



# АНГИОЛОГИЯ И СОСУДИСТАЯ ХИРУРГИЯ



## В этом номере:

### АНГИОЛОГУ

Стволовые клетки у больных с хронической артериальной недостаточностью  
Дальтепарин в реконструктивной сосудистой хирургии

Малые дозы ацетилсалициловой кислоты в лечении больных с хронической артериальной недостаточностью

Клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий

### ЛУЧЕВОМУ ДИАГНОСТУ

Эффективность ультразвуковой диагностики при стенозе сонных артерий

### ИНТЕРВЕНЦИОННОМУ РАДИОЛОГУ

Эндоваскулярные методы лечения острых тромбозов артерий нижних конечностей

Каротидная эндартерэктомия или каротидное стентирование

### ФЛЕБОЛОГУ

Хирургическое лечение острой тромбоземболии легочной артерии

Флеботромбоз и врожденная тромбофилия

### ХИРУРГУ

Каротидная эндартерэктомия при общей и местной анестезии

Операции на сонных артериях в остром периоде ишемического инсульта

### В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

Хирургическое лечение посттравматических артерио-венозных свищей и аневризм

# ANGIOLOGY AND VASCULAR SURGERY

Том 17

# 2011

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ****LITERATURE REVIEW****МИРОВОЙ ОПЫТ И ТЕНДЕНЦИИ  
ГЕНОТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ****ДЕЕВ Р.В., ГРИГОРЯН А.С., ПОТАПОВ И.В.,  
КИСЕЛЕВ С.Л., ИСАЕВ А.А.**ОАО «Институт стволовых клеток человека»,  
Москва, Россия

Прошло более 15 лет с момента первого применения в клинической практике генотерапевтической конструкции для лечения хронической ишемии нижних конечностей. За это время в мире накоплен значительный опыт — пролечено не менее 1000 пациентов, что позволяет обобщить опубликованные результаты этих клинических испытаний. В результате такого анализа следует признать, что наименее опасными генными терапевтическими конструкциями являются плазмидные, а наиболее эффективными — содержащие ген VEGF165. Самые убедительные результаты показаны при лечении хронической ишемии нижних конечностей, в то время, как использование генотерапии при лечении ишемической болезни сердца пока не принесло отчетливых положительных результатов.

**Ключевые слова:** генотерапия, хроническая ишемия нижних конечностей, ишемическая болезнь сердца, сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGF, плазида.

**ВВЕДЕНИЕ**

Несомненным прогрессом новых направлений в клинической медицине стал процесс постепенного вхождения в практику биотехнологических способов лечения. В частности, в ангиологию — принципов и методов «терапевтического ангиогенеза», т. е. вариантов индукции развития сосудистой сети в ишемизированных тканях при помощи ангиогенных факторов роста или генетических конструкций [1]. Достаточно убедительно это иллюстрирует непрерывный рост количества научных публикаций, посвященных различным аспектам «терапевтического ангиогенеза» (Рис.).

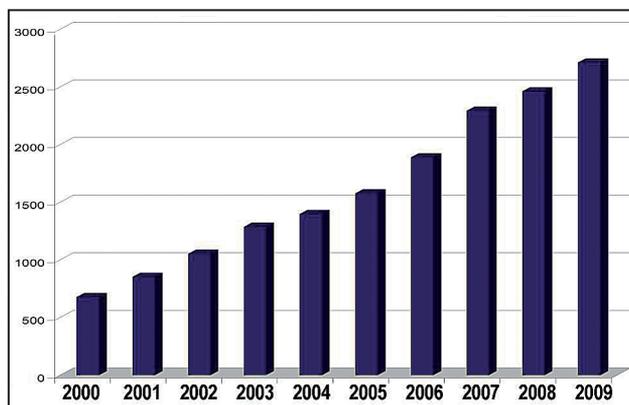


Рис. Количество публикаций в базе данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> за период 2000–2009 г.г. по запросу «therapeutic angiogenesis»

В TASC второго пересмотра (2007), имеются параграфы, касающиеся генотерапии [2]. Международное сообщество (Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease) относит эти методы к категории «будущих» способов лечения, чья эффективность на сегодняшний день в должной степени не доказана. Созвучно с этим рекомендует относиться к «терапевтическому ангиогенезу» и Аме-

риканская кардиологическая ассоциация, ранжируя подобные методы лечения в класс IIb — нуждающихся в тщательной проверке с осуществлением плацебо-контролируемых исследований. В унисон зарубежным специалистам, российские ангиологи в «Национальных рекомендациях по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией» (2010) приводят то же суждение [3], хотя большинство проведенных к сегодняшнему дню исследований являются плацебо-контролируемыми и дают достоверные ответы не только в отношении безопасности методов «терапевтического ангиогенеза», но и эффективности клинического применения тех или иных ангиогенных препаратов.

За последние 15 лет, прошедшие с момента первого использования генной терапии у больных с облитерирующими заболеваниями артерий, накоплен определенный опыт лечения генотерапевтическими методами различных форм хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) и ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Вышеперечисленные обстоятельства подчеркивают необходимость предметного рассмотрения полученных в мире данных и тенденций клинического внедрения генотерапевтических методов лечения.

**ГЕНОТЕРАПИЯ В АНГИОЛОГИИ:  
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ**

Еще в 1948 году гипотетически предполагалось наличие химического «фактора X», ответственного за развитие сосудов при диабетической пролиферативной ретинопатии [4]. Считается [1], что концепция «терапевтического ангиогенеза» начала формироваться тотчас после выявления особенностей ангиогенеза в опухолях [5, 6]. Обнаружив в них фактор ответственный за образование сосудов — TAF (tumor angiogenesis

factor), J. Folkman (1971, 1972), первоначально предложил его блокировать для предотвращения развития сосудов в опухолях и их дальнейшей прогрессии. В 1983 г. в опухолях был описан еще один фактор, который, по-видимому, соответствовал TAF, и обеспечивал повышение проницаемости сосудистой стенки, в связи с чем и был назван «фактором проницаемости сосудов» (vascular permeability factor, VPF) [7]. Фактор VPF не связывали с физиологическим васкуло-, артерио- и ангиогенезом, предполагая, что он играет роль лишь в патологических процессах, однако вскоре после описания «сосудистого эндотелиального фактора роста» (vascular endothelial growth factor, VEGF) было обнаружено, что VPF и VEGF кодируются одним геном и образуются в результате альтернативного сплайсинга [8–10]. Сам VEGF впервые был охарактеризован в 1989 г. как гепарин-связывающий ангиогенный фактор роста, оказывающий высокоспецифическое митогенное воздействие на эндотелиальные клетки [11, 12]. Важно отметить, что практически сразу было продемонстрировано, что фактор VEGF активирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов синергично с фактором bFGF, однако сам по себе bFGF не вызывает подобных эффектов [13, 14]. В дальнейшем это было использовано на практике разработчиками методик «терапевтического ангиогенеза», которые сочетали в одной конструкции гены нескольких проангиогенных факторов [15–17].

