

ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННЫХ МОДИФИКАЦИЙ КЛЕТОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА



© Е.В. Абакушина^{1,2*}, И.Г. Воробьева¹, И.А. Степанова^{1,2}, С.А. Румянцев²

¹ООО «Текон Медицинские приборы», Москва

²ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», Москва

У пациентов с сахарным диабетом (СД) системные нарушения в организме могут вызывать целый ряд осложнений. Одним из основных осложнений является нарушение процессов заживления ран, что может привести к развитию диабетической язвы стопы (ДЯС) и последующей ампутации конечности. Модифицированные мезенхимальные стволовые клетки (ГМ-МСК) как средство терапии хронических ран позволяют снизить homing (хоуминг), обладают повышенным пролиферативным потенциалом, терапевтическими противоопухолевыми и поддерживающими функции поджелудочной железы свойствами. Для терапии ДЯС изучают нативные и генно-модифицированные клетки из аллогенных или аутологичных источников. В обзоре представлен мировой опыт применения стволовых клеток в терапии в доклинических и клинических исследованиях, собраны данные о предложенных технологиях терапии диабетических язв с применением ГМ-МСК: совместная трансплантация ГМ-МСК с островками поджелудочной железы, регуляция процессов миграции при помощи изменения экспрессии интегринов, блокирование сигналов эстрогена, повышенная экспрессия ряда генов, таких как *SDF-1α*, *c-JUN*, *MALAT1*, для повышения жизнеспособности и стимуляции пролиферации мезенхимальных стволовых клеток. Клетки, временно несущие терапевтические генно-инженерные конструкции, в доклинических испытаниях показывают высокую эффективность их применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диабетическая язва стопы; мезенхимальные стволовые клетки; генные модификации.

THERAPY OF CHRONIC SKIN ULCERS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS USING GENE MODIFICATIONS OF CELL TRANSPLANT

© Elena V. Abakushina^{1,2*}, Iva G. Vorobyova¹, Irina A. Stepanova^{1,2}, Sergey A. Roumiantsev²

¹Tecon MP LLC, Moscow, Russia

²Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

In patients with diabetes mellitus (DM), systemic disorders in the body can cause a number of complications. One of the main complications is the disruption of wound healing processes, which can lead to the development of a diabetic foot ulcer (DFU) and subsequent amputation of the limb. Modified mesenchymal stem cells (GM-MSCs) - as a means of treating chronic wounds, reduce homing, have increased proliferative potential, therapeutic antitumor and pancreas-supporting properties. Native and genetically modified cells from allogeneic or autologous sources are studied for the treatment of DFU. The review presents the world experience of using stem cells in therapy in preclinical and clinical studies, collects data on the proposed technologies for the treatment of diabetic ulcers using GM-MSCs: combined transplantation of GM-MSCs with pancreatic islets, regulation of migration processes by changing the expression of integrins, blocking estrogen signals, increased expression of a number of genes, such as *SDF-1α*, *c-JUN*, *MALAT1*, to increase the viability and stimulate the proliferation of mesenchymal stem cells. Cells temporarily carrying therapeutic genetically engineered constructs show high efficiency of their use in preclinical trials.

KEYWORDS: diabetic foot ulcer; mesenchymal stem cells; gene modifications.

ВВЕДЕНИЕ. МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ

Одним из основных осложнений сахарного диабета (СД) является нарушение регенерации ран; раны, которые не заживают в течение четырех недель, считаются хроническими и требуют дополнительного терапевтического вмешательства. Длительно незаживающие язвы стопы при диабете (ДЯС) представляют собой комплексную проблему при терапии из-за того, что существуют гипо- и гипергликемия, а также нарушения ангиогенеза и хроническая воспалительная реакция, связанная с на-

чалом СД. ДЯС наблюдаются по меньшей мере у 34% пациентов с СД [1]. Одним из ключевых аспектов лечения хронических ран, возникающих при СД, является изучение применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Клеточная терапия может способствовать как восстановлению функции поджелудочной железы, так и снижению уровня провоспалительных цитокинов. Это было продемонстрировано на моделях СД первого типа (СД1) у грызунов и показало, что введение МСК позволяет нормализовать уровень глюкозы и увеличивать выработку инсулина благодаря восстановлению островков Лангерганса поджелудочной железы. Источник МСК может быть

аутологичным или аллогенным [2]. Клетки из обоих источников исследуют для терапии как без обработки — с минимальными манипуляциями, так и модифицированные генно-инженерными методами. Это особенно важно для стволовых клеток, полученных от пациентов с СД, так как было показано, что такие клетки обладают сниженными жизнеспособностью и пролиферативным потенциалом. За последние годы создано несколько технологий генной терапии на основе транзитной трансфекции стволовых клеток жировой ткани и показано их преимущество для лечения ДЯС (табл. 1). На данный момент эффективность показана только в доклинических испытаниях на мышиных моделях.

Лечение ДЯС дополнительно осложняется другими факторами риска, такими как невропатия и заболевания периферических артерий. Гипо- и особенно гипергликемия, которая возникает при СД, способствует образованию язв за счет прогрессирования атеросклероза, нарушения работы популяций клеток кожи и периферической нейропатии [3]. Гипергликемия также нарушает белковый синтез, миграцию и пролиферацию кератиноцитов, фибробластов и поддерживает в ДЯС непрекращающийся воспалительный процесс, что может приводить к инфицированию стопы и увеличивает риск ампутации [4].

