

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНА VEGF165 В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ 2А–3 СТАДИИ

ДЕЕВ Р.В.¹, БОЗО И.Я.¹, МЖАВАНАДЗЕ Н.Д.², НЕРСЕСЯН Е.Г.³,
ЧУХРАЛЯ О.В.¹, ШВАЛЬБ П.Г.², ЧЕРВЯКОВ Ю.В.³, СТАРОВЕРОВ И.Н.³,
КАЛИНИН Р.Е.², ВОРОНОВ Д.А.⁴, ГАВРИЛЕНКО А.В.⁴, ИСАЕВ А.А.¹

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

² Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

³ Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль, Россия

⁴ Российский научный центр хирургии им. Б.В. Петровского

В статье обобщен опыт лечения 100 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 2а–3 степени по А.В. Покровскому–Фонтейну (75 пациентов вошли в клиническую группу, 25 – в контрольную), которым было невозможно выполнить хирургическую реваскуляризацию. Пациенты клинической группы помимо стандартной сосудистой терапии получали местно внутримышечно препарат Неоваскулген (плазмидная генетическая конструкция, содержащая ген vegf165 человека) в курсовой дозе 2,4 мг. Результаты оценены через 1 год. Показано, что введение генотерапевтического препарата безопасно, не влечет местных и системных аллергических реакций, неопластических процессов. Эффективность лечения оценивалась путем регистрации длины безболевого ходьбы (ДБХ), транскутанно-определяемого напряжения кислорода (T_cPO_2), линейной скорости кровотока, лодыжечно-плечевого индекса, ангиографии, использования опросника SF-36.

Установлено, что через 1 год статистическая значимость межгрупповых и внутригрупповых различий достигнута для ДБХ (прирост 167,2%), T_cPO_2 (прирост 20,4%). Наибольший клинический ответ по ДБХ зафиксирован у пациентов с 3 ст. заболевания (547,5%), а также у больных с многоэтажным поражением сосудов (269,1%). Полученные данные позволяют рассматривать генную терапию препаратом Неоваскулген как эффективный компонент комплексного лечения данной категории пациентов.

Ключевые слова: плазмидная ДНК, ген vegf165, терапевтический ангиогенез, хроническая ишемия нижних конечностей, генная терапия, клиническое исследование.

ВСТУПЛЕНИЕ

По данным ВОЗ главной причиной смертности во всем мире остаются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [1]. Известно, что основным этиологическим фактором большинства болезней сердечно-сосудистой системы является атеросклероз. В большом числе случаев атеросклероз поражает сосуды нижних конечностей, что приводит к развитию хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК), влекущей за собой быструю инвалидизацию и даже смерть при переходе в критическую форму (КИНК) [2].

Хирургическая реконструкция сосудов на сегодняшний день признается основным способом лечения [3], но у ряда пациентов она не может быть проведена в силу анатомических особенностей сосудистого русла, уровня поражения и иных причин. В таких случаях используют консервативные терапевтические подходы, возможности и объемы которых очень не велики. Так, в соответствии с рекомендациями Американской ассоциации кар-

диологов (АСС/АНА, 2006) препаратом 1 класса для лечения перемежающейся хромоты является цилостазол (Плеталь, Экистол), дающий прирост длины безболевого ходьбы (ДБХ) за полгода около 50% [4]. Применение препарата ограничивается тем, что он до сих пор не зарегистрирован в России. Более того, в начале 2013 г. Европейское медицинское агентство выпустило информационное письмо, ограничивающее использование цилостазола в связи с регистрацией большого числа побочных эффектов [5]. Препараты группы простагландинов, используемые для лечения КИНК, имеют ограниченный период эффективности и самостоятельно не решают проблему остановки дальнейшего прогрессирования заболевания. Таким образом, существующий дефицит терапевтических возможностей обуславливает поиск новых способов фармакологической коррекции ХИНК.

Одним из современных направлений в лечении пациентов, имеющих сосудистую патологию, является выбор генотерапевтических препаратов [6, 7],

в которых в качестве активных веществ используются гены, кодирующие различные факторы роста или транскрипционные факторы: VEGF165 [8–10], bFGF [11, 12] HIF, HGF [13, 14] и др. Механизм действия генных препаратов связан с тем, что после поступления внутрь клетки, такие молекулы транзиторно продуцируют тот или иной фактор, тем самым обеспечивая дополнительный локальный уровень ростового фактора в непосредственной близости от целевых сосудов, что, в свою очередь, индуцирует локальный неангиогенез. Не исключено, что при этом могут наблюдаться еще и опосредованные эффекты: антиапоптотический, репаративный и др.

В мире проведено несколько десятков клинических исследований II–III фаз, что позволило накопить как отрицательный [15], так и положительный опыт применения препаратов-кандидатов данной группы [16]. Задачей настоящего исследования являлось проведение клинического испытания препарата Неоваскулген, активным компонентом которого является последовательность гена сосудистого эндотелиального фактора роста человека (vegfl65), входящая в состав векторной плазмидной ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено клиническое исследование применения препарата с геном vegfl65 человека в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 2а–3 стадии.

Основания, дающие право на проведение клинических исследований. Доклиническое исследование общей токсичности (острая, подострая, хроническая; местно-раздражающее действие), специфической токсичности (аллергенность, воздействие на репродуктивную и иммунную системы, мутагенное и канцерогенное действие), а также выявление специфической активности выполнены в ФГУ «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург (2008 г.).

2б–3 фаза клинического исследования «Исследование краткосрочной безопасности, переносимости и эффективности препарата Неоваскулген в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (2–3 степени (2а–3 степени) по А.В. Покровскому–Фонтейну)» была проведена на основании разрешения от 21 апреля 2010 г. № 177, выданного Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Министерства здравоохранения и социального развития РФ. Исследование проведено с соблюдением этических принципов, заложенных в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» (1964, 2000 г.) и

отраженных в ОСТ 42-511-99 «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации», в правилах ICH GCP и действующих нормативных требованиях. Протокол клинического исследования одобрен Национальным комитетом по этике (протокол № 62 от 7 апреля 2013 г.). Материалы клинического исследования одобрены локальными этическими комитетами до начала исследования.

