

Первый клинический опыт применения прямой генной терапии VEGF и bFGF при лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей

М.В. Плотников^{1,4}, А.А. Ризванов^{1,2}, Р.Ф. Масгутов^{1,2,3}, М.О. Мавликеев³,
И.И. Салафутдинов^{1,2}, И.М. Газизов³, Ю.Д. Романова², И.И. Шамсутдинова¹, А.А. Богов^{1,3},
А.В. Максимов^{1,4}

¹ Республиканская клиническая больница, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Казанский государственный медицинский университет Росздрава, Казань

⁴ Казанская государственная медицинская академия, Казань

The first clinical experience of direct gene therapy using VEGF and bFGF in treatment patients with critical lower limb ischemia

M.V. Plotnikov^{1,4}, A.A. Rizvanov^{1,2}, R.F. Masgutov^{1,2,3}, M.O. Mavlikeev³,
I.I. Salafutdinov^{1,2}, I.M. Gazizov³, Y.D. Romanova², I.I. Shamsutdinova¹, A.A. Bogov^{1,3},
A.V. Maksimov^{1,4}

¹ Republican Clinical Hospital, Kazan

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

³ Kazan State Medical University, Kazan

⁴ Kazan State Medical Academy, Kazan

Представлено клиническое наблюдение успешного лечения дистальной формы заболевания периферических артерий нижних конечностей с явлениями критической ишемии у пациента 60 лет.

Была выполнена инъекция двухкассетной экспрессионной плазмиды с кДНК генов сосудистого эндотелиального фактора роста и основного фактора роста фибробластов, в мышцы голени и мягкие ткани стопы пораженной конечности. Эффект лечения оценивали при помощи функциональных проб: измерение лодыжечно-плечевого индекса, тредмил-тест, время восстановления исходного плече-лодыжечного индекса после нагрузки и временной окклюзии. Выполнялось иммуногистохимическое исследование биоптатов мышц пораженной конечности.

Ключевые слова: двухкассетная экспрессионная плазмиды, заболевание периферических артерий, критическая ишемия, генная терапия, биоптаты мышц.

In this paper we present the clinical observation of successful treatment of distal form of peripheral artery disease of the lower extremity with symptoms of critical ischemia in a 60 years old patient.

Intramuscular injection of dual expression plasmid, encoding vascular endothelial growth factor VEGF and basic fibroblast growth factor FGF2, was performed to the affected lower extremity. The effect of treatment was evaluated by functional tests: measurement of ankle-brachial index, treadmill test, the recovery time, shoulder-ankle index after strain and temporary occlusion. Performed immunohistochemical examination of biopsy samples of the affected lower extremity muscles.

Key words: dual expression plasmid, peripheral artery disease, critical ischemia, gene therapy, muscle biopsies.

Заболевания периферических артерий (ЗПА) — частая причина снижения качества жизни и инвалидизации [1]. Общая распространенность ЗПА в популяции по данным различных исследований варьирует в пределах 3–10%, увеличиваясь до 15–20% в возрастной группе старше 70 лет [2–4]. Прогноз сохранения конечности при ЗПА является в целом благоприятным, однако у четверти пациентов наблюдается либо сохранение симптомов, либо их прогрессирование с развитием критической ишемии нижних конечностей (КИНК) [5–7]. При этом лишь половине пациентов с установленным диагнозом КИНК может быть выполнена реваскуляризация конечности, четверть пациентов получают консервативное лечение, остальным выполняется первичная ампутация бедра или голени [8]. В этой связи, высок интерес к разработке непрямых методов реваскуляризации [9]. С 90-х годов прошлого века изучению терапевтического ангиогенеза посвящено большое количество

работ [10, 11]. Положительные результаты этих исследований стали толчком к апробации технологий стимуляции ангиогенеза в клинической практике. В России разработан генотерапевтический препарат «Неоваскулген» (Институт Стволовых Клеток Человека), разрешенный для клинического применения. Неоваскулген® является первым в Европе, первым в своем классе и всего лишь одним из четырех в мире генотерапевтических препаратов, разрешенных к клиническому применению. В настоящее время Неоваскулген® рекомендован для применения в комплексной терапии пациентов при ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза [15]. Препарат создан на основе плазмидного вектора, кодирующего ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Нами разрабатывается инновационный генотерапевтический препарат, позволяющий повысить эффективность лечения ишемических заболеваний за счет одновременной экспрессии двух высоко-

e-mail: plotnikov_mv@bk.ru

активных про-ангиогенных фактора роста — VEGF и основного фактора роста фибробластов (bFGF2).

