

Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей

К.А. Талицкий, О.С. Булкина, Т.И. Арефьева, О.Н. Воробьева, И.В. Левицкий, А.А. Федорович, П.И. Макаревич, Е.В. Парфенова, Ю.А. Карпов

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

Efficacy of therapeutic angiogenesis in patients with chronic lower limb ischemia

K.A. Talitsky, O.S. Bulkina, T.I. Arefeva, O.N. Vorobyeva, I.V. Levitsky, A.A. Fedorovich, P.I. Makarevich, E.V. Parfyenova, Yu.A. Karpov
Russian Cardiology Research-and-Production Complex of the RF Ministry of Public Health, Moscow

Терапевтический ангиогенез — перспективный метод лечения для пациентов с хронической ишемией нижних конечностей, которым не показана реваскуляризация. В ряде исследований был продемонстрирован хороший терапевтический эффект генной и клеточной терапии, направленный на стимуляцию ангиогенеза. Вместе с тем, факторы, влияющие на эффективность стимуляции ангиогенеза в клинических условиях, остаются малоизученными. В данном исследовании 30 больных 49–78 лет с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротического происхождения (Fontaine IIb-IV) были рандомизированы в группу генной терапии (ГТ), либо в группу контроля (К). В группе ГТ больным в ишемизированные мышцы конечностей вводили плазмидную ДНК, включающую кодирующую часть гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF-165). Всем больным проводились сеансы тренировочной ходьбы на тредмиле. Для оценки эффективности вмешательства помимо клинических показателей использовали ангиографию, сцинтиграфию, транскутанную оксиметрию, лазерное доплеровское исследование, ультразвуковое дуплексное сканирование, тредмил-тест, оценивали содержание циркулирующих прогениторных клеток с помощью поточной цитометрии и ангиогенных факторов роста методом иммуноферментного анализа. Через 3 мес. в группе ГТ отмечено увеличение показателей перфузии конечностей, дистанции безболевой ходьбы и показателей коллатерального кровоснабжения. У 50% пациентов эффект лечения расценен как умеренный (Rutherford +2), у 30% как минимальный (Rutherford +1), у 20% без динамики. В группе стандартной терапии значимой динамики клинико-лабораторных показателей не отмечено. Серьезных осложнений зарегистрировано не было. При корреляционном анализе эффективность ангиогенной терапии ассоциировалась с проходимым подвздошным сегментом, меньшей длительностью анамнеза курения и более высоким лодыжечно-плечевым индексом.

Ключевые слова: терапевтический ангиогенез, хроническая ишемия нижних конечностей, васкулярный эндотелиальный фактор роста.

Ишемические поражения нижних конечностей занимают важное место в структуре сердечно-сосудистой заболеваемости. Периферический атеросклероз (ПА) является главной причиной ишемии нижних конечностей и ассоциирован с 3–6-кратным повышением сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. Распространенность ишемии нижних конечностей среди населения старше 50 лет составляет 5–8%, а при наличии таких факторов риска, как гиперлипидемия, курение, артериальная гипертензия или сахарный диабет, достигает 30% [1]. ПА представляет серьезную медицинскую и социальную проблему в связи с частой инвалидизацией и высокой смертностью больных, недостаточной эффективно-

Therapeutic angiogenesis is a promising treatment modality in patients with chronic lower limb ischemia, for whom revascularization is not indicated. A number of studies demonstrated satisfactory therapeutic effects of gene and cell-based therapy targeted to stimulate angiogenesis. At the same time the factors affecting the efficacy of angiogenesis stimulation in clinical settings are under-investigated.

In the given study 30 patients, aged 49–78 years with chronic lower limb ischemia of atherosclerotic origin (Fontaine IIb-IV) were randomized into groups of gene therapy (GT) or the control group (C). Plasmid DNA containing an encoding part of the vascular endothelial growth factor (VEGF-165) gene was inserted into ischemic limb muscles of the GT patients. All the patients had sessions of treadmill training walking. Besides clinical findings, angiography, scintigraphy, transcutaneous oxymetry, laser Doppler examination, duplex ultrasonography, treadmill test were carried out to evaluate the intervention efficacy. Also circulating progenitor cell count was assessed by flow cytometry, ELISA was used to evaluate angiogenic growth factors. In 3 months limb perfusion rate, painless walking distance, collateral circulation indices increased. In 50% of patients the therapeutic effect was assessed as moderate (Rutherford +2), in 30% as minimal (Rutherford +1), 20% of patients showed no dynamics. Clinical laboratory tests had no significant dynamics in the group of standard therapy. No serious complications were noted. In a correlation test the efficacy of angiogenic therapy was associated with a patent iliac segment, shorter smoking history and higher ankle-brachial index.

Key words: therapeutic angiogenesis, chronic lower limb ischemia, vascular endothelial growth factor.

стью существующих методов лечения, особенно при распространенном поражении артериального русла нижних конечностей, что делает актуальным поиск новых терапевтических технологий [2, 3].

Терапевтический ангиогенез — терапия, направленная на стимуляцию роста новых сосудов в ишемизированных тканях с помощью ангиогенных факторов роста, их генов или стволовых и прогениторных клеток — рассматривается как перспективный метод лечения пациентов с рефрактерной ишемией нижних конечностей, позволяющий улучшить перфузию тканей, уменьшить ишемические симптомы и в ряде случаев предотвратить ампутацию. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях,

проведенных в ведущих медицинских центрах мира, было показано, что введение в ишемизированные мышцы или в сосуды нижних конечностей факторов роста или их генов стимулирует ангиогенез, улучшает перфузию тканей и уменьшает симп-томатику, обусловленную ишемией [4]. Наиболее изученным на сегодняшний день является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) — основной регулятор ангиогенеза как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде развития организма. Генетические конструкции, содержащие ген VEGF, прошли 2-ю фазу клинических испытаний в нескольких медицинских центрах США, Европы и Азии, показавших хорошую переносимость, безопасность применения подобных генетических конструкций как при введении в ишемизированные мышцы конечностей, так и при введении в миокард у больных ИБС [5].

Вместе с тем, эффективность применения терапевтического ангиогенеза может заметно отличаться от исследования к исследованию. В пионерской работе I. Baumgartner et al. (1998) через 8 нед. после внутримышечного введения раствора плазмиды с геном VEGF165 у 7 из 9 пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК) был отмечен достоверный прирост лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) в среднем с 0,33 до 0,48. При ангиографии визуализировались новообразованные коллатеральные сосуды, по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) регистрировалось улучшение перфузии дистальных отделов конечностей, у 8 из 9 больных отмечалось клиническое улучшение [5]. В то же время в рандомизированном исследовании RAVE у 105 больных с ишемией нижних конечностей, которым в ишемизированные мышцы вводили репликационно-дефектный аденовирус, содержащий ген VEGF121, либо плацебо, достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами не было. Возможно, определенную роль играет выбор изоформы VEGF121, в структуре которой отсутствует гепарин-связывающий домен, ответственный за фиксацию молекулы в тканях, что приводит к более быстрому «вымыванию» трансгенного продукта из тканей и снижает эффективность стимуляции ангиогенеза. Следует также принимать во внимание периодичность введения трансгена: наилучшие результаты были получены в работах с повторным введением.

