

Генные и клеточные технологии в лечении синдрома диабетической стопы

Коненков В.И., Климонтов В.В.

ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск
(директор – академик РАН В.И. Коненков)

Применение генных и клеточных технологий рассматривается как одно из перспективных направлений в разработке методов лечения синдрома диабетической стопы. Потенциальными кандидатами для генной и клеточной терапии являются больные с критической ишемией нижних конечностей, не подлежащие ангиохирургическому лечению, а также пациенты с длительно не заживающими трофическими язвами, рефрактерными к стандартной терапии. В ряде клинических исследований показаны возможности применения трансфера генов VEGF, HIF-1, FGF, PDGF, HGF и других факторов роста для стимуляции ангиогенеза и заживления диабетических язв. Установлены ангиогенные и репаративные эффекты трансплантации аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга и периферической крови, ангиогенных прогениторных клеток, стволовых мезенхимальных клеток костного мозга, стромальных клеток жировой ткани у больных сахарным диабетом (СД) с критической ишемией нижних конечностей. Результаты рандомизированных клинических исследований показали благоприятные эффекты генной и клеточной терапии на суррогатные индексы ишемии, выраженность болей в покое и заживление язв, однако данные о влиянии на частоту ампутаций неоднозначны. В дальнейших исследованиях необходимо решить вопрос об оптимальных дозах и способах введения биологических агентов, предикторах их эффективности, а также определить безопасность лечения в долгосрочной перспективе.

Ключевые слова: диабетическая стопа; критическая ишемия; заживление язв; ангиогенез; трансфер генов; факторы роста, клеточная терапия

Gene and cell-based technologies for the treatment of diabetic foot syndrome

Konenkov V.I., Klimontov V.V.

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation

Genetic and cellular techniques emerge as promising modalities for the treatment of diabetic foot syndrome.

Two patient groups potentially to benefit most from these novel methods are patients with critical lower limb ischemia (CLLI) in whom angioplasty is not indicated, and patients with trophic ulcers resistant to conventional therapy. A series of clinical trials has shown positive effects of transferring VEGF, HIF-1, FGF, PDGF, HGF and certain other growth factor genes to stimulate blood vessel formation and healing of diabetic ulcers. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow and peripheral blood cells, endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells and stromal cell of the adipose tissue has also demonstrated its clinical potential in patients with diabetes mellitus and CLLI. Randomized clinical trials report beneficial effects of gene and cell therapy on such surrogate endpoints as ischemic index, rest pain and ulcer healing, though data on amputation rates is controversial. Further studies are necessary to determine optimal dosage and route of administration of biological agents and predictors of their efficacy, as well as long-term safety of these novel treatment modalities.

Keywords: diabetic foot syndrome, critical ischemia, ulcer healing, angiogenesis, gene transfer, growth factors, cellular therapy

DOI: 10.14341/DM2014163-69

Синдром диабетической стопы (СДС) – одно из наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета (СД), важнейший фактор риска ампутаций конечностей. В различных регионах России распространенность язвенных поражений стоп у пациентов с СД варьирует от 2,3 до 12% [1], частота ампутаций на уровне стопы составляет в среднем 3,1 на 1000 больных, на уровне голени и выше – 3,6 на 1000 [2]. Стандартные методы лечения СДС не всегда позволяют достичь заживления раневого дефекта и предупредить ампутацию, что делает актуальным поиск новых лечебных подходов. В последние

годы большой интерес вызывают методы регенеративной медицины, включая генные и клеточные технологии. Обсуждается их использование для стимуляции восстановления кровотока при критической ишемии нижних конечностей (КИНК), а также для репарации длительно не заживающих трофических язв.

В данном обзоре мы обобщили накопленные к настоящему времени данные об эффективности и безопасности методов генной и клеточной терапии в лечении СДС. Поиск информации проведен по базам данных Pubmed/Medline, ClinicalTrials.gov, E-Library.