Характеристика препарата и метод введения. Действующее вещество исследуемого препарата – высокоочищенная сверхскрученная форма плазмидной ДНК, содержащая последовательность гена vegfl65. Кроме этого рекомбинантная плазида содержит регуляторный участок, который определяет транскрипцию гена vegfl65, сигнал сплайсинга, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции SV40, а также ряд вспомогательных областей, необходимых для эффективного биосинтеза плазмидной ДНК в клетках штамма-продуцента E. coli.

Исследуемый препарат производится в виде стерильного лиофилизата (1,2 мг во флаконе), который растворяется водой для инъекций в объеме 2 мл и показан только для местного введения – множественные инъекции (4–5) в мышцы на уровне нижней и средней трети голени.

Характеристика пациентов. В исследование включены пациенты, у которых выполнение хирургической реконструкции сосудистого русла было невозможным: наличие протяженной окклюзии бедренной артерии с переходом на дистальное русло; поражение сосудов дистальных сегментов с плохим прогнозом; выполненные ранее реконструктивные вмешательства на артериях нижних конечностей, но не приведшие к устранению хронической ишемии при невозможности повторной операции; декомпенсация соматической патологии, которая могла бы препятствовать выполнению хирургического вмешательства.

Критерии включения пациентов:

- возраст более 40 лет;
- симптомы перемежающейся хромоты атеросклеротического генеза продолжительностью не менее 6 мес.;
- 2а–3 стадия заболевания по классификации Фонтейна в модификации А.В. Покровского;
- отсутствие гемодинамически значимых стенозов (>60%) аорто-подвздошно-бедренного артериального сегмента или (при их наличии)
- удовлетворительно функционирующий проксимальный шунт (протез) при условии, что реваскуляризирующая операция выполнена не ранее, чем за 3 мес. до момента включения в исследование;
- при наличии гемодинамически значимых поражений артерий бедренно-подколенного сег-

мента — удовлетворительная проходимость глубокой артерии бедра;

- наличие гемодинамически значимых поражений передней и (или) задней тиббиальных артерий диффузного характера;
- добровольное подписание пациентом информированного согласия.

Критерии невключения пациентов:

- манифестация заболевания сосудов до 40 лет;
- хроническая ишемия нижних конечностей неатеросклеротического генеза (артериит, системные заболевания, болезнь Бюргера, врожденные аномалии и травмы сосудов и т.д.);
- КИНК с язвенно-некротическим повреждением тканей конечностей;
- недавняя (менее 3 мес.) операция на артериях нижних конечностей или недавний (менее 3 мес.) тромбоз глубоких вен нижних конечностей;
- недавние (менее 6 мес.) случаи острого инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии, аортокоронарного шунтирования или стентирования коронарных артерий, инсульта или транзиторных ишемических атак;
- планируемая обширная хирургическая операция в ближайшие 6 мес.;
- тяжелое сопутствующее заболевание с ожидаемой продолжительностью жизни менее года;
- декомпенсация патологии сердечно-сосудистой системы, функции почек, печени, декомпенсированный сахарный диабет;
- инфекционные заболевания, септические состояния, ВИЧ-инфекция;
- наличие онкологического анамнеза или подозрения на злокачественное новообразование;
- наличие клинически значимых изменений лабораторных показателей крови и мочи, свидетельствующих о недиагностированном заболевании и требующих дополнительного обследования;
- декомпенсированный сахарный диабет; беременность, лактация;
- наличие алкогольной или наркотической зависимости.

Общая характеристика включенных пациентов представлена в табл. 1.

Участники клинической группы в программе комплексного лечения двукратно получали внутримышечные инъекции Неоваскулгена в дозе 1,2 мг с интервалом в 14 сут. (общая доза 2,4 мг). 25 человек контрольной группы получали стандартную терапию (коллоидные растворы, препараты, улучшающие реологические свойства крови, дезагреганты, сти-

Показатель	Контрольная группа	Клиническая группа (получавшие Неоваскулген)	Всего
Пациенты, включенные в исследование	25	75	100
Пациенты, выполнившие программу клинического исследования (0,5 года)	25	73	98
Причины выбывания:			
- потеряны контакт или иное	0	0	0
- смерть	0	2	2
Пациенты, прошедшие наблюдение через 1,0 год	13	39	52
Причины выбывания:			
- потеряны контакт или иное	11	33	44
- смерть	1	1	2

муляторы регенерации и витамины — в рекомендованных дозах). В ходе исследования и за 0,5 года до него пациенты не получали препараты группы простагландинов.

Дизайн исследования и контрольные временные точки. Данное исследование было спланировано и проведено как открытое проспективное рандомизированное и контролируемое. Выбранный дизайн обусловлен тем, что генотерапевтические препараты являются новой категорией лекарственных средств с недостаточно изученной фармакодинамикой и фармакокинетикой, что требовало как осознанного согласия включаемых пациентов, так и не предполагало «ослепления» медицинского персонала. Кроме того, включение в исследование пациентов с пограничными формами ХИНК (3 ст. по А.В. Покровскому—Фонтейну), для одного из первых исследований такого рода в России предполагает, что любое сокрытие информации от пациентов, чья будущая инвалидность может зависеть от хода исследования, была бы не этичной.

Исследование проведено на базе трех исследовательских центров: Российского научного центра хирургии им. Б.В. Петровского (Москва), Рязанского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Ярославской областной клинической больницы (силами профессорско-преподавательского состава Ярославской государственной медицинской академии).

Согласно определенным в протоколе контрольным временным точкам, пациенты выполняли визиты для проведения обследования на 14, 90, 180 сут. После выполнения всех визитов и предусмотренных исследований оценивались результаты безопасности и эффективности, проводилась статистическая обработка данных, формировался итоговый отчет. По окончании исследования, согласно протоколу, наблюдение за пациентами было продолжено еще на 180 сут., с контрольным обследованием через 1

год после включения в исследование. Для этого пациентам разъяснялись цели последующих визитов исследования, был сформирован новый протокол отсроченного клинического исследования, каждый пациент повторно подписывал добровольное информированное согласие.