В настоящее время продолжают поиски оптимальных генов-кандидатов и путей их введения. В рандомизированном исследовании Y.H. Kusumanto с соавт. (2006) у 54 больных с ПХ и КИНК, страдающих сахарным диабетом, после двукратного (с интервалом 28 сут.) введения плазмиды, содержащей ген VEGF165, в ишемизированные мышцы в группе вмешательства наблюдалось заживление трофических язв, уменьшение болевого синдрома, увеличение перфузии конечности [6]. В исследовании TALISMAN 201 у больных с КИНК 4-кратное введение плазмиды NV1 с геном FGF позволило снизить риск ампутации конечности в 2 раза по сравнению с плацебо [7]. В исследовании R.J. Powell с соавт. (2010) у больных КИНК после повторных введений плазмиды с геном HGF 1 раз в 2 нед. отмечался достоверный прирост пальцевого индекса давления и уменьшение болевого синдрома по данным визуальной аналоговой шкалы [8]. В исследовании H. Shigematsu с соавт. (2011) у 22 больных с КИНК удалось получить хороший эффект (уменьшение

болеи, увеличение ЛПИ, заживление ишемических язв) при повторном введении плазмиды с геном HGF с интервалом в 2 нед. [9].

В лаборатории молекулярной эндокринологии (руководитель академик В.А. Ткачук) и лаборатории ангиогенеза (руководитель проф. д.м.н. Е.В. Парфенова) ИЭК РКНПК был разработан препарат «Корвиан» — плазмидная конструкция, содержащая ген VEGF. Результаты проведенных токсикологических и общепармакологических испытаний препарата показали отсутствие токсичности и его безопасность при введении лабораторным животным, а доклинические исследования на моделях ишемии конечностей и инфаркта миокарда продемонстрировали его эффективность в стимуляции ангиогенеза и регенеративных процессов в тканях [10]. Целью настоящей работы была оценка безопасности и эффективности стимуляции ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей, которым невозможно провести хирургическую или эндоваскулярную реваскуляризацию, и выявление факторов, влияющих на эффективность данного вмешательства.

Факторы, определяющие эффективность стимуляции ангиогенеза в клинических условиях, остаются в основном малоизученными. В исследованиях, где для стимуляции ангиогенеза применяли клеточную терапию, эффективность вмешательства была выше у больных с облитерирующим тромбангиитом, чем у больных с ишемией конечностей атеросклеротического генеза. В исследованиях генной терапии уровень ангиогенных факторов роста в крови повышался в единичных случаях и не коррелировал с эффективностью вмешательства. Вместе с тем, роль клеточных компонентов ангиогенного каскада в терапевтическом ангиогенезе практически не исследована.

Клетки-предшественницы эндотелиоцитов (ЭКП) привлекают растущее внимание исследователей во всем мире и как новый маркер сердечно-сосудистого риска, и как возможное «лечебное средство». Экспериментальным путем было установлено, что в определенных условиях ЭКП могут дифференцироваться в гладкомышечные клетки и кардиомиоциты [11, 12]. На моделях ишемии у животных показано, что ЭКП включаются в места повреждения эндотелия и фокусы активной неоваскуляризации; до 25% новообразованного эндотелия формируется за счет ЭКП [13]. В пилотных клинических исследованиях аутоотрансплантация мононуклеарной фракции крови, обогащенной мобилизованными из костного мозга ЭКП, приводит к значимой стимуляции коллатерального ангиогенеза при острой и хронической ишемии нижних конечностей, улучшению перфузии конечности и клинического течения заболевания [14–16].

В ряде исследований, в том числе выполненных сотрудниками РКНПК, было установлено, что снижение уровня циркулирующих прогениторных клеток коррелирует с уровнем сердечно-сосудистого риска и маркерами эндотелиальной дисфункции [17, 18]. При периферическом атеросклерозе отмечается существенное уменьшение количества циркулирующих ЭКП со снижением их жизнеспособности и функциональной активности [19], что может оказывать влияние на эффективность терапевтического ангиогенеза [20]. Вместе с тем, на сегодняшний день остается неясным, какая из популяций прогениторных клеток вносит основной вклад в развитие лечебного эффекта

при терапевтическом ангиогенезе [15, 21]. Учитывая ключевую роль эндотелиальных предшественников и ангиогенных факторов роста в процессах ангиогенеза, их содержание в крови больных может отражать динамику ангиогенной стимуляции и быть одним из доступных для изучения факторов, влияющих на общую эффективность ангиогенной терапии.

Материал и методы

Пациенты. В исследование включали больных с облитерирующим атеросклерозом и хронической ишемией нижних конечностей (Fontaine II–IV), имеющих преимущественно односторонний характер поражения, не являющихся оптимальными кандидатами для выполнения реваскуляризации. Больные были рандомизированы в группы генной терапии и стандартного лечения. Критерии исключения были традиционными для клинических исследований в области терапевтического ангиогенеза (табл. 1). В исследование не включались больные с онкологическим анамнезом, пролиферативной ретинопатией, аутоиммунными заболеваниями, тяжелыми метаболическими нарушениями. Перед решением вопроса об участии в исследовании больным проводился онкоскрининг. Пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был утвержден Комитетом по этике при Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Ученым советом РКНПК и локальным этическим комитетом.

Протокол исследования. Дизайн работы — проспективное открытое рандомизированное контролируемое исследование. Все больные получали базисную терапию (статины, ацетилсалициловая кислота, трентал, ингибиторы АПФ или блокаторы рецепторов ангиотензина II), всем пациентам при отсутствии противопоказаний проводились сеансы тренировочной ходьбы на тредмиле. В группе генной терапии дополнительно к стандартной терапии больные получали лечение, направленное на стимуляцию ангиогенеза в ишемизированных конечностях.

Пациентам группы генной терапии в ишемизированные мышцы путем обкалывания вводили «Корвиан» — стерильный апиогенный препарат плазмидной ДНК, включающей кодирующую часть (кДНК) гена VEGF165 под контролем цитомегаловирусного промотора. Введение препарата проводили дважды с промежутком в одну неделю (у 10 больных) и трижды с про-

межутком в неделю между первым и вторым введениями и две недели — между 2-м и 3-м введениями.

Для оценки эффективности вмешательства, помимо стандартного клинического обследования, был использован комплекс современных лабораторных и клинико-инструментальных методов. Относительную и абсолютную дистанцию безболевой ходьбы оценивали по стандартной методике в ходе тредмил-теста по протоколу Гарднера-Скиннера. Всем больным проводили дуплексное сканирование и УЗДГ нижних конечностей с определением ЛПИ, ангиографию, сцинтиграфию нижних конечностей с $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, транскутанную оксиметрию. Толерантность к физической нагрузке оценивалась исходно, через 2 нед. и 1, 3, 6 мес. после начала лечения. Трофические язвы при их наличии на момент включения фотографировали каждый месяц. Повторная ангиография, сцинтиграфия и МРТ нижних конечностей проводились через 3 мес. после начала лечения.