В настоящий момент для трансплантации МСК пациентам, кроме клеток костного мозга, применяется пул клеток жировой ткани МСК. Жировая ткань состоит из стромальной сосудистой фракции (SVF), которая содержит различные типы клеток и зрелых адипоцитов. До 3% выделенного из жировой ткани клеточного пула занимают МСК [5]. МСК под действием хемокинов и медиаторов воспаления мигрируют к очагу патологического процесса, ускоряя восстановление тканей. Благодаря таким свойствам МСК используются при системной красной волчанке, для восстановления хряща, функций

почек и конечностей после ишемии, при заболеваниях легких, болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD), инсульте, инфаркте, лечении онкологических заболеваний, а также при апластической или серповидно-клеточной анемии и других заболеваниях [6]. Список зарегистрированных препаратов представлен в табл. 2 [7, 8].

МСК, выделенные из жировой ткани пациентов с диабетом, обладают сниженной пролиферацией и способностью к дифференцировке в фибробласты, а также быстрым апоптозом, что приводит к уменьшению терапевтического эффекта при их применении [9]. При хронических воспалительных процессах в организме снижена возможность распознавать и убивать патогенные клетки. Также нарушение иммунной защиты кожи возникает за счет подавления синтеза антимикробных пептидов при диабете [10]. Механизм действия МСК для заживления ДЯС может быть связан как с изменением контактов между клетками в ране, так и с паракринным эффектом [4].

Показано, что МСК обладают иммуномодулирующим действием на клетки кожи мышей с СД1. Используя совместную трансплантацию МСК с островками поджелудочной железы, авторы показали, что МСК способны снижать воспаление и усиливать терапевтический эффект трансплантата островков Лангерганса [11]. В присутствии МСК увеличивается пролиферативная активность дифференцированных фибробластов, повышается экспрессия факторов заживления ран и коллагеновых волокон первого и третьего типа. Использование стволовых клеток жировой ткани приводит не только к ускоренному заживлению, но и подавлению фиброза. Фиброз вызывается чрезмерным отложением компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ — extracellular matrix), фибробластами и миофибробластами. Синтез и деградация матрикса регулируется активностью дермальных фибробластов, которые производят белки

Таблица 1. Препараты на основе стволовых клеток (модифицировано по статье [2]).

Название препарата	Год регистрации	Страна	Патология
Hearticellgram-AMI	2012	Корея	Острый инфаркт миокарда
Cuepistem	2012	Корея	Осложненная болезнь Крона
Cartistem	2014	Корея	Дегенеративный артрит
Prochymal/remestemcel-L	2014	Канада	«Трансплантат против хозяина»
Neuronata-R	2015	Корея	Боковой склероз спинного мозга
Temcell HS	2016	Япония	«Трансплантат против хозяина»
Stempeucel	2016	Индия	Тяжелая ишемия конечностей
Alofisel	2018	Япония и Бельгия	Осложненная болезнь Крона
Holoclar	2015	Италия	Восстановление эпителия роговицы
MPC	2010	Австралия	Заживление переломов и заживление диска
ChondroCelect	2009	Бельгия	Остеоартроз коленного сустава
Prochymal	2009	США	Сахарный диабет 1 типа
MultiStem	2012	США	Ишемический инсульт
Maci	2016	США	Костно-хрящевые повреждения
Hemacord	2011	США	Геморрагическая болезнь

Таблица 2. Клинические испытания препаратов на основе стволовых клеток различного происхождения для заживления диабетической язвы стопы [7, 8].

Год публикации	Номер клинического исследования	Диагноз и количество пациентов с ДЯС	Тип стволовых клеток	Критерии эффективности
2021	ChiCTR2200055885	СД 59 пациентов	МСК жировой ткани	Размер язвы, время закрытия, кровоток в сосудах, эластичность артериальной стенки
	NCT04689425	СД2 20 пациентов	Мононуклеарные клетки из пуповинной крови	Скорость закрытия раны, среднее время закрытия раны
2020	NCT03267784	СД2 23 пациентов	Алло-APZ2-DFU Суспензия ABCB5+ МСК	Процент уменьшения площади раневой поверхности, абсолютное уменьшение площади раны, оценка раневой инфекции, время до первого полного закрытия раны
2019	NCT03230175	СД1 и СД2 32 пациентов	Криоконсервированный аллотрансплантат пуповины (TTAX01)	Время до первого полного закрытия раны
	NCT02092870	СД1 и СД2 25 пациентов	МСК жировой ткани	Процентное изменение размера раны по сравнению с исходным уровнем через 12 недель
	NCT02844660	СД1 и СД2 130 пациентов	Аллотрансплантат пуповины человека	Доля пациентов, достигших полного закрытия раны, скорость закрытия раны
	NCT04255004	СД1 и СД2 76 пациентов	Аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови	Вариация чрескожного измерения кислорода, время заживления, сравнение боли в покое
	NCT03865394	СД1 и СД2 46 пациентов	Аллогенные МСК жировой ткани	Процент полного закрытия раны, среднее время, необходимое для закрытия раны
2016	NCT01859117	СД 15 пациентов	МСК плацентарной ткани	Увеличение дистанции безболезненной ходьбы, улучшение перфузии ног, чрескожного давления кислорода (TcO_2)
	NCT02619877	СД1 и СД2 59 пациентов	ALLO-ASC-DFU	Доля повторной эпителизации, время для повторной эпителизации
	NCT02394886	СД1 и СД2 5 пациентов	Аллогенные МСК жировой ткани	Количество участников с нежелательными явлениями как мера безопасности и переносимости
2015	NCT02209051	СД2 29 пациентов	Аллотрансплантат амниотической мембраны человека	Время для полного закрытия раны целевой язвы, скорость закрытия раны, частота, тяжесть и тип нежелательных явлений
	NCT02092870	СД2 25 пациентов	МСК жировой ткани	Процентное изменение размера раны по сравнению с исходным уровнем через 12 недель
2013	NCT00987363	СД1 и СД2 60 пациентов	Аутологичные МСК костного мозга	Клинически объективное улучшение конечности