Генная терапия при СДС

В 1990-е гг. рядом исследовательских групп была установлена роль пептидных факторов роста в репарации трофических язв. Начато изучение возможностей использования рекомбинантных факторов роста для стимуляции заживления трофических язв, резистентных к стандартному лечению. В рандомизированных клинических исследованиях (РКИ) был установлен терапевтический эффект ряда регуляторов, включая эпидермальный фактор роста (EGF) [3], фактор роста тромбоцитов (PDGF) [4] и фактор роста фибробластов 2 (FGF-2) при СДС [5]. Исследования показали способность факторов роста стимулировать заживление нейропатических язв при условии многократного введения и создания высоких локальных концентраций. Последнее обстоятельство объясняется тем, что при введении в организм пептидные факторы роста быстро разрушаются протеолитическими ферментами. В связи с этим, возникла идея введения генов ростовых факторов в геном клеток, присутствующих в зоне язвы или ишемии, для обеспечения постоянной экспрессии и создания концентраций, близких к физиологическим. В качестве «проводников» (векторов) генов предложено использовать бактериальные плазмиды, вирусы, липосомы, наночастицы, метилцеллюлозные диски, коллагеновые гели и повязки [6]. В экспериментальных работах показана возможность стимуляции заживления раневых дефектов при СД с помощью трансфера гена *EGF* [7, 8], *PDGF-B* [9], трансформирующего фактора роста β [10], *FGF-4* и фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*) [11].

Опубликованы первые результаты применения генов ростовых факторов с целью репарации нейропатических язв у человека. В исследовании I/II фазы показана возможность использования гена *PDGF-B* для лечения длительно незаживающих язв нижних конечностей у больных с СДС. Ген вводился с помощью аденовируса, на коллагеновом геле. К концу третьего месяца заживление язвы наблюдалось у 10 из 12 пациентов [12]. В другом исследовании, сравнивавшем эффект генной терапии *PDGF-B* со стандартным лечением нейропатических язв (разгрузка с помощью Total Contact Cast) у 20 больных с СДС, не получено достоверной разницы в частоте и скорости заживления язвенных дефектов на двух режимах лечения [13]. В двойном слепом исследовании I/II фазы, включавшем 50 больных с диабетической полинейропатией, введение плазмиды с геном *VEGF* в большей степени уменьшало симптомы нейропатии по сравнению с плацебо ($p < 0,01$) через 6 месяцев наблюдения [14].

Большой прогресс достигнут в применении генных технологий в лечении ишемической формы СДС. Перспективность использования методов терапевтического ангиогенеза у этой категории больных связана с дистальным характером поражения артерий, которое в ряде случаев делает невозможным выполнение ангиохирургических вмешательств. Вторая предпосылка состоит в несостоятельности ангиогенного ответа на ишемию, которой характеризуется СД. Как известно, развитие

ишемии при облитерирующих поражениях сосудов характеризуется активацией ангио- и васкулогенеза, что ведет к формированию коллатералей и частичному восстановлению кровотока. У больных СД этот защитный механизм нарушен вследствие метаболических изменений и, возможно, генетических особенностей [15, 16].

Ключевую роль в процессе ангиогенеза играет *VEGF*. Данный фактор избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, их предшественников и моноцитов, увеличивает сосудистую проницаемость, способствует вазодилатации через усиление продукции оксида азота NO [17]. В пилотных исследованиях показаны возможность и краткосрочная безопасность стимуляции ангиогенеза у больных с КИНК при внутримышечном введении в зону ишемии гена *VEGF* с применением в качестве вектора плазмид [18] и аденовирусов [19]. Генная терапия приводила к достоверному увеличению показателей лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) [18, 19] и предупреждению ампутаций конечностей у части больных [18]. Наиболее частым осложнением терапии являлись периферические отеки. В двойном слепом плацебо-контролируемом РКИ, включавшем 54 пациента с СД и КИНК, введение плазмиды с *VEGF₁₆₅* улучшало показатели кровотока (лодыжечно-плечевой и пальце-плечевой индексы, $p = 0,05$) и ускоряло заживление трофических язв ($p = 0,01$), однако статистически значимого снижения частоты ампутаций к сотому дню наблюдения достичь не удалось. Введение гена не сопровождалась развитием серьезных побочных эффектов [20].