Критерии безопасности. Оценка безопасности осуществлялась в течение 6 мес. (14 сут. пациент наблюдался в стационаре, далее – амбулаторно) путем регистрации нежелательных и серьезных нежелательных явлений, как в ходе контрольных визитов, так и в случаях внепланового обращения за медицинской помощью. Кроме стандартного перечня нежелательных и серьезных нежелательных явлений для обеспечения онкологической безопасности пациенты, давшие согласие на последующее наблюдение, еще в течение 6 мес. проходили полное обследование, включая исследование органов грудной клетки и живота с помощью инструментальных методов. Также на всех визитах был осуществлен стандартный план обследования, который включал исследование витальных функций, регистрацию ЭКГ, клинический и биохимический анализы крови, исследование свертывающей системы крови, анализ мочи.

Критерии эффективности. Подразделялись на первичные и вторичные.

Первичным (основным) критерием эффективности был принят показатель «дистанция безболевого ходьбы» (ДБХ). Данный показатель, в соответствии с классификацией ACC/ANA Guidelines for the Management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric and abdominal aortic): executive summary, относится к 1 классу доказательности [4], не требует сложного оборудования и является стандартным для пациентов с заболеванием периферических артерий. Для определения ДБХ проводили тредмил-тест на беговой дорожке при угле подъема 0° и скорости 1 км/ч. Замеряли время от начала ходьбы и до наступления болевых ощущений в мышцах конечностей. Результаты этого исследования ложились в основу внутригруппового распределения пациентов по степени тяжести на основе классификации перемежающейся хромоты по Фонтейну в модификации А.В. Покровского: 2а ст. – до возникновения болей при ходьбе пациента на расстояние более 200 м; 2б ст. – менее 200 м, но более 50 м; 3 ст. – прохождение менее 50 м или предъявление жалоб на боли в покое, не сопровождающиеся язвенно-некротическими изменениями тканей [3].

Вторичные критерии эффективности: определение тканевого напряжения кислорода (T_cPO_2) пораженной конечности, лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), линейной скорости кровотока (ЛСК), проведение ангиографии, оценка качества жизни.

Определение T_cPO_2 пораженной конечности дает косвенное представление о кровоснабжении (микродинамике) тканей и относится к 2а классу доказательности [4]. Измерение показателя проводилось на всех визитах в коже тыльной поверхности стопы на приборе ТСМ-2 «Радиометр» (Дания). Измерению предшествовала калибровка датчика. Для каждого больного использовался индивидуальный датчик. Измерения проводились прибором автоматически (включая определение температуры) в положении пациента сидя в течение 5 мин.

ЛПИ определялся у пациентов без окклюзии задней большеберцовой артерии на каждом визите по стандартной методике. Несмотря на то, что показатель относится к 1 классу доказательности [4], он характеризует состояние магистрального кровотока (макродинамики) и его диагностическая значимость у неоперабельных пациентов ограничена.

ЛСК оценивалась при дуплексном ультразвуковом сканировании задней большеберцовой артерии.

У 30% пациентов, включенных в исследование, были проведены рентгенконтрастные ангиографии нижних конечностей до введения препарата, через 0,5 и 1,0 год. Ангиограммы как первичные, так и повторные, выполнялись на одном ангиографе, одним и тем же специалистом с такой же временной задержкой снимков. Ангиограммы оценивали субъективно, сравнивая с исходной картиной. В случаях, когда количество сосудов при простом подсчете превышало изначальное на 30–50%, говорили об умеренном улучшении, при увеличении более чем на 50% – о хорошем.

Все пациенты, принимавшие участие в исследовании, заполняли неспецифический опросник оценки качества жизни SF-36 (“SF-36 Health Status Survey”). Все 36 пунктов опросника сгруппированы в восемь шкал: физическое функционирование, ролевая деятельность, телесная боль, общее здоровье, жизнеспособность, социальное функционирование, эмоциональное состояние и психическое здоровье. Все шкалы формируют два показателя: психологическое и физическое благополучие. Заполнение опросника и трактовка полученных результатов осуществлялась согласно инструкции.

Методы статистического анализа. Проводили оценку статистической значимости следующих показателей:

- изменений абсолютного значения основных и косвенных признаков ишемии отдельно в клинической и отдельно в контрольной группах;
- различий абсолютных значений основных и косвенных признаков ишемии между группами в каждый из анализируемых визитов;
- различий в приросте (в период между 1 и 4 визитами) абсолютного значения основных и косвенных признаков ишемии между группами.

Сравнивали частоты положительных исходов лечения между двумя группами. При этом любое увеличение проходимой дистанции расценивалось как «успех», отсутствие прироста показателей ДБХ или его снижение расценивались как «неуспех». Распределение совокупностей абсолютных значений каждого из изучаемых признаков (ДБХ, T_cPO_2 , ЛПИ, ЛСК) отличалось от нормального распределения, поэтому для проверки гипотез использовались непараметрические тесты (табл. 2)

В оценку динамики по тредмил-тесту не попали 6 пациентов (5 – из клинической группы и 1 – из контрольной), которым была проведена ампутация одной из нижних конечностей до включения в исследование и оценка эффективности для них осуществлялась на основании анализа вторичных критериев. В анализируемую популяцию вошли 94 пациента (70 – из клинической группы и 24 – из контрольной). В зависимости от технического оснащения исследовательского центра, а также срока, прошедшего с завершения исследования, размер РР был вариабелен, что всегда учитывалось при статистической обработке данных.

Определение T_cPO_2 выполнялось только в двух исследовательских центрах (клиническая группа – 65, контрольная – 20). В остальных случаях оценка показателей соответствовала распределению пациентов при рандомизации, за исключением выбывших пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика исходного состояния включенных в исследование пациентов. При сопоставлении исходных характеристик пациентов (табл. 3) не было установлено статистически значимых различий в зависимости от гендерного состава, а также показателей первичных и вторичных критериев. По основному критерию – ДБХ – пациенты также были сопоставимы. При более детальном анализе выявлено, что группа контроля и клиническая группа сопоставимы по степени тяжести и по уровням окклюзии. Однако при рандомизации в группу контроля не вошли пациенты с терапевтической стадией болезни (2а), а с хирургической (3) было всего 3 пациента, в результате чего межгрупповые сравнения по степени тяжести проводились только для пациентов со стадией 2б.