В настоящее время определено, что существует целое семейство факторов VEGF, каждый из представителей которого функционирует либо на определенном этапе онтогенеза, либо реализует различные процессы, связанные с сосудистым руслом (Табл. 1), причем основным представителем семейства считается VEGF-A. Фактор PlGF (ростовой фактор, выделяемый из плаценты, placenta-derived growth factor) который обнаружен в очагах васкулогенеза, участвует в ангиогенезе – во время воспаления, при заживлении ран, а также при канцерогенезе [18].

Факторы семейства VEGF связываются рецепторами VEGFR-1 (*flt-1*) и VEGFR-2 (*KDR/flk-1*), обладающими тирозинкиназной активностью [25]. Данные рецепторы были обнаружены на поверх-

ности эндотелия [26], а также на некоторых клетках гемопоэтического ростка, в частности, на моноцитах и мегакариоцитах [1, 27], а также на нейронах, остеобластах, панкреоцитах – но в значительно меньшем количестве [28]. Описан также VEGFR-3 (*FLT-4*) [29], который, однако, не является рецептором VEGF-A, а связывает VEGF-C и VEGF-D [30].

Ген фактора VEGF-A состоит из 8 экзонов, разделенных 7 интронами размером в среднем по 14 Кб [31]. После транскрипции пре-мРНК VEGF-A претерпевает процесс альтернативного сплайсинга, чтобы дать начало одному из двух подсемейств белков VEGF-A, в каждом из которых, в свою очередь, также выделяется по несколько изоформ на основании количества аминокислот, входящих в их состав. Количество аминокислот, присутствующих в той или иной изоформе, определяется альтернативным включением в первичную структуру белка экзонов 6 и 7, кодирующих гепарин-связывающие домены, а сами изоформы характеризуются разной биологической активностью. Два основных подсемейства VEGF-A обладают различными вариантами С-терминальных последовательностей [32]. Выделяют VEGF<sub>xxx</sub> (проангиогенные формы) и VEGF<sub>xxxб</sub> (антиангиогенные формы) [33], где «xxx» соответствует количеству составляющих белок аминокислот.

Следует отметить, что фактор синтезируется в виде предшественника, имеющего 226 аминокислотных остатков и биологическую активность приобретает после отщепления части из них в ходе процессинга. Известно 12 различных представителей фактора VEGF-A: VEGF<sub>111</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>121б</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165б</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>189б</sub> и VEGF<sub>206</sub> [33–37]. Основной функционально активной изоформой фактора является VEGF<sub>165</sub> [38].

Долгое время фактор VEGF интересовал исследователей и клиницистов главным образом в отношении к канцерогенезу, а подходы к регуляции роста сосудов ограничивались лишь подавлением ангиогенеза в опухолях, однако в последние годы все больше внимания уделяется локальной стимуляции ангиогенеза в зонах ишемии с целью восстановления

Краткая характеристика представителей семейства VEGF

Таблица 1

Фактор	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	PlGF
Рецепторы	VEGFR-1 VEGFR-2; для VEGF <sub>121</sub> – дополнительно рецепторы нейротрофина NRP1 и NRP2 [19]	VEGFR-1 VEGFR-2	VEGFR-1 VEGFR-2 VEGFR-3	VEGFR-1 VEGFR-2 VEGFR-3	VEGFR-1 VEGFR-2
Биологическая роль (эффект)	активация пролиферации и миграции эндотелиоцитов; - вазодилатация; - повышение проницаемости стенки сосудов [20, 21]; опосредованное участие в регенерации, воспалении, опухолевый рост и др.	эмбриональный ангио- и васкулогенез и сопряженные с этим процессы – развитие яичников, энхондральный остеогенез и др. [22].	лимфангиогенез	лимфангиогенез в бронхиолах [23, 24].	образование сосудов плаценты.

кровоснабжения и трофики тканей. Наиболее эффективной в этом отношении на сегодняшний день является генная терапия.

Методология генной терапии состоит во внесении в клетку определенных генов, что обеспечивает синтез недостающих или экспрессирующихся белковых продуктов. Существуют две основные группы методов доставки генов (нуклеиновых кислот) в клетки: вирусные и невирусные, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками, основные из которых приведены в таблице (Табл. 2).

Таким образом, наиболее приемлемыми для клинического использования являются невирусные, в частности – плазмидные способы введения фрагментов нуклеиновых кислот. Существенным фактором,

ограничивающим развитие этого направления, является низкая эффективность. Однако, на сегодняшний день разработаны технические подходы для доставки плазмидой ДНК в клетку: электропорация [60], микропорация [59] и др., позволяющие достичь 80–90% клеток. Обсуждаются возможности липосомального введения терапевтического генетического материала, а также генно-клеточной терапии – способа, трансплантации предварительно генномодифицированных *in vitro* клеток.

