



УДК 617.58-005.4-08

Первые результаты клинического применения прямой генной терапии VEGF и bFGF при лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей

М.В. ПЛОТНИКОВ, А.А. РИЗВАНОВ, Р.Ф. МАСГУТОВ, М.О. МАВЛИКЕЕВ, И.И. САЛАФУТДИНОВ, И.М. ГАЗИЗОВ, Ю.Д. РОМАНОВА, И.И. ШАМСУТДИНОВА, А.А. БОГОВ, А.В. МАКСИМОВ, А.П. КИЯСОВ

Республиканская клиническая больница МЗ РТ, г. Казань
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казанский государственный медицинский университет
Казанская государственная медицинская академия

Плотников Михаил Викторович

сосудистый хирург отделения сосудистой хирургии № 1, ассистент кафедры кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии
420068, г. Казань, ул. Оренбургский Тракт, д. 138
тел. (843) 268-69-87, e-mail: plotnikov_mv@bk.ru

Представлены результаты применения двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 у пациентов с заболеванием периферических артерий (ЗПА): 10 мужчинам с ЗПА выполнена внутримышечная инъекция изучаемого препарата в пораженную конечность. Для объективизации результатов исследования применялось измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), тредмил-тест, время восстановления исходного ЛПИ после нагрузки, иммуногистохимическое исследование. Зафиксировано улучшение функционального состояния конечности после введения препарата на 19%, по данным ЛПИ, увеличение дистанции безболевого ходьбы в 2 раза, снижение времени восстановления исходного ЛПИ на 38%. По данным иммуногистохимического исследования отмечено увеличение плотности капиллярной сети на 47,9%.

Ключевые слова: заболевания периферических артерий, ангиогенез, факторы роста сосудов, основной фактор роста фибробластов, CD34+, биопсия мышц, иммуногистохимия.

First results of clinical use of direct gene therapy VEGF and bFGF for treatment of patients with chronic ischemia of lower limbs

M.V. PLOTNIKOV, A.A. RIZVANOV, R.F. MASGUTOV, M.O. MAVLIKEEV, I.I. SALAFUTDINOV, I.M. GAZIZOV, YU.D. ROMANOVA, I.I. SHAMSUTDINOVA, A.A. BOGOV, A.V. MAKSIMOV, A.P. KIYASOV

Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan
Kazan (Volga region) Federal University
Kazan State Medical University
Kazan State Medical Academy

The article shows the results of using the double cassette expression plasmid vector pBud-VEGF165-FGF2 for patients with peripheral arterial diseases (PAD): 10 men with PAD experienced intramuscular injection of studied medication to the affected limb. For explaining the findings was used the measurement of ankle-brachial index (ABI), treadmill test, recovery period of initial ABI after pressure, immunohistochemical study. Was recorded an improvement in functional status of limbs after using treatment by 19% according to ABI, an increase in walking distance twice, reduced time to restore the original LPI by 38%. According to immune histochemical study was recorded an increase in density of capillary network up to 47.9%.

Key words: peripheral arteries diseases, angiogenesis, vascular growth factors, main fibroblast growth factor, CD34+, muscle biopsy, immunohistochemistry.

Заболевания периферических артерий (ЗПА) с поражением дистального артериального русла является серьезной проблемой ангиохирургии, поскольку прямая реваскуляризация у этой категории больных, как правило, невозможна [1]. Естественное течение ЗПА без адекватной коррекции хирургическими или фармакологическими методами приводит к нарастанию степени ишемии и в итоге к ампутации, а результаты применения таких методов не прямой реваскуляризации, как симпатэктомиа, введение аутокрови, реваскуляризирующая остеоперфорация, артериализация венозного кровотока, не имеют стабильных положительных результатов. Это заставляет искать альтернативные способы лечения [2-4]. В связи с этим продолжается изучение возможностей терапевтического ангиогенеза. Основными объектами изучения для применения в этих целях в настоящее время рассматриваются факторы роста сосудов и прогениторные клетки [5, 6]. Накопленные данные свидетельствуют о положительном эффекте терапии как у пациентов с перемежающейся хромотой, так и при критической ишемии. Нами также получен положительный опыт применения стволовых клеток при ЗПА, однако данный метод имеет определенные ограничения [7].

Цель исследования: определить эффективность применения двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 при лечении ЗПА [8]. Изучаемый нами генотерапевтический препарат одновременно экспрессирует два высоко активных проангиогенных фактора роста — фактор роста сосудов и основной фактор роста фибробластов, что предполагает повысить эффективность лечения ишемических заболеваний.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты с хронической ишемией нижних конечностей IIБ степени (по А.В. Покровскому), у которых выполнение прямой реваскуляризации (шунтирующих операций или ангиопластики) невозможно или результат их сомнителен из-за окклюзии подколенно-берцового сегмента. Все пациенты — мужчины, средний возраст составил $53,65 \pm 2,34$ года. Структура заболеваний: облитерирующий атеросклероз — 7, облитерирующий тромбангиит — 3 пациента. У всех пациентов было получено информированное согласие на исследование. Протокол исследования одобрен Ученым советом КФУ и Локальным этическим комитетом.