Известно, что начальные этапы активации ангиогенеза в условиях ишемии реализуются с помощью фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1). Данный фактор регулирует экспрессию многих ангиогенов, включая *VEGF*. Гипергликемия оказывает ингибирующее действие на сигнальные пути *HIF-1* [21]. В эксперименте введение плазмиды с геном *HIF-1* активировало ангиогенез и ускоряло заживление ран у мышей с СД [22]. Эффекты трансфера *HIF-1* с помощью аденовируса изучены в исследовании I фазы, включавшем 34 пациента с неоперабельной КИНК, в том числе 15 больных СД. Через год наблюдения прекращение болей в покое наблюдалось у 14 из 32 больных, полное заживление язвы — у пяти из 18. Периферический отек развился у 18 человек и являлся наиболее частым побочным эффектом [23].

Определенные надежды в плане стимуляции ангиогенеза у больных, не являющихся кандидатами для ангиохирургического лечения, возлагались на пептиды семейства FGF. В исследовании I фазы внутримышечное введение плазмиды с геном *FGF-1 (NV1FGF)* достоверно ($p < 0,01$) уменьшало выраженность болей в покое, размер язвенных дефектов и повышало перкутанное напряжение кислорода у 51 больного с ишемией нижних конечностей [24]. В многоцентровом РКИ II фазы показано снижение риска всех ампутаций в 2 раза (HR=0,498, $p = 0,015$), высоких ампутаций — в 2,7 раза (HR=0,371, $p = 0,015$) при восьмикратном внутримышечном введении NV1FGF у 125 больных с ишемией и незаживающими язвами ног [25]. Однако

в наиболее крупном РКИ III фазы TAMARIS (NV1FGF Gene Therapy on Amputation-Free Survival in Critical Limb Ischemia), включавшем 525 больных с КИНК (53% больных с СД), не выявлено различий в риске ампутаций и смерти при введении NV1FGF или плацебо в течение года наблюдения (HR=1,11, $p=0,48$) [26].

Перспективы генной терапии связывают с использованием фактора роста гепатоцитов (*HGF*). Данный фактор роста эффективно стимулирует ангиогенез в условиях *in vitro* и *in vivo* [27]. В исследовании I/IIa фазы двукратное внутримышечное введение плазмиды с геном *HGF* 22 больным с заболеваниями периферических артерий через 2 месяца приводило к увеличению ЛПИ ($p<0,001$), уменьшению размеров наиболее крупных язв ($p=0,007$) и снижению выраженности болей в покое ($p=0,007$) [28]. Трансфер гена *HGF* не сопровождался развитием периферических отеков и других серьезных побочных эффектов в течение 2-летнего наблюдения [29]. В двойном слепом РКИ III фазы (44 пациента с КИНК) двукратное, с интервалом в 28 дней, локальное введение гена *HGF* с помощью плазмиды способствовало уменьшению выраженности ишемических болей и/или ускорению заживления трофических язв (70,4% пациентов с группой *HGF*, 30,8% – в группе плацебо, $p=0,014$) [30]. В другом РКИ 22 пациента с КИНК, язвами и некрозами, не подлежащие хирургической реваскуляризации, получали 3 серии из 8 внутримышечных инъекций плазмиды с геном *HGF* или плацебо с интервалом 2 нед. Плазмида вводилась под УЗИ-контролем, места введения были индивидуализированы для каждого пациента на основании ангиографических данных. К 6-му месяцу пальце-плечевой индекс возрос ($p=0,047$), а выраженность болей в покое уменьшилась ($p=0,04$) в группе активного лечения. Полное заживление ишемических язв наблюдалось у 31% больных, получавших ген *HGF*, и ни в одном случае в группе плацебо [31]. В настоящее время запланировано многоцентровое РКИ III фазы, в котором будут изучаться эффекты трансфера гена *HGF* более чем у 500 больных с КИНК.

