

Материалы сателлитного симпозиума «Терапевтический ангиогенез: мировой и российский опыт лечения ишемии нижних конечностей. Эффект геннотерапевтического препарата на основе гена VEGF»

29 ноября, Москва

(В рамках XVII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов)

А.А. Исаев, Р.В. Деев

**Терапевтический ангиогенез как инновационный
подход в лечении пациентов с хронической
ишемией нижних конечностей**

Институт стволовых клеток человека, Москва
art.isaev@gmail.com, romdey@gmail.com

Вектор развития современного здравоохранения во всех странах направлен на улучшение качества и продолжительности жизни людей. В каждой области медицины эта задача решается по-своему, но интегральный биотехнологический подход стремится решить ее путем внедрения в клиническую практику инновационных продуктов (медицинских услуг и лекарственных препаратов) разработанных на основе самых современных научных достижений в области клеточных, генных и постгеномных технологий.

Одним из таких универсальных направлений является «терапевтический (стимулированный с терапевтической целью) ангиогенез», представляющий собой новую лечебную стратегию улучшения перфузии ишемизированных тканей с помощью оптимизации естественных биологических процессов неоваскуляризации. Причем, решение проблемы контролируемой индукции роста сосудов только в первом приближении может иметь относительно узкое приложение — для лечения ишемических состояний; последующие исследования в данной области решают и проблемы регулируемой (управляемой) регенерации тканей и органов, неизбежно осуществляемой в тесном взаимодействии с ангиогенезом.

Явления индуцированного ангиогенеза можно добиться различными путями: привлечением в интересующую зону клеток, имеющих ангиогенный потенциал; использованием рекомбинантных ангиогенных факторов роста; геннотерапевтическими методами.

В качестве агентов клеточной трансплантации для индукции ангиогенеза в научной литературе описано использование ядросодержащих клеток костного мозга и периферической крови; эндотелиальных клеток-предшественниц; гемопоэтических стволовых клеток; мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток; ядросодержащих клеток периферической крови; стволовых клеток эндометрия и др. Несмотря на некоторые успехи в выявлении безопасности и эффективности клеточных препаратов при ишемических состояниях следует отметить объективные сложности на пути к широкому

их внедрению. Во-первых, на сегодняшний день все же приходится констатировать недостаточный масштаб клинических исследований для формирования достоверных и дифференцированных выводов об эффективности при тех или иных формах ишемического поражения. Во-вторых, реализация таких технологий подразумевает преодоление инфраструктурных и производственных сложностей стандартизованного, масштабного производства «клеточных препаратов».

Белковые факторы, будучи введенными в области ишемии, в течение нескольких десятков минут подвергаются распаду, вероятно так и не оказав существенного, клинически значимого эффекта. Вышеуказанные сложности двух методологических направлений терапевтического ангиогенеза делают весьма перспективными генные препараты, обеспечивающие синтез эндогенных проангиогенных факторов, способных запустить каскад физиологического алгоритма ангиогенеза.

Проведенные в мире и в России доклинические и клинические исследования свидетельствуют о безопасности разработанных способов геннотерапевтического ангиогенеза. Вместе с тем, с точки зрения эффективности лишь единичные клинические исследования перешагнули рубеж 3 фазы. Одним из таких исследований стало изучение препарата «Неоваскулген», содержащего в качестве действующего начала плазмидную конструкцию, кодирующую сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF165).

Большим исследовательским коллективом проведен комплекс доклинических и клинических исследований. В частности, в ходе доклинических исследований определялась токсичность, мутагенность, специфическая эффективность препарата. Было установлено, что препарат является нетоксичным, не обладает мутагенным действием.

В дальнейшем в рамках официально разрешенной 1/2а фазы клинических исследований были изучены краткосрочная безопасность, токсичность препарата, а также выбран режим дозирования. В ходе последующей 2б/3 фазы клинических исследований была продолжена оценка безопасности (выявление редких осложнений, побочных эффектов), а также доказана его эффективность в комплексной терапии хронической ишемии нижних конечностей (IIa–III ст. по А.В. Покровскому — Фонтейну; ХИНК).