Верификация диагноза проводилась при помощи дистальной ангиографии нижних конечностей. Для определения параметров кровоснабжения конечности выполнялись функциональные исследования: измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), тредмил-тест (измерение дистанции безболевой ходьбы), время восстановления исходного ЛПИ после нагрузочной пробы. На основании иммуногистохимических исследований биоптатов скелетной мышцы проводилась выявление неоангиогенеза.

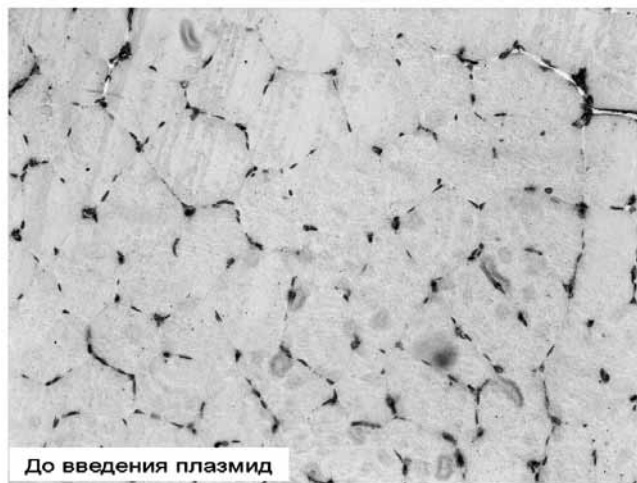
Критерии включения: проходимость аорто-бедренного сегмента и глубокой артерии бедра; возраст ≤ 65 лет; хроническая артериальная недостаточность IIБ степени (по А.В. Покровскому); длительность заболевания более 2 лет; не менее 6 месяцев после последней реконструктивной операции; невозможность прямой реваскуляризации.

Критерии исключения: тяжелая сердечно-сосудистая недостаточность; сердечно-сосудистые события в анамнезе сроком менее 6 месяцев; нарушение сознания; онкологический анамнез; положительные маркеры к вирусным гепатитам и ВИЧ.

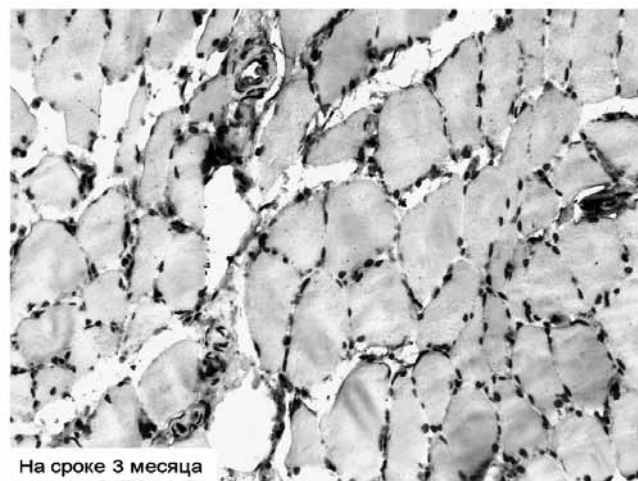
Дизайн исследования. По этическим причинам формирование контрольной группы пациентов нами не проводилось, однако эффективность исследуемого пре-

Рисунок 1.

Иммуногистохимическое исследование скелетной мышцы до и после введения плазмид. Окрашивание маркерами к CD34. Красным цветом выявлены сосудистые структуры



До введения плазмид



На сроке 3 месяца

парата решили оценить за счет оригинального дизайна исследования. После выявления пациента, соответствующего критериям включения/исключения, проводилось изучение параметров периферического кровотока функциональными методами исследования — это соответствовало контрольной точке исследования «минус 3 месяца». На контрольном обследовании через 3 месяца при отсутствии положительной динамики в параметрах функциональных проб пациенту выполнялась инъекция исследуемого препарата и забор первичной биопсии — срок «ноль». В дальнейшем на сроках три, шесть и двенадцать месяцев для оценки эффективности изучаемого препарата проводились функциональные исследования. Забор контрольной биопсии выполнялся на сроке 3 месяца.

Введение препарата и биопсия. Операцию по забору биоптата проводили под спинномозговой анестезией. Кожный разрез выполняли на уровне середины голени, выделяли медиальную часть икроножной мышцы, производили забор мышцы размерами $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ см. После обеспечения гемостаза и послойного ушивания раны выполнялась внутримышечная инъекция раствора двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 в количестве 1 мг в переднюю и заднюю группы мышц голени в равноудаленных точках



одинаковыми объемами. На 2-е сутки после манипуляции пациенты выписывались из стационара.

Парафиновые срезы биоптатов икрожных мышц, забранные до и через 3 месяца после инъекции, окрашивались иммуногистохимически с применением антител к CD34 (маркер эндотелиальных клеток) для выявления капилляров. Окрашенные срезы подвергались морфологическому анализу, производился подсчет количества капилляров на одно мышечное волокно.