Сцинтиграфия нижних конечностей с $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ проводилась для оценки перфузии конечностей на аппарате Siemens SkyLight по оригинальному протоколу. Показатель перфузии выражался как доля накопленной радиоактивности радиофармпрепарата по отношению к общей радиоактивности тела.

Ангиографию нижних конечностей проводили по стандартной методике феморальным или радиальным доступом. В качестве контрастного препарата использовали «Омнипак» либо «Визипак». Для корректной оценки ангиограмм в динамике для каждого больного при повторной ангиографии основные параметры исследования оставляли неизменными: тип установки, вид доступа, калибр катетера и положение его кончика, объем и скорость введения контраста, проекцию, скорость и продолжительность съемки. Степень развития коллатералей оценивали по Рентропу для каждого сегмента артериального русла конечности в отдельности: подвздошный сегмент, бедро, голень. Для оценки эффективности коллатерального кровотока применяли коллатеральный индекс Choi, модифицированный нами для нижних конечностей. Индекс определяется как частное от суммы баллов по Рентропу для каждого сегмента конечности и суммы так называемых индексов коллатерального сопротивления, представляющих собой произведение максимального процента стеноза магистральной артерии для каждого сегмента конечности и времени прохождения контрастом данного сегмента.

Таблица 1. Критерии отбора пациентов

Критерии включения	Критерии исключения
Больные с ишемией нижних конечностей (Fontaine IIb–IV) и лодыжечно-плечевым индексом менее 0.9, которым не планируется выполнение хирургической или чрескожной реваскуляризации нижних конечностей, подписавшие информированное согласие на участие в исследовании	Острый коронарный синдром или ОНМК в предшествующие 3 мес. Стенокардия III–IV ФК ХСН III–IV ФК NYHA Неконтролируемая инфекция Пролиферативная ретинопатия; Онкологические заболевания, в т.ч. в анамнезе Клиренс креатинина менее 30 мл/мин Тяжелая печеночная недостаточность Дыхательная недостаточность II–III ст. Нефротический синдром Аутоиммунные заболевания

У больных с окклюзионными поражениями артерий для оценки числа коллатералей также использовали адаптированный метод Vajanto и соавт. (2009): подсчитывали все видимые коллатерали, пересекающие прямую, перпендикулярную длиннику окклюзированного сегмента артерии на границе его средней и дистальной трети [22]. При наличии нескольких участков окклюзии показатели усреднялись для каждого больного.

Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ). Исследование динамики параметров микроциркуляторного кровотока в коже методом ЛДФ выполнено у 18 пациентов исходно и через 8–12 нед. после терапии препаратом «Корвиан». Исследование выполняли в положении лежа на спине после 15-минутного периода адаптации в помещении при температуре $+23 \pm 1^\circ\text{C}$ в средней трети передней поверхности голени одноканальным лазерным анализатором кровотока «ЛАКК-02» и блок «ЛАКК-ТЕСТ» («ПАЗМА», Россия), что позволяет оценивать параметры периферического кровотока в видимой красной области спектра (длина волны — 630 нм) в 1 мм^3 кожи при постоянно поддерживаемой температуре в области исследования ($+32^\circ\text{C}$). Перед исследованием производили измерение температуры кожных покровов инфракрасным термометром «Beurer» (Германия) непосредственно в области исследования.

Уровень базальной перфузии оценивали на протяжении 6 мин. Для оценки функционального состояния регуляторных механизмов микрососудов применяли вейвлет анализ осцилляций кровотока и тепловую дилататорную пробу [23–28]. Состояние крупных ($>50\text{ мкм}$) артериол оценивали по величине амплитуды пульсовых колебаний, которая косвенно отражает количество притекающей к микроциркуляторному руслу артериальной крови, при базальной перфузии, на высоте дилататорного стимула ($+42^\circ\text{C}$) и в период восстановления после теплового воздействия. Исследование проводили до и через 3 мес. после лечения.

Транскутанная оксиметрия. Исследование проводили на приборе TCM 400 (Radiometer Copenhagen). Электрод располагали на коже тыльной поверхности стопы в I межпальцевом промежутке. Температура электрода поддерживалась на уровне 44°C . Напряжение кислорода (TspO_2) определяли в положении лежа, сидя и во время позиционной пробы с пассивным подъемом конечности на угол 45° в течение 3 мин и последующим восстановлением. Исследование проводили у пациентов всех групп до и через 3 мес. после лечения.

Исследование минорных клеточных популяций крови. Пробы крови брали до начала лечения, на фоне ангиогенной терапии, через 1, 3 и 6 мес. после лечения. Содержание циркулирующих прогениторных клеток оценивали в образцах мононуклеарной фракции крови, полученной путем центрифугирования на градиенте плотности $1,077\text{ г/л}$. Визуализацию поверхностных маркеров прогениторных клеток осуществляли методом прямой иммунофлуоресценции. Содержание циркулирующих клеток-предшественниц (ЦКП) оценивалось методом потоочной цитометрии на основании фенотипа $\text{CD45}^-\text{CD34}^+\text{CD133}^+$ (рис. 1) и $\text{CD45}^-\text{CD34}^-\text{CD133}^+$. По данным литературы, популяция циркулирующих ЦКП содержится внутри идентифицируемых таким образом популяций ЦКП [29]. В качестве контроля использовались образцы моно-

нуклеарной фракции крови от 10 здоровых добровольцев. Уровни циркулирующих предшественников выражались как число клеток на 1 млн мононуклеаров.

Определение уровня циркулирующих ангиогенных факторов. Уровень циркулирующего VEGF165 определяли в плазме крови пациентов из групп генной терапии и стандартного лечения перед началом лечения и затем на 7, 10, 14 и 42-е сут. после начала лечения (первого введения «Корвиана»). Взятие крови проводили из кубитальной вены утром натощак в одно и то же время в пробирки с ЭДТА (Saarstedt), плазму отделяли центрифугированием при 3000 rpm, полученные образцы плазмы хранили при -70°C . Определение концентрации VEGF и HGF проводили методом ИФА (ELISA) с помощью стандартных наборов VEGF Detection Kit, Human HGF Immunoassay (R&D).

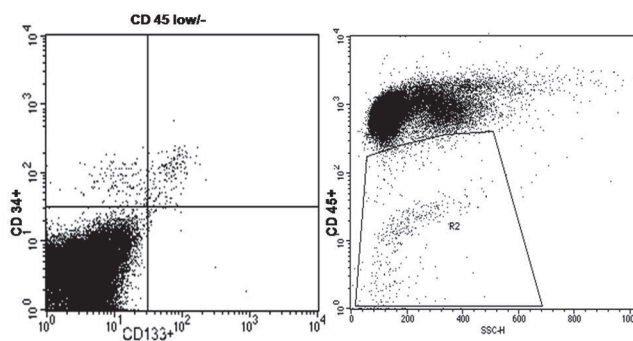


Рис. 1. Иммунофенотипирование $\text{CD45}^{\text{low/-}}\text{CD34}^+\text{AC133}^+$ прогениторных клеток методом потоочной цитометрии

Статистическая обработка результатов. Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение. Межгрупповые различия оценивались с помощью теста Манна — Уитни. Для повторных измерений использовали критерий Вилкоксона. Для анализа зависимостей применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Уровень значимости был принят 0,05.

