

Фаза 2б-3 клінічного дослідження геноопосередкованого терапевтичного ангіогенезу (vegф165) та відстрочене спостереження за пацієнтами з хронічною ішемією нижніх кінцівок Іа—ІІІ стадії



Р.В. Деєв¹, І.Я. Бозо¹, М.Д. Мжаванадзе², Е.Г. Нерсесян³,
О.В. Чухрала¹, О.А. Рожко¹, П.Г. Швальб², Ю.В. Червяков³,
І.Н. Староверов³, Р.Е. Калінін², Д.А. Воронов⁴,
О.В. Гавриленко⁴, С.Л. Кисельов^{1,5}, А.О. Ісаєв¹

¹ Інститут стовбурових клітин людини, Москва, РФ

² Рязанський державний медичний університет імені І.П. Павлова, РФ

³ Ярославська державна медична академія, РФ

⁴ Російський науковий центр хірургії імені Б.В. Петровського,
Москва, РФ

⁵ Інститут загальної генетики імені М.І. Вавілова, Москва, РФ

Мета роботи — дослідити ефективність та безпечність застосування генотерапевтичного плазмідного препарату на основі гена vegф165 у комплексному лікуванні пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу Іа—ІІІ стадії.

Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 100 хворих: 75 осіб становили клінічну групу, 25 — групу контролю. Термін спостереження — 6 міс за основним протоколом та 6 міс у процесі відстроченого спостереження. Реєстрували випадки небажаних явищ і серйозних небажаних явищ, оцінювали довжину дистанції безболісної ходьби, транскутанну напругу кисню, гомілково-плечовий індекс, лінійну швидкість кровоплину, у 30 % пацієнтів виконували рентгеноконтрастну ангіографію, у всіх хворих оцінювали якість життя.

Результати та обговорення. Встановлено, що генна плазмідна конструкція безпечна. Її застосування у складі комплексного лікування у неоперабельних пацієнтів супроводжується статистично значущим збільшенням дистанції безболісної ходьби в середньому на 167,2 %, найліпший результат отримано у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок ІІІ стадії — приріст 547,5 % за рік; міжгрупова різниця досягла вірогідності: $p = 0,001$ за 6 міс і $p = 0,004$ за 1 рік. Також статистично значущо збільшився показник транскутанної напруги кисню. Величини приросту гомілково-плечового індексу і лінійної швидкості кровоплину досягли статистичної значущості.

Висновки. Генний препарат істотно впливає на мікрогемодинаміку в ішемізованій кінцівці та ефективний у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок: стабілізує клінічний стан пацієнтів, зумовлює регрес патологічної симптоматики і поліпшує якість життя.

Ключові слова: плазмідні ДНК, VEGF, терапевтичний ангіогенез, хронічна ішемія нижніх кінцівок, генна терапія, клінічне дослідження.

Стаття надійшла до редакції 10 липня 2013 р.

Деєв Роман Володимирович, к. мед. н., директор з науки Інституту стовбурових клітин людини
119991, ГСП-1, м. Москва, вул. Губкіна, 3, будівля 2. E-mail: romdey@gmail.com

© Р.В. Деєв, І.Я. Бозо, М.Д. Мжаванадзе, Е.Г. Нерсесян, О.В. Чухрала,
О.А. Рожко, П.Г. Швальб, Ю.В. Червяков, І.Н. Староверов, Р.Е. Калінін,
Д.А. Воронов, О.В. Гавриленко, С.Л. Кисельов, А.О. Ісаєв, 2013

Перше десятиріччя нового століття засвідчило, що в структурі терапевтичних засобів для лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок поряд із нівелюванням чинників ризику, препаратами, що поліпшують реологію крові, простагландинами, індукторами регенерації зарезервовано місце й для групи ангіогенних засобів. Створення фармакологічних засобів із виразним ефектом індукції локального ангіогенезу на основі клітинних препаратів, рекомбінантних білкових факторів і геннотерапевтичних препаратів триває. Терапевтичний арсенал судинного хірурга все ще досить обмежений. Так, відповідно до рекомендацій Американської колегії кардіологів/Американської асоціації серця (ACC/АНА, 2006), препаратом 1-го класу для лікування переміжної кульгавості є циластозол, що дає приріст дистанції безболісної ходьби (ДБХ) за півроку майже 50 % [9]. Застосування препарату обмежується тим, що він досі не зареєстрований в Україні та Росії. Більше того, на початку 2013 р. Європейське медичне агентство випустило реліз, що обмежує використання циластозолу внаслідок реєстрації багатьох побічних ефектів [5]. Препарати групи простагландинів, що використовують для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, мають обмежений період ефективності й самостійно не розв'язують проблеми зупинки прогресування хвороби. Таким чином, дефіцит терапевтичних можливостей зумовлює оптимізацію роботи зі створення повноцінного фармацевтичного агента для патогенетичної корекції хронічної ішемії нижніх кінцівок.