Несмотря на положительные результаты, полученные в отдельных исследованиях, мета-анализ 12 РКИ, посвященных лечению облитерирующих заболеваний периферических артерий с помощью ангиогенных факторов роста (*VEGF*, *FGF*, *HGF*, *Del-1*, *HIF-1 α*), не выявил достоверного влияния данного вида лечения на частоту ампутаций и динамику заживления язв [32]. Заметим, что объединение и даже сопоставление результатов разных исследований по генной терапии сопряжено со значительными трудностями. Они объясняются различиями исследований по характеристикам включенных пациентов (критическая ишемия или перемежающаяся хромота, наличие или отсутствие СД), видам и режимам введения генов, типам векторов. Клиническая эффективность генной терапии СДС нуждается в дальнейших исследованиях.

Клеточная терапия при СДС

В большинстве работ, посвященных клеточной терапии СДС, использовались аутологичные мононуклеары

костного мозга (АМКМ) или аутологичные мононуклеары периферической крови (АМПК). В составе АМКМ и АМПК обнаруживаются ангиогенные клетки, в том числе и так называемые эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), способные давать начало новой сосудистой сети. Механизм действия имплантируемых клеток включает паракринную секрецию ангиогенных факторов роста (*VEGF*, *FGF-2*, *GM-CSF* и др.), стимуляцию образования сосудистой сети и регенераторных процессов в зоне ишемии.

Первым РКИ, показавшим эффективность клеточной терапии КИНК, стал проект TACT (The Angiogenesis using Cell Transplantation). Было установлено, что инъекции АМКМ в икроножную мышцу ишемизированной конечности достоверно повышают ЛПИ и перкутанное напряжение кислорода ($p<0,0001$), дистанцию безболевого ходьбы ($p=0,025$) и уменьшают боли в покое ($p=0,0001$) через 4 недели после введения в сравнении с контролем (АМПК) [33]. Анализ отдаленных результатов показал высокую частоту сохранения конечностей через 3 года после терапии: ампутаций удалось избежать у 60% больных с атеросклерозом и у 91% больных с тромбангиитом. Эффект АМКМ на дистанцию безболевого ходьбы и выраженность болей в покое сохранялся по меньшей мере в течение двух лет [34]. В серии последующих исследований были показаны благоприятные эффекты внутримышечного введения АМКМ [35, 36], АМКМ или АМПК [37], аутологичных CD-34⁺-клеток [38, 39] на суррогатные индексы ишемии у больных с КИНК, не являющихся оптимальными кандидатами на хирургическую реваскуляризацию. В некоторых исследованиях зафиксировано уменьшение выраженности болей в покое [35, 37, 38], высокая частота заживления язв [35] и улучшение качества жизни [35, 36]. В исследовании PROVASA интраартериальное введение АМКМ у пациентов с КИНК увеличивало частоту заживления язвенных дефектов ($p=0,01$) и уменьшало выраженность болей в покое ($p=0,009$) в сравнении с плацебо; достоверных изменений ЛПИ достичь не удалось [40].

Недавний метаанализ 12 РКИ, изучавших эффекты введения ангиогенных клеток костномозгового происхождения 510 больным с КИНК, подтвердил положительный эффект клеточной терапии на выраженность болей в покое, дистанцию безболевого ходьбы, ЛПИ и транскутанное напряжение кислорода (все $p<0,00001$). Клеточная терапия приводила к снижению частоты высоких ампутаций (RR=0,58, $p=0,004$), однако этот эффект оказался статистически не значимым при исключении из анализа исследований без плацебо-контроля (RR=0,78, $p=0,46$) [41].

Особый интерес представляют результаты работ, целенаправленно изучавших эффекты применения клеточной терапии КИНК у больных СД. Показано, что внутримышечное введение (в 50–70 точек) CD34⁺-АМПК у больных СД с КИНК активирует ангиогенез в зоне ишемии конечности в течение 1,5 месяцев после процедуры [42]. В РКИ, включавшем 96 больных СД с КИНК, показана меньшая частота высоких ампутаций конечностей у пациентов, получавших АМКМ, по сравнению

со стандартным режимом лечения (21% и 44% в течение 120 дней соответственно, $p < 0,05$) [43]. В 6-месячном контролируемом исследовании, включавшем 50 больных СД с КИНК, установлено, что внутримышечное введение АМКМ и АМПК в одинаковой степени повышает транскутанное напряжение кислорода ($p < 0,05$) и уменьшает частоту высоких ампутаций (11,1%, в группе стандартного лечения – 50%, $p = 0,003$) [44].