Результаты и обсуждение

Характеристика пациентов. В исследовании приняли участие 30 больных (25 мужчин и 5 женщин) с облитерирующим атеросклерозом и хронической ишемией нижних конечностей (Fontaine II–IV) 51–76 лет, имеющих ряд относительных противопоказаний к реваскуляризации. В группу генной терапии было включено 20, в группу стандартного лечения — 10 пациентов. Клиническая характеристика больных приведена в табл. 2. В соответствии с критериями включения, поражение артерий конечностей имело преимущественно односторонний характер. Тем не менее, наличие гемодинамически значимых стенозов артерий контралатеральной конечности (стеноз более 50%) было отмечено у 70% больных. Изолированное поражение артерий бедренно-подколенного сегмента (БПС) встречалось у 43% больных, изолированное поражение сосудов подвздошного сегмента — у 10%, остальные пациенты имели сочетанное поражение артерий подвздошно-бедренного и бедренно-подколенного сегментов. У 40% больных ранее были выполнены операции реваскуляризации артерий нижних конечностей, из них в 1/3 случаев — в объеме бедренно-подколенного шунтирования,

в 2/3 случаев — аорто-бедренного или подвздошно-бедренного шунтирования. Сохранение симптоматической ишемии конечностей в половине случаев

было обусловлено наличием дистального поражения артериального русла, в остальных случаях — стенозированием либо окклюзией шунтов.

Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов

	Генная терапия	Стандартное лечение	P
Мужчины/женщины	18/2	7/3	0,136359
Возраст, лет	61,1±8,8	64,5±8,8	0,831051
Анамнез АГ, лет	12,6±8,16	11,1±3,98	0,437754
Среднее САД, мм рт. ст.	142,22±16,41	149,38±15,68	0,029194
Среднее ДАД, мм рт. ст.	85,55±11,36	81,73±15,59	0,823830
Клиника стенокардии, %	85	90	0,368709
ИМ в анамнезе, %	55	60	0,816372
Сахарный диабет, %	30	25	0,622554
Стаж курения, лет	36,5±5,30	32,38±16,84	0,047202
Ожирение, %	30	30	0,686972
Анамнез перемежающейся хромоты, лет	7,3±5,6	9,75±3,96	0,791359
Ишемия конечностей IIБ/III/IV ст.	15/3/2	7/2/1	0,081051
Реваскуляризация нижних конечностей в анамнезе, %	30	40	0,037754
Коронарная реваскуляризация в анамнезе, %	50	50	0,979194
Лодыжечно-плечевой индекс	0,516±0,21	0,455±0,30	0,033830

Ход исследования. Диагностические и лечебные процедуры в рамках протокола протекали без серьезных осложнений. В группе терапевтического ангиогенеза в течение первых суток после лечения больные отмечали чувство тяжести в области инъекций и незначительный дискомфорт при ходьбе. В группе генной терапии четверо больных (25%) характеризовали интенсивность дискомфорта как умеренную, при этом в 2 случаях по просьбе больных для облегчения дискомфорта однократно вводились анальгетики (НПВС). Остальные пациенты отмечали лишь легкий дискомфорт, не требовавший назначения анальгетиков, полностью проходивший в течение 8 ч после инъекций.

У одного больного в группе генной терапии с критической ишемией конечности (IV ст.) на фоне лечения в течение 3 нед. отмечались симметричные отеки голени, регрессировавшие после назначения малых доз мочегонных и не рецидивировавшие после их отмены.

Схема введения ангиогенного материала показана на рис. 2.

Клинический эффект лечения. По данным проспективного наблюдения в группе генной терапии в течение 6 месяцев после введения «Корвиана», у 20% больных не наблюдалось существенных изменений в клиническом статусе конечности, у 30% пациентов — минимальное улучшение (+1 по Рутерфорду), у 50% — умеренное улучшение (+2 по Рутерфорду). Ухудшения клинического статуса не наблюдалось. У одного больного с ишемией конечности IV ст., гангреной 3–4 пальцев стопы после

проведения курса лечения препаратом «Корвиан» на фоне последовавшего улучшения состояния конечности удалось отказаться от ранее запланированной ампутации голени и выполнить минимальную ампутацию на уровне головок плюсневых костей с сохранением I пальца. У больного с ишемией конечности III ст. на фоне терапии было достигнуто уменьшение болевого синдрома, позволившее отказаться от приема анальгетиков, уменьшение тяжести ишемии до IIБ ст.

В группе стандартной терапии через 3 мес. после лечения у одного больного наблюдали минимальное улучшение, у 6 больных — без существенных изменений, у трех больных наблюдали минимальное ухудшение (–1 по Рутерфорду).



Рис. 2. Точки введения ангиогенного материала в мышцы ишемизированной конечности

К 6 мес. после лечения в группе генной терапии сохранялся достигнутый терапевтический эффект, за исключением одного пациента с ишемией конечности IV ст., которому в связи с отсутствием значимого эффекта (0 по Рутерфорду) через 3 мес. было выполнено бедренно-тибиальное шунтирование. К 6 мес. в группе стандартного лечения в 3 случаях наблюдали минимальное ухудшение, в двух — умеренное ухудшение (-2 по Рутерфорду), в 5 случаях — без перемен.

За 6 мес. наблюдения в исследуемой популяции больных не было зарегистрировано летальных исходов, острых нарушений коронарного, мозгового или периферического кровообращения, злокачественных новообразований, усугубления патологии сетчатки или аутоиммунной патологии и т.п.

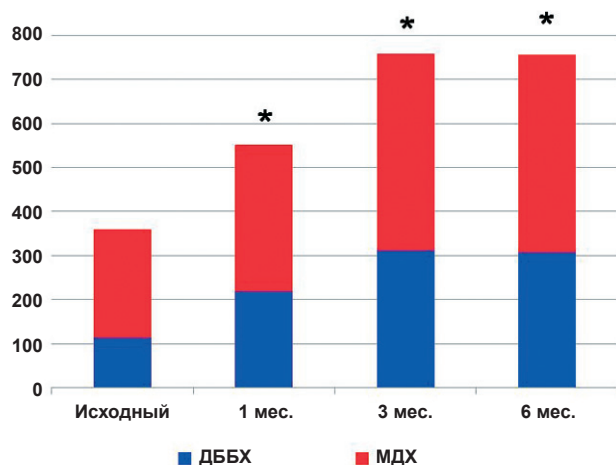


Рис. 3. Динамика дистанции безболевой ходьбы на фоне генной терапии: ДББХ — дистанция безболевой ходьбы; МДХ — максимальная дистанция ходьбы; * — $p < 0,05$

В группе стандартного лечения средняя ДББХ составила 91 ± 49 м, МДХ — 170 ± 95 м. На фоне терапии (трентал у 60%, вазопростан у 40%, сеансы тренировочной ходьбы) отмечалась тенденция к увеличению проходимой дистанции: через 1 мес. ДББХ возрастала в среднем на 32%, МДХ — на 80%. К 3 мес. после лечения отмечалось возвращение ДББХ к исходным значениям, прирост МДХ около 30% сохранялся к 6 мес. наблюдения (рис. 4).