Одним із сучасних трендів лікування пацієнтів, що мають судинну патологію, є геннотерапевтичні препарати [7, 18], в яких як активні речовини використано ДНК різних факторів росту та транскрипційних: VEGF165 [2, 11, 14], bFGF [15, 17] HIF, HGF [8, 20] та ін. У світі проведено кілька десятків клінічних досліджень II–III фаз, що дало змогу накопичити як негативний [3], так і позитивний досвід застосування препаратів цієї групи [21].

Мета роботи — дослідити ефективність та безпечність застосування геннотерапевтичного плазмідного препарату на основі гена *veg165* у комплексному лікуванні пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу IIa–III стадії.

Матеріали і методи

Доклінічне дослідження загальної токсичності (гостра, підгостра, хронічна; місцево-подразнювальна дія) та специфічної (алергенність, вплив на репродуктивну та імунну системи, мутагенна і канцерогенна дія), а також виявлення специфічної активності виконано в ФДМ «Інститут токсикології ФМБА Росії» (Санкт-Петербург, 2008). Фазу 2б–3 клінічного дослідження «Дослідження короткочасної безпечності, переносності та ефектив-

ності препарату «Неоваскулоген» у комплексній терапії пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок (II–III стадії (IIa–III стадії) за Покровським — Фонтейном)» проведено за дозволом від 21 квітня 2010 р. № 177 Федеральної служби з нагляду у сфері охорони здоров'я і соціального розвитку Міністерства охорони здоров'я і соціального розвитку РФ. Дослідження виконано з дотриманням етичних принципів, закладених у Гельсінкській декларації Всесвітньої медичної асоціації «Рекомендації для лікарів, що проводять біомедичні дослідження за участю людей» (1964, 2000 р.) і відображених у ОСТ 42-511-99 «Правила проведення якісних клінічних випробувань в Російській Федерації», правила ICH GCP і чинних нормативних вимог.

Характеристика препарату і метод введення

Діюча речовина досліджуваного препарату — високоочищена надскручена форма плазмиди з геном, що кодує судинний ендотеліальний фактор росту (vascular endothelial growth factor, VEGF). Виготовляють у вигляді стерильного ліофілізату (1,2 мг у флаконі), який розчиняють водою для ін'єкцій в об'ємі 2 мл. Показаний тільки для місцевого введення — множинні ін'єкції (4–5) в м'язи на рівні нижньої і середньої третини гомілки.

Характеристика пацієнтів

У дослідження введено пацієнтів, у яких виконати хірургічну реконструкцію судинного русла було неможливо.

Критерії введення пацієнтів:

- вік понад 40 років;
- симптоми переміжної кульгавості атеросклеротичного генезу тривалістю не менше 3 міс;
- IIa–III стадія захворювання за класифікацією Фонтейна в модифікації А.В. Покровського;
- відсутність гемодинамічно значущих стенозів (> 60 %) аорто-клубово-стегнового артеріального сегмента або (за їх наявності) проксимальний шунт (протез), що задовільно функціонує за умови, що операцію ревазулізації виконано не раніше ніж за 3 міс до моменту введення в дослідження;
- гемодинамічно значущі ураження артерій стегново-підколінного сегмента — задовільна прохідність глибокої артерії стегна;
- гемодинамічно значущі ураження передньої і (або) задньої тібіальних артерій дифузного характеру;
- добровільне підписання пацієнтом інформованої згоди.

