

Материалы симпозиума «Терапевтический ангиогенез. Возможности генной терапии. Мировой и российский опыт» 22 - я Международная конференция «Нерешенные вопросы сосудистой хирургии»

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

Создание и опыт использования препарата на основе гена VEGF в лечении хронической ишемии нижних конечностей

*Научный Центр сердечно-сосудистой хирургии
им. А.Н. Бакулева РАМН (Москва)*

В НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева исследования по изучению ангио- и миогенеза и возможности их стимуляции при ишемии ведутся с 1999 г., а с 2001 г. — начата разработка методов клинического использования генных и клеточных препаратов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Начало исследований было посвящено созданию и использованию генотерапевтического средства на основе плазмидной конструкции, содержащей сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF165) человека. В 2002 г. были завершены доклинические исследования и препарат на его основе «Ангиостимулин» был рекомендован к клиническому применению в рамках клинических испытаний. Были проведены клинические исследования стимуляции ангио-/миогенеза при ишемии миокарда (ИБС, тяжелая сердечная недостаточность) и хронической ишемии нижних конечностей (2003–2010 гг.) пролечено 43 пациента; они продолжают наблюдаться по настоящее время. Это тяжелая категория больных с облитерирующим атеросклерозом, для которых генная терапия стала возможностью избежать прогрессирования заболевания и ампутации конечности.

Стимулятор ангиогенеза вводился однократно внутриаартериально или внутримышечно обкалыванием икроножной мышцы. Контрольное обследование проводилось через 1, 3 и 6 мес. после введения стимулятора. У всех больных, обследованных в динамике, был получен хороший эффект клинически и по данным инструментальных методов: достоверно увеличился показатель транскутанного напряжения кислорода на стопе, индекс лодыжечного давления, длительность ходьбы, улучшились показатели микроциркуляции, увеличилось количество вновь образовавшихся коллатеральных артерий (по данным ангиографического исследования), улучшились показатели качества жизни пациентов (опросник SF 36), показатели коагулограммы. Положительная динамика достигала максимальных значений к 3 мес. Удалось оценить динамику состояния 8 пациентов по всем критериям через 6 лет после введения препарата.

Полученные результаты позволяют в дальнейшем улучшить результаты лечения пациентов с дистальной формой поражения артерий нижних конечностей, выработать оптимальную тактику введения генного препарата.

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

Стимуляция ангиогенеза в комплексном лечении больных с хронической ишемией нижних конечностей (сочетание реконструктивных операций с генно- инженерными технологиями)

*Российский научный центр хирургии
им. акад. Б.В. Петровского РАМН (Москва)
Медико-генетический центр РАМН (Москва)*

Цель исследования: изучить эффективность и безопасность использования генно-инженерных рекомбинантных конструкций с генами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиогенина (Ang) в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей.

Материал и методы: сконструированы оригинальные рекомбинантные конструкции с генами VEGF и Ang. Ангиогенная активность конструкций испытана в эксперименте на модели ишемии конечности крысы с положительными результатами. В дальнейшем проведено проспективное контролируемое клиническое исследование, в которое включено 114 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей IIБ–III ст. Из них 59 пациентов составили основную группу, 55 — контрольную. Пациентам основной группы дополнительно путем внутримышечных инъекций в икроножную группу мышц пораженной конечности вводились стимуляторы ангиогенеза: нативные плазмиды с VEGF и Ang (12 пациентов), CELO-Ang (18), Ad5-Ang (15), Ad5-(Ang+VEGF) (14). Стимуляция ангиогенеза была использована как в качестве изолированного метода лечения (24 пациента), так и в сочетании с реконструктивными сосудистыми операциями (35 пациентов). В качестве критериев оценки результатов лечения использовались проходимость шунтов, дистанция безболевого ходьбы, лодыжечно-плечевой индекс, время восстановления исходных показателей кровотока при проведении тредмил-теста, перфузия мышц по данным радиоизотопных методов исследования, индекс качества жизни. Отдаленные результаты изучены в сроки от 6 до 26 мес.

Результаты: значимых специфических побочных эффектов в основной группе пациентов не наблюдалось. При использовании стимуляции ангиогенеза

в качестве самостоятельного метода лечения в основной группе были получены лучшие результаты (по сравнению с контрольной группой) по показателям дистанции безболевого ходьбы ($p < 0,05$ при IIБ и III ст. ишемии), времени восстановления исходных параметров кровотока (только при IIБ ст., $p = 0,057$), прироста транскутанного напряжения кислорода ($p < 0,05$ при IIБ и III ст.) и качества жизни ($p = 0,052$ при IIБ ст., $p < 0,05$ при III ст.).

При использовании стимуляции ангиогенеза в дополнение к реконструктивным сосудистым операциям, в отдаленном периоде наблюдения по основным показателям, включая дистанцию безболевого ходьбы, время восстановления исходных ультразвуковых показателей кровотока, перфузию мышц нижних конечностей и качество жизни, нами отмечены лучшие результаты в основной группе по сравнению с контрольной как у пациентов с исходной IIБ, так и с III степенью ишемии конечностей. Наиболее стойким и клинически значимым эффект был в подгруппе, где была использована конструкция Ad5-(Ang+VEGF).