В экспериментальных работах по «терапевтическому ангиогенезу» применялись как рекомбинантные ангиогенные факторы роста (VEGF165, FGF-1/2 и др.), так и их гены. Использование факторов роста ограничивает их короткий срок эффективного функ-

Краткая характеристика трансфицирующих векторов		
Вектор	Достоинства	Недостатки
Вирусные векторы		
Лентивирусы (сем. Retroviridae, что объединяет их по свойствам с ретровирусными векторами)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Инфицируют клетки во всех фазах клеточного цикла [39];</li> <li>- трансфекция обеспечивает длительную и стабильную экспрессию трансгена [40-42];</li> <li>- псевдотипирование поверхностного гликопротеина позволяет менять вирусный тропизм</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Встраиваются в геном, что влечет за собой высокую вероятность вставочного мутагенеза и активацию протоонкогенов</li> </ul>
Ретровирусы (обычно создаются на основе вируса Moloney murine leukemia – Mo-MLV)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Инфицируют преимущественно делящиеся клетки, что делает ретровирусные векторы удобным инструментом для противоопухолевой терапии <i>in vivo</i> [43];</li> <li>- трансфекция обеспечивает длительную и стабильную экспрессию гена [44]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Неконтролируемое встраивание в геном [45];</li> <li>- некоторые ретровирусы содержат протоонкогены, которые обычно удаляются из вирусного генома при создании вектора, однако существует риск их сохранения в связи с погрешностями технологии [45];</li> <li>- размеры встраиваемого в вектор фрагмента ДНК не могут превышать 7,5 кб, чего недостаточно для большинства генов даже при использовании кДНК [46];</li> <li>- экспрессия трансгенов подавляется про-воспалительными цитокинами, такими как IFN-<math>\alpha</math> и IFN-<math>\gamma</math>, чья продукция активируется в ответ на инфекцию [47];</li> <li>- не инфицирует покоящиеся (неделяющиеся) клетки</li> </ul>
Аденовирус	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Не встраиваются в геном реципиента;</li> <li>- размеры геномов аденовирусов составляют в среднем 35 кб. До 30 из них можно использовать для встраивания интересующего гена [46, 48];</li> <li>- высокая эффективность трансфекции;</li> <li>- инфицируют клетки во всех фазах клеточного цикла</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- При внутривенном введении до 90% вирусных частиц разрушается в печени [49];</li> <li>- высокая иммуногенность приводит к активации CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, уничтожающих инфицированные клетки, а также CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих в ответ на инфекцию IFN-<math>\gamma</math>, что в свою очередь ведет к появлению в организме реципиента антител к вирусу [50];</li> <li>- В организме некоторых людей до проведения терапии могут присутствовать антитела к определенным аденовирусам [51];</li> <li>- токсичны в высоких дозах [52];</li> <li>- немодифицированные аденовирусы не способны инфицировать гладкомышечные, эндотелиальные и многие др. клетки [53];</li> <li>- временная (транзиторная) экспрессия трансгена</li> </ul>
Аденоассоциированные вирусы	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Не являются патогенными сами по себе; инфицируют клетки во всех фазах клеточного цикла [54];</li> <li>- интеграция в геном в строго определенный сайт (19q 13-qter) [54];</li> <li>- длительная стабильная экспрессия гена [55, 56]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Размеры вставки в вектор не могут превышать 4,7 кб [48];</li> <li>- умеренная иммуногенность [55, 56]</li> </ul>
Вирус простого герпеса (HSV-1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- обладает высокой инфекционностью по отношению к нервным клеткам в связи с природным тропизмом данных вирусов;</li> <li>- эпизодная репликация в клетке хозяина;</li> <li>- способны нести значительные генные вставки (до 50 т.п.н.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Нейротропный вирус, что ограничивает область применения [57];</li> <li>- у большинства людей имеются антитела к HSV-1 [57];</li> <li>- иммуногенны</li> </ul>
Невирусные векторы		
Плазмиды	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Размеры терапевтического гена не лимитированы;</li> <li>- плаزمида не интегрируется в геном клетки реципиента [58];</li> <li>- иммуногенность отсутствует</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Низкая эффективность трансфекции в сравнении с вирусными векторами при прямом введении в ткани (около 0,1%) [59];</li> <li>- временная (транзиторная) экспрессия гена</li> </ul>

ционирования в тканях, в то время, как применение генной терапии приводит к относительно длительной экспрессии активных факторов роста *in situ*.

Эффекты генотерапевтических конструкций изучались на различных экспериментальных моделях: ишемии задних конечности у крыс и кроликов, острой и хронической ишемии миокарда у собак и минисвиней [61-68]. На основании этого опыта можно сделать ряд основных выводов.

1. Практически во всех случаях введение генов факторов роста стимулировало развитие новых коллатералей и капилляров, которые со временем не регрессируют.

2. Улучшение перфузии тканей наблюдалось вне зависимости от метода введения терапевтического агента: внутривенного [63], внутримышечного или интраартериального [68].

3. Однократное введение гена ангиогенного фактора в ишемизированную ткань заменяло многократные инъекции рекомбинантных факторов.

4. При использовании генов не отмечалось развития значимых негативных побочных эффектов, в то время как при введении белковых факторов роста в ряде случаев наблюдались системные реакции в виде гипотензии, аллергии.

5. При внутримышечном введении плазмидной ДНК достигается эффективная стимуляция ангиогенеза в ишемизированных конечностях. Важно отметить, что авторы работ проверяли экспрессию в различных органах и показали, что нигде, кроме как в зоне введения, ее практически не наблюдалось, что свидетельствовало об отсутствии системного эффекта данного метода генной терапии.

6. Наиболее эффективным в стимуляции ангиогенеза показал себя фактор VEGF.

Успехи доклинических испытаний, весьма однозначно показавших безопасность и эффективность применения фактора VEGF в генной терапии, позволили довольно быстро перейти к клиническим исследованиям.

#### КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

По данным R. Gupta и соавт. (2009), генотерапевтическое лечение проведено 1000 пациентам, страдающим ишемическими заболеваниями и ни в одном случае не было выявлено опасных побочных эффектов, в частности, развития злокачественных опухолей, чего в немалой степени опасались исследователи [1, 69, 70]. В начале XXI века вирусные и невирусные способы введения генетического материала соотносились как 53 к 47% [70]. С момента первых клинических испытаний (1994) к 2001 г. доля генотерапии среди всех клинических испытаний новых способов лечения сердечно-сосудистых заболеваний возросла

с 3% до 17%, причем генотерапия на основе VEGF составляла более 60%.

Первые клинические испытания генотерапевтических методик проведены в группе пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК) [71]. Несмотря на то, что в исследование были включены очень тяжелые пациенты, их смертность не превышала аналогичный показатель среди больных, подвергнутых иным манипуляциям, в частности, лазерной реваскуляризации [70].

Сосудистые мальформации в виде телеангиэктазий определялись на месте введения в единичных случаях как в эксперименте, так и у больных. 15 лет назад описан единственный достоверный случай их формирования у пациентов с внутриаартериальным введением генконструкции [72]. Что касается иных опухолей, то в обширной сводке 2009 года [1], упомянуто развитие в единичных случаях предшествовавших опухолей у части пациентов, сравнимой с контрольной группой, то есть данный процесс не был связан с введением препарата.