Продолжение таблицы 2

Год публикации	Номер клинического исследования	Диагноз и количество пациентов с ДЯС	Тип стволовых клеток	Критерии эффективности
2012	NCT01065337	СД1 и СД2 30 пациентов	Стволовые клетки костного мозга	Частота высоких ампутаций, частота пациентов с полным заживлением язв, улучшение чрескожного парциального давления кислорода (TcPO2)
2010	NCT00955669	СД1 и СД2 40 пациентов	Аутологичные МСК костного мозга и моноклеарные клетки	Магнитно-резонансная ангиография
	NCT01232673	СД1 и СД2 90 пациентов	Аутологичные МСК	Высокая ампутация конечности через 120 дней, измерения перфузии тканей

ЕСМ, такие как коллаген и их ингибиторы. Показано, что экспрессия на мембране фибробластов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), расположенных по краю раневой поверхности, играет существенную роль в ускорении процесса заживления. Этот фактор воздействует на клетки эндотелия при взаимодействии с рецепторами VEGFR 1, 2 и 3 типов. Он также увеличивает экспрессию фактора роста фибробластов (bFGF), полноразмерного VEGFR 2 и фактора роста тромбоцитов (PDGF), что способствует образованию новых кровеносных сосудов и заживлению ран [12]. Технология, направленная на транзитное усиление экспрессии VEGF165 в МСК, прошла клинические испытания в России, в 2016 году [NCT02538705], однако данные по ней пока не представлены. Терапия ГМ-МСК жировой ткани может быть лучшим решением для лечения ДЯС, чем немодифицированными клетками, поскольку эндогенные МСК у пациентов с СД имеют низкую жизнеспособность и нарушенную пролиферацию [9]. При этом если введение МСК связано с повышенным риском нецелевого homing (хоуминга), то при использовании ГМ-МСК при незаживающих кожных поражениях может быть безопасной и перспективной методикой. За последние годы создано несколько технологий генной терапии на основе транзитной трансфекции стволовых клеток и показано их преимущество для лечения ДЯС (табл. 2). На данный момент эффективность показана только в доклинических испытаниях на мышинных моделях ДЯС. Источник МСК, их количество и качественные характеристики становятся важны для успеха трансплантации при измененном состоянии иммунной системы при диабете. Известно, что с увеличением возраста пациента пролиферативный потенциал мезенхимальных клеток жировой ткани не снижается [13], что делает эти клетки наиболее перспективными для использования. Выделение МСК из жировой ткани — метод с минимальным риском поражения донорского органа. Показано, что популяция МСК костного мозга у пациентов с диабетом критически уменьшается [14], поэтому МСК жировой ткани — основные кандидаты для временных генетических модификаций в целях терапии ДЯС.

К преимуществам аллогенного источника для трансплантации относят возможность выбрать донора (в том числе с оптимальным индексом массы тела (ИМТ), цитокиновым профилем и производством ангиогенных факторов и жизнеспособностью у трансплантата), возможность заранее отбирать и хранить данный материал. Недостатками данного источника клеток являются: потенциальная возможность реакции трансплантата против хозяина (РТПХ), передача латентных вирусов с материалом, необходимость тщательных и дорогостоящих исследований донорского материала.

Цитокиновый профиль, секретируемый МСК жировой ткани, может смещаться в сторону воспалительного фенотипа у пациентов с ожирением, а низкий ИМТ у доноров жировой ткани позволяет выделять клеточные фракции с оптимальной способностью к пролиферации и дифференцировке. Замораживание клеток изменяет экспрессию интерферона-γ (IFN-γ), из-за чего снижается их противовоспалительное терапевтическое действие [15]. Использование клеток, не подвергавшихся заморозке, не всегда возможно в клинической практике.

Очевидным достоинством аутологичного материала является его безопасность, аутологичная ткань для трансплантации не несет в себе многих терапевтических рисков [16]. Однако стволовые клетки могут активировать онкологические процессы из-за миграции в патологическую ткань, изменяя ее воспалительный фенотип — делая ее «невидимой» для иммунной системы и активизируя процессы ангиогенеза — за счет производимых факторов и микро-РНК. Микро-РНК влияют на фенотип стволовых клеток, контролируя профили экспрессии, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Профили микро-РНК для различных типов тканей уникальны, поэтому местоположение жировой ткани, из которой выделяют клетки, влияет на эффективность трансплантации [17]. Выбор места забора донорной ткани, пол пациента, масса тела, возраст донора и контроль микро-РНК-статуса МСК жировой ткани важны для качества и количества получаемых стволовых клеток и играют ключевую роль в безопасности клеточной трансплантации.

ИММУНОМОДУЛИРОВАНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МСК

Иммуномодулирующие и поддерживающие ангиогенез свойства МСК были описаны в ряде работ [10, 11, 17]. Эти клеточные популяции лишены человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), что дает возможность тестировать для применения в клинической практике разные источники МСК жировой ткани [18]. Тестируются аутологичный (собственные клетки пациента) и аллогенный (клетки донора) источники клеток жировой ткани. Считается, что МСК являются иммунопривилегированными или иммунодефицитными из-за отсутствия или крайне низкой экспрессии генов комплексов гистосовместимости (МНС) I и II типа. Однако повторные введения донорного материала показывают значительную реакцию воспаления сустава на аллогенные МСК, но не аутологичные МСК [17]. Цитокины, в частности IFN- γ и TNF α , определяют иммунный фенотип стволовых клеток, индуцируя пролиферацию и дифференцировку МСК (рис. 1, модифицировано по статье [18]).

Экспрессия белков МНС и иммуногенность аллогенного клеточного продукта изменяется провоспалительным IFN- γ . Интерфероны, в том числе IFN- γ , взаимодействуя с каскадом белков, регулирующих работу промоторов, отвечающих за экспрессию генов МНС-II, активируют связывание транскрипционного фактора IRF9 с регуляторной последовательностью ДНК, называемой элементом регуляторного ответа интерферона (ISRE), запуская экспрессию гена [19].

Интерлейкин-6 (IL-6) и моноцитарный колониестимулирующий фактор (M-CSF), которые продуцируют МСК, играют роль в дифференцировке дендритных клеток (ДК). Высокие уровни IL-6, которые секретируют МСК, способствуют дифференцировке ДК к миелоидному фенотипу. Простагландин второго типа (PGE2) способствует созреванию ДК, блокада синтеза PGE2 в МСК может вызывать снижение активности Т-клеток. При ДЯС вырабатываются медиаторы воспаления, что приводит к привлечению Т-клеток и увеличению син-

теза факторов воспаления, таких как TNF- α , хемокинов и их рецепторов, например, CC Motif Chemokine Receptor 4 (CCR4) на поверхности клеток в язве [20]. Экспрессия воспалительных хемокинов увеличивается в ответ на активацию TNF- α или IL-1 β . В результате МСК мигрируют к месту воспаления, что осуществляется за счет градиента хемокинов SDF-1 и CX3CL, которые взаимодействуют напрямую с рецепторами CXCR4 или CX3CR1 на их мембране [21]. CXCR4 располагается на поверхности клеток только у 3,9% МСК жировой ткани, при этом большая часть его содержится внутри клеток. Рецептор CXCR4, вероятно, перемещается на поверхность после стимуляции хемокинами, что способствует миграции МСК. Повышенная экспрессия рецептора CXCR4 определяет направление миграции МСК не только к ДЯС, но и к опухоли [22], помогая ее инвазии в стро-му. Блокировка ключевых факторов миграции, например, интегрин β 1, и трансплантация непосредственно в патологический очаг, возможно, будет делать терапию более безопасной. Было показано снижение количества МСК в миокарде при блокаде интегрин β 1, клетки вводились в кровоток. Интегрин α 4/ β 1 может создавать прикрепление стволовых клеток к местам миграции и обеспечивать взаимодействие с клетками эндотелия сосудов и клеточным матриксом через рецептор VCAM-1, который связывается с интегринами α 4 β 1, β 1, α 4 β 7 и фибронектином [23]. МСК взаимодействуют с клетками эндотелия благодаря интегрин α 4, β 1, VCAM-1, Р-селектину и секреции цитокинов. Интегрины β 1 и β 2 играют важную роль в межклеточном взаимодействии клеток и адгезии с компонентами внеклеточного матрикса [24]. Одним из решений, помогающих избежать осложнений МСК-терапии, является локальное использование этих клеток вблизи места повреждения. Поскольку для восстановления кожного покрова основная масса трансплантированных клеток не должна попадать в кровоток, чтобы избежать нецелевой их миграции. Возможно, временная блокировка интегринов — перспективное средство для контроля локализации терапевтических МСК.