Исследования проводились на базе трех клинических центров: в Российском научном центре

хирургии им. Б.В. Петровского (Москва); в Рязанском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова; в Ярославской Областной клинической больнице. Всего в клинических исследованиях приняло участие 150 неоперабельных (в силу анатомических особенностей) пациентов.

Установлено, что препарат «Неоваскулген» безопасен для пациентов. По первичному критерию эффективности «дистанция безболевого ходьбы» у пациентов клинической группы обнаружен статистически значимый рост, который достоверно отличался от выявленной тенденции у пациентов контрольной группы.

По оценке первичных и вторичных критериев эффективности, данным ангиографии, оценки качества жизни следует констатировать, что лечение эффективно у пациентов с ХИНК IIa–III стадии по А.В. Покровскому — Фонтейну после применения препарата «Неоваскулген», что подтверждает гипотезу об индукции препаратом ангиогенеза и улучшении кровообращения в дистальных отделах конечностей. По результатам проведенного комплекса исследований на препарат было выдано регистрационное удостоверение (ЛП-000671 от 28.09.2011), а сам он внесен в Государственный реестр лекарственных средств России.

Таким образом, включение в программу лечения неоперабельных пациентов с ХИНК концепции терапевтического ангиогенеза, реализованной с помощью геннотерапевтического препарата «Неоваскулген» оказалось весьма продуктивным и открывающим новые возможности не только для сосудистой хирургии и ангиологии, но и для медицины в целом.

Л.А. Бокерия, В.С. Аракелян, М.В. Еремеева,
О.А. Демидова

Комбинированное лечение хронической ишемии нижних конечностей с использованием стимуляторов ангиогенеза

НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва
Leoan@online.ru

Цель работы: улучшение результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей.

Материал и методы. Исследование по применению генного препарата «Ангиостимулин» (плазмидная конструкция, содержащая ген сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF165) при хронической ишемии нижних конечностей проводилось с 2003 по 2010 г. В исследовании участвовало 49 пациентов, средний возраст которых составил $60,3 \pm 10,3$ г. Этиологией заболевания в 88% случаев являлся атеросклероз, в 12% — облитерирующий тромбангиит. У всех пациентов имелаась дистальная форма поражения артерий нижних конечностей (проксимальный сегмент был коррегирован не менее чем за 3 мес. до включения в исследование). Критическая ишемия установлена у большинства пациентов (77%). «Ангиостимулин» в дозе 1000 мкг вводился однократно внутриаартериально в магистральную артерию конечности или внутримышечно обкалыванием икроножной мышцы. Сопутствующей в течение первых 12 мес. наблюдения была только базовая антиагрегантная терапия.

Результаты. В 16% случаев несмотря на успешно проведенную операцию, восстановления магистрального кровотока на стопе и значимого клинического

улучшения получить не удалось, что обусловлено значимым поражением артерий дистального русла, что явилось показанием для проведения интенсивной ангиотропной терапии. В случае наличия клиники хронической ишемии нижних конечностей в стадии суб- и декомпенсации (2Б–4А ст.), неоперабельного поражения артерий дистального русла при анатомо-функциональной недостаточности коллатеральных путей кровотока (неэффективность консервативной ангиотропной терапии), отсутствии онкологического анамнеза пациенты включались в исследование.