Выводы: использование генно-инженерных конструкций с генами-стимуляторами ангиогенеза позволяет улучшать отдаленные результаты лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Комбинация хирургических сосудистых реконструкций с генно-инженерными методами стимуляции ангиогенеза демонстрирует лучшие результаты по сравнению с отдельными видами лечения. Проведенное исследование позволяет сделать заключение о безопасности использованного метода.

Р.В. Деев, С.Л. Киселев, А.А. Исаев,
А.В. Приходько, И.В. Потапов

Мировой опыт генной терапии хронической ишемии нижних конечностей и ИБС

Институт Стволовых Клеток Человека (Москва)

С момента первого применения в клинической практике генотерапевтической конструкции для лечения хронической ишемии нижних конечностей прошло более 15 лет. За это время в мире накоплен значительный опыт — пролечено не менее 1000 пациентов, что позволяет обобщить опубликованные результаты этих клинических испытаний. В ходе такого анализа следует признать, что исследователи, оценивая разработанные препараты по соотношению безопасность/эффективность, склоняются к использованию в клинической практике наиболее безопасных плазмидных генных конструкций, несмотря на низкую степень инфицирующей активности. Наиболее эффективными оказались конструкции, содержащие ген VEGF165. Убедительные результаты показаны при лечении хронической ишемии нижних конечностей, в то время, как использование генотерапии при лечении ишемической болезни сердца пока не принесло убедительных положительных результатов.

Дальнейшие исследования в данной области связаны с окончанием трех фаз клинических испытаний и вхождением генотерапевтических препаратов в клиническую практику, накоплением опыта применения и более четкого определения тех групп пациентов, которым они показаны.

С.Л. Киселев

Гены и генная терапия

*Институт стволовых клеток человека (Москва)
НИЦ «Курчатовский институт» (Москва)*

Одной из основных задач генной терапии (ГТ) является коррекция системы работы генов путем их направленного переноса в организм или в определенный тип клеток и тканей. Отличие и одновременно преимущество ГТ по сравнению с другими видами терапии заключается в том, что ГТ направлена на устранение причин заболевания, в то время как большинство лекарств устраняет лишь симптомы заболевания. На настоящий момент существует два типа ГТ: *ex vivo* и *in vivo*. Первый заключается в индивидуализированном подходе, когда генно-инженерные манипуляции с клетками пациента осуществляются *in vitro*, потом уже генетически обработанные клетки попадают обратно в организм. *In vivo* введение гена в векторной молекуле (конструкции) осуществляется непосредственно в организм пациента. Все клинические исследования сфокусированы на внесении дополнительных генов, а не на коррекции существующих или на их замещении, что значительно сложнее. Сегодня на рынке уже существуют генотерапевтические препараты, которые показали свою эффективность, хотя количество их очень небольшое. Несомненно, что на протяжении еще длительного времени ГТ не станет основным средством лечения пациентов, а будет играть лишь вспомогательную роль.

И.Н. Староверов, Ю.В. Червяков, Р.Н. Кузьмин,
Е.Г. Нерсисян, Р.В. Деев

Результаты лечения больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей препаратом на основе гена, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)

Ярославская Государственная медицинская академия

*Областная клиническая больница (Ярославль)
Институт стволовых клеток человека (Москва)*

Несмотря на появление новых, зачастую сложных, трудоемких и дорогостоящих хирургических методов лечения хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей (ХОЗАНК), существенного прогресса в плане увеличения продолжительности и качества жизни таких больных не произошло. Следует констатировать, что современная фармакотерапия не дает стойкого и значимого эффекта, особенно у больных с критической ишемией. Одним из альтернативных путей может быть использование генно-инженерных технологий, направленных на стимуляцию неоангиогенеза в пораженных конечностях.

Именно с этой целью Институтом стволовых клеток человека был разработан новый препарат «Неоваскулген», представляющий собой высокоочищенную сверхсжатую форму плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF — vascular endothelial growth factor). В эксперименте было показано, что препарат активировал пролиферацию клеток эндотелия человека, а также значительно стимулировал рост кровеносных сосудов у мышей.

Целью работы явилось: в рамках I/IIa фазы клинического испытания препарата «Неоваскулген» на основе гена, кодирующего VEGF, определить его безопасность, переносимость и эффективность в комплексной терапии пациентов при ишемии нижних конечностей (II–III степени по А.В. Покровскому-Фонтейну).

Отметим, что на момент планирования работы препарат прошел необходимые испытания *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы: за период с сентября по декабрь 2009 г. в отделении хирургии сосудов Ярославской областной клинической больницы проведено консервативное лечение 20 пациентов с ХОЗАНК IIA–IIB–III стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну. Возраст больных варьировал от 40 до 74 лет, и в среднем составил $62,3 \pm 5,26$. Мужчин было 16 (75%), женщин — 4 (25%). Соотношение мужчин и женщин 4:1. В комплекс стандартной сосудистой терапии включено двукратное введение препарата «Неоваскулген» 1,2 мг в ягодичную мышцу пораженной конечности с интервалом в 1 и 2 нед. (10 и 10 больных соответственно). Разделение на группы было необходимо для изучения безопасности при разной кратности и последующего выбора режима применения препарата. У 14 пациентов имелась сопутствующая кардиальная патология: ИБС — у 8 больных, из них ПИКС — у 2 пациентов; артериальная гипертензия — у 5 человек. В 3-х наблюдениях отмечена ишемическая болезнь головного мозга на фоне атеросклероза прецеребральных артерий. Один пациент в анамнезе перенес ОНМК.