Критерії невведення пацієнтів:

- маніфестація захворювання судин до 40 років;
- хронічна ішемія нижніх кінцівок неатеросклеротичного генезу (артеріт, системні захворювання, хвороба Бюргера, природжені аномалії і травми судин тощо);

Т а б л и ц я 1

Загальна характеристика пацієнтів

Пацієнти	Контроль	Клінічна група	Разом
Уведено в дослідження	25	75	100
Виконали програму клінічного дослідження (0,5 року)	25	73	98
Вибули: втрачено контакт чи щось інше	0	0	0
смерть	0	2	2
Пройшли обстеження через 1 рік	13	39	52
Вибули: втрачено контакт чи щось інше	11	33	44
смерть	1	1	2

- критична ішемія нижніх кінцівок з виразково-некротичним пошкодженням тканин кінцівок;
- недавня (менше 3 міс) операція на артеріях нижніх кінцівок або недавній (менше 3 міс) тромбоз глибоких вен нижніх кінцівок;
- недавні (менше 6 міс) випадки гострого інфаркту міокарда, нестабільної стенокардії, аортокоронарного шунтування або стентування коронарних артерій, інсульту або транзиторних ішемічних атак;
- декомпенсація патології серцево-судинної системи, функції нирок, печінки, декомпенсований цукровий діабет;
- онкологічний анамнез або підозри на злоякісне новоутворення;
- декомпенсований цукровий діабет.

Загальну характеристику пацієнтів представлено в табл. 1.

Учасники клінічної групи в програмі комплексного лікування двічі отримували внутрішньом'язові ін'єкції плазмідної генної конструкції *p-vegf165* в дозі 1,2 мг з інтервалом 14 діб (загальна доза 2,4 мг). 25 осіб контрольної групи отримували стандартну терапію (колоїдні розчини, препарати, що поліп-

шують реологічні властивості крові, дезагреганти, стимулятори регенерації і вітаміни в рекомендованих дозах). Препаратів із групи простагландинів у процесі дослідження і за 0,5 року до нього пацієнти не отримували.

Організація дослідження та контрольні часові точки

Дослідження сплановано і проведено як відкрите, проспективне, рандомізоване і контрольоване. Виконано на базі трьох дослідницьких центрів: Російського наукового центру хірургії ім. Б.В. Петровського (Москва), Рязанського державного медичного університету ім. І.П. Павлова, Ярославської обласної клінічної лікарні (силами професорсько-викладацького складу Ярославської державної медичної академії; рис. 1).

Згідно з визначеними у протоколі контрольними часовими точками, пацієнтів обстежували на 14, 90 та 180-ту добу. Після передбачених досліджень оцінювали результати безпечності та ефективності, проводили статистичну обробку даних, формували підсумковий звіт. Після дослідження, згідно з протоколом, спостереження за пацієнтами