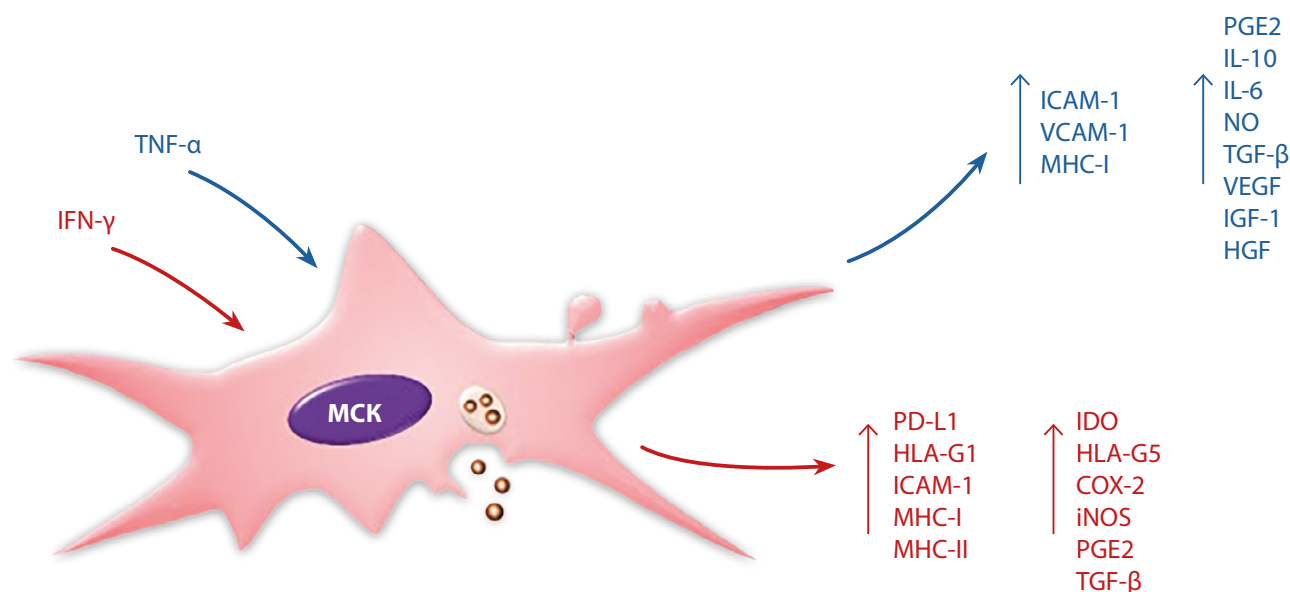


Рисунок 1. Интерферон-гамма (IFN- γ) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) определяют иммунный фенотип мезенхимальных стволовых клеток.

Повышенные титры некоторых гормонов — эстрогена, прогестерона, лептина — способствуют малигнизации тканей и запуску провоспалительных реакций [25]. Так, МСК, которые были получены из подкожной жировой ткани брюшной полости пациентов с ожирением, усиливали канцерогенез после совместного культивирования с лептином. Профиль экспрессии генов стволовых клеток демонстрировал изменения, вызванные ожирением. Блокирование сигналов эстрогена с помощью лептин-нейтрализующего антитела уменьшало негативное влияние клеток жировой ткани, полученных от пациентов с ожирением, которое вызывает значительные изменения в фенотипе клеточного трансплантата, усиливая канцерогенез через эстрогензависимые пути ER+/PR+ [25]. Кроме того, стволовые клетки способны подавлять рост трансформированных клеток, останавливая клеточный цикл, также ингибируя пролиферацию и блокируя путь PI3K/AKT [26]. МСК, трансплантированные в модели мыши с гепатоцеллюлярной карциномой, раком поджелудочной железы, раком простаты и меланомы подавляли рост опухоли [27]. Учитывая эти противоречивые данные, при трансплантации необходим контроль миграции и изменения фенотипа введенных МСК на уровне цитокинов, гормонов и микро-РНК.

ГМ-МСК ТЕСТИРУЮТСЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Одной из первых работ, в которой использовали ГМ-МСК, было подавление ксенотрансплантата меланомы человека у мыши. Клетки с повышенной экспрессией интерферона- β (IFN- β) вводили в приживленную опухоль, что приводило к снижению скорости ее роста, а также двукратному повышению выживаемости мышей по сравнению с контрольной группой после проведения таких инъекций [28]. В мышинной модели ксенографта также продемонстрировано, что добавление низких доз цитостатика цисплатина к IFN- β -модифицированным МСК значительно усиливает эффективность противоопухолевой терапии [29].

На сегодняшний день выделен ряд генов, относящихся к опухолевым супрессорам, чьи генетические модификации исследуются для терапии ГМ-МСК. Одним из многообещающих терапевтических агентов является индуцирующий апоптоз цитокин — рецептор фактора некроза опухоли (TRAIL), который обнаружен на поверхности злокачественных клеток. В ГМ-МСК с повышенным синтезом TNF- α в сочетании с лучевым воздействием значительно возрастает уровень экспрессии TRAIL. Противоопухолевая эффективность подобных модифицированных клеток была описана для различных видов опухолей. Кроме того, показано, что модификации IFN- γ у ГМ-МСК уровень экспрессии TRAIL увеличен [30].

Для применения таких клеток необходимо проводить тестирование патологических тканей на наличие экспрессии X-сцепленного ингибитора белка апоптоза (XIAP). Некоторые опухоли могут проявлять устойчивость к высоким уровням TRAIL, что связано с увеличенной экспрессией XIAP, способного снижать активность каспаз 3 и 9. Анти-апоптотические свойства XIAP регулируются другим активатором каспазы, получаемым из митохондрий (Smac), который предотвращает физическое

взаимодействие между XIAP и каспазами, тем самым блокируя ингибирование апоптоза [31].

В качестве противоопухолевых агентов, кроме IFN- β и TRAIL, также рассматриваются интерлейкины IL-2, IL-12 и IL-21, так как они играют важную роль в регуляции воспалительных и иммунных реакций. IL-12-модифицированные ГМ-МСК способствуют снижению степени метастазирования и индуцируют апоптоз опухолевых клеток у мышей с гепатоцеллюлярной карциномой, раком легких и меланомой, активируя при этом цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки [32]. Доказано, что введение ГМ-МСК, полученных из околоплодных вод и экспрессирующих IL-2, приводило к индукции апоптоза в клетках рака яичников у мышей. Кодированный геном PTEN белок — фосфатаза и гомолог тензина (phosphatase and tensin homolog) — представляет собой один из основных опухолевых супрессоров у человека. Показано, что стволовые клетки суперэкспрессирующие белок PTEN могут трансформироваться в клетки глиобластомы *in vivo* [33].