Кроме того, применение современных генных конструкций не вызывает образования антител к VEGF и лишено местного или системного иммуногенного эффекта [73].

Таким образом, сегодня представляется вполне закономерным и правильным анализировать результаты клинического применения генотерапевтических конструкций не столько с позиции обсуждения их безопасности, сколько в отношении их эффективности.

#### ХРОНИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

##### *Использование гена VEGF<sub>165</sub>*

Первая фаза клинического протокола по генной терапии с применением VEGF была начата в 1994 г. группой Джеффри Иснера [74]. В этом исследовании безопасный плазмидный вектор, несущий ген фактора VEGF<sub>165</sub>, был, так же как и в доклинических работах данной группы, помещен в полимерный гидрогель, который покрывал баллон катетера для ангиопластики. В исследование было включено 22 пациента с незаживающими трофическими язвами на ногах. Первым двум пациентам вводилось 100 мкг плазмиды, двум следующим — 300 мкг, остальные 18 пациентов были разделены на 3 группы по 6 человек. В первой группе вводилось 1000 мкг плазмиды, второй — 2000 мкг, и в третьей — 4000 мкг. В 1996 и 1998 гг. исследователи сообщили о первых результатах, оказавшихся весьма обнадеживающими. Уже через месяц после начала терапии у трех пациентов, получивших 1000 мкг плазмиды в полимерном гидрогеле, было обнаружено формирование новых коллатералей в области нижней трети голени и стопы, что в течение года клинически проявилось исчезно-

вением болей в покое [74, 75].

Этой же группой исследователей было инициировано клиническое испытание второй методики, когда плазмида, несущая ген VEGF<sub>165</sub>, вводилась напрямую в ишемизированные мышцы [76]. В исследовании участвовало 9 пациентов с IV степенью ишемии (по Фонтейну), большинству из них была показана ампутация конечности. Каждый пациент получил 4000 мкг плазмиды, растворенной в физиологическом растворе (2 внутримышечные инъекции 3–5 мл суспензии непосредственно в ишемизированные мышцы). В течение 12 нед. после данной терапии с помощью иммуноферментного анализа регистрировалось повышение концентрации фактора VEGF в зоне ишемии. Время наблюдения за больными составило в среднем 6 мес. Результаты оказались весьма обнадеживающими: у 8 пациентов было зафиксировано повышение систолического давления крови в ишемизированной конечности (в среднем с  $53 \pm 4,8$  до  $66 \pm 4,6$  при  $p=0,008$ ), увеличился лодыечно-плечевой индекс с  $0,33 \pm 0,05$  до  $0,43 \pm 0,04$  в течение первых 4 нед. наблюдения, до  $0,45 \pm 0,04$  на 8-ой нед., и достигал  $0,48 \pm 0,03$  на 12-ой неделе наблюдения ( $p=0,17$ ). У всех больных при ангиографии было показано развитие новых коллатералей диаметром 200–800 мкм, при этом в течение всего срока наблюдения коллатерали не подвергались регрессии. У 3-х пациентов полностью исчезли боли в покое, у 4-х произошло полное заживление трофических язв, в том числе у 3-х из них, которым была показана ампутация. Следует отметить стабильность достигнутых эффектов, ведь ранее с помощью ПЦР- и Southern blot-тестов было показано, что экспрессия при подобном методе доставки плазмиды в ткань составляет не более 1 мес [76, 77].

Исследования с геном VEGF<sub>165</sub> в плазмидном векторе инициированы и проводятся в России. Сотрудниками НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева и Института биологии гена РАН был разработан генный препарат «Ангиостимулин» на основе плазмидной конструкции, содержащей ген VEGF<sub>165</sub> человека. Эффективность препарата оценивалась на модели ишемии задних конечностей крыс, а позднее та же группа авторов опубликовала результаты первого российского локального клинического исследования. В ходе 6-месячного наблюдения за пациентами с дистальной формой поражения артерий было установлено положительное действие данной конструкции, что проявлялось положительной динамикой как субъективных признаков болезни, так и клинико-инструментальными показателями [79]. В дальнейшем авторы сосредоточились на изучении эффектов конструкции при ИБС.

В 2008 г. исследователи из ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс

Минздравсоцразвития РФ» (ФГУ РКНПК Росздрава, Москва) получили разрешение на проведение I-II фаз клинических испытаний препарата «Корвиан», представляющего собой суспензию плазмиды, несущей кДНК фактора VEGF<sub>165</sub>, в физиологическом растворе, у пациентов с критической ишемией нижних конечностей (в исследование вошло 20 пациентов). Длительность испытаний, проводившихся на базе отдела ангиологии института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГУ РКНПК Росздрава под руководством академика РАН и РАМН Е.И. Чазова, составляла 8 мес. Однако, в доступной литературе результаты этого исследования отсутствуют.

В 2009 г. ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека» (Москва) получил разрешение Росздравнадзора РФ на проведение клинических исследований препарата «Неоваскулген», являющегося лиофилизатом высокоочищенной сверхскрученной формы плазмиды rCMV-VEGF<sub>165</sub>. В простое открытое рандомизированное многоцентровое исследование было включено 45 пациентов, 10 из которых составили группу сравнения. Исследование проведено в строгом соответствии с национальными правилами этики и достоверности клинических исследований. В работу были включены пациенты с ХИНК (II-III степени по А.В. Покровскому–Фонтейну) с целью определения переносимости и безопасности конструкции (I/IIa фаза). Препарат вводился внутримышечно дважды, в дозе 1,2 мг с интервалом в 7 или 14 сут. В ходе наблюдения оценивались: жалобы, жизненно важные функции, дистанция безболевого ходьбы, общий и биохимический анализы крови, мочи, коагулограмма, результаты ультразвуковой доплерографии сосудов нижних конечностей, лодыечно-плечевой индекс и транскутанное напряжение кислорода (TcPO<sub>2</sub>).