По данным лабораторных (стабильные показатели биохимического анализа крови) и клинических методов обследования (отсутствие местного отека, гипертермической реакции) применение «Ангиостимулина» безопасно. Клиническая эффективность установлена в 84% случаев. Через 3 мес. отмечено умеренное улучшение (+2 по Рутерфорду), через 6 и 12 мес. достигнутый эффект сохранялся у всех пациентов. Прирост показателя транскутанного напряжения кислорода через 1 мес. составил 6,5, через 3 мес. — 10,9, через 6 мес. — 14, через 12 мес. — 14,8 мм рт.ст. по сравнению с исходным показателем. При внутримышечном введении рост данного показателя наступал раньше, чем при внутриаартериальном. Увеличение индекса лодыжечного давления в покое (по данным ультразвуковой доплерографии) отмечено в отсроченном периоде и составило к 6–12 мес. 0,1–0,12. Максимальная дистанция ходьбы по данным тредмилл-теста увеличивалась постепенно (динамика коррелирует с приростом показателя транскутанного напряжения кислорода), и к 6-му мес. прирост составил в среднем 231 м. Подтверждением эффективности использования «Ангиостимулина» являются усиление коллатеральной сети по данным ангиографии в объеме $+2 \pm 0,45$ единиц (по классификации Tateishi-Yuyama E., H. Matsubara от 2002 г.) и улучшение качества жизни пациентов по данным опросника SF 36-1.

Выводы. Применение препарата позволяет улучшить результаты лечения пациентов с дистальным поражением артерий нижних конечностей.

Применение «Ангиостимулина» безопасно.

Эффект лечения наступает через 3 мес. и сохраняется до 12 мес., но ограничивается умеренным улучшением, что является препятствием к его изолированному применению.

И.Н. Староверов, Ю.В. Червяков, Е.Г. Нерсисян

Отдаленные результаты лечения больных с ХОЗАНК IIБ и III стадии препаратом на основе гена VEGF

Ярославская Государственная
медицинская академия,
Ярославская областная клиническая больница
Cheryurval@yandex.ru

На базе Института стволовых клеток человека (г. Москва) был разработан новый препарат «Неоваскулген», представляющий собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей эндотелиальный фактор роста сосудов. Препарат создан в качестве лечебного средства для снижения частоты ампутации и смертности в популяции пациентов с хронической ишемией конечности, в особенности у больных, которым не может быть проведена стандартная реваскуляризация по поводу

окклюзионного поражения периферических артерий (многоэтажное поражение артерий, дистальная форма атеросклероза, в том числе в сочетании с диабетической ангиопатией). В настоящее время препарат «Неоваскулген» внесен в Государственный реестр лекарственных средств. Регистрационный номер ЛП-000671. Наша клиника стала одним из трех центров в России, где начали использовать этот препарат у больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ХОЗАНК).

Определение безопасности, переносимости и эффективности препарата на основе гена, кодирующего VEGF в комплексной терапии пациентов при хронической ишемии нижних конечностей (II–III ст. по А.В. Покровскому — Фонтейну) проводилось в клинических исследованиях I–IIa и IIb–III фазы. В своей работе мы проследили отдаленные результаты использования препарата в течение 1 и 2 лет.

Материал исследования. За период с сентября 2009 г. по декабрь 2010 г. в отделении сосудистой хирургии Ярославской областной клинической больницы проведено консервативное лечение 45 пациентов с ХОЗАНК. Возраст больных варьировал от 40 до 78 лет, и в среднем составил $63,3 \pm 5,8$. Мужчин было 36 (75%), женщин 9 (25%). Соотношение мужчин и женщин 4:1. У 29 пациентов отмечена сопутствующая кардиальная патология: ишемической болезнью сердца страдало 20 больных, из них 4 в анамнезе перенесли острый инфаркт миокарда. Артериальная гипертензия выявлена у 12 человек. В 6 наблюдениях имела ишемическая болезнь головного мозга на фоне атеросклероза экстра- и интракраниальных артерий. Один пациент в анамнезе перенес острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) без выраженного неврологического дефицита.