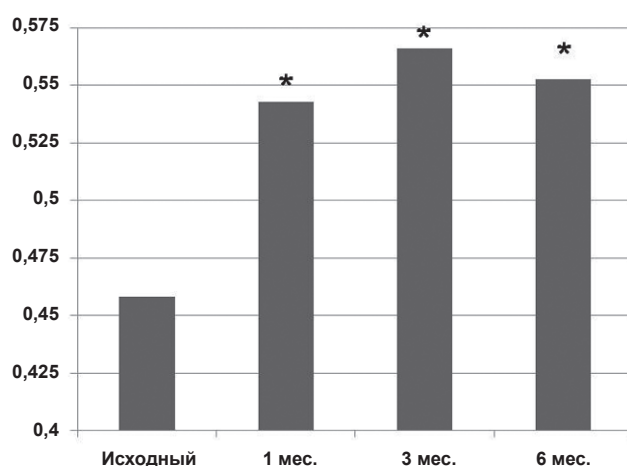


Рис. 5. Динамика лодыжечно-плечевого индекса на фоне генной терапии, * — $p < 0,05$

Дистанция безболевой ходьбы. Дистанцию безболевой ходьбы (ДББХ) определяли с помощью тредмил-теста по протоколу Гарднера-Скиннера. У пациентов с ишемическими болями в покое или трофическими изменениями данный тест не проводили. Среди получавших «Корвиан» пациентов, которым проводился данный тест, средняя дистанция безболевой ходьбы составила 114 ± 46 м, максимальная дистанция ходьбы — 244 ± 115 м. Положительная динамика ДББХ и максимальной дистанции ходьбы (МДХ) отмечалась уже через 1 мес. после лечения. ДББХ к 1 мес. возрастала в 1,93 раза, а к 3 мес. — в 2,75 раза по сравнению с исходной. МДХ в указанные сроки увеличивалась в 1,5 и 2,01 раза соответственно. Улучшение толерантности к нагрузкам сохранялось не менее 6 мес. (рис. 3).

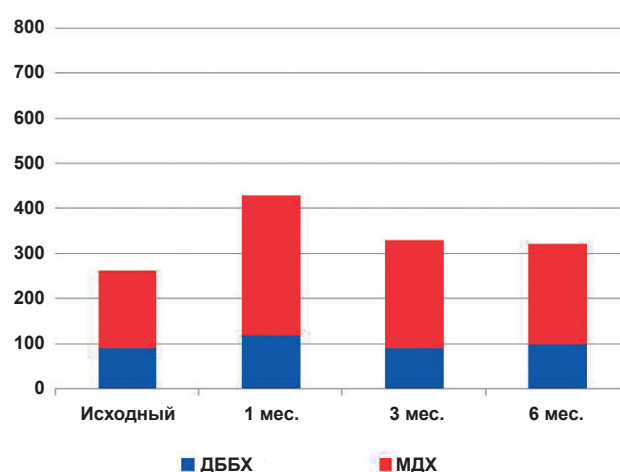


Рис. 4. Динамика дистанции безболевой ходьбы на фоне стандартного лечения: ДББХ — дистанция безболевой ходьбы; МДХ — максимальная дистанция ходьбы на фоне; $p = ns$

ЛПИ. В группе больных, получавших «Корвиан», среднее значение ЛПИ до лечения составило $0,46 \pm 0,25$. У большинства больных (65%) ЛПИ был менее 0,6, что свидетельствует о выраженном нарушении кровообращения нижних конечностей. После окончания курса инъекций ЛПИ возрастал на 12% к 1 мес. и на 18% к 6 мес. (рис. 5). Через 3 мес. после лечения ЛПИ у большинства больных (70%) превышал 0,6.

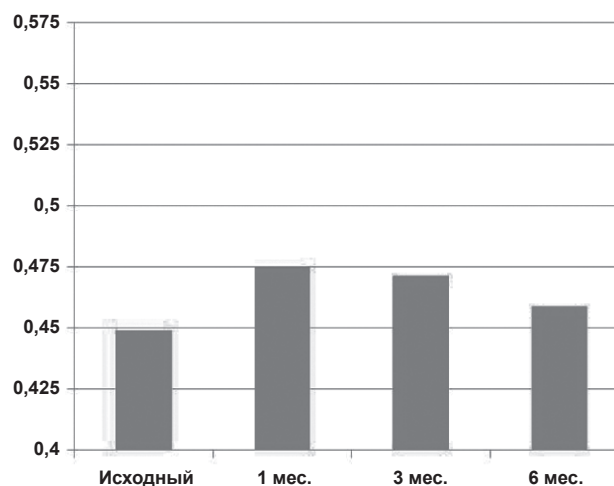


Рис. 6. Динамика лодыжечно-плечевого индекса на фоне стандартного лечения, $p = ns$

Среднее значение ЛПИ в группе стандартной терапии до лечения составляло $0,45 \pm 0,29$. На фоне терапии отмечалась тенденция к увеличению ЛПИ через 1 мес. с возвращением к исходным значениям к 3 мес. (рис. 6).

Сцинтиграфия нижних конечностей. Показатели перфузии голени и бедра в группе пациентов были достоверно ниже, чем среди здоровых добровольцев в среднем на 25%. Через 3 мес. в группах терапевтического ангиогенеза наблюдали достоверное увеличение перфузии в среднем на 7,3% для бедра и на 7,8% для голени (рис. 7).

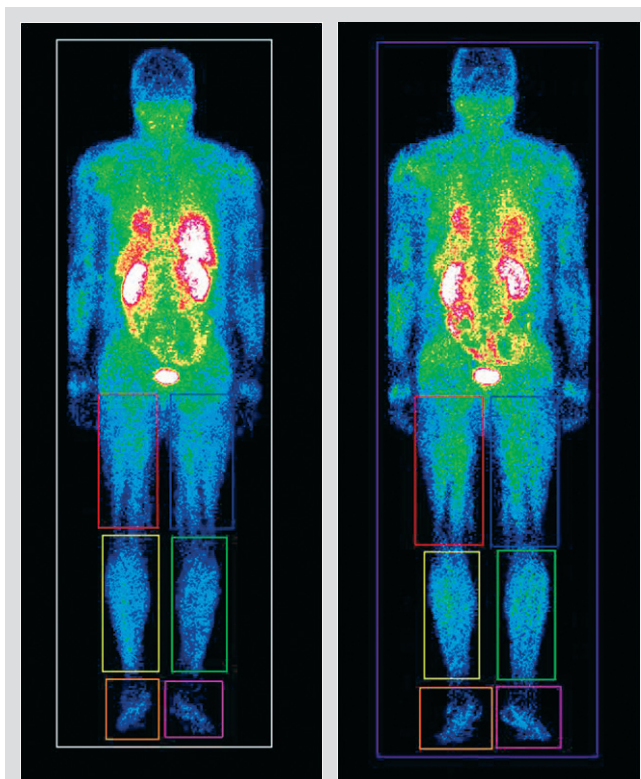


Рис. 7. Сцинтиграфия нижних конечностей больного П.:
А – до лечения;
Б – через 3 мес. после терапии «Корвианом»

В группе стандартной терапии перфузия бедра была снижена по сравнению со здоровыми добровольцами на 39%, голени – на 49%, стопы – на 14%. Через 3 мес. после лечения показатели перфузии оставались на прежнем уровне.