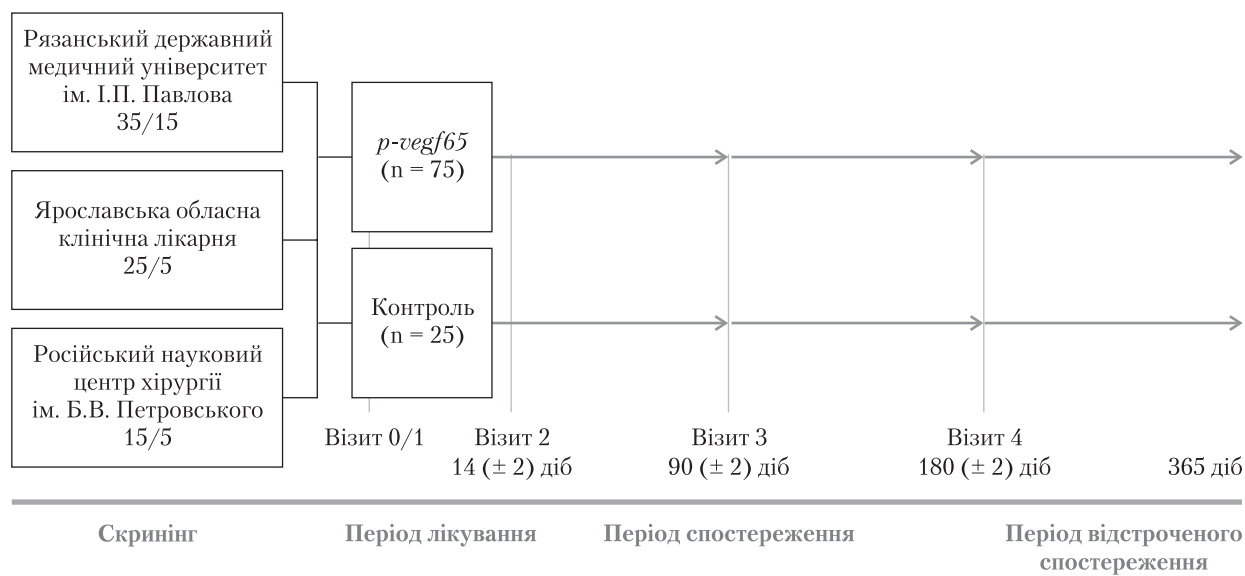


Рис. 1. Організація дослідження

було продовжено ще на 180 діб з контрольним обстеженням через 1 рік після початку дослідження.

Критерії безпеки

Оцінювали безпеку протягом 6 міс (14 діб за пацієнтом спостерігали в стаціонарі, далі — амбулаторно) шляхом реєстрації небажаних та серйозних небажаних явищ як під час контрольних візитів, так і у разі позапланового звернення по медичну допомогу.

Критерії ефективності

Первинний критерій

Дистанція безболісної ходьби. За первинний (основний) критерій ефективності було прийнято показник ДБХ. Відповідно до класифікації ACC/AHA Guidelines for the Management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric and abdominal aortic): executive summary, він належить до I класу доказів [18], не вимагає складного обладнання і є стандартним для пацієнтів із захворюванням периферичних артерій. Результати дослідження лягли в основу внутрішньогрупового розподілу пацієнтів за стадією захворювання на підставі класифікації переміжної кульгавості за Фонтейном у модифікації А.В. Покровського: Па — до виникнення болю під час ходьби пацієнта на відстань понад 200 м; Пб — менше за 200 м, але більше ніж 50 м; Пв — проходження менше 50 м або пред'явлення скарг на біль у стані спокою, що не супроводжується виразково-некротичними змінами тканин [1].

Вторинні критерії

ТсРО₂. Визначення транскутанної напруги кисню (ТсРО₂) в ураженій кінцівці дає непряме уявлення про кровопостачання (мікрогемодинаміку) тканин і належить до Па класу доказів [18]. Показник реєстрували під час усіх візитів у першому міжпальцевому проміжку на стопі ураженої кінцівки.

Гомілково-плечовий індекс (ГПІ) визначали у пацієнтів під час кожного візиту за стандартною методикою. Хоча він належить до I класу доказів [18], характеризує стан магістрального кровоплину

(макрогемодинаміки), і його діагностична значущість у неоперабельних пацієнтів обмежена.

Лінійну швидкість кровоплину (ЛШК) оцінювали під час дуплексного ультразвукового сканування задньої великогомілкової артерії.

Ангіографія. У 30 % пацієнтів проведено рентгенконтрастну ангіографію нижніх кінцівок до введення препарату, через 6 міс і 1 рік. Як первинні, так і повторні ангіограми виконував один і той самий фахівець на одному ангіографі, з однаковою часою затримкою знімків.

Якість життя. Всі пацієнти заповнювали неспецифічний опитувальник для оцінки якості життя SF-36 (SF-36 Health Status Survey).

Методи статистичного аналізу

Методи статистичного аналізу наведено в табл. 2.

Результати

Характеристика початкового стану пацієнтів

Під час порівняння початкових характеристик пацієнтів (табл. 3) не встановлено статистичної значущості різниці щодо гендерного складу, а також показників первинних і вторинних критеріїв. За основним критерієм — ДБХ — пацієнти також були порівнювані. У групі контролю вона становила (114,3 ± 11,4) м. У процесі детальнішого аналізу виявлено, що група контролю та клінічна порівнювані за ступенем тяжкості і рівнями оклюзії. Однак під час рандомізації в групу контролю не увійшли пацієнти з терапевтичною стадією хвороби (Па), а з хірургічною (Пв) було лише 3 хворих, тому міжгрупові порівняння проводили тільки для пацієнтів зі стадією захворювання Пб.