В интересах оценки клинической эффективности больные были разделены на 3 группы в зависимости от исходной стадии заболевания: первая группа — стадия IIA (4 пациента), вторая группа — стадия IIB (6 больных) и третья группа — стадия III (10 наблюдений). Нами использовались следующие методы исследования: ультразвуковая доплерография, ультразвуковое ангиосканирование, чрескожное определение напряжения кислорода ($TcPO_2$) и тредмил-тест.

Результаты: отдаленные результаты прослежены у всех 20 больных в срок 1 год. Выживаемость пациентов составила 100%. Один больной перенес повторное ОНМК. В 2 наблюдениях выполнены высокие ампутации нижней конечности по поводу декомпенсированной ишемии через 9 мес. после включения в исследование (все больные имели исходную III стадию заболевания). Таким образом, сохранность конечностей при критической ишемии составила 80%, а для всех стадий заболеваний — 90%. В одном случае отмечено прогрессирование ишемии контралатеральной конечности, что потребовало дополнительного курса консервативного лечения.

Прирост лодыжечно-плечевого индекса через год в первой группе составил $0,05 \pm 0,01$ ($p > 0,05$). Динамика линейной скорости кровотока (ЛСК) на стопе была более убедительной $+7 \pm 0,4$ см/сек., но тоже статистически не значимой ($p > 0,05$). Показатели дистанции безболевого ходьбы достоверно увеличились на 1760 ± 120 м ($p < 0,01$). Изменений в показателях $TcPO_2$ не отмечено, так как в этой группе у всех больных они были в пределах нормы.

Исследование отдаленных результатов второй группы показали схожие изменения: ЛПИ увеличился на $0,08 \pm 0,03$ ($p > 0,05$); ЛСК — на $6,5 \pm 2,4$ см/сек. ($p > 0,05$); $TcPO_2$ достоверно увеличилось на 34 ± 7 мм рт. ст.; по результатам тредмил-теста дистанция увеличилась на 417 ± 38 м ($p < 0,01$), то есть 2/3 пациентов в результате лечения были переведены из IIB во IIA стадию заболевания. В третьей группе получены следующие результаты: ЛПИ незначимо увеличился на $11 \pm 6,1$; ЛСК на $6,8 \pm 3,7$ см/сек. ($p > 0,05$); напряжение кислорода в тканях стопы увеличилось на $23,7 \pm 7,4$ ($p < 0,05$). Наиболее яркая динамика наблюдалась при выполнении тредмил-теста: дистанция безболевого ходьбы достоверно увеличилась на 260 ± 34 м. Таким образом, в отдаленном периоде у 70% пациентов удалось купировать явления критической ишемии, 50% из них были переведены в IIA стадию заболевания.

Выводы: при использовании препарата «Неоваскулген» в отдаленном периоде отмечена хорошая переносимость и отсутствие побочных действий. В сочетании с комплексной терапией у пациентов с ишемией нижних конечностей (II–III степени по А.В. Покровскому-Фонтейну) отмечается улучшение качества их жизни за счет значительного увеличения дистанции безболевого ходьбы ($p < 0,05$) в 90% наблюдений. Дальнейшие исследования данного препарата с применением и других методов диагностики, включая ангиографию, позволят объективизировать данные о его эффективности.

П.Г. Швальб, Р.Е. Калинин, С.В. Грязнов

Опыт применения препарата на основе гена VEGF у больных с хроническими облитерирующими заболеваниями нижних конечностей

Рязанский Государственный медицинский университет

В клинике сосудистой хирургии проведена 1–2а фазы клинических испытаний генотерапевтического препарата, представляющего собой плазмидную конструкцию с геном VEGF165 (эндотелиального сосудистого фактора роста), изучена безопасность препарата и краткосрочная клиническая эффективность. В исследование включено 24 пациента с хронической ишемией нижних конечностей IIB–III стадией заболевания по А.В. Покровскому-Фонтейну. Исследование выполнено как открытое рандомизированное; пациенты группы А получали две повторные (через 7 сут.) внутримышечные инъекции препарата на фоне комплексной терапии, пациенты группы В — повторные инъекции через 14 сут. Наблюдение за пациентами продолжалось до 90 сут. Установлено, что препарат «Неоваскулген» безопасен, не вызывает как местных, так и общих нежелательных или побочных эффектов и осложнений. Получены первичные данные, свидетельствующие об эффективности, так за срок наблюдения отмечен рост безболезненного преодоления расстояния — на 37%, чрескожно определяемого напряжения кислорода — на 7,3%, лодыжечно-плечевого индекса — на 11%.