Транспорт белка с помощью стволовых клеток к местам повреждения и их противоопухолевые свойства описаны для таких белков, как IFN- α , IFN- γ , CX3CL1, апоптин, PEGF и микро-РНК — miR124 и miR145. Модификация стволовых клеток для одновременной экспрессии нескольких терапевтических белков может повысить их противоопухолевый потенциал. Было показано, что TRAIL и модифицированные тимидинкиназой вируса простого герпеса (HSV-TK) МСК значительно снижают скорость роста опухоли и увеличивают выживаемость мышей со злокачественной глиобластомой [34].

РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ АУТОЛОГИЧНЫХ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДЯС

Генные модификации клеток могут быть постоянные и временные. Для каждого типа модификаций критерии безопасности продукта на основе ГМ-МСК отличаются. Стабильно измененные клетки должны быть получены из моноклона, т.е. быть потомством одной модифицированной клетки, так как в таком случае, после генного анализа линии, будет известно, куда встроились инженерные конструкции и сколько их, насколько генетически стабильна линия, не становится ли клетка патогенной из-за инсерционного мутагенеза. При таком типе модификаций сохранить тонкие биохимические настройки клеток сложно, так как и быстрое проникновение рекомбинантной ДНК с повреждением клеточной стенки электропорацией, и длительные процессы культивирования, и встройки в геном будут способствовать проявлению воспалительного фенотипа клеток. Транзиторная (временная) модификация ДНК возможна при использовании генных каркасов, аденоассоциированных вирусов, фагоцитозу фрагментов ДНК/РНК. Такое изменение сохраняется в клетке несколько дней — пока рекомбинантные нуклеиновые кислоты не уничтожатся клеточными нуклеазами, при этом инженерная кассета не встраивается в геном. Не создавая стабильных изменений, следовательно, избегая инсерционного мутагенеза, такая технология основана на защитных механизмах самих иммунных клеток, не меняет их биологических свойств на постоянной основе. Элиминация чужеродного

генетического материала происходит на 3–5 сутки после поглощения.

Предложено несколько методов генетической модификации аутологичных МСК жировой ткани при лечении ДЯС на основе временной экспрессии ряда генов. Транзиторная сверхэкспрессия для восстановления терапевтического потенциала — увеличения пролиферации и жизнеспособности трансплантируемых клеток одного из генов — *SDF-1a* и *MALAT1* [36], *c-Jun* [35], *IL-7* [37], а также некоторых микро-РНК [38].

Ген *c-Jun* представляет собой основной элемент фактора транскрипции AP-1, который участвует в регуляции дифференцировки, миграции, пролиферации и апоптоза клеток, а также в звеньях воспалительных процессов и онкогенезе. Этот фактор также связан с метаболизмом EGF, что подчеркивает его важную роль в процессе заживления кожных ран. Клетки с повышенной экспрессией *c-Jun* демонстрируют более активную пролиферацию и продукцию факторов роста, что стимулирует заживление ран у крыс с диабетом по сравнению с контролем [35].

Действие гена *SDF-1a* для восстановления регенеративного потенциала МСК показало [38], что клетки несут конструкцию с повышенной экспрессией гена *SDF-1a*, активированного этим геном. *SDF-1a* действует как хемокин, рекрутируя клетки в месте раны и стимулируя ангиогенез [38]. Этот ген улучшает жизнеспособность МСК. Показано, что скаффолд, применяемый в ране в виде генного каркаса, активированного геном *SDF-1a*, усиливает ангиогенез, что способствует ускоренному заживлению раны.

Экспрессия VEGF — избыточная экспрессия *MALAT1* — также оказывает сильное влияние на количество белка VEGF в клетке. *MALAT1* производит полноразмерную некодирующую РНК, конкурентно ингибирует miR-205, которая при отсутствии механизмов подавления связывается с 3' участком РНК гена VEGF и блокирует синтез белка. Оказалось, что трансплантация МСК, транзитивно экспрессирующих *MALAT1*, оказывает влияние не только на ускоренное заживление ран, но и стимулируют выживаемость бета-клеток поджелудочной железы у мышей [39].

Цитокин IL-7 выполняет значимую роль в процессах заживления ран, выступая в качестве фактора выживания для определенных видов клеток. В случае временного повышения экспрессии гена *IL-7* в стволовых клетках усиливается экспрессия основных ангиогенных факторов, таких как: VEGF, фактор роста гепатоцитов [HGF], рецептора VEGF 1 и 2 типов. Было экспериментально подтверждено ускоренное заживление ДЯС при такой модификации [40].

Некоторые малые РНК, например, miR-205, miR-206, miR-130a-3p, являются прямыми регуляторами трансляции белка VEGF [39]. Снижение экспрессии miR-205 увеличивает количество белка VEGF, производимого стволовыми клетками, что облегчает лечение ДЯС. Внутриклеточная модуляция этих микро-РНК в МСК способствует репарации кожи и снижает проонкогенный риск.