Оцінка безпеки

Самопочуття пацієнтів клінічної групи ні під час введення препарату, ні в подальшому не змінювалося. Після введення препарату місцевих патологічних реакцій, зокрема алергічних, анафілактичних та непластичних, не помічено протягом як 6 міс спостережень, передбачених протоколом, так і 1 року. Біохімічний аналіз крові і коагулограма

Т а б л и ц я 2

Характеристика методів статистичного аналізу, які використовували в процесі дослідження

Гіпотеза	Статистичний метод
Оцінка вірогідності змін абсолютного значення показника ДБХ, ТсРО ₂ , ГПІ та ЛШК у кожній групі	Метод порівняння парних випадків Вілкоксона і тест Sign
Оцінка різниці центральних тенденцій між групами. Оцінка вірогідності різниці абсолютних значень основних і непрямих ознак ішемії (ДБХ, ТсРО ₂ , ГПІ) між групами в кожен із візитів (0/1, 3 і 4).	Метод порівняння непарних випадків Манна — Уїтні
Оцінка вірогідності різниці в прирості (у період між 1-м і 4-м візитами) абсолютного значення основних і непрямих ознак ішемії (ДБХ, ТсРО ₂ , ГПІ, ЛШК) між групами	Метод порівняння непарних випадків Манна — Уїтні
Порівняння частоти позитивних наслідків лікування між двома групами	Точний тест Фішера

Т а б л и ц я 3

Характеристика початкового стану пацієнтів

Показник	Контроль (n = 25)	Клінічна група (n = 75)	p
Чоловіки	20 (80,0 %)	50 (66,65 %)	1,000
Жінки	5 (20,0 %)	25 (33,35 %)	1,000
Стадія хронічної ішемії нижніх кінцівок			
IIa	—	9 (12 %)	
IIb	22 (88 %)	57 (76 %)	
III	3 (12 %)	9 (12 %)	
Рівень оклюзії			
Проксимальний	12 (48 %)	38 (50,7 %)	
Дистальний	5 (20 %)	16 (21,3 %)	
Поєднаний (багатоповерховий)	8 (32 %)	21 (28 %)	
ДБХ	114,3 ± 11,4	135,3 ± 12,2	0,558
TcPO ₂	76,5 ± 1,9	75,9 ± 1,3	0,921
ГПІ	0,46 ± 0,06	0,51 ± 0,02	0,248
ЛШК	17,6 ± 2,1	14,2 ± 1,6	0,547

засвідчили, що у пацієнтів із хронічною ішемією нижніх кінцівок незалежно від отримання *p-vegfr165* зберігався підвищений базовий рівень креатиніну та фібрин-мономера. Також зазначено, що введення згаданого препарату в комплекс лікування не призводить до зміни концентрації глюкози в крові.

Протягом 6 міс у 2 пацієнтів розвинулися стани, що не дали змоги продовжити дослідження: гостре порушення мозкового кровообігу (група контролю) зі сприятливим наслідком і гострий інфаркт міокарда з летальним кінцем (клінічна група). Під час уважного вивчення останнього випадку причинно-наслідкового зв'язку із застосуванням *p-vegfr165* не виявлено.

Розвитку пухлин, порушення зору й інших патологічних станів, які побічно могли б свідчити про ускладнення ангіогенної терапії, не помічено у пацієнтів на всіх етапах обстеження до 1 року.

Оцінка ефективності*Первинний критерій*

Дистанція безболісної ходьби. Збільшення ДБХ було зауважено деякими пацієнтами клінічної групи вже через 2 тиж, але помітним воно ставало в період 45–60 діб. Об'єктивно через 3 міс ДБХ у клінічній групі становила (236,5 ± 19,3) м, а через 6 міс — (284,7 ± 29,8) м, тобто статистично значущою різниця порівняно з початковим станом у клінічній групі і в групі контролю стала з 90-ї доби (табл. 4). Зростання показника у хворих клінічної групи спостерігалось протягом перших 6 міс і продовжувало збільшуватися в процесі відстроченого спостереження (рис. 2). Через рік тенденція збереглася, а приріст збільшився на 167,2 %, що стано-

вило 226,3 м, водночас як у групі контролю істотних змін не відбулося.