Получены первые результаты применения трансплантаций аутологичных клеток у больных СДС с помощью внутриартериальных инфузий. В пилотном нерандомизированном исследовании (20 больных СД с КИНК), внутриартериальное введение АМКМ способствовало уменьшению симптомов ишемии и ускорению заживления язв через 3 и 12 месяцев наблюдения. Клиническая динамика коррелировала с ангиографически верифицированным ангиогенезом [45].

В одном из недавних РКИ [46] сравнивалась эффективность внутримышечного введения АМКМ и аутологичных стволовых мезенхимальных клеток костного мозга (АСМКМ) у 42 больных СДС с двусторонней КИНК. В группе АСМКМ по сравнению с АМКМ наблюдалась достоверно большая частота заживления язв в первые 6 недель исследования ($p = 0,02$). На 24-й неделе выявлено более выраженное увеличение дистанции безболевого ходьбы ($p = 0,04$), ЛПИ ($p = 0,017$) и транскутанного напряжения кислорода ($p = 0,001$). Различий в выраженности болей в покое и частоте ампутаций не наблюдалось. Авторы пришли к выводу, что применение АСМКМ может быть более эффективным методом клеточной терапии СДС по сравнению с АМКМ.

Предпринята попытка оптимизировать эффективность клеточной терапии КИНК у больных СД путем обогащения вводимой суспензии АМКМ 90^+ -позитивными («ткане-регенерирующими») клетками. 22 пациента были рандомизированы и получили лечение АМКМ или АМКМ с повышенным количеством клеток, экспрессирующих $CD90^+$. Полное заживление язв на 45-й неделе исследования наблюдалось у всех больных, за исключением одного пациента, получившего $CD90^+$ -АМКМ, и двух пациентов, получивших «стандартный» вариант АМКМ. При этом общее количество имплантированных клеток было в 3,5 раза меньше в опытной группе по сравнению с группой сравнения [47].

Продолжается поиск альтернативных источников клеток для регенеративной терапии. В исследовании I фазы ACellDREAM показано, что локальное внутримышечное введение аутологичных стромальных клеток жировой ткани больным СД с КИНК способствует ускорению заживления ишемических язв [48]. Ввиду большей доступности жировой ткани по сравнению с костным мозгом, данный вид клеток можно рассматривать как весьма перспективный для дальнейшего изучения.

Предикторы клинической эффективности клеточной терапии недостаточно разработаны. Показано, что эффект зависит от доли KDR^+ -клеток (kinase insert domain protein receptor) в составе имплантируемых АМКМ [36]. Лимфопения в аспирате костного мозга чаще наблюдается у больных СД с неэффективностью клеточной терапии [43]. Больные СД с прогрессирующими деструктивными изменениями стоп (язвы, некрозы, гангрена), а также получающие лечение гемодиализом, имеют высокий риск ампутации пальца или конечности, несмотря на клеточную терапию [42].

Большинство исследователей сообщают о хорошей переносимости имплантации клеток. В то же время, имеются данные о высокой частоте сердечно-сосудистых осложнений (инфаркт миокарда, мезентериальный тромбоз, сердечная недостаточность) у пожилых больных с КИНК после индуцированной G-CSF мобилизации и последующего введения ЭПК [49]. Учитывая повышение концентрации *VEGF* в плазме крови после введения ангиогенных клеток [42], нельзя исключить увеличение риска неоваскуляризации сетчатки у больных СД с ретинопатией. Показано, что введение АМКМ или АМПК больным с СДС не увеличивает риск новообразования ретинальных сосудов сетчатки в течение 6 месяцев наблюдения. Возможно, это объясняется тем, что имплантируемые клетки секретируют не только стимуляторы, но и ингибиторы ангиогенеза [50]. Анализ клинических исходов у 54 пациентов с перемежающейся хромотой или критической ишемией, прошедших курс генной терапии *VEGF-A*, не выявил увеличения частоты развития СД, диабетической ретинопатии и рака спустя 10 лет после вмешательства [51].