Установлено, что препарат безопасен для пациентов, имеет хорошую переносимость; не оказывает значимого влияния на общеклинические, биохимические показатели, а также параметры гемостаза. В группе испытуемых в сравнении с исходным уровнем статистически значимо увеличивались лодыечно-плечевой индекс (на 18,8–22,9%), уровень TcPO<sub>2</sub> (на 15,4–17,8%), безболезненно проходимое расстояние (на 260,8–290,3%). Ангиографическое исследование, проведенное в отсроченный период, продемонстрировало улучшение кровотока по сосудам и развитие коллатералей. Полученные результаты позволили обосновать проведение следующей фазы клинических испытаний на больших группах пациентов.

Научная группа под руководством профессоров А.В. Гавриленко и Н.П. Бочкова в 2010 году опубликовала результаты комплексного лечения пациентов с ХИНК с использованием генных препаратов на основе вирусных векторов и генов

VEGF и ангиогенина [80]. В проспективное контролируемое исследование было включено 114 пациентов с ПБ-III степенью ишемии конечностей. В ходе исследования у части больных была выявлена транзиторная системная воспалительная реакция, разрешавшаяся через 3-6 суток после введения препарата, а наиболее выраженный терапевтический эффект наблюдался при использовании комбинированной конструкции (VEGF + ангиогенин).

#### **Использование гена VEGF<sub>121</sub> и других генов**

Крупное исследование (105 пациентов) с применением в качестве терапевтического агента гена VEGF<sub>121</sub> было опубликовано в 2003 г. [82]. Было показано, что применение аденовируса, несущего ген VEGF<sub>121</sub>, не приводит к существенному улучшению в состоянии пациентов, при этом описано формирование отеков в области введения препарата.

Были предприняты попытки использования в качестве действующего начала терапевтических конструкций на основе фактора роста фибробластов в аденовирусном [83], и плазмидном векторе [84, 85]. В большинстве случаев их эффективность осталась под сомнением.

Фактор индуцируемый гипоксией-1 $\alpha$  также является перспективным терапевтическим агентом. Первая фаза исследований (n=38) у пациентов с ХИНК, показала безопасность введения аденовирусной конструкции [86]. Дальнейшая фаза исследований еще выполняется, в нем задействовано 289 пациентов и о его результативности можно будет судить позднее (идентификатор NCT001176550).

Ген белка Del-1 был исследован как терапевтический агент в плазмидном векторе у 105 пациентов в ходе IIa фазы клинических испытаний [87]. Сравнение результатов с группой плацебо через 90 сут не выявило существенных различий. Очевидно, использование генов данных факторов не получит дальнейшего развития [1].

### **ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА**

#### **Использование гена VEGF<sub>165</sub> и других генов**

Успех первого клинического исследования, проведенного у больных с критической ишемией нижних конечностей, инициировал начало клинических испытаний генной терапии при ишемической болезни сердца [88]. Предполагалось, что инъекции плазмиды, несущей ген фактора VEGF<sub>165</sub>, непосредственно в ишемизированную сердечную мышцу, обеспечат формирование артериальных коллатералей и новой капиллярной сети, как это наблюдалось среди больных с ишемией нижних конечностей. В первое подобное исследование вошло 16 пациентов, страдающих тяжелой стенокардией атеросклеротического генеза [88]. У всех них были невыполнимы ангиопластика и (или) аортокоронарное шунтирование. Каждый

пациент получил инъекцию 125 мкг плазмидной ДНК, растворенной в физиологическом растворе (4 инъекции по 2 мл непосредственно в ишемизированный миокард через миниторакотомический доступ). Осложнений операции и введения препарата не было отмечено ни в одном случае.

В течение 2 мес наблюдения у всех пациентов было констатировано выраженное улучшение симптоматики. По данным SPECT-исследований перфузии миокарда и результатам ангиографии также было отмечено формирование новых сосудов. Из 11 пациентов, время наблюдения за которыми составило 3 мес, у 6 (55%) полностью исчезли симптомы стенокардии. У других частота приступов стенокардии снизилась с  $50,1 \pm 4,7$  до  $3 \pm 1,9$  в неделю ( $p < 0,0001$ ). Аналогичные результаты были получены в другом клиническом испытании с тем отличием, что пациенты получали от 250 до 500 мкг плазмиды, несущей ген VEGF<sub>165</sub>, в виде инъекций в ишемизированную сердечную мышцу [89]. С помощью SPECT-анализа и электромеханического картирования левого желудочка было показано, что генная терапия способствует статистически достоверному уменьшению зоны ишемии в миокарде с  $6,45 \pm 1,37$  см<sup>2</sup> до  $0,95 \pm 0,41$  см<sup>2</sup> ( $p = 0,001$ ) в течение 2 мес после инъекции плазмиды.

В НИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева препарат «Ангиостимулин» был испытан у больных с ишемической болезнью сердца [90]. Он был введен 28 пациентам во время операций с использованием различных видов реваскуляризации миокарда. «Ангиостимулин» вводился на заключительном этапе операции внутримиокардиально в общей дозе 1000 мкг в зону, где требовалась стимуляция ангиогенеза. Время наблюдения за больными составило примерно 2 года. Во всех случаях было отмечено значимое клиническое улучшение, начиная с 3-го мес. наблюдения: переход стенокардии напряжения в более благоприятный класс по классификации Канадского общества кардиологов и, соответственно, снижение дозы принимаемых нитропрепаратов; возрастание порога толерантности физической нагрузке; повышение качества жизни (по результатам применения опросника SFF36); уменьшение общей площади и выраженности дефектов накопления радиофармпрепарата при нагрузке и в покое (по результатам сцинтиграфии миокарда) через 3 и 6 мес после операции в сравнении с дооперационной картиной [91, 92].

В другом исследовании («Angiogenesis using VEGF-A<sub>165</sub>/bFGF plasmid delivered percutaneously in no-option CAD patients; a controlled trial (VIF-CAD)», NCT00620217), ведущемся в Институте Кардиологии (Institute of Cardiology) в Варшаве под руководством профессора Витольда Ружилло (Witold Ruzyllo), 52 пациентам с ишемической болезнью сердца и сер-

дечной недостаточностью проводятся интрамиокардиальные инъекции суспензии плазмиды, несущей гены двух ангиогенных факторов – VEGF<sub>165</sub> и bFGF. Исследователи рассчитывают на синергичный положительный эффект данных факторов в индукции артерио- и ангиогенеза в ишемизированном миокарде.