В комплекс стандартной сосудистой терапии включено двукратное введение препарата «Неоваскулген» по 1,2 мг в мышцы пораженной конечности. В I группе (2009 г. — 20 больных, I–IIa фаза клинических исследований (КИ) — оценка безопасности и подбор режима введения) введение проводилось в ягодичную мышцу с интервалом в 1 и 2 нед. Во II группе (2010 г. — 25 больных, IIb–III фаза КИ — оценка эффективности и безопасности) препарат вводился в икроножные мышцы (передне-наружная и задне-медиальная группа мышц на 5 уровнях) с интервалом 2 нед. Для изучения клинической эффективности больные разделены на 3 группы в зависимости от стадии заболевания: первая группа — стадия IIa — 5 пациентов. Вторая группа — стадия IIb — 22 больных. Третья группа — стадия III — 18 наблюдений. Важными критериями включения в исследование были: 1. полная проходимость проксимального артериального русла исходно или после операции (более 3 мес.) — гемодинамически незначимый стеноз аорто-бедренного сегмента до 50%; 2. наличие неоперабельного дистального поражения или анатомо-функциональная недостаточность коллатеральных путей кровотока.

Методы исследования. Клинико-лабораторные методы исследования крови и мочи, коагулограмма, ультразвуковое дуплексное ангиосканирование, ультразвуковая доплерография (измерение линейной скорости кровотока (ЛСК) и индекса регионарного систолического давления — (ИРСД)), определе-

ние транскutánного напряжения кислорода в тканях I пальца стопы ($TcPO_2$), тредмилл-тест, ангиография.

Отдаленные результаты прослежены у всех 45 больных в срок до 1 года и у 20 пациентов в срок до 2 лет. Выживаемость в срок до 1 года составила 97,8% (1 больной умер через 6 мес. после включения в исследование от повторного ОИМ). Выживаемость пациентов в срок до 2 лет — 95% (1 больной умер через 22 мес. от начала исследования после ампутации ноги на уровне бедра). Один больной перенес повторное ОНМК с умеренным неврологическим дефицитом. Сохранность конечностей для всех стадий заболевания через 1 год составила 93,3% (для III ст. — 83,3%). Через 2 года — 90% (для III ст. — 80%). В двух наблюдениях отмечено прогрессирование ишемии контрлатеральной конечности (что потребовало в 1 наблюдении дополнительного курса лечения, в другом, после отсутствия эффекта от лечения — ампутации).

А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, Н.П. Бочков

**Сравнительный анализ
различных методов комплексного лечения
больных с хронической ишемией нижних
конечностей с использованием генно-
инженерных стимуляторов ангиогенеза**

Российский научный центр хирургии
им. Б.В. Петровского РАМН, Москва
dmvoronov@gmail.com

Одним из современных, принципиально новых по механизмам действия и перспективных для дальнейшего изучения и использования подходов в лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК) является применение методов индукции ангиогенеза, основанных на использовании самоэкспрессирующихся генно-инженерных конструкций с генами, кодирующими синтез белков-факторов ангиогенеза.

Цель работы: оценка клинической эффективности, ближайших и отдаленных результатов использования генно-инженерных конструкций с генами фактора роста эндотелия сосудов и (или) ангиогенина в комплексном лечении пациентов с ХИНК.

Материал и методы. Всего в проспективное контролируемое исследование на различных его этапах вошло 134 пациента с ХИНК IIb–III степени (116 мужчин, 18 женщин, в возрасте от 43 до 80 лет, средний возраст 61 ± 7 лет). Этиологией заболевания во всех случаях был атеросклероз, у 29 пациентов имелся сопутствующий сахарный диабет 2-го типа, у 3 пациентов были признаки сочетанного артериитического процесса. ХИНК IIb степени была диагностирована у 89 пациентов, III степени — у 45. У всех пациентов имелись выраженные диффузные изменения артерий голени.

