disease: systematic review and meta-analysis. Int J Clin Pract 2008;62(9):1383-90.
11. Attanasio S, Snell J. Therapeutic angiogenesis in the management of critical limb ischemia: current concepts and review. Cardiol Rev 2009;17(3):115-20.

12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997;275(5302):964-7.
13. Al Mheid I, Quyyumi AA. Cell therapy in peripheral arterial disease. Angiology 2008;59(6):705-16.
14. Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. Trends Mol Med 2009;15(4):180-9.
15. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 2002;360(9331):427-35.
16. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. Thromb Haemost 2010;103(4):696-709.
17. Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. Thromb Haemost 2007;98(6):1335-42.
18. Pacilli A, Faggioli G, Stella A, Pasquinelli G. An update on therapeutic angiogenesis for peripheral vascular disease. Ann Vasc Surg 2010;24(2):258-68.
19. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. Atherosclerosis 2010;209(1):10-7.
20. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, et al. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. Stem Cells 2009;27(11):2857-64.
21. Mutirangura P, Ruangsetakit C, Wongwanit C, et al. Enhancing limb salvage by non-mobilized peripheral blood angiogenic cell precursors therapy in patients with critical limb ischemia. J Med Assoc Thai 2009;92(3):320-7.