Целью нашего исследования стало определить эффективность применения двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 при лечении пациентов с ЗПА в стадии КИНК [12]. Исследование было одобрено Ученым советом КФУ и Локальным этическим комитетом.

Материал и методы

Больной А. (60 лет) поступил в отделение сосудистой хирургии № 1 в ноябре 2011 г. с жалобами на постоянные, усиливающиеся в ночное время боли в области трофической язвы I пальца левой стопы, зябкость обеих стоп, быструю утомляемость и боли в икроножной мышце левой нижней конечности при ходьбе через 10–15 м. Ночной отдых облегчался клиностазом конечности и наркотическими анальгетиками.

Из анамнеза: больным себя считает около 5 лет, когда постепенно стал отмечать появление зябкости стоп и повышенной утомляемости в икроножных

мышцах при ходьбе. В 2009 г. развился острый атеротромбоз левой подколенной артерии, по поводу чего была произведена тромбэктомия с ревизией дистальных сегментов берцовых артерий. В последующем перемежающаяся хромота до 20–30 м. сохранялась и летом 2010 г. у больного появилась трофическая язва I пальца левой стопы. Больному проводились неоднократные курсы препаратом простагландина Е с кратковременным положительным эффектом. В октябре 2011 г. ввиду присоединения болей в покое выполнена левосторонняя поясничная симпатэктомия, однако значимый клинический эффект не был достигнут.

Местный статус при поступлении: левая голень и стопа бледные, подкожные вены заполнены слабо. Пульсация магистральных артерий не определялась на подколенной артерии и дистальнее. На I пальце левой стопы в области дистальной фаланги по латеральной поверхности — трофический дефект под струпом размером 1,5×2 см. (рис. 1). По данным артериографии, магистральное артериальное русло дистальнее подколенной артерии не контрастировалось (рис. 2).



Рис. 1. Большой палец стопы пациента с критической ишемией нижних конечностей, трофическая язва: А — до введения плазмиды; Б — через 3 мес. после введения; В — через 6 мес. после лечения