Залежно від ступеня тяжкості найбільший приріст ДБХ встановлено у пацієнтів із найтяжчою ішемією — III стадії (див. табл. 4): приріст 96,4 м (231,2 %), а через рік — на 228,3 м (547,5 %). У пацієнтів найчисленнішої групи (IIb стадії) згаданий показник збільшився на 129,4 м (108,3 %); зміни виявилися стійкими і через рік були ідентифіковані ті ж такі величини. У групі з ішемією IIa стадії через 6 міс приріст становив 290 м (90,6 %), а через 1 рік — 660 м (206,3 %).

Залежно від рівня оклюзії найліпші результати спостерігали через півроку в пацієнтів з мультифокальним ураженням судин нижніх кінцівок, середня величина приросту в них досягла 246,6 м (158,3 %), а через рік приріст становив 419,2 м (269,1 %). У групі контролю результати були істотно нижчими: приріст за півроку дорівнював 34 м (33,5 %), а через рік було помічено істотний регрес ДБХ, у середньому на 56 м (–58,3 %).

У пацієнтів із переважно дистальним ураженням судин (клінічна група) через півроку констатовано позитивні зрушення ДБХ — збільшення на 179,7 м (132,4 %), а через рік — на 230,3 м (169,7 %).

Вторинні критерії

Показник мікрогемодинаміки: TcPO₂. У клінічній групі спостерігали безперервну тенденцію до збільшення середнього значення TcPO₂ від (75,9 ± 1,3) мм рт. ст. під час першого візиту до (85,7 ± 1,4) мм рт. ст. через 180 діб (приріст майже 13 %). У наступні півроку ця величина так само збільшувалася і досягла середнього значення (91,4 ± 0,7) мм рт. ст. — приріст 20,4 % (рис. 3). Ве-

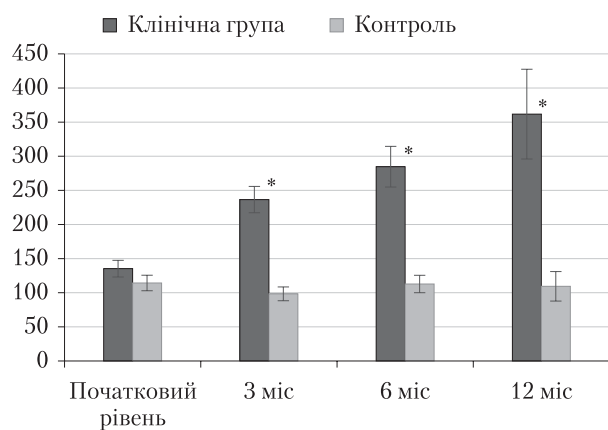
Т а б л и ц я 4

Результати вимірювань первинних і вторинних критеріїв ефективності лікування (M ± m)

Показник	Клінічна група				Контроль				Статистична значущість різниці між групами	
	Початковий рівень	3 міс	6 міс	12 міс	Початковий рівень	3 міс	6 міс	12 міс	р для 6 міс	р для 12 міс
ДБХ (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
Па стадія	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	—	—	—	—	—	—
ІІ стадія	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
ІІІ стадія	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 ± 6,7 *	—	*	*
Проксимальний рівень оклюзії	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
Дистальний рівень оклюзії	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
Багаторівнева оклюзія	155,8 ± 38,1	344,4 ± 75,5 p = 0,012	402,4 ± 89,3 p = 0,001	575,0 ± 193,0 p = 0,021	96,0 ± 16,3	90,0 ± 19,5	130,0 ± 24,0 p = 0,043	40,0 ± 20,0 p = 0,900	0,07	0,121
ТСР _{О2} (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
ГПШ (73/25)	0,51 ± 0,02	0,54 ± 0,02 p = 0,001	0,56 ± 0,02 p = 0,001	0,56 ± 0,03 p = 0,001	0,46 ± 0,06	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,06 p = 0,5	0,49 ± 0,08 p = 0,109	0,264	0,239
ЛШК (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