Заключение

Применение методов регенераторной медицины (генных и клеточных технологий) является перспективным направлением в лечении СДС. Потенциальными кандидатами для генной и клеточной терапии являются больные с КИНК, не подлежащие ангиохирургическому лечению, а также пациенты с нейропатическими и нейроишемическими язвами, рефрактерными к стандартной терапии.

В настоящее время многие аспекты генной и клеточной терапии СДС недостаточно разработаны. Эффективность ряда предложенных методов нуждается в проверке в РКИ. В дальнейших исследованиях необходимо решить вопрос об оптимальных дозах и способах введения биологических агентов, предикторах их эффективности, определить безопасность лечения в долгосрочной перспективе.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с рукописью.

Список литературы

1. Галстян ГР, Дедов ИИ. Организация помощи больным с синдромом диабетической стопы в Российской Федерации. Сахарный диабет. 2009;(1):4–7. [Galstyan GR, Dedov II. Principles of care in diabetic foot patients in Russia. Diabetes mellitus. 2009;(1):4–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-5411>]
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Сунцов ЮИ, Петеркова ВА, Галстян ГР, Майоров АО, Кураева ТЛ, Сухарева ОЮ. Результаты реализации подпрограммы "Сахарный диабет" Федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы". Сахарный диабет. 2013;(Прил.2):1–48. [Dedov I.I., Shestakova M.V., Suntsov Y.I., Peterkova V.A., Galstyan G.R., Mayorov A.Y., Kuraeva T.L., Sukhareva O.Y. Federal targeted programme "Prevention and Management of Socially Significant Diseases (2007–2012)": results of the "Diabetes mellitus" sub-programme. Diabetes mellitus. 2013;(2S):1–48. DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-2013-2S>]
3. Fernández-Montequín JI, Valenzuela-Silva CM, Díaz OG, Savigne W, Sancho-Soutelo N, Rivero-Fernández F, et al. Intralesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. International Wound Journal. 2009;6(6):432–443. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00641.x>]
4. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. Diabetes Care. 1998;21(5):822–827.
5. Uchi H, Igarashi A, Urabe K, Koga T, Nakayama J, Kawawamori R, et al. Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (bFGF) for diabetic ulcer. European Journal of Dermatology. 2009;19(5):461–468. doi: <http://dx.doi.org/10.1684/ejd.2009.0750>
6. Davidson JM. New and alternative treatment for the diabetic foot: stem cells and gene transfer. In: The Foot in Diabetes. Fourth ed. Eds. Boulton AJM, Cavanagh PR, Rayman G. John Wiley and Sons Ltd, 2006:198–206.
7. Ko J, Jun H, Chung H, Yoon C, Kim T, Kwon M, et al. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of streptozotocin diabetic mice. Diabetes and Metabolism Journal. 2011;35(3):226–235. DOI: <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2011.35.3.226>
8. Kim HS, Yoo HS. In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes. Acta Biomaterialia. 2013;9(7):7371–7380. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.018>
9. Man L-X, Park JC, Terry MJ, Mason JM, Burrell WA, Liu F, et al. Lentiviral Gene Therapy With Platelet-Derived Growth Factor B Sustains Accelerated Healing of Diabetic Wounds Over Time. Annals of Plastic Surgery. 2005;55(1):81–86.
10. Lee P-Y, Chesnoy S, Huang L. Electroporatic Delivery of TGF- β 1 Gene Works Synergistically with Electric Therapy to Enhance Diabetic Wound Healing in db/db Mice. J Invest Dermatol. 2004;123(4):791–798.
11. Jazwa A, Kucharzewska P, Leja J, Zagorska A, Sierpniowska A, Stepniowski J, et al. Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice. Genetic Vaccines Therapy. 2010;8:6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1479-0556-8-6>
12. Mulder G, Tallis AJ, Marshall VT, Mozingo D, Phillips L, Pierce GF, et al. Treatment of nonhealing diabetic foot ulcers with a platelet-derived growth factor gene-activated matrix (GAM501): Results of a Phase 1/2 trial. Wound Repair and Regeneration. 2009;17(6):772–779. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00541.x>
13. Bhansali A, Venkatesh S, Dutta P, Dhillon MS, Das S, Agrawal A. Which is the better option: recombinant human PDGF-BB 0.01% gel or standard wound care, in diabetic neuropathic large plantar ulcers off-loaded by a customized contact cast? Diabetes Research and Clinical Practice. 2009;83(1):e13–e16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2008.10.005>
14. Ropper AH, Gorson KC, Gooch CL, Weinberg DH, Pieczek A, Ware JH, et al. Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: A randomized, double-blinded trial. Annals of Neurology. 2009;65(4):386–393. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21675>
15. Коненков ВИ, Климонтов ВВ. Ангиогенез и васкулогенез при сахарном диабете: новые концепции патогенеза и лечения сосудистых осложнений. Сахарный диабет. 2012;(4):17–27. [Konenkov VI, Klimontov VV. Vasculogenesis and angiogenesis in diabetes mellitus: novel pathogenetic concepts for treatment of vascular complications. Diabetes mellitus. 2012;(4):17–27. DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-5533>]
16. Коненков ВИ, Шевченко АВ, Прокофьев ВФ, Климонтов ВВ, Королев МА, Фазуллина ОН, и соав. Ассоциации вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, TNFA) с сахарным диабетом 2 типа у женщин. Сахарный диабет. 2012;(3):4–10. [Konenkov VI, Shevchenko AV, Prokof'ev VF, Klimontov VV, Korolev MA, Fazullina ON, et al. Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and cytokine (IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA) genes combinations with type 2 diabetes mellitus in women. Diabetes mellitus. 2012;(3):4–10. DOI: <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-6079>]
17. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Harikainen J. Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. Journal of the American College of Cardiology. 2007;49(10):1015–1026. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>
18. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive Expression of ph-VEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. Circulation. 1998;97(12):1114–1123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.97.12.1114>
19. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Mätsi P, Musalo H, Alhava E, et al. Increased Vascularity Detected by Digital Subtraction Angiography after VEGF Gene Transfer to Human Lower Limb Artery: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Phase II Study. Molecular Therapy. 2002;6(1):127–133. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2002.0638>
20. Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, Smit AJ, van den Dungen JJ, Hooymans JM, et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. Human Gene Therapy. 2006;17(6):683–691. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2006.17.683>

21. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The possible mechanisms underlying the impairment of HIF-1 α pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10(10):1412–1421. DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.5630>.
22. Liu L, Marti GP, Wei X, Zhang X, Zhang H, Liu YV, et al. Age-dependent impairment of HIF-1 α expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;217(2):319–327. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21503>
23. Rajagopalan S, Olin J, Deitcher S, Pieczek A, Laird J, Grossman PM, et al. Use of a Constitutively Active Hypoxia-Inducible Factor-1 α Transgene as a Therapeutic Strategy in No-Option Critical Limb Ischemia Patients: Phase I Dose-Escalation Experience. *Circulation*. 2007;115(10):1234–1243. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.106.607994>
24. Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, et al. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: Preliminary results of a phase I trial. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2002;35(5):930–936. DOI: <http://dx.doi.org/10.1067/mva.2002.123677>
25. Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC, et al. Therapeutic Angiogenesis With Intramuscular NV1FGF Improves Amputation-free Survival in Patients With Critical Limb Ischemia. *Molecular Therapy*. 2008;16(5):972–978. DOI: <http://dx.doi.org/http://www.nature.com/mt/journal/v16/n5/supinfo/mt200833s1.html>
26. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, et al. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *The Lancet*. 2011;377(9781):1929–1937. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60394-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60394-2)
27. Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Taniyama Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: Differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascular Pharmacology*. 2012;57(1):3–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2012.02.002>
28. Morishita R, Makino H, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Azuma J, et al. Phase I/IIa Clinical Trial of Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer to Treat Critical Limb Ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(3):713–720. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.110.219550>
29. Makino H, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Azuma J, Sawa Y, et al. Long-Term Follow-Up Evaluation of Results From Clinical Trial Using Hepatocyte Growth Factor Gene to Treat Severe Peripheral Arterial Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32(10):2503–2509. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.111.244632>
30. Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, Sasajima T, Ishimaru S, Ohashi Y, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Therapy*. 2010;17(9):1152–1161. doi:10.1038/gt.2010.51
31. Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO, Daniel G, Henry TD, Koga M, et al. Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 2008;118(1):58–65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.727347>
32. Hammer A, Steiner S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease – a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Vasa*. 2013;42(5):331–339. DOI: <http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000298>
33. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2002;360(9331):427–435. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09670-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09670-8)
34. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, et al. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *American Heart Journal*. 2008;156(5):1010–1018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2008.06.025>
35. Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II–III thromboangiitis obliterans. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2006;44(4):732–739. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2006.06.023>
36. Murphy MP, Lawson JH, Rapp BM, Dalsing MC, Klein J, Wilson MG, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2011;53(6):1565–1574.e1561. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.074>
37. 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. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;98(6):1335–1342. DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH07-02-0137>
38. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, 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):2857–2864. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.207>
39. Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston W, Driver VR, Sharafuddin M, et al. A Randomized, Controlled Pilot Study of Autologous CD34+ Cell Therapy for Critical Limb Ischemia. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2012;5(6):821–830. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/circinterventions.112.968321>
40. Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schlüter M, et al. Intraarterial Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Critical Limb Ischemia: A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial (PROVASA). *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2011;4(1):26–37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/circinterventions.110.958348>
41. Teraa M, Sprengers RW, van der Graaf Y, Peters CEJ, Moll FL, Verhaar MC. Autologous Bone Marrow-Derived Cell Therapy in Patients With Critical Limb Isch-