Оценка безопасности. Самочувствие пациентов клинической группы ни во время введения препарата, ни в последующем не менялось. Местных патологических реакций, включая аллергические, анафилактические и неопластические после введения препарата не отмечено, как в течение 0,5 года наблюдений, предусмотренных протоколом, так и в течение целого года наблюдения. Биохимический

Таблица 2

Характеристика методов статистического анализа, использованных в исследовании	
Гипотеза	Статистический метод
Оценка достоверности изменений абсолютного значения показателя ДБХ, ТКНК, ЛПИ и ЛСК в каждой группе	Метод сравнения парных случаев Вилкоксона (Wilcoxon) и тест Sign
Оценка достоверности различий центральных тенденций между группами Оценка достоверности различий абсолютных значений основных и косвенных признаков ишемии (ДБХ, T_cPO_2 , ЛПИ) между группами в каждый из анализируемых визитов (0/1, 3 и 4). Оценка достоверности различий в приросте (в период между 1 и 4 визитами) абсолютного значения основных и косвенных признаков ишемии (ДБХ, T_cPO_2 , ЛПИ, ЛСК) между группами.	Метод сравнения непарных случаев Манна–Уитни
Сравнение частоты положительных исходов лечения между двумя группами.	Точный тест Фишера

Таблица 3

Характеристика исходного состояния пациентов			
Показатель	Контрольная группа	Клиническая группа (Неоваскулген)	p
Число пациентов, n (%)	25 (100,0)	75 (100,0)	
мужчин	20 (80,0)	50 (66,65)	1,000
женщин	5 (20,0)	25 (33,35)	1,000
Степень тяжести ХИНК, n (%)			
2а	–	9 (12)	
2б	22 (88)	57 (76)	
3	3 (12)	9 (12)	
Уровень окклюзии, n (%)			
проксимальный	12 (48)	38 (50,7)	
дистальный	5 (20)	16 (21,3)	
многоэтажное поражение	8 (32)	21 (28)	
ДБХ, м	114,3±11,4	135,3±12,2	0,558
T_cPO_2 , мм рт. ст.	76,5±1,9	75,9±1,3	0,921
ЛПИ	0,46±0,06	0,51±0,02	0,248
ЛСК, см/с	17,6±2,1	14,2±1,6	0,547

анализ крови и коагулограмма показали, что у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей вне зависимости от получения препарата сохранялся повышенный базовый уровень креатинина и фибрин-мономера. Также отмечено, что включение данного препарата в комплексное лечение не приводит к изменению концентрации глюкозы в крови. Особенно важно, что этот факт установлен и для пациентов с компенсированным сахарным диабетом (6 – в клинической группе, 3 – в группе контроля).

В течение первых 6 мес. у двух пациентов развились состояния, не позволяющие им продолжить исследование: острое нарушение мозгового кровообращения (группа контроля) с благополучным исходом и острый инфаркт миокарда с летальным исходом (клиническая группа). При внимательном изучении последнего случая, причинно-следст-

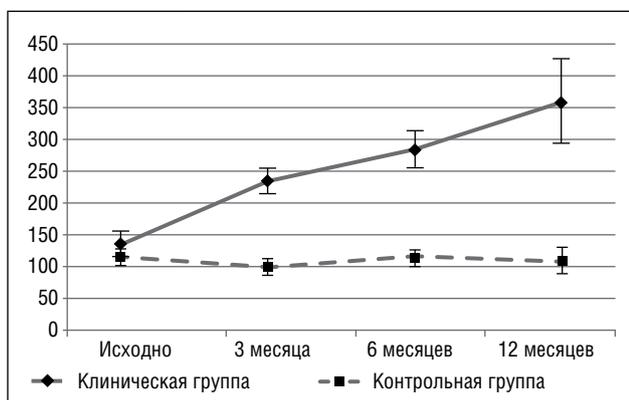


Рис. 1. Изменение ДБХ в ходе клинического исследования и дальнейшего наблюдения. Здесь и на рис. 2–4: * Различия между показателями клинической и контрольной групп статистически значимы ($p < 0,05$).

венная связь с применением генного препарата не выявлена.

Развитие опухолей, нарушение зрения и иные патологические состояния, которые косвенно могли бы свидетельствовать об осложнениях ангиогенной терапии, не были обнаружены у пациентов на всех сроках обследования в ходе наблюдений до 1 года.

Оценка эффективности. Первичный критерий. Увеличение ДБХ впервые было отмечено самими пациентами клинической группы, в некоторых случаях уже через 2 нед., но более заметным оно становилось в период 45–60 сут. Объективно, через 3 мес. ДБХ в клинической группе составила $236,5 \pm 19,3$ м, а через 6 мес. – $284,7 \pm 29,8$ (табл. 4), то есть статистически значимыми различия с исходным состоянием в клинической группе и в сравнении с группой контроля стали заметны с 90 сут. Рост показателя в клинической группе наблюдался в течение первых 0,5 года и продолжал увеличиваться в ходе отсроченного наблюдения (рис. 1). Прирост среднего значения пути, который пациент мог пройти без боли, в исследуемой группе к полугоду составил 149,4 м (110,4%), в то время как в контрольной группе наблюдалось снижение показателя на 1,5 м от исходного значения. Через год наблюдений тенденция сохранилась, а прирост увеличился на 167,2%, что составило 226,3 м, в то время как в группе контроля существенных изменений не произошло.

В зависимости от степени тяжести наибольший прирост ДБХ был установлен у пациентов с самой тяжелой ишемией из включенных в исследование – с 3 ст. (табл. 4): прирост 96,4 м, что составило 231,2%, а через 1 год – прирост на 228,3 м (547,5%). У пациентов самой многочисленной группы – с 2б ст. – показатель ДБХ увеличился на 129,4 м (108,3%); изменения оказались стойкими и через 1 год были идентифицированы те же величины. В группе с 2а ст. прирост составил 290 м (90,6%) через полгода, а спустя год – 660 м (206,3%).