Процессы ангиогенеза являются мишенью для малых РНК, таких как miR-205-5p, miR-23a-3p и miR-130a-3p, которые нацелены на большинство генов, связанных с этим. VEGF может усиленно экспрессироваться благодаря транзитивно увеличенной дозе гена регуляторной РНК в стволовой клетке. Такая регуляция VEGF может

быть более безопасной, чем конститутивная сверхэкспрессия генов ангиогенеза, которая часто происходит в малигнизированных тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заживление ДЯС при состояниях с измененным иммунным статусом (в т.ч. из-за изменения концентрации глюкозы в крови) в сочетании с хроническим воспалительным процессом, как при СД, — длительный процесс, который может закончиться ампутацией пораженной конечности или смертью из-за сепсиса. Рецидивы воспаления, вторичные инфекции в открытой ране, заживающей в течение нескольких месяцев, делают даже небольшие повреждения серьезным испытанием для иммунной системы организма.

Новые клеточные технологии помогают контролировать заживление ран, успешно разрабатываются для терапии хронических язв, возникающих зачастую при диабете. К таким клеточным технологиям относятся: увеличение жизнеспособности стволовых клеток за счет использования генного каркаса эпидермального фактора роста или *SDF-1a*, временной повышенной экспрессии генов *Neurotrophin-3*, *c-Jun* и *IL-7*, экспрессия гена *MALAT1* для снижения активности микро-РНК-205-5p. Такое свойство трансплантируемых клеток, как миграция к местам воспаления в организме, делает их незаменимым инструментом для переноса различных терапевтических агентов к местам патологического процесса. Для того чтобы использовать такие технологии в клинической практике, они должны быть максимально безопасны. Однако показано, что терапия стволовыми клетками имеет и побочные эффекты, которые могут усугубить хронические воспалительные процессы, часто возникающие как следствие диабета. Эти технологии находятся в процессе разработки и требуют валидации и оценки клинической эффективности перед применением. Следовательно, если введение МСК сопровождается временными генными модификациями, которые способны контролировать миграцию, жизнеспособность и паракринный эффект трансплантата, то это, несомненно, сделает клеточную терапию ДЯС более эффективной и безопасной.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно-технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15-2022-310.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Абакушина Е.В. — разработка концепции научной работы, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания; Воробьева И.Г. — написание статьи, подбор литературы по теме статьи; Степанова И.А. — анализ научной литературы; составление черновика рукописи; Румянцев С.А. — обработка результатов, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med*. 2017;376(24):2367-2375. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1615439>
- Liu J, Ding Y, Liu Z, Liang X. Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:258. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
- Hanefeld M, Duetting E, Bramlage P. Cardiac implications of hypoglycemia in patients with diabetes - a systematic review. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:135. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-135>
- Skrepnek GH, Mills JL Sr, Armstrong DG. A Diabetic Emergency One Million Feet Long: Disparities and Burdens of Illness among Diabetic Foot Ulcer Cases within Emergency Departments in the United States, 2006-2010. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134914. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134914>
- Shao J, Zhang W, Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biol Res*. 2015;48:62. doi: <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0053-4>
- Najar M, Melki R, Khalife F, et al. Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Value, Challenges and Optimization. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:716853. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716853>
- ClinTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine [cited 2024 Aug 7]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>.
- Chinese Clinical Trial Registry [Internet]. ChiCTR. [cited 2024 Aug 7]. Available from: <https://www.chictr.org.cn>.
- Otero-Viñas M, Falanga V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(4):149-163. doi: <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0627>
- Rivas-Santiago B, Trujillo V, Montoya A, et al. Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J Dermatol Sci*. 2012;65(1):19-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.09.013>
- Rahavi H, Hashemi SM, Soleimani M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exert in vitro immunomodulatory and beta cell protective functions in streptozotocin-induced diabetic mice model. *J Diabetes Res*. 2015;2015:878535. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/878535>
- Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(11):483-512. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.001>
- Warsinske HC, Ashley SL, Linderman JJ, et al. Identifying Mechanisms of Homeostatic Signaling in Fibroblast Differentiation. *Bull Math Biol*. 2015;77(8):1556-82. doi: <https://doi.org/10.1007/s11538-015-0096-2>
- Tang QL, Han SS, Feng J, et al. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF. *Mol Med Rep*. 2014;9(4):1277-82. doi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1921>
- Gentile P, Casella D, Palma E, Calabrese C. Engineered Fat Graft Enhanced with Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells for Regenerative Medicine: Clinical, Histological and Instrumental Evaluation in Breast Reconstruction. *J Clin Med*. 2019;8(4):504. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm8040504>
- Cassidy FC, Shortiss C, Murphy CG, et al. Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Human Bone Marrow Stromal Cell Number and Phenotypic Characteristics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2476. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21072476>
- Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*. 2014;32(9):2430-42. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.1729>
- López-García L, Castro-Manreza ME. TNF- α and IFN- γ Participate in Improving the Immunoregulatory Capacity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Importance of Cell-Cell Contact and Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9531. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22179531>
- Fukumoto R. Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome. *Mil Med Res*. 2016;3:17. doi: <https://doi.org/10.1186/s40779-016-0086-1>
- Krampera M, Galipeau J, Shi Y, et al. MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*. 2013;15(9):1054-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.010>
- Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, et al. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):42. doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0503-8>
- Lourenco S, Teixeira VH, Kalber T, et al. Macrophage migration inhibitory factor-CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors. *J Immunol*. 2015;194(7):3463-74. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402097>
- Carraro A, Trevellin E, Fassan M, et al. Esophageal adenocarcinoma microenvironment: Peritumoral adipose tissue effects associated with chemoresistance. *Cancer Sci*. 2017;108(12):2393-2404. doi: <https://doi.org/10.1111/cas.13415>
- Segers VF, Van Riet I, Andries LJ, et al. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(4):H1370-7. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00523.2005>
- Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177-183. doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>
- Sheng H, Wang Y, Jin Y, et al. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*. 2008;18(8):846-57. doi: <https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>
- Barros JF, Wacławski I, Peclí C, et al. Role of Chemokine Receptor CCR4 and Regulatory T Cells in Wound Healing of Diabetic Mice. *J Invest Dermatol*. 2019;139(5):1161-1170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.039>
- Du J, Liu A, Zhu R, et al. The Different Effects of IFN- β and IFN- γ on the Tumor-Suppressive Activity of Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019;2019:4592701. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/4592701>
- Ahn JO, Lee HW, Seo KW, et al. Anti-tumor effect of adipose tissue derived-mesenchymal stem cells expressing interferon- β and treatment with cisplatin in a xenograft mouse model for canine melanoma. *PLoS One*. 2013;8(9):e74897. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074897>
- Yang X, Du J, Xu X, et al. IFN- γ -secreting-mesenchymal stem cells exert an antitumor effect in vivo via the TRAIL pathway. *J Immunol Res*. 2014;2014:318098. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/318098>
- Hörnle M, Peters N, Thayaparsingham B, et al. Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*. 2011;30(5):575-87. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.434>
- Yang ZS, Tang XJ, Guo XR, et al. Cancer cell-oriented migration of mesenchymal stem cells engineered with an anticancer gene (PTEN): an imaging demonstration. *Oncotargets Ther*. 2014;7:441-6. doi: <https://doi.org/10.2147/OTT.S59227>
- Guo XR, Hu QY, Yuan YH, et al. PTEN-mRNA engineered mesenchymal stem cell-mediated cytotoxic effects on U251 glioma cells. *Oncol Lett*. 2016;11(4):2733-2740. doi: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4297>
- Etich J, Bergmeier V, Pitzler L, Brachvogel B. Identification of a reference gene for the quantification of mRNA and miRNA expression during skin wound healing. *Connect Tissue Res*. 2017;58(2):196-207. doi: <https://doi.org/10.1080/03080207.2016.1210606>
- Yue C, Guo Z, Luo Y, et al. c-Jun Overexpression Accelerates Wound Healing in Diabetic Rats by Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2020;2020:7430968. doi: <https://doi.org/10.1155/2020/7430968>
- Laiva AL, O'Brien FJ, Keogh MB. SDF-1 α Gene-Activated Collagen Scaffold Restores Pro-Angiogenic Wound Healing Features in Human Diabetic Adipose-Derived Stem Cells. *Biomedicines*. 2021;9(2):160. doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020160>
- Sun X, Luo L, Li J. LncRNA MALAT1 facilitates BM-MSCs differentiation into endothelial cells via targeting miR-206/VEGFA axis. *Cell Cycle*. 2020;19(22):3018-3028. doi: <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1829799>