Ангиография нижних конечностей. У 92% больных имелись окклюзионные поражения артерий нижних конечностей. Среднее число видимых коллатералей на участках окклюзии составило $11,2 \pm 2,3$. Средний балл по Рентропу составил $1,12 \pm 0,6$.

У больных в группе терапевтического ангиогенеза через 3 мес. наблюдалось возрастание коллатерального индекса на 40% и снижение индекса коллатерального сопротивления на 17% (рис. 8). Средний балл по Рентропу вырос на 38%, с $1,12$ до $1,55$ ($p < 0,05$). Среднее число видимых коллатералей также увеличилось на 35%, до $15,1 \pm 1,4$ ($p < 0,05$).

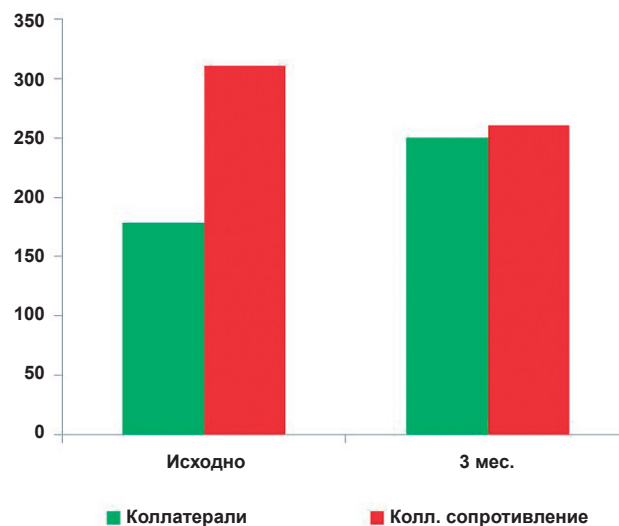


Рис. 8. Динамика показателей коллатерального кровообращения через 3 мес. после стимуляции ангиогенеза, * $p < 0,05$

Лазерная доплеровская флоуметрия. На фоне терапии препаратом «Корвиан» отмечается достоверное увеличение тканевой перфузии (M). Прирост перфузии обусловлен увеличением притока артериальной крови к микроциркуляторному руслу, что выражается в увеличении амплитуды пульсовых колебаний (Ac). И хотя при базальной перфузии и в период восстановления после теплового воздействия положительная динамика со стороны величины Ac не достоверна, тем не менее, тенденция совершенно очевидна. На высоте теплового воздействия (Ac max) максимальная дилатация артериол увеличивается статистически значимо, что сопровождается не достоверным, но увеличением максимального прироста перфузии (ΔM) и статистически значимым укорочением времени его достижения (T max). Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод, что на фоне действия препарата «Корвиан» отмечается положительная динамика со стороны функционального состояния крупных артериол и способности микрососудистого русла воспринимать дополнительный объем крови в ответ на дилататорный стимул, что может косвенно указывать на увеличение количества микрососудов (рис. 9, 10).

Транскутанная оксиметрия. У включенных в исследование больных уровень TspO₂ в положении лежа был достоверно снижен, в среднем на 50% по сравнению с нормой, составив $26,2 \pm 11,4$ мм рт. ст. Показатели уровней TspO₂ в группах больных не имели статистически значимых различий. В положении сидя наблюдалось увеличение TspO₂ в среднем до $53,8 \pm 12,1$ мм рт. ст., а во время позиционной пробы – падение до $14,2 \pm 14,5$ мм рт. ст. и восстановление до $30,33 \pm 22,8$ мм рт. ст. через 1 мин отдыха. Через 3 мес. после лечения в группе терапевтического ангиогенеза наблюдалось статистически значимое увеличение TspO₂ до $34,7 \pm 10,1$ мм рт. ст. в положении лежа и $63,5 \pm 12,8$ мм рт. ст. в положении сидя (рис. 11).

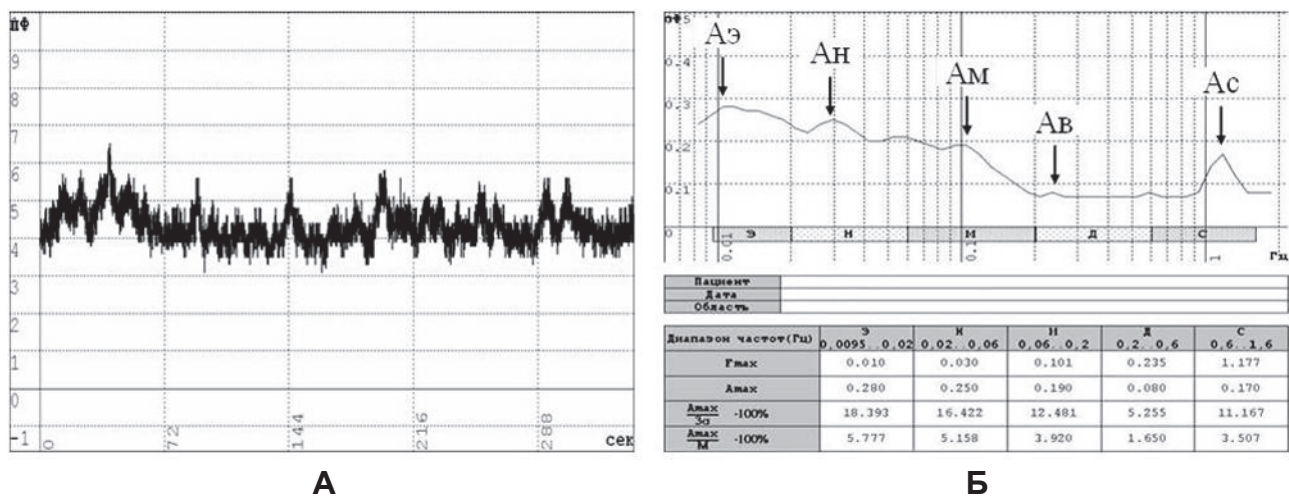


Рис. 9. Базальная перфузия нижних конечностей по данным лазерной доплеровской флоуметрии. А – ЛДФ-грамма; Б – амплитудно-частотный вейвлет анализ отраженного сигнала. Стрелками указаны максимальные значения амплитуд регуляторных механизмов: Аз – эндотелиальный; АН – нейрогенный; АМ – миогенный; АВ – веноулярный; Ас – кардиальный (пульсовой)