- emia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Annals of Surgery*. 2013;258(6):922–929. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182854cf1>
42. Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H, et al. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *Journal of Artificial Organs*. 2006;9(4):226–233. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10047-006-0351-2>
43. Procházka V, Gumulec J, Jalůvka F, Salounová D, Jonszta T, Czerný D, et al. Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell Transplantation*. 2010;19(11):1413–1424. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368910X514170>
44. Dubsy M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Pagacova L, Sixta B, et al. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2013;29(5):369–376. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2399>
45. Ruiz-Salmeron R, de la Cuesta-Diaz A, Constantino-Bermejo M, Pérez-Camacho I, Marcos-Sánchez F, Hmadcha A, et al. Angiographic Demonstration of Neoangiogenesis After Intra-arterial Infusion of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in Diabetic Patients With Critical Limb Ischemia. *Cell Transplantation*. 2011;20(10):1629–1639. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368910X0177>
46. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;92(1):26–36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2010.12.010>
47. Kirana S, Stratmann B, Prante C, Prohaska W, Koepferich H, Lammers D, et al. Autologous stem cell therapy in the treatment of limb ischaemia induced chronic tissue ulcers of diabetic foot patients. *International Journal of Clinical Practice*. 2012;66(4):384–393. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02886.x>
48. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre J-S, Gross F, Grolleau J-L, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245–257. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.011>
49. Jonsson TB, Larzon T, Arfvidsson B, Tidefelt U, Axelsson CG, Jurstrand M, et al. Adverse events during treatment of critical limb ischemia with autologous peripheral blood mononuclear cell implant. *International Angiology*. 2012;31(1):77–84.
50. Dubsy M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Varga M, Kolesar L, et al. Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell Transplantation*. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368913X674071>
51. Muona K, Makinen K, Hedman M, Manninen H, Yla-Herttuala S. 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. *Gene Therapy*. 2012;19(4):392–395. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2011.109>

Коненков Владимир Иосифович

академик РАН, директор, ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, Новосибирск

Климонтон Вадим Валерьевич

д.м.н., зав. лабораторией эндокринологии, ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, Новосибирск

E-mail: klimontov@mail.ru