В зависимости от уровня окклюзии наибольшие результаты наблюдались через полгода у пациентов с многоэтажным поражением сосудов нижних конечностей, средняя величина прироста у таких больных достигла 246,6 м (158,3%), а через год прирост – 419,2 м (269,1%). В группе контроля результаты были существенно ниже: прирост за полгода – 34 м (33,5%), а через год был отмечен существенный регресс ДБХ в среднем на 56 м (–58,3%).

У пациентов с преимущественно дистальным поражением сосудов в клинической группе были констатированы положительные сдвиги ДБХ: через полгода – увеличение на 179,7 м (132,4%), а через год – на 230,3 м (169,7%).

Вторичные критерии. Оценивались показатели микрогемодинамики (T_cPO_2 , ЛПИ, ЛСК), результаты ангиографического исследования, качество жизни.

В клинической группе отмечалась непрерывная тенденция к увеличению среднего значения T_cPO_2 с $75,9 \pm 1,3$ мм рт. ст. при первом визите до $85,7 \pm 1,4$ мм рт. ст. через 180 сут. (прирост около 13%). В следующие полгода данная величина так же увеличивалась и достигала среднего значения $91,4 \pm 0,7$ – прирост 20,4%. В контрольной группе отмечалась противо-

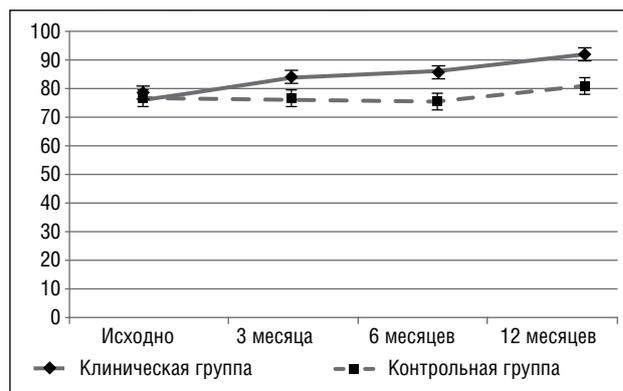


Рис. 2. Изменение T_cPO_2 в ходе клинического исследования и дальнейшего наблюдения.

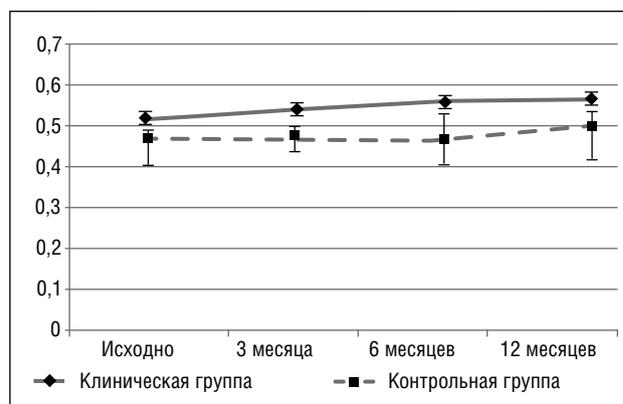


Рис. 3. Изменение ЛПИ в ходе клинического исследования и дальнейшего наблюдения.

положительная динамика: снижение среднего значения показателя с $76,5 \pm 1,9$ мм рт. ст. до $74,7 \pm 2,2$ мм рт. ст. за полгода и некоторый подъем далее к году до $80,7 \pm 4,5$ мм рт. ст. (рис. 2). Отмеченные различия между значениями признаков в клинической группе были статистически значимы, а в контрольной группе недостоверны, т.е. данный показатель у последних не претерпел существенных изменений в ходе стандартного лечения.

Различия в абсолютных значениях ЛПИ и его приросте между клинической и контрольной группами в течение всего периода исследования не имели статистической значимости. Так, через полгода после начала исследования прирост значения ЛПИ в клинической группе составил всего 0,05, а в группе контроля показатель не изменился (табл. 4). При отсроченном клиническом наблюдении (1 год) установлено, что у пациентов клинической группы достигнутые улучшения оставались стабильными (рис. 3).

ЛСК имела тенденцию к росту только в клинической группе, среднее значение возросло на 8,4 см/с за полгода (прирост 59,2%). К году этот показатель снизился, но все же превышал исходное значение на 5,5 см/с. В контрольной группе пациентов, получавших только стандартное терапевтическое лечение, уровень ЛСК не изменился и даже имел тенденцию к снижению (рис. 4).

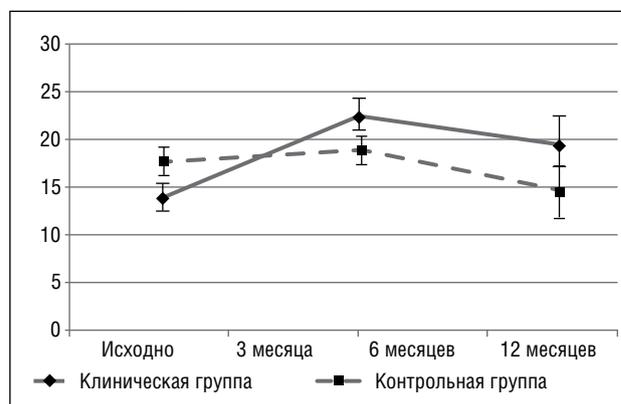


Рис. 4. Изменение ЛСК в ходе клинического исследования и дальнейшего наблюдения.