#### **Использование гена VEGF<sub>121</sub>**

Позже были проведены I-II фазы клинических испытаний применения при ишемической болезни сердца аденовирусных векторов, несущих ген другой изоформы фактора VEGF – VEGF<sub>121</sub> [82, 93–95]. В одном из этих испытаний время наблюдения за пациентами (n=32), получавшими 4Ч10<sup>10</sup> вирусных частиц в суспензии непосредственно в ишемизированный миокард, составило в среднем 6,5 мес [90]. При этом наблюдалось очевидное клиническое улучшение и восстановление перфузии миокарда. Тем не менее, двое пациентов из группы исследования погибли в ранние сроки (19 сут) после операции миниторакотомии и введения AdVEGF<sub>121</sub>, в то время как в контрольной группе (n=35) погиб только один пациент через 1 год от начала наблюдения в результате инфаркта миокарда. Тяжелые осложнения, связанные с процедурой введения AdVEGF<sub>121</sub>, наблюдались в 4-х случаях, и состояли в резком ухудшении сердечной деятельности (авторы не указывают конкретного характера нарушений).

В другом крупном аналогичном испытании, включившем 105 пациентов и также продлившемся около 6,5 мес, было показано, что применение аденовируса, несущего ген VEGF<sub>121</sub>, не сопровождается улучшением состояния пациентов [82], а, напротив, ведет лишь к выраженным воспалительным реакциям в зоне инъекции суспензии аденовируса. Таким образом, суммируя результаты перечисленных клинических испытаний, следует отметить, что наиболее выраженные и однозначные положительные клинические эффекты наблюдаются при использовании «голой» (плазмидной) ДНК гена VEGF<sub>165</sub>, инъецируемой непосредственно в участок ишемизированной мышцы.

Высказано суждение, что в связи с отсутствием связывания с гепарином VEGF<sub>121</sub> обладает коротким периодом полувыведения, и успевает индуцировать только первый этап ангиогенеза (ослабление адгезии эндотелиоцитов, что и приводит к формированию отека) [1]. Кроме того, VEGF<sub>121</sub> способен связываться с рецепторами нейротрофинов, что может ему придавать особые биологические свойства [19].

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, накопленный в мире опыт клинического применения геннотерапевтических препаратов вообще и на основе VEGF – в частности, достоверно свидетельствует о безопасности использования этого класса лекарственных средств.

При трактовке полученных экспериментальных и клинических результатов следует учитывать конструктивные особенности геннотерапевтического препарата, поскольку, основываясь даже на одном гене, они могут существенно отличаться по результативности применения в связи с особенностями производства.

Несмотря на низкую эффективность трансфекции, плазмидные векторы демонстрируют свою эффективность в клинике и без дополнительных способов оптимизации. Фактическая безопасность плазмидных векторов по сравнению с вирусными способами доставки гена в клетку делает их наиболее предпочтительными в терапии.

Врачам-клиницистам еще предстоит определить место генной терапии в программе лечения пациентов с ишемическими заболеваниями. Остается весьма перспективной возможность эффективной стабилизации «терапевтических» стадий ХИНК с использованием геннотерапевтических препаратов в составе комплексной терапии.

Наиболее демонстративно эффекты генотерапии реализуются у препаратов на основе генов VEGF<sub>165</sub> при «хирургических» стадиях заболевания, причем данное положение можно считать вполне доказанным в больших плацебо-контролируемых исследованиях, однако окончательное место данного направления в терапии КИНК определяют мультицентровые исследования. Практикующие врачи уже сегодня связывают будущий прогресс в лечении инкурабельных пациентов с генной терапией [83]. Так, у значимой доли больных с ХИНК на фоне использования генных препаратов станет выполнимой ранее бесперспективная вследствие неразвитости периферического русла хирургическая реконструкция кровотока, в ряде случаев может быть отсрочено хирургическое лечение или сняты показания к ампутации. Для этих категории больных сочетание хирургического и генноинженерного подхода является весьма многообещающим и перспективным [96].

Эффективность генотерапии ИБС все еще остается под вопросом, поскольку окончательно не определена группа пациентов, у которой введение в лечебную программу этих методов существенно влияло бы на прогноз заболевания [97]. Вполне возможно, что данный эффект может быть достигнут за счет совмещения генотерапии с иными методиками реваскуляризации при анатомической невозможности выполнения сосудистых реконструкций [98].

Таким образом, основными тенденциями в развитии геннотерапевтических способов лечения ишемических заболеваний является использование в клинической практике безопасных плазмидных векторов для доставки гена наиболее эффективного фактора VEGF<sub>165</sub>, а также его сочетаний с другими проангиогенными генами, что оказывается наиболее