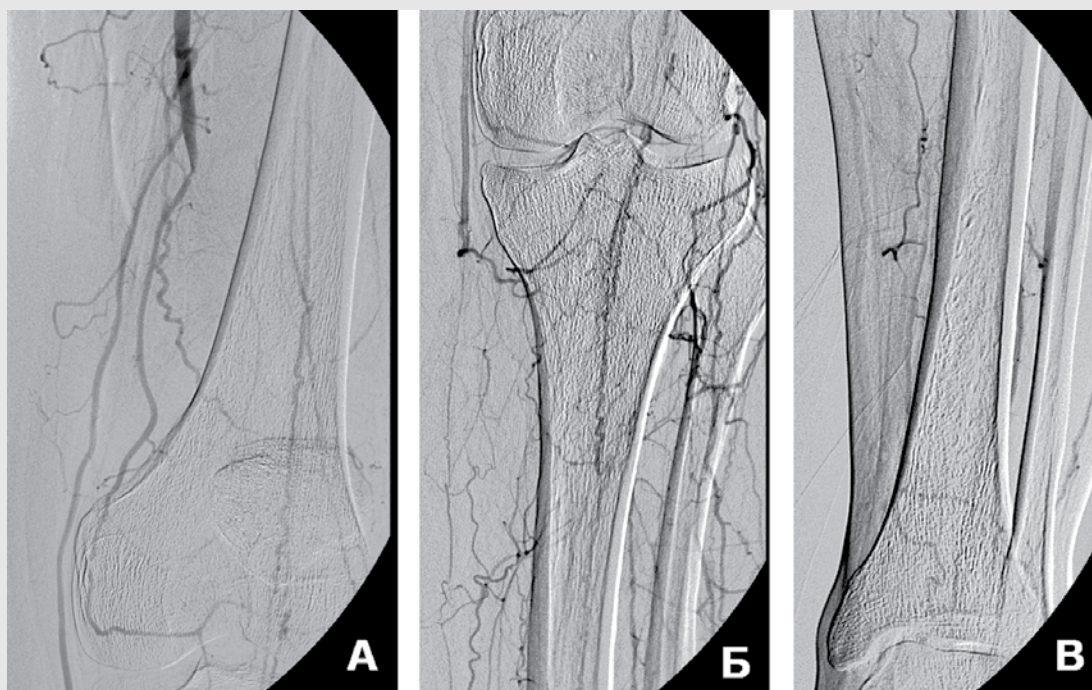


Рис. 2. Артерии нижней конечности пациента до лечения. Оклюзия подколенной (А) и берцовых артерий в проксимальном (Б) и дистальном (В) сегментах. Дистальная ангиография

С учетом ранее перенесенных безуспешных попыток хирургической прямой и непрямой реваскуляризации, отсутствия эффекта от проводимой фармакотерапии и наличия критической ишемии больному было предложено произвести инъекцию двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2 [12]. Рекомбинантная плазида создана на базе экспрессионного вектора pBudCE4.1 (Invitrogen, США) и обеспечивает одновременную и независимую экспрессию VEGF и FGF2 за счет наличия двух экспрессионных кассет.

Было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Процедура выполнена с разрешения этического комитета в рамках темы Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан» «Разработка новых методов прямой генной терапии у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей и диабетической стопой». Препарат плазмиды получен хроматографическим методом с применением колонок «PlasmidSelect Xtra Starter Kit» (GE Healthcare Life Sciences, США), обеспечивающим получение ДНК, удовлетворяющей стандартам cGMP.

В условиях операционной под спинномозговой анестезией через кожный разрез на уровне середины голени произведена биопсия икроножной мышцы. После ушивания раны выполнена инъекция передне-латеральной и задней группы мышц голени равными дозами в равноудаленных точках препаратом двухкассетного экспрессионного плазмидного вектора pBud-VEGF165-FGF2. Также была выполнена инъекция мягких тканей стопы: межплюсневых мышц, подошвенной клетчатки, параульцилярной клетчатки 1 пальца стопы. Общее количество введенной плазмидной ДНК составило 1 мг.

Объективизация результатов проводилась при помощи измерения лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), стандартного тредмил-теста, определения времени восстановления исходного ЛПИ после нагрузочной ходьбы и окклюзионной пробы.

Для гистологического анализа забирались биоптаты мышц, подвергнутых терапевтическому воздействию. Биоптаты заливали по стандартной методике в парафин, получали срезы толщиной 4–6 мкм. Выполняли иммуногистохимическое исследование с помощью коммерческих моноклональных антител к CD34 для визуализации капилляров (клон QVEnd/10, Novocastra, Великобритания, разведение 1:75). Реакция с антителами к CD34 позволяет наиболее полно визуализировать капиллярную сеть [13], так как CD34 — маркер прогениторных клеток, в том числе клеток-предшественниц эндотелия [14], и, следовательно, позволяет выявить капилляры на более ранней стадии развития.

Результаты

Осложнений местного и системного характера не наблюдалось. На вторые сутки пациент отметил улучшение, выражающееся в потеплении конечности и уменьшении болевого синдрома. На пятые сутки пациент констатировал исчезновение болей в покое, отказ от наркотических анальгетиков и нормализацию ночного сна, а также некоторое увеличение дистанции безболевого ходьбы в привычном для себя темпе. На седьмые сутки пациент был выписан.

Отдаленные результаты исследованы на сроке 3 и 6 мес.

1. ЛПИ: до введения препарата и на сроке 3 мес. — кровотоки в артериях около лодыжечной области лоджировать не удалось (0), через 6 мес. — выявлен кровоток в задне-большеберцовой артерии, ЛПИ составил 0,48;

2. Дистанция безболевого ходьбы по результатам стандартного тредмил-теста: до введения — 24 м, через 3 мес. — 177 м, через 6 мес. — более 200 м (рис. 3);

3. Время восстановления исходного ЛПИ после дозированной нагрузки (измерение осциллографическим методом): до введения — 11 мин 42 с, через 3 мес. — 8 мин 31 с, через 6 мес. — 8 мин 3 с (рис. 4);

4. Время восстановления исходного ЛПИ после трехминутной окклюзии (измерение осциллографическим методом): до введения — 5 мин 36 с, через 3 мес. — 2 мин 23 с, через 6 мес. — 1 мин 52 с (рис. 5).