При оценке результатов исследования установлено, что у подавляющего большинства пациентов (75% из прошедших ангиографию) отмечена убедительная положительная динамика в виде образования на голени коллатеральной сосудистой сети. Не отмечены подобные результаты у 12,5% пациентов. Еще в 12,5% наблюдениях зафиксирована незначительная положительная динамика в виде усиления контрастирования микроциркуляторного русла за счет увеличения диаметров сосудов. Значительное увеличение сформированных коллатералей зарегистрировано у 37,5%, и их умеренное увеличение, еще у 37,5% больных. В этих наблюдениях обнаружен ма-

Результаты измерений первичных и вторичных критериев эффективности

Таблица 4

Показатель	M±m в группе и статистическая значимость различий показателей разных сроков								Статистическая значимость различий (p) между группами	
	Клиническая				Контрольная					
	исходно	3 мес.	6 мес.	12 мес.	исходно	3 мес.	6 мес.	12 мес.		
ДБХ, м (70/24)	135,3±12,2	236,5±19,3 p=0,001	284,7±29,8 p=0,001	361,7±65,8 p=0,001	114,3±11,4	98,4±10,1 p=0,227	112,8±12,8 p=0,576	109,4±21,6 p=0,674	0,001	0,004
Степень тяжести ХИНК										
2a	320,0±45,9	536,2±112,1 p=0,007	610,0±129,4 p=0,008	980,0±285,4 p=0,08						
2b	119,5±7,9	221,1±19,1 p=0,004	248,9±23,6 p=0,001	249,3±22,1 p=0,014	114,3±11,4	106,7±10,5 p=0,227	112,8±12,8 p=0,576	109,4±21,6 p=0,674	0,001	0,028
3	41,7±2,9	108,8±46,1 p=0,025	138,1±19,8 p=0,018	270,0±36,2 p=0,018	40,7±2,3	46,0±4,0*	36,7±6,*	-	*	*
Уровень окклюзии проксимальный	122,7±11,1	160,3±15,9 p=0,017	210,5±24,1 p=0,001	216,8±38,6 *	125,8±19,5	99,8±15,2	122,7±22,1 p=0,7	125,8±25,7 p=0,9	0,1	0,3
дистальный	135,7±22,3	311,2±40,6 p=0,008	315,4±54,8 p=0,001	366,0±77,1 p=0,011	75,7±37,2 *	88,6±19,4	76,7±37,2 *	118,0±45,3 *	0,047	0,1
Многоэтажное поражение	155,8±38,0 7	344,4±75,5 p=0,012	402,4±89,2 p=0,001	575,0±193, p=0,021	96,0±16,3	90,0±19,5	130,0±23,95 p=0,043	40,0±20, p=0,900	0,07	0,121
ТСР02, мм рт. ст. (65/20)	75,9±1,3	83,5±1,2 p=0,001	85,7±1,4 p=0,001	91,4±0,7 p=0,001	76,5±1,9	76,0±1,9	74,7±2,2	80,7±4,5	0,001	0,003
ЛПИ (73/25)	0,51±0,02	0,54±0,02 p=0,001	0,56±0,027 p=0,001	0,56±0,03 p=0,001	0,46±0,06	0,46±0,03	0,46±0,6 p=0,5	0,49±0,08 p=0,109	0,264	0,239
ЛСК, см/с (65/20)	14,2±1,6	**	22,6±2,0 p=0,001	19,8±2,5 p=0,001	17,6±2,1	**	18,9±2,1 p=0,161	14,8±3,2 p=0,715	0,549	0,485

* Объем выборки недостаточен для расчета статистической значимости различий.
** Исследование не выполнялось.

кротоскопически определяемый неоангиогенез за счет новых коллатералей, и возможно, за счет раскрытия ранее не функционировавших сосудов.

Оценка качества жизни выполнялась исходно и через 0,5 года от начала исследования посредством опросника SF-36. Рассмотрим изменение показателей, которые оценивались. Физическое функционирование — клиническое улучшение состояния кровообращения в нижних конечностях оказало существенное влияние на качество жизни пациентов группы, получавшей препарат (+11,0), в динамике наблюдалось значительное улучшение данного параметра ($p=0,003$), по сравнению с пациентами контрольной группы (+4). Рольное функционирование, обусловленное физическим состоянием — у пациентов клинической группы отмечалось существенное улучшение показателя (+16), в то время как у пациентов контрольной группы наблюдался регресс показателя (–2,5). Интенсивность боли и ее влияние на способность заниматься повседневной деятельностью на фоне лечения в обеих группах остались на низком уровне, что вполне оправдано, с учетом того, что шкала оценивает интенсивность ощущений, но не частоту развития болевых приступов. Общее состояние здоровья — на начальном этапе пациенты оценивали свое состояние ниже среднестатистического уровня, на выходе из исследования показатель возрос, причем в сравнении с контрольной группой изменения оказались статистически значимыми. Жизненная активность, т.е. ощущение себя полным сил и энергии или, напротив, обессиленным, повысилась к концу исследования в обеих группах, однако различия в приросте показателя оказались незначительными. Социальное функционирование — прирост наблюдался в обеих группах пациентов, однако межгрупповые различия были статистически незначимыми. Рольное функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием, — в клинической группе наблюдался существенный достоверный прирост данного показателя (+17,3), что объясняется значительным повышением эмоционального настроения пациентов на фоне улучшения физического состояния, различия в сравнении с группой контроля весьма выражены. Психическое здоровье — в результате терапии в обеих группах, наблюдалась тенденция к улучшению психологического состояния, однако различия были

статистически не достоверны.

При дальнейшем анализе вышеперечисленные шкалы были сгруппированы в два показателя — «физический компонент здоровья» и «психический компонент здоровья». Зарегистрирован статистически достоверный прирост показателя «физический компонент здоровья» у пациентов клинической группы, что объясняется значительным улучшением физического состояния пациентов. На фоне улучшения физического состояния, наблюдалось некоторое улучшение и эмоционального настроения пациентов, о чем говорила тенденция к росту показателя «психологический компонент здоровья» (табл. 5). Однако, разница в приросте показателя в клинической и контрольной группах в последнем случае не значима.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия генной терапии с использованием генов, кодирующих ангиогенные факторы роста для паракринной регуляции роста сосудов — терапевтического ангиогенеза — начала развиваться с пионерских работ Джеффри Иснера [8, 17, 18]. Клинические исследования начались с тестирования нескольких терапевтических генов — vegf165, fgf, hgf и др. [6]. Для обеспечения попадания целевых генов в клетки тканей пациента эти гены были заключены в различные векторные молекулы: вирусные [6, 10] и невирусные — прежде всего, плазмиды [6, 8, 9, 19]. В большом количестве клинических исследований была показана безопасность обоих типов векторных молекул при местном введении различных доз генных препаратов, как в аспекте системных аллергических реакций, так и в части отсутствия неопластических процессов — пролиферативной ретинопатии, сосудистых опухолей, индукции роста дормантных опухолей и др. [6, 19]. Однако данные, получаемые при оценке эффективности, более разнообразны. В ряде случаев исследования были признаны неудачными, в частности из-за выбора слишком жестких критериев эффективности, например, количество ампутаций или кривой выживаемости [20], и в связи с гетерогенностью включенных в исследование пациентов — атеросклероз, болезнь Бюргера, диабетическая стопа. На эффективность, безусловно, влияет и выбор терапевтического гена, в ряде случаев не оптимального по степени важности и объему рецепторного поля для ангиогенеза.