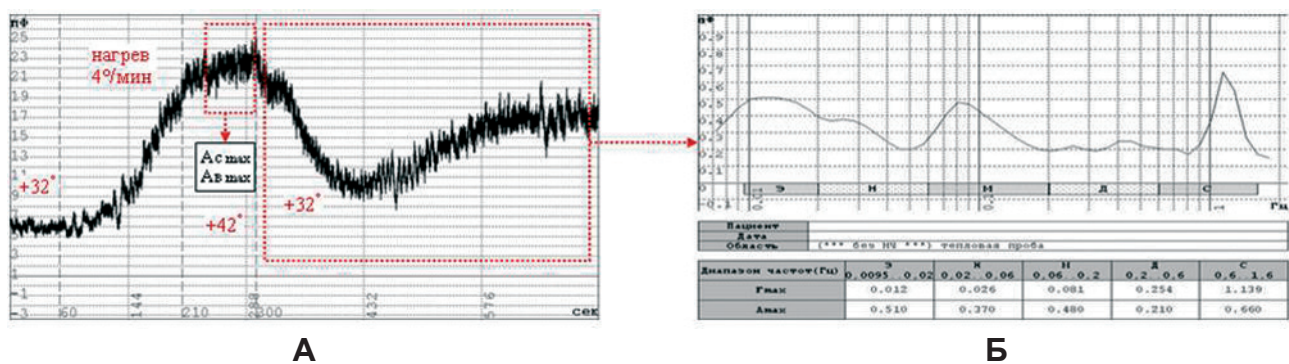


Рис. 10. Динамика перфузии нижних конечностей по данным лазерной доплеровской флоуметрии в ходе тепловой дилататорной пробы: А – ЛДФ-грамма пробы (прямоугольниками выделены фрагменты, которые подвергаются амплитудно-частотному анализу). На высоте теплового воздействия оценивалась максимальная дилатация артериол (Ас тах) и венул (Ав тах); Б – амплитудно-частотный анализ периода восстановления с оценкой функциональной активности всех звеньев модуляции микротока

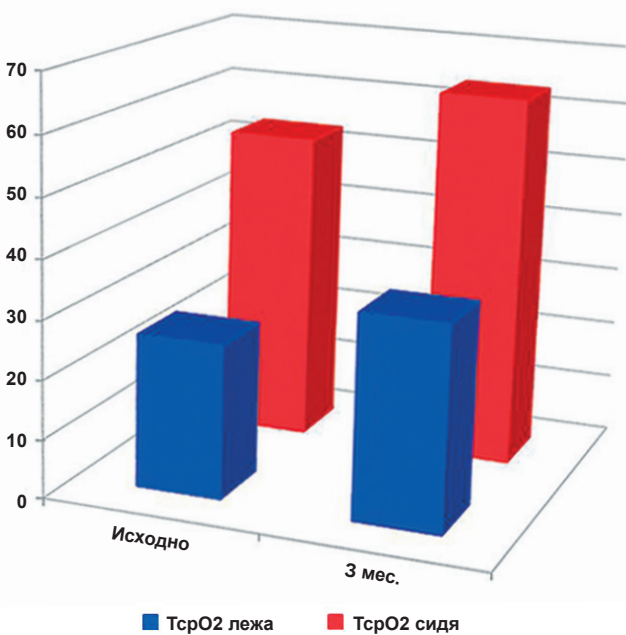


Рис. 11. Динамика показателей транскутанной оксиметрии через 3 мес. после стимуляции ангиогенеза

Наблюдалась также тенденция к менее выраженному падению уровня ТспО2 во время позиционной пробы ($15,3 \pm 16,5$ мм рт. ст.) и более быстрому восстановлению ТспО2 после пробы – $37,4 \pm 19,1$ через 1 мин отдыха. В группе стандартного лечения достоверных изменений исследованных показателей не отмечено. Полученные данные свидетельствуют об увеличении кровотока по микрососудам на фоне стимуляции ангиогенеза. Тенденция к более быстрому восстановлению кровотока после ишемии может отражать рост числа функционально полноценных коллатералей.

Циркулирующие ангиогенные факторы роста. У большинства пациентов уровень циркулирующего VEGF был ниже порога определения. Исходно VEGF определялся в крови у трех пациентов группы генной терапии с ишемией IIБ, II и IV ст. Значимое повышение уровня VEGF в крови на 7–14-е сут. от начала лечения наблюдалось у 4 больных из группы «Корвиана» (20%), двое из которых получали 3 серии инъекций препарата. Повышение уровня VEGF было транзиторным, с возвратом к нормальным значениям к 1 мес. от начала терапии. У 2 больных транзиторный подъем уровня VEGF составил 1,1–1,2 верхнего предела нормы (ВПН), у одного – до 5 ВПН, и у одного больного – до 10 ВПН. Среди больных,

у которых отмечалось повышение уровня VEGF, у двух отмечалось умеренное улучшение (+2 по Рутерфорду), у одного — минимальное улучшение (+1), у одного — отсутствие клинической динамики (0).

Уровень циркулирующего HGF в группе генной терапии составил 662 ± 165 пг/мл, в группе стандартной терапии — 682 ± 125 пг/мл ($p = ns$). Статистически значимой динамики уровня циркулирующего HGF на фоне лечения обнаружено не было.

Популяции циркулирующих прогениторных клеток. Содержание общей фракции циркулирующих $CD45^{low/-}$ и $CD45^{low/-}CD34^+CD133^-$ предшественников достоверно не отличалось у пациентов и здоровых добровольцев (контроль). Уровни $CD45^{low/-}CD34^+CD133^+$ клеток во всех группах пациентов были достоверно ниже по сравнению с контролем: в группе клеточной терапии в 3,65 раза, в группе генной терапии — в 1,5 раза, в группе стандартного лечения — в 2,33 раза (рис. 12).

В группе генной терапии через 1 мес. после лечения отмечалось повышение уровня циркулирующих $CD34^+CD133^+$ предшественников (в 2,03 раза), которое сохранялось не менее 3 мес. Одновременно отмечался прирост уровня $CD34^+CD133^+$ предшественников в 1,8 раза, сохранявшийся к 3 мес.

В группе стандартной терапии значимых изменений уровня ЦКП отмечено не было. Содержание $CD34^+CD133^+$ предшественников оставалось сниженным. Отмечалась тенденция к росту уровня $CD34^+CD133^+$ предшественников на 67%, не достигавшая границ статистической значимости.

Прирост ЛПИ через 3 мес. от начала терапии коррелирует с исходным уровнем $CD34^+CD133^+$ предшественников как в группе генной терапии ($r = 0,68$, $p < 0,05$).