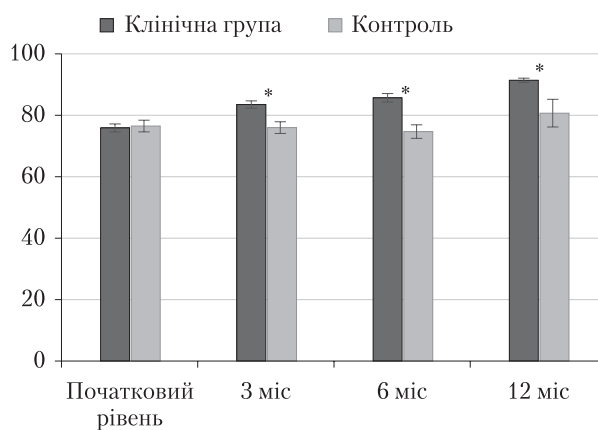
* Обсяг вибірки недостатній для розрахунку статистичної значущості різниці.

** Дослідження не виконували.



*Різниця між показниками клінічної та контрольної груп статистично значуща ($p < 0,05$)

Рис. 2. Зміни ДБХ у процесі клінічного дослідження і подальшого спостереження



*Різниця між показниками клінічної та контрольної груп статистично значуща ($p < 0,05$)

Рис. 3. Зміни TcPO₂ в процесі клінічного дослідження і подальшого спостереження

личина приросту у клінічній групі, на відміну від контрольної, була статистично значущою.

Показники макрогемодинаміки: ГПП. Абсолютні значення ГПП і його приріст не мали статистично значущої різниці між клінічною та контрольною групами протягом усього періоду дослідження не мала статистичної значущості. Так, через півроку після початку дослідження приріст ГПП в клінічній групі становив лише 0,05, а в групі контролю не змінився (див. табл. 4). Під час відстроченого спостереження (рік) встановлено, що у пацієнтів клінічної групи досягнуте поліпшення залишалося стабільним (рис. 4).

Показники макродинаміки: ЛШК. ЛШК мала тенденцію до зростання тільки в клінічній групі, за півроку середнє значення збільшилося на 8,4 см/с (приріст 59,2 %). До року цей показник знизився, але все ж таки перевищував початкове значення на 5,5 см/с. У контрольній групі пацієнтів, які отримували тільки стандартне терапевтичне ліку-

вання, ЛШК не змінилася і навіть мала тенденцію до зниження (рис. 5).

Ангіографія. Під час оцінки результатів дослідження у більшості пацієнтів (75 %) встановлено переконливу позитивну динаміку: утворення на гомілці колатеральної судинної мережі. Не зауважено таких показників у 12,5 % пацієнтів. Ще у 12,5 % спостереженнях зафіксовано незначну позитивну динаміку у вигляді посилення контрастування мікроциркуляторного русла за рахунок збільшення діаметрів судин. Значне збільшення сформованих колатералей зареєстровано у 37,5 %, а помірне — ще у 37,5 % хворих. Виявлено неоангіогенез, який визначається макроскопічно за рахунок нових колатералей і, можливо, розкриття судин, що раніше не функціонували.

Якість життя оцінювали на початку дослідження та через 6 міс за допомогою опитувальника SF-36. Всі шкали було згруповано в два показники —