В настоящее исследование были включены пациенты, которым было невозможно выполнить хирургическую реваскуляризацию, в связи с чем их прогноз являлся неудовлетворительным. Не включение в исследование больных с язвенно-некротическими формами заболевания (4 ст. по А.В. Покровскому–Фонтейну) позволяет детектировать эффект у

Показатели качества жизни у пациентов клинической и контрольной групп Таблица 5

Компонент здоровья	Группа	0,5 года	Прирост	p
Физический	клиническая	38,48	2,49	0,001
	контрольная	36,43	–0,34	
Психологический	клиническая	39,93	4,84	0,241
	контрольная	46,86	2,39	

пациентов с жизнеспособными тканями конечности, что очень важно для дальнейшего развития терапевтического эффекта от применения генного препарата. В большинстве опубликованных исследований в экспериментальную группу включались пациенты с язвами и гангренами, т.е. у этой категории пациентов была значительно снижена масса здоровой ткани в местах введения препаратов-кандидатов. Это негативным образом влияло на получаемые результаты [15, 21, 22]. Такой подход ограничивает возможности дальнейших исследований и определению таргетных показателей к применению генных препаратов у пациентов с ХИНК. Немаловажно, что в исследование включены пациенты с 3 ст., которые предъявляли жалобы на боли в покое, следовательно, относились к группе с КИНК, но при этом обладали некоторым резервом компенсаторных возможностей кровотока, которые не позволяли развиваться язвам и гангренам.

В настоящем исследовании как в ходе основного протокола (0,5 года), так и в ходе последующего наблюдения во всех трех лечебных центрах не наблюдалось нежелательных и серьезных нежелательных явлений, а также данных о каких-либо осложнениях и побочных эффектах. Это подтверждает, что Неваскулген в выбранной дозе и режиме введения безопасен как во время применения, так и, по крайней мере, в течение не менее года, что согласуется с данными по другим препаратам на основе гена vegf165 [6, 19, 21].

Оценка эффективности представляется более сложной. К сожалению, затруднено сравнение с данными других синонимичных исследований, так как в большинстве случаев ранее в исследования включались пациенты с критической ишемией нижних конечностей, у которых боли при ходьбе возникали сразу при начале движения или уже были в покое, в связи с чем тредмил-тест им не проводился [10, 11, 14, 22, 23]. По основному критерию отнесения пациента к той или иной группе степени тяжести, ДБХ, мы определили, что в ходе исследования существенно менялось соотношение пациентов внутри клинической группы в пользу более легких форм, в то время в группе контроля наблюдалась скорее отрицательная динамика за счет увеличения доли

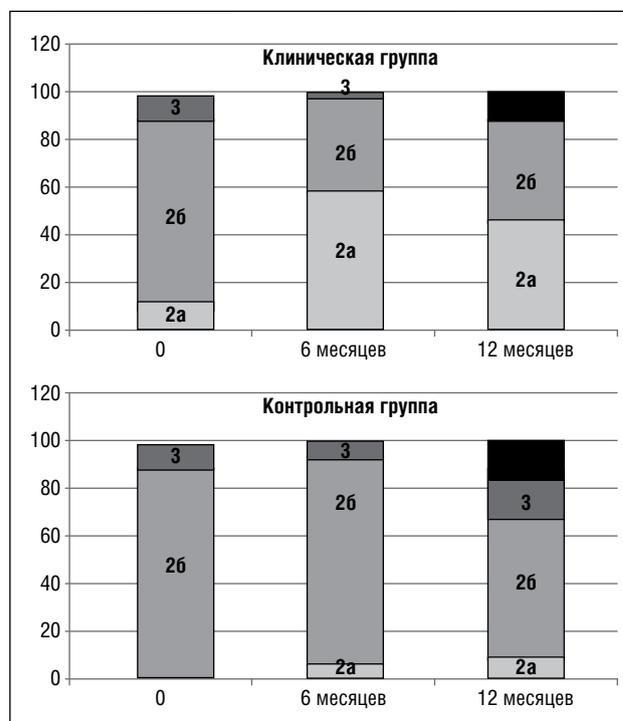


Рис. 5. Соотношение пациентов (%) внутри клинической и контрольной групп по степени тяжести. Черный сектор – доля пациентов, перенесших ампутации.

пациентов с более тяжелыми формами, в том числе приведших к ампутации (рис. 5).

Через 1 год наблюдений мы уже имели возможность проследить сохранность конечностей и выживаемость пациентов (табл. 6). При этом установлено, что местная генная терапия, направленная на борьбу с локальной ишемией, не оказывает существенного влияния ни на смертность, ни на ампутации, зависящие, по-видимому, в значительной степени от системных проявлений атеросклероза. Однако следует признать, что данные показатели необходимо анализировать в дальнейшем на больших группах пациентов.