Результаты

В настоящее время мы располагаем опытом применения изучаемого препарата у 10 пациентов с ЗПА.

Осложнений при проведении операций забора первичной и повторной биопсии не было. После внутримышечного введения изучаемого препарата в пораженную конечность реакций системного и местного характера не выявлено. Отдаленные результаты изучены на сроке 3 и 6 месяцев.

1. ЛПИ: «минус 3 месяца» — 0,47; срок «ноль» — 0,49; через 3 месяца — 0,55; через 6 месяцев — 0,6.

2. Дистанция безболевого ходьбы: «минус 3 месяца» — 59 метров, срок «ноль» — 58 метров, через 3 мес. — 112 метров, через 6 мес. — 108 метров.

3. Время восстановления исходного ЛПИ после дозированной нагрузки: «минус 3 месяца» — 890 сек., срок «ноль» — 860 сек., через 3 мес. — 598 сек., через 6 мес. — 563 сек.

Иммуногистохимический анализ биоптатов выявил увеличение плотности капиллярной сети на сроке 3 месяца на 47,9% (индекс К/М — соотношение «капилляры/мышечное волокно» возрастает после аутотрансплантации с 1,69 до 2,5; $p < 0,05$) (рис. 1).

Обсуждение

В настоящее время имеется целый ряд работ, посвященный генной терапии при ишемии конечностей. В большинстве своем они основаны на применении генно-инженерных конструкций, содержащих только один потенциальный стимулятор ангиогенеза — фактор роста сосудов (VEGF). В мире уже существуют генно-

терапевтические препараты, разрешенные в клинической практике. Одним из них является российский препарат — Неоваскулоген® [9]. Нами изучается инновационный генно-терапевтический препарат, который может позволить получить лучший эффект, благодаря экспрессии двух высокоактивных проангиогенных факторов — фактора роста сосудов (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF2).

Естественное течение ЗПА и прогноз сохранения конечности в целом определяются как благоприятные. Однако установлено, что прогрессивное ухудшение функциональных параметров кровотока происходит с каждым годом и кумулятивный 10-летний риск развития критической ишемии у пациентов с ЗПА составляет 30% [10]. Трехмесячное наблюдение, предшествующее введению исследуемого препарата, в нашей группе пациентов также свидетельствует об отсутствии динамики течения заболевания без вмешательства.

Имеются экспериментальные работы, в которых наличие неоангиогенеза при использовании клеточной или генной терапии доказывается морфологически, однако в клинических условиях гистохимическая оценка генно-стимулированного неоангиогенеза выполнена нами впервые. При этом выявлено увеличение плотности капиллярной сети скелетной мышцы на 47,9% ($p < 0,05$) через 3 месяца после интрамускулярного введения 1 мг двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2.

Выводы

Применение прямой генной терапии при помощи двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 у пациентов с ЗПА и хронической артериальной недостаточностью IIБ степени приводит к улучшению параметров периферического кровотока, увеличению плотности капиллярной сети в скелетной мышце, что, по-видимому, связано с неоангиогенезом. Изучение безопасности и эффективности предложенного метода генной терапии ЗПА требует большего числа наблюдения и изучения отдаленных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекомендации Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. Диагностика и лечение больных с заболеваниями периферических артерий. — М., 2007; 8.
2. Комаров А.Л., Панченко Е.Л., Деев А.Д. и соавт. Течение перемежающейся хромоты и прогноз больных атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей. Анализ результатов проспективного наблюдения // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2000. — № 6 (2). — С. 9-18.
3. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. Critical limb ischemia: management and outcome. Report of a national survey // Eur J Vase Endovasc Surg 1995. — Vol. 10. — P. 108-113.
4. Казанчан П.О., Попов В.А., Дебелый Ю.В. и соавт. Хирургическая реваскуляризация при критической ишемии // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2000. — № 3 (32). — С. 5.
5. Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В. и соавт. Мировой опыт и тенденции генной терапии ишемических заболеваний // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2011. — № 17 (2). — С. 145-54.
6. Хорев Н.Г., Елыкомов В.А., Залозный Д.А. Терапевтический клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий

// Ангиология и сосудистая хирургия. — 2011. — № 17 (2). — С. 36-44.

7. Плотников М.В., Киясов А.П., Максимов А.В. и соавт. Результаты применения аутологичных стволовых клеток периферической крови у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2011. — № 2. — С. 11-15.

8. Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Ялвач М.Э. и соавт. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — № 5 (2). — С. 62-7.

9. Швальб П.Г., Гавриленко А.В., Калинин Р.Е. и др. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb-III фаза клинических испытаний) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — № 6 (3). — С. 76-83.

10. Satish C. Muluk, Visala S. Muluk, Mary E. Kelley et al. Outcome events in patients with claudication: A 15-year study in 2777 patients // J Vasc Surg. — 2001. — Vol. 33. — С. 251-8.