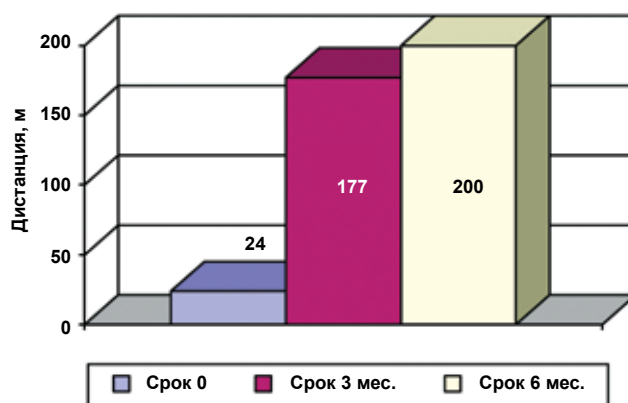


Рис. 3. Дистанция безболевого ходьбы по результатам стандартного тредмил-теста

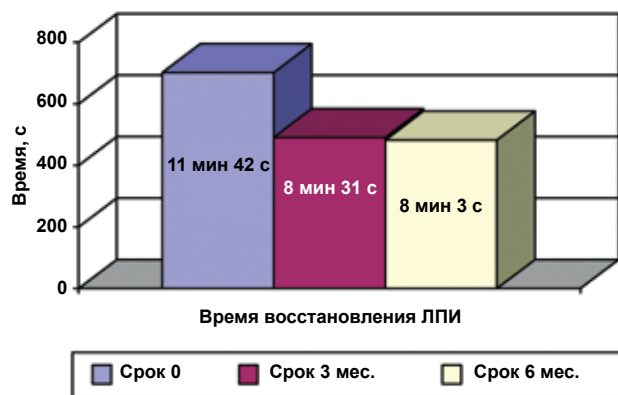


Рис. 4. Время восстановления исходного ЛПИ после дозированной нагрузки (тредмил-теста)

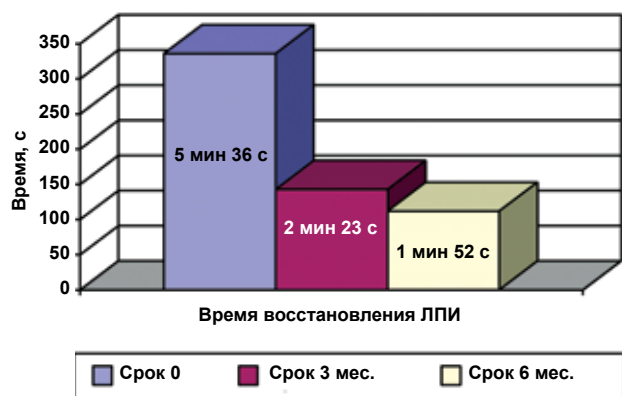


Рис. 5. Время восстановления исходного ЛПИ после трехминутной редукции артериального кровотока, окклюзионная проба

По результатам иммуногистохимического исследования биоптатов мышц с антителами к CD34 выявлено увеличение плотности капиллярной сети (рис. 6).

При объективном осмотре на сроке 3 мес. отмечалось значительное уменьшение трофического дефекта I пальца левой стопы и полное заживление на сроке 6 мес. (см. рис. 1).

На сроке 6 мес. пациент отмечал отсутствие ограничения дистанции при ходьбе в привычном для себя темпе.

Выводы

Представленное клиническое наблюдение показывает возможность применения терапевтических методов ангиогенеза с использованием прямой генной терапии двухкассетной экспрессионной плазмидой при IV степени хронической ишемии нижних конечностей.