Таким образом, клиническое исследование показало, что включение в комплексную терапию препарата Неваскулген на основе плазмидной ДНК с геном vegf165 приводит к достоверному положительному результату: не только стабилизирует клиническое состояние пациентов, но и в значительной степени приводит к регрессу патологической симптоматики, облегчает состояние пациентов и улучшает качество жизни. Наблюдение в течение года подтвердило стойкость полученных положительных сдвигов и дальнейший рост улучшения по ДБХ. Несмотря на положительные результаты, необходимо проведение дальнейших исследований с включением больших по количеству групп пациентов. Важно оценить влияние препарата с

Показатель	Ампутации				Умершие			
	ИТТ		РР		ИТТ		РР	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Через 6 мес.	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0	2,7/0	2/0	2,7/0
Через 12 мес.	5/2	6,7/8	5/2	10,7/14,3	3/1	4/4	3/1	6,5/7,1

Примечание: ИТТ – все пациенты, включенные в исследование (75/25), РР – группа пациентов, которые были исследованы на сроке 12 мес. после начала исследования (46/14).

vegfl65 на течение заболевания у пациентов с диабетической ангиопатией, тромбангиитом. Одной из целей последующей работы должно стать создание эффективных схем лечения данной патологии с использованием синергичного эффекта препаратов разных фармакологических групп.

Источники финансирования

Исследования финансировались компанией-спонсором ОАО «Институт стволовых клеток человека», Москва.

Раскрытие информации

Главный исследователь:

по Протоколу клинических исследований (0,5 года) — профессор П.Г. Швальб; последующие наблюдения (1,0 год) — к. м. н. Р.В. Деев

Особая информация:

А.А. Исаев, И.Я. Бозо, О.В. Чухраля, Р.В. Деев, С.Л. Киселев — сотрудники Института стволовых клеток человека;

А.А. Исаев и С.Л. Киселев — акционеры компании «Институт стволовых клеток человека».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cardiovascular diseases. Fact sheet #317, 2011. WHO Library Cataloguing in Publication Data. <http://who.int/medicentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. *Isner J.M., Kearney M.* Atherosclerosis: pathology of the vasculature in live patients. London: WB Saunders. 1999; 128.
3. *Покровский А.В.* Клиническая ангиология. М.: Медицина. 2004; 1696.
4. *Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzner N.R., et al.* ACC/AHA guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47(6): 1239–1312.
5. European Medicines Agency recommends restricting use of cilostazol-containing medicines. 2013. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/03/news_detail_001746.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1.
6. *Gupta R., Tongers J., Losordo D.W.* Human Studies of Angiogenic Gene Therapy. *Circ. Res.* 2009; 105: 724–736.
7. Phases of gene therapy clinical trials. Gene therapy clinical trials worldwide, provided by the journal of Gene medicine. <http://www.wiley.com/legacy/wiley-chi/genmed/clinical>.
8. *Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R., et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996; 348: 370–374.
9. *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.
10. *Mäkinen 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(1): 127–133.
11. *Marui A., Tabata Y., Kojima S., et al.* A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I–IIa study. *Circulation.* 2007; 71: 1181–1186.
12. *Nikol S., Baumgartner I., Van Belle E., et al.* Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.* 2008; 16(5): 972–978.
13. *Rajagopalan S., Olin J., Deitcher S., et al.* Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1alpha transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose escalation experience. *Circulation.* 2007; 115:1234–1243.
14. *Henry T.D., Hirsch A.T., Goldman J., et al.* Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene Therapy.* 2011; 18: 788–794.
15. *Belch J., Hiatt W.R., Baumgartner I., et al.* Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet.* 2011 Jun 4; 377: 9781: 1929–1937.
16. *Shigematsu H., Yasuda K., Iwai T., et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Therapy.* 2010; 17: 1152–1161.
17. *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.
18. *Isner J.M.* Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 30: 185–197.
19. *Deev R.V., Grigorian A.S., Potapov I.V., et al.* World-wide experience and recent trends in gene therapy of ischaemic diseases. *Angiol. Sosud. Khir.* 2011; 17: 2: 145–154.
20. *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.
21. *Kusumoto Y.H., Hospers G.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.

22. *Morishita R., Makino H., Aoki M., et al.* Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 713–720.
23. *Powell R.J., Simons M., Mendelsohn F.J., et al.* Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 2008; 118: 58–65.
-

SUMMARY

EFFICACY OF USING VEGF156 GENE IN COMPREHENSIVE TREATMENT OF PATIENTS WITH STAGE 2A–3 LOWER LIMB CHRONIC ISCHAEMIA

Deev R.V.¹, Bozo I.Ya.¹, Mzhavanadze N.D.², Nersesyan E.G.³, Chukhralya O.V.¹, Shvalb P.G.², Chervyakov Yu.V.³, Staroverov I.N.³, Kalinin R.E.², Voronov D.A.⁴, Gavrilenko A.V.⁴, Isaev A.A.¹

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² Ryazan State Medical University named after I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

³ Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russia

⁴ B.V. Petrovsky Russian Research Centre of Surgery under the Russian Academy of Medical Sciences

The authors share their experience in treating a total of 100 patients presenting with stage 2A–3 chronic lower limb ischaemia according to the classification of Pokrovsky–Fontain (the clinical group was composed of 75 patients and the control group comprised 25 subjects), in whom it was impossible to perform surgical revascularization. The clinical group patients received in addition to the conventional vascular therapy local intramuscular injections of Neovasculogen (plasmid genetic construction containing human gene VEGF165) at a course dose of 2.4 mg. The results were assessed after 1 year. It was shown that administration of this gene therapeutic agent is safe with no local or systemic allergic reactions and free form neoplastic processes. Efficacy of treatment was assessed by registering the pain-free walking distance (PFWD), transcutaneous oxygen tension (T_cPO_2), linear velocity of blood flow, ankle-brachial index (ABI), angiography, and by means of SF-36 questionnaire.

It was determined that after 12 months the statistical significance of intergroup and intragroup differences was reached for PFWD (increment 167.2%), T_cPO_2 (increment 20.4%). The highest clinical response for the PFWD was registered in patients with stage 3 of the disease (547.5%), as well as in those with multi-storey vascular lesions (269.1%). The obtained findings make it possible to consider gene therapy with Neovasculogen as an efficient component of comprehensive treatment of this cohort of patients.

Key words: plasmid DNA, VEGF165 gene, therapeutic angiogenesis, lower limb chronic ischaemia, gene therapy, clinical trial.