лее эффективным в лечении хронической ишемии нижних конечностей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Gupta R., Tongers J., Losordo D.W.** Human Studies of Angiogenic Gene Therapy. *Circ. Res.* 2009; 105: 724–36.
2. **Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A.** et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. (Suppl. S)* 2007; 45: 5–67.
3. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией. М.: 2010; 431.
4. **Michaelson I.C.** The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* 1948; 68: 137–180.
5. **Folkman J.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285(21): 1182–1186.
6. **Folkman J.** Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* 1972; 175(3): 409–416.
7. **Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M.** et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983–985.
8. **Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G.** et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989; 246: 1309–1312.
9. **Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J.** et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246: 1306–1309.
10. **Tischer E., Gospodarowicz D., Mitchell R.** et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 165: 1198–206.
11. **Gospodarowicz D., Abraham J.A., Schilling J.** Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *PNAS USA* 1989; 86: 7311–7315.
12. **Ferrara N., Henzel W.J.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 161: 851–858.
13. **Goto F., Goto K., Weindel K., Folkman J.** Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cell within collagen gels. *Lab. Invest.* 1993; 69: 508–517.
14. **Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., Montesano R.** Potent synergism between vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189: 824–31.
15. **Макаревич П.И., Шевелев А.А., Рыбалкин И.Н.** и др. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста VEGF, HGF и ангиопоэтина-1. *Клет. транспл.* 2010; V(1): 47–52.
16. **Салафутдинов И.И., Шафигулина А.К., Ялвач М.Э.** и др. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVES. *Клет. транспл.* 2010; V(2): 62–67.
17. **Zachary I., Mathur A.** Vascular protection a novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1512.
18. **Maglione D., Guerriero V., Viglietto G.** et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *PNAS USA.* 1991; 88: 9267–9271.
19. **Soker S., Takashima S., Miao H.Q.** et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998; 92(6): 735–745.
20. **Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9: 653–660.
21. **Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581–611.
22. **Zelzer E., Mamluk R., Ferrara N.** et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Devel.* 2004; 131(9): 2161–2171.
23. **Korpelainen E.I., Alitalo K.** Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998; 10: 159–164.
24. **Joukov V., Kaipainen A., Jeltsch M.** et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell. Physiol.* 1997; 173: 211–215.
25. **Terman B.I., Carrion M.E., Kovacs E.** et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991; 6: 1677–1683.
26. **Vaisman N., Gospodarowicz D., Neufeld G.** Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 19461–19466.
27. **Shen H., Clauss M., Ryan J.** et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood.* 1993; 81: 2767–2773.
28. **Matsumoto T., Claesson-Welsh L.** VEGF receptor signal transduction. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment.* 2001; 112: 21.
29. **Pajusola K., Aprelikova O., Korhonen J.** et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer. Res.* 1992; 52: 5738–5743.
30. **Karkkainen M.J., Makinen T., Alitalo K.** Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: E2–E5.
31. **Houck K.A., Ferrara N., Winer J.** et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5: 1806–1814.
32. **Bates D.O., Cui T.G., Doughty J.M.** et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer. Res.* 2001; 62: 4123–4131.
33. **Perrin R.M., Konopatskaya O., Qiu Y.** et al. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia.* 2005; 48: 2422–2427.
34. **Miller-Kasprzak E., Jagodzinski P.P.** 5-Aza-2-deoxycytidine increases the expression of antiangiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed. Pharmacother.* 2008; 62: 158–163.
35. **Jingjing L., Xue Y., Agarwal N., Roque R.S.** Human Mueller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 1999; 40: 752–759.
36. **Mineur P., Colige A.C., Deroanne C.F.** et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J. Cell Biol.* 2008; 179: 1261–1273.
37. **Lange T., Guttmann-Raviv N., Baruch L.** et al. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 17164–17169.
38. **Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M.** et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 26031–26037.
39. **Naldini L., Bloemer U., Gallay P.** et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996; 272: 263–267.

40. **Bloemer U., Naldini L., Kafri T.** et al. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurones with a lentivirus vector. *J. Virology*. 1997; 71: 6641–6649.
41. **Kafri T., Bloemer U., Peterson D.A.** et al. Sustained expression of genes delivered into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genetics*. 1997; 17: 314–317.
42. **Miyoshi H., Takahashi M., Gage F.H., Verma I.M.** Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *PNAS USA* 1997; 94: 10319–10323.
43. **Roth J. A., Cristiano R.J.** Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Nat. Cancer Inst.* 1997; 89: 21–38.
44. **Oldfield E.H., Ram Z.** Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. *Human Gene Therapy*. 1995; 6: 55–85.
45. **Markowitz D., Goff S., Bank A.** A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virology*. 1988; 62: 1120–1124.
46. **Verma I.M., Somia N.** Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*. 1997; 389: 239–242.
47. **Ghazizadeh S., Carroll J.M., Taichman L.B.** Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy. *J. Virology*. 1997; 71: 9163–9169.
48. **Smith A.E.** Viral vectors in gene therapy. *Ann. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 807–838.
49. **Worgall S., Wolff G., Falck-Pedersen E., Crystal R.G.** Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Human Gene Therapy*. 1997; 8: 37–44.
50. **Yang Y., Wilson J.M.** Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I restricted CD4+ CTLs in vivo. *J. Immunol.* 1995; 155: 2564–2569.
51. **Gahry-Sdard H., Molinier-Frenkel V., Le Boulaire C.** et al. Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. *J. Clinical Invest.* 1997; 100: 2218–2226.
52. **Melillo G., Scoccianti M., Kovesdi I.** et al. Gene therapy for collateral vessel development. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 480–489.
53. **Harris J.D., Lemoine N.R.** Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet.* 1996; 12: 400–405.
54. **Kotin R.M., Siniscalco M., Samulski R.J.** et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *PNAS USA*. 1990; 87: 2211–2215.
55. **Maeda Y., Ikeda U., Ogasawara Y.** et al. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 514–521.
56. **Fisher K.J., Jooss K., Alston J.** et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene delivery. *Nature Medicine*. 1997; 3: 306–316.
57. **Koelle D.M., Corey L.** Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Ann. Rev. Med.* 2008; 59: 381–395.
58. **Lim J.Y., Park S.H., Jeong C.H.** et al. Microporation is a valuable transfection method for efficient gene delivery into human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *BMC Biotechnology*. 2010; 10: 38.
59. **Nishikawa M., Huang L.** Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12: 861–870.
60. **Teissie J., Golzio M., Rols M.P.** Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present knowledge. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005; 1724: 270–280.
61. **Helisch A., Ware A.** Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease. *Thrombosis. Haemostasis* 1999; 82: 772–780.
62. **Banai S., Jaklitsch M.T., Shou M.** et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994; 89: 2183–2189.
63. **Bauters C., Asahara T., Zheng L.P.** et al. Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Reendothelialization and Attenuates Intimal Hyperplasia in Balloon-Injured Rat Carotid Artery. *J. Vasc. Surg.* 1995; 21: 314–325.
64. **Unger E.F., Banai S., Shou M.** et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: 1588–1595.
65. **Asahara T., Bauters C., Zheng L.P.** et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995; 92II: 365–371.
66. **Muhlhauser J., Merrill M.J., Pili R.** et al. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ. Res.* 1995; 77: 1077–1086.
67. **Chleboun J.O., Martins R.N., Mitchell C.A.** et al. bFGF enhances the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1992; 185: 510–516.
68. **Takeshita S., Zheng L.P., Brogi E.** et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 662–670.
69. **Kusumato Y.H., Hospers G.A.P., Mulder N.H., Tio R.A.** Therapeutic angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral and coronary artery disease: a review. *Int. J. Cardiovasc. Int.* 2003; 5: 27–34.
70. **Isner J.M., Vale P.R., Symes J.F., Losordo D.W.** Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ. Res.* 2001; 89: 389–400.
71. **Albers M., Fratezi A.C., DeLuccia N.** Assessment of quality of life of patients with severe ischemia as a result of infringuinal arterial occlusive disease. *J. Vasc. Surg.* 1992; 16: 54–59.
72. **Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R.** et al. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF165. *Lancet*. 1996; 348: 370–374.
73. **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: 1114–1123.
74. **Isner J.M., Walsh K., Symes J.** et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995; 91: 2687–2692.
75. **Isner J.M.** Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 30: 185–197.
76. **Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D.** et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*. 1996; 94: 3281–3290.
77. **Takeshita S., Tsurumi Y., Couffinhal T.** et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab. Invest.* 1996; 75: 487–502.
78. **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: 683–691.
79. **Bokeriya L.A., Arakelyan V.S., Eremeeva M.V.** et al. The use angiogenesis stimulators for the treatment of chronic ischemia of lower extremities. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 144(1): 141–146.
80. **Воронов Д.А., Гаериленко А.В., Народицкий Б.С.** и др. Результаты применения генных технологий в комплексном хирургическом и консервативном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. *Кардиол., серд.-сос. хир.* 2010; 3: 47–51.
81. **Makinen K., Manninen H., Hedman M.** et al. Increased

- vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 2002; 6: 127–133.
82. **Rajagopalan S., Mohler E.R. III, Lederman R.J.** et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation.* 2003; 108: 1933–1938.
83. **Matyas L., Schulte K.L., Dormandy J.A.** et al. Arteriogenic gene therapy in patients with unreconstructable critical limb ischemia: a randomized, placebo-controlled clinical trial of adenovirus 5-delivered fibroblast growth factor-4. *Hum. Gene Ther.* 2005; 16(10): 1202–1211.
84. **Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E.** et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NVIFGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008; 16(5): 972–978.
85. **Baumgartner I., Chronos N., Comerota A.** et al. Local gene transfer and expression following intramuscular administration of FGF-1 plasmid DNA in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2009; 17(5): 914–921.
86. **Rajagopalan S., Olin J., Deitcher S.** et al. Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose-escalation experience. *Circulation.* 2007; 115: 1234–1243.
87. **Grossman P.M., Mendelsohn F., Henry T.D.** et al. Results from a phase II multicenter, double-blind placebo-controlled study of Del-1 (VLTS-589) for intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease. *Am. Heart J.* 2007; 153: 874–880.
88. **Losordo D.W., Vale P.R., Isner J.M.** Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am. Heart J.* 1999; 138: S132–141.
89. **Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E.** et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of ph-VEGF165 gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 1999; 102: 965–974.
90. **Бокерия Л.А.** Клеточно-генные технологии при эндоваскулярном и хирургическом лечении заболеваний сердца и сосудов. *Рос. мед. вести* 2004; 3: 75–78.
91. **Eremeeva M., Bockeria L., Golukhova E.** et al. Different methods of revascularization combined with intramyocardial VEGF gene transfer administration in IHD patients. *Int. J. Med. Impl. Dev.* 2003; 1: 100–155.
92. **Eremeeva M., Bockeria L., Golukhova E.** et al. Intramyocardial VEGF gene administration in IHD patients during different methods of surgical revascularisation. *Angiogenesis: Novel basic science insights and human therapy. Keystone symposia abstract book.* 2004; 12.
93. **Stewart D.J., Hilton J.D., Arnold J.M.** et al. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther.* 2006; 13: 1503–1511.
94. **Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R.** et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999; 100: 468–474.
95. **Rasmussen H.S., Rasmussen C.S., Macko J.** VEGF gene therapy for coronary artery disease and peripheral vascular disease. *Cardiovasc. Rad. Med.* 2002; 3: 114–117.
96. **Воронов Д.А.** Использование генных индукторов неоангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: фундаментальные аспекты и клинические результаты. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* 2009; 5: 44–48.
97. **Шевченко Е.К., Талицкий А.К., Парфенова Е.В.** Перспективы повышения эффективности генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически модифицированные клетки. *Клет. транспл.* 2010; V(2): 19–28.
98. **Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация /** Под ред. Л.А. Бокерия, И.И. Беришвили, Ю.И. Бузиашвили, И.Ю. Сигаева. Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. М. 2001: 184.

## SUMMARY

### WORLDWIDE EXPERIENCE AND RECENT TRENDS IN GENE THERAPY OF ISCHAEMIC DISEASES

Deev R.V., Grigoryan A.S., Potapov I.V., Kiselev S.L., Isaev A.A.

Open Joint-Stock Company «Institute for Human Stem Cells», Moscow, Russia

*Fifteen odd years have passed since the first application of a gene-therapeutic modality in clinical practice for treatment of lower-limb chronic ischaemia. Over this time, vast experience has been gained worldwide, with not less than one thousand patients treated by gene-based therapies, thus making it possible to generalise the published findings of these clinical trials. Resulting from such an analysis, it should be recognized that the least dangerous gene therapeutic modalities available so far are plasmid ones, with the most efficient being those containing the*

*gene of vascular endothelial growth factor VEGF<sub>165</sub>. The most convincing results were obtained while treating chronic ischemia of the lower extremities, whereas gene-based therapy used for treatment of coronary artery disease failed to have yielded, as of yet, clear cut positive results.*

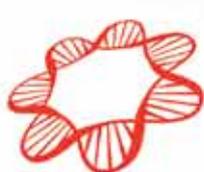
**KEY WORDS:** gene therapy, chronic ischaemia of lower extremities, coronary artery disease, vascular endothelial growth factor (VEGF), plasmid.

#### Адрес для корреспонденции:

Деев Р. В.  
Институт стволовых клеток человека,  
ул. Губкина д. 3, стр. 2,  
19991, Москва, Россия,  
Тел.: 8-965-147-13-64  
E-mail.: romdey@gmail.com

#### Correspondence to:

Deev R. V.  
Institute for Human Stem Cells,  
Ul. Gubkina, 3, bldg. 2 ,  
19991, Moscow, Russia,  
Tel.: 8-965-147-13-64  
E-mail: romdey@gmail.com



# НЕОВАСКУЛГЕН®

НОВЫЕ СОСУДЫ – ДЛЯ НОВЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ

- Первый в Европе препарат для терапевтического ангиогенеза <sup>1,2,3</sup>
- Когда невозможно проведение реконструктивной или эндоваскулярной операции в лечении ишемии нижних конечностей\* в связи с характером и распространенностью поражения <sup>4</sup>
- Когда нужно увеличить расстояние проходимое без боли в 3 раза <sup>5</sup>

\* синдром хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза, включая хроническую критическую ишемию нижних конечностей.

Регистрационное удостоверение: № ЛП-000671.