38. Zhu J, Luo Y, Zhao Y, et al. circEHP1 promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of bladder cancer via miR-130a-3p/TGFβR1/VEGF-D signaling. *Mol Ther*. 2021;29(5):1838-1852. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2021.01.031>
39. Li X, Song Y, Liu F, et al. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Proliferation, Angiogenesis, and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells by Inducing VEGF and IDO. *J. Cell. Biochem*. 2017;118(9):2780-2791. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.25927>
40. Khalid RS, Khan I, Zaidi MB, et al. IL-7 overexpression enhances therapeutic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells for diabetic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 2019;27(3):235-248. doi: <https://doi.org/10.1111/wrr.12706>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

***Абакушина Елена Вячеславовна**, д.м.н. [Elena V. Abakushina, MD, PhD]; адрес: Россия, 117292, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanov street, 117292 Moscow, Russia]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3881-3221>; ResearcherID: O-6947-2014; Scopus Author ID: 15844847700; eLibrary SPIN: 7015-3946; e-mail: abakushina@mail.ru

Воробьева Ива Глебовна, к.б.н., ст.н.с. [Iva G. Vorobyova, PhD in Biology, senior researcher]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-3351>; eLibrary SPIN: 3362-1307; e-mail: vorobieva@tecon.ru

Степанова Ирина Анатольевна, к.б.н., н.с. [Irina A. Stepanova, PhD in Biology, researcher]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1316-398X>; ResearcherID: U-5075-2018; Scopus Author ID: 56086276200; eLibrary SPIN: 1354-6913; e-mail: IrinkaStepanova@yandex.ru

Румянцев Сергей Александрович, д.м.н., профессор [Sergey A. Roumiantsev, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7418-0222>; ResearcherID: L-1428-2018; Scopus Author ID: 6506470384; eLibrary SPIN: 1433-2016; e-mail: s_roumiantsev@mail.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Абакушина Е.В., Воробьева И.Г., Степанова И.А., Румянцев С.А. Терапия хронических трофических язв у больных сахарным диабетом с применением генных модификаций клеточного трансплантата // *Сахарный диабет*. — 2024. — Т. 27. — №6. — С. 611-619. doi: <https://doi.org/10.14341/DM13215>

TO CITE THIS ARTICLE:

Abakushina EV, Vorobyova IG, Stepanova IA, Roumiantsev SA. Therapy of chronic skin ulcers in patients with diabetes mellitus using gene modifications of cell transplant. *Diabetes Mellitus*. 2024;27(6):611-619. doi: <https://doi.org/10.14341/DM13215>