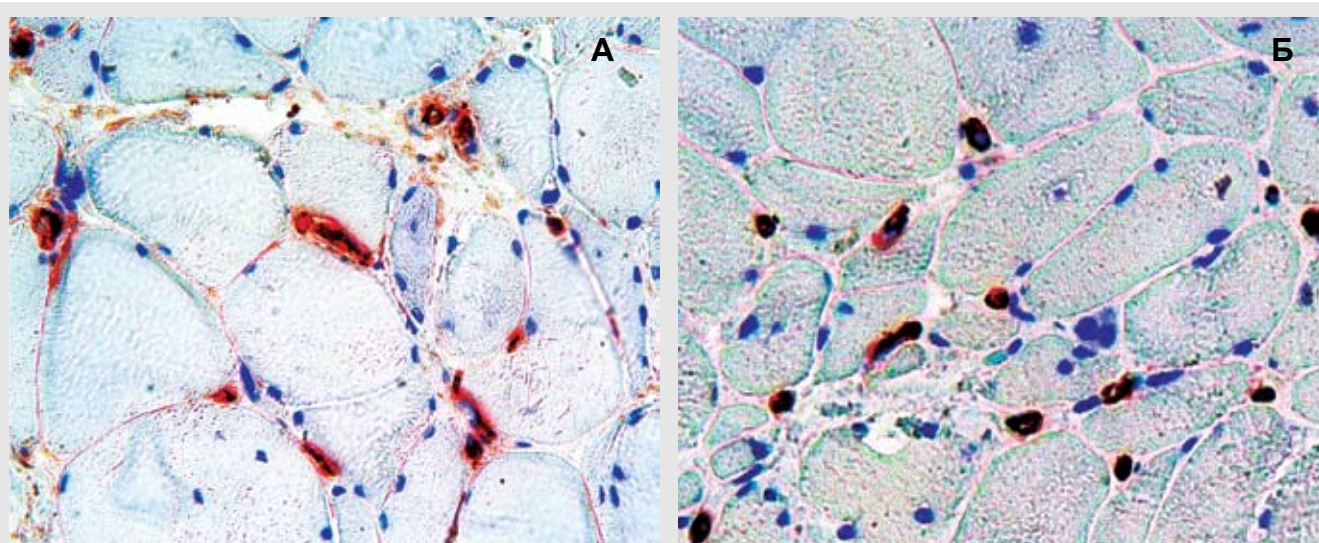


Рис. 6. Мышечная ткань пациента до (А) и через 3 мес. после (Б) лечения. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34. Ув.: ×200

Благодарности

Выполнение данного научного исследования финансируется за счёт темы ГАУЗ «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан» «Разработка новых методов прямой генной терапии у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей и диабетической стопой» и государствен-

ного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.552.11.7083. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. М.: Медицина; 1997.
2. Criqui M.H., Fronek A., Barrett-Connor E. et al. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation* 1985; 71(3): 510–5.
3. Hiatt W.R., Hoag S., Hamman R.F. Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study. *Circulation* 1995; 1; 91(5): 1472–9.
4. Selvin E., Erlinger T.P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Circulation* 2004; 110(6): 738–43.
5. Muluk S.C., Muluk V.S., Kelley M.E. et al. Outcome events in patients with claudication: A 15-year study in 2777 patients. *J. Vasc. Surg.* 2001; 33: 251–8.
6. Комаров А.Л., Панченко Е.Л., Деев А.Д. и др. Течение перемежающейся хромоты и прогноз больных атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей. Анализ результатов проспективного наблюдения. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2000; 6(2): 9–18.
7. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. Critical limb ischemia: management and outcome. Report of a national survey. *Eur. J. Vas. Endovasc. Surg.* 1995; 10: 108–13.
8. Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzner N.R. et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial

Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease). J. Am. Coll. Cardiol. 2006; 47:1–192.

9. Казанчан П.О., Попов В.А., Дебелый Ю.В. и др. Хирургическая реваскуляризация при критической ишемии. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2000; 3(32): 5.

10. 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): 145–54.

11. Хорев Н.Г., Елыкомов В.А., Залозный Д.А. Терапевтический клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2011; 17(2): 36–44.

12. 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): 62–7.

13. Norrby K., Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS* 2003; 111: 483–9.

14. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964–7.

15. 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): 76–83.

Поступила 14.08.2012