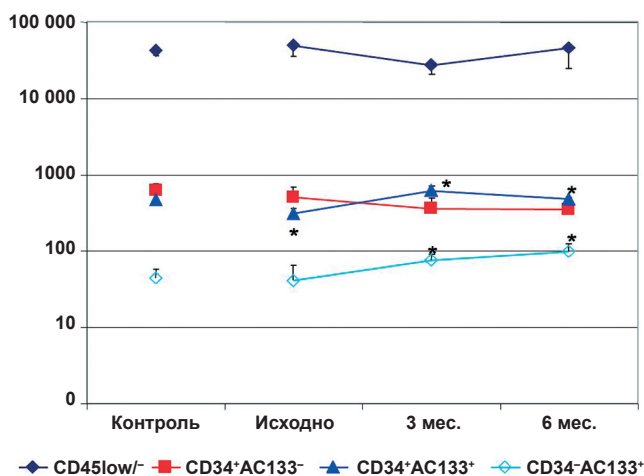


Рис. 12. Циркулирующие прогениторные клетки на фоне генной терапии. Содержание клеточных популяций определялось в образцах мононуклеарной фракции крови до лечения, через 1 и 3 мес. после лечения методом потоковой цитометрии. Уровни циркулирующих предшественников представлены как число клеток на 1 млн мононуклеаров. В качестве контроля использовались образцы мононуклеарной фракции от 10 здоровых добровольцев, * $p < 0,05$

При сравнительном анализе в группе терапевтического ангиогенеза уровень ЦКП у больных с хорошими результатами терапии (+2 по Рутерфорду) был достоверно выше (в 2,12 раза; $p < 0,05$), чем у пациентов, «не ответивших» на лечение (0 по Рутерфорду) (рис. 13).

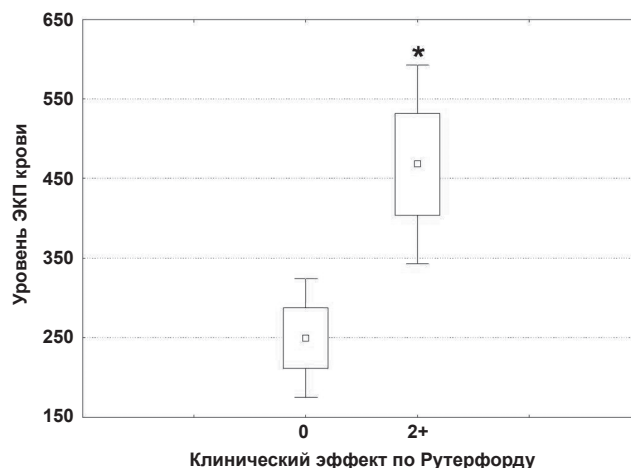


Рис. 13. Эффективность терапевтического ангиогенеза, зависимость от исходного уровня циркулирующих $CD45^{low/-}CD34^+AC133^+$ прогениторных клеток. Содержание клеточных популяций определялось в образцах мононуклеарной фракции крови до лечения, методом потоковой цитометрии. Уровни циркулирующих эндотелиальных предшественников (ЭКП) представлены как число клеток на 1 млн мононуклеаров, * $p < 0,05$

Корреляционный анализ. Взаимосвязь между эффективностью терапии (по Рутерфорду) и основными клиничко-лабораторными показателями оценивалась методом ранговой корреляции Спирмена. Эффективность терапии достоверно ассоциируется с проходным подвздошно-бедренным сегментом ($r = 0,505$, $p = 0,02$), менее длительным анамнезом курения ($r = 0,485$, $p = 0,037$), более высоким исходным ЛПИ ($r = 0,477$, $p = 0,033$).

Выявленные взаимосвязи могут отражать роль гемодинамических факторов и функции эндотелия в процессах ангиогенеза.

Заключение

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что применение терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей более эффективно, чем стандартная консервативная терапия. Применение генной терапии технически несложно и хорошо переносится больными. Использование комплекса клиничко-инструментальных методов позволяет продемонстрировать формирование функционально полноценных коллатеральных сосудов и улучшение микроциркуляции конечности, что значительно уменьшает выраженность симптоматики, вызванной ишемией. Наибольший эффект от ангиогенной терапии наблюдается у пациентов с проходным подвздошно-бедренным сегментом, имеющих более высокий исходный ЛПИ и меньший стаж курения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzner N.R. et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47(6): 1239–312.
2. Rutherford R.B., Baker J.D., Ernst C. et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J. Vasc. Surg.* 1997; 26: 517–38.
3. Clagett G.P., Sobel M., Jackson M.R. et al. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: 609S–626S.
4. Талицкий К.А., Карпов Ю.А., Парфенова Е.В. Терапевтический ангиогенез в лечении ишемии нижних конечностей. *Кардиология* 2007; 12: 81–4.
5. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114–23.
6. Kusumanto Y.H., van Weel V., Mulder N.H. 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. *Hum Gene Ther.* 2006; 17(6): 683–91.
7. Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E. et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008; 16(5): 972–8.
8. Powell R.J., Goodney P., Mendelsohn F.O. et al. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial. *J. Vasc. Surg.* 2010; 52(6): 1525–30.
9. Shigematsu H., Yasuda K., Sasajima T. et al. Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patients with critical limb ischemia. *Int Angiol.* 2011; 30(2): 140–91.
10. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A. et al. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol. Ther.* 2007; 15(11): 1939–46.
11. Kucia M., Dawn B., Hunt G. et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; 95(12): 1191–9.
12. Badorff C., Brandes R.P., Popp R. et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107(7): 1024–32.
13. Murayama T., Tepper O.M., Silver M. et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp. Hematol.* 2002; 30(8): 967–72.
14. Kawamura A., Horie T., Tsuda I. et al. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther. Apher. Dial.* 2005; 9: 59–63.
15. Ishida A., Ohya Y., Sakuda H. et al. Autologous peripheral blood mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia. *Circ. J.* 2005; 69: 1260–5.
16. Huang P., Li S.Z., Han M.Z. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb. Haemost.* 2004; 91(3): 606–9.
17. Urbich C., Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int.* 2005; 67(5): 1672–6.
18. Руда М.М., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А. Предшественники эндотелиальных клеток: роль в восстановлении функции эндотелия и перспективы терапевтического применения. *Кардиология* 2008; 1: 66–73.
19. Yamamoto K., Kondo T., Suzuki S. et al. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24:e192–6.
20. De Vriese A.S., Billiet J., Van Droogenbroeck J. et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans. *J. Intern. Med.* 2008; 263: 395–403.
21. Sieveking D.P., Ng M.K. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc. Med.* 2009; 14(2): 153–66.
22. Vajanto I., Korpisalo P., Karjalainen J. et al. Antegrade flow and peripheral resistance determine the level of endogenous arteriogenesis in patients with superficial femoral artery occlusion. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009; 39(12): 1048–54.
23. Schmid-Schönbein H., Ziege S., Rutten W. et al. Active and passive modulation of cutaneous red cell flux as measured by laser Doppler anemometry. *VASA* 1992; 34 (Suppl): 38–47.
24. Schmid-Schonbein H., Ziege S., Grebe R. et al. Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations. *Int. J. Microcirc.* 1997; 17: 346–59.
25. Kvernmo H.D., Stefanovska A., Bracic A. et al. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvasc. Res.* 1999; 57: 298–309.
26. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H.D. Wavelet analysis of oscillations in peripheral blood circulation measured by Doppler technique. *Trans. Biomed. Eng.* 1999; 46: 1230–9.
27. Kvandal P., Stefanovska A., Veber M. et al. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. *Microvasc. Res.* 2003; 65: 160–71.
28. Aalkaer C. Vasomotion: cellular background for the oscillator and for the synchronization of smooth muscle cell. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 144: 605–16.
29. Rustemeyer P., Wittkowski W., Jurk K. et al. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J. Immunoassay Immunochem.* 2006; 27(1): 77–88.

Поступила 02.03.2011