Пациенты были распределены на основную (74 больных) и контрольную (60 больных) группы. У пациентов основной группы дополнительно к соответствующим методам лечения использовались генные индукторы ангиогенеза, которые вводились инъекционно в виде раствора в икроножную группу мышц пораженной конечности, в т.ч. нативные плазмиды с генами VEGF и ANG — у 27 пациентов, вирусные векторные конструкции CELO-ANG — у 18, Ad5-ANG — у 15, Ad5-(ANG+VEGF) — у 14. Стимуляция ангиогенеза была использована как в качестве самостоя-

тельного метода лечения в сочетании с традиционной консервативной терапией (39 пациентов), так и в дополнение к реконструктивным сосудистым операциям (35 пациентов). По основным исходным клиническим признакам, а также по объему консервативной терапии, соответствующие подгруппы основной и контрольной групп статистически значимо не отличались.

Отдаленные результаты лечения изучены в сроки от 6 до 52 мес. В качестве критериев оценки результатов лечения использовались проходимость шунтов, дистанция безболевой ходьбы, лодыжечно-плечевой индекс, время восстановления исходных ультразвуковых показателей кровотока при проведении тредмилл-теста, перфузия мышц по данным радиоизотопных методов исследования, индекс качества жизни. В подгруппе консервативной терапии анализ проводился раздельно для пациентов с IIБ и III ст. ишемии, в подгруппе хирургического лечения — в зависимости от использованной генной конструкции.

Результаты. При использовании генных препаратов — индукторов ангиогенеза в качестве самостоятельного метода лечения по показателям дистанции безболевой ходьбы и качества жизни статистически значимо лучшие результаты получены в основной группе (по сравнению с контрольной) как при IIБ, так и при III ст. ишемии. По показателю времени восстановления исходных параметров кровотока пограничные (по статистической значимости) различия между основной и контрольной группами удалось получить только для пациентов с IIБ ст. ишемии. У пациентов основной группы с III степенью ишемии наблюдалось статистически значимое снижение этого показателя по сравнению с исходным показателем, однако степень этого снижения не достигала уровня статистической значимости различий с контрольной группой. Относительные (от исходного) изменения всех анализируемых показателей у пациентов с IIБ ст. ишемии превышали таковые у пациентов с III ст. ишемии. По показателю динамики лодыжечно-плечевого индекса статистически значимых различий получено не было.

Непосредственные и ближайшие результаты хирургического лечения в основной и контрольной

группе по оцениваемым клиническим параметрам статистически значимо не различались. В отдаленном периоде сохранность конечностей в основной и контрольной группах составила 84,3% и 87,9% соответственно ($p = 0,968$). По приросту показателя лодыжечно-плечевого индекса после операции статистически значимых различий между пациентами основной и контрольной групп получено не было. В то же время при использовании всех векторных конструкций были получены статистически значимо лучшие (по сравнению с контрольной группой) показатели прироста дистанции безболевой ходьбы, мышечной перфузии, уменьшения времени восстановления исходных показателей кровотока и улучшения качества жизни. Количество пациентов, у которых максимально достигнутый клинический эффект операции сохранялся более 12 мес. составил: при использовании CELO-ANG — 77%, Ad5-ANG — 82%, Ad5-(ANG + VEGF) — 93%, в контрольной группе — 76%.

Введение всех векторных конструкций приводило к развитию той или иной степени выраженности системной воспалительной реакции, однако в случае использования аденовирусных векторов ее выраженность была минимальной. При введении нативных плазмид признаков воспалительных реакций практически не отмечалось.

Выводы. Генно-инженерные индукторы ангиогенеза могут быть эффективно и приемлемо безопасно использованы в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей.

В качестве самостоятельного метода лечения технология наиболее эффективно может быть использована у пациентов со средними степенями ишемии.

Комбинация хирургических сосудистых реконструкций с методами стимуляции ангиогенеза демонстрирует лучшие результаты по сравнению с отдельными видами лечения.

Предложенные методики комплексного лечения пациентов с ишемией нижних конечностей могут рассматриваться как одно из актуальных, инновационных и перспективных направлений медицинской науки и практики. Целесообразно продолжение экспериментальных и клинических исследований по данной проблеме