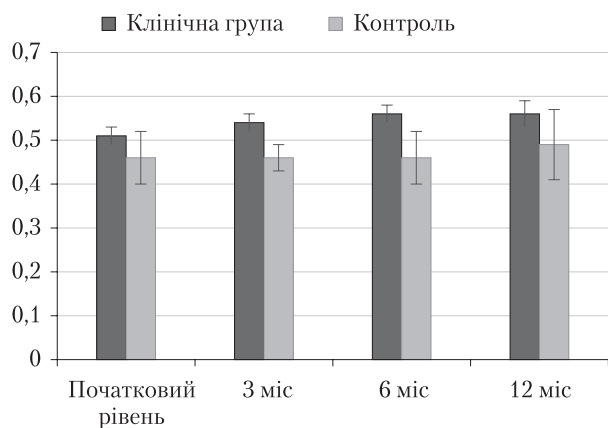


Рис. 4. Зміни ГПП в процесі клінічного дослідження і подальшого спостереження

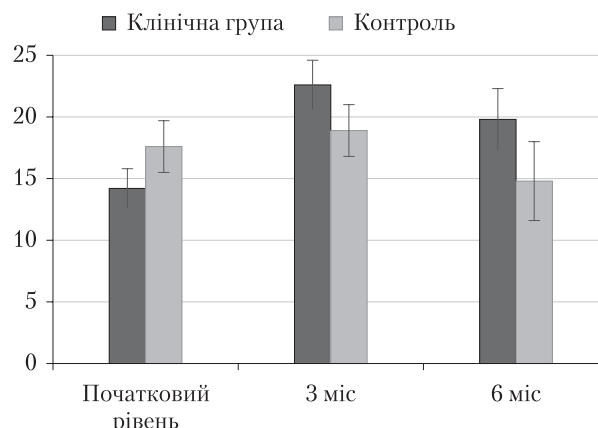


Рис. 5. Зміни ЛШК у процесі клінічного дослідження і подальшого спостереження

«фізичний компонент здоров'я» і «психічний компонент здоров'я». Зареєстровано статистично вірогідний приріст показника «фізичний компонент здоров'я» у пацієнтів клінічної групи, що пояснюється значним поліпшенням фізичного стану пацієнтів (приріст 2,49; $p = 0,001$).

Обговорення

Стратегія генної терапії з використанням генів, що кодують ангіогенні фактори росту для паракринної регуляції росту судин (терапевтичного ангіогенезу), почала розвиватися з праць Джефрі Існера [10–12]. Тестували кілька терапевтичних генів [7]. Для трансфекції тканин пацієнта ці гени було укладено в різні вектори: вірусні [7, 14] і невірусні – насамперед голі плазмідні [2, 4, 7, 11, 18]. У багатьох клінічних дослідженнях показано безпечність обох підходів за місцевого введення різних доз генних препаратів: як в аспекті системних алергійних або анафілактоїдних реакцій, так і в частині відсутності неопластичних процесів – проліферативної ретинопатії, судинних пухлин, індукції росту дормантних пухлин та ін. [4, 7]. Проте дані, отримані під час оцінки ефективності, різноманітніші. У низці випадків дослідження було визнано невдалими, зокрема через вибір занадто жорстких критеріїв ефективності, наприклад, кількості ампутацій або кривої виживаності [6], і в зв'язку з гетерогенністю введених у дослідження пацієнтів – атеросклероз, хвороба Бюргера, діабетична стопа. Безумовно, на ефективність впливає і вибір терапевтичного гена, у низці випадків не оптимального за ступенем важливості й обсягом рецепторного поля для ангіогенезу.

Невведення в це дослідження хворих із виразково-некротичними формами хвороби (IV стадія за Покровським – Фонтейном) дає змогу рееструва-

ти ефект у пацієнтів із життєздатними тканинами кінцівки, що дуже важливо для подальшого розвитку генної терапії. Так, у більшість досліджень беруть пацієнтів із виразками і гангреною, й негативні висновки щодо ефективності закривають дорогу до подальшого вивчення препаратів та більш таргетного визначення показань до застосування їх у пацієнтів із хронічною ішемією нижніх кінцівок [3, 13, 16].

Оцінка ефективності видається складнішою. На жаль, утруднено порівняння з даними інших синонімічних досліджень, оскільки в більшості випадків в дослідження брали пацієнтів із критичною ішемією нижніх кінцівок, у яких біль під час ходіння виникав одразу на початку руху або вони вже були у стані спокою, тому тредміл-тест їм не проводили [8, 14–16, 19]. За основним критерієм захування пацієнта до тієї чи тієї групи ступеня тяжкості ДБХ ми визначили, що в процесі дослідження істотно змінювалося співвідношення пацієнтів усередині клінічної групи на користь легших форм, у групі ж контролю спостерігали негативну динаміку швидше за рахунок збільшення частки пацієнтів із тяжкими формами, які призвели до ампутації (рис. 6). Через 1 рік ми вже мали нагоду простежити ступінь збереження кінцівок і виживання пацієнтів (табл. 5). При цьому встановлено, що істотного впливу місцева генна терапія, спрямована на боротьбу з локальною ішемією, не має ні на смертність, ні на ампутації, що залежить, мабуть, значною мірою від системних виявів атеросклерозу.

Висновки

Уведення в комплексну терапію генного препарату на основі плазмідної ДНК з геном *vegf165* зумовлює вірогідний позитивний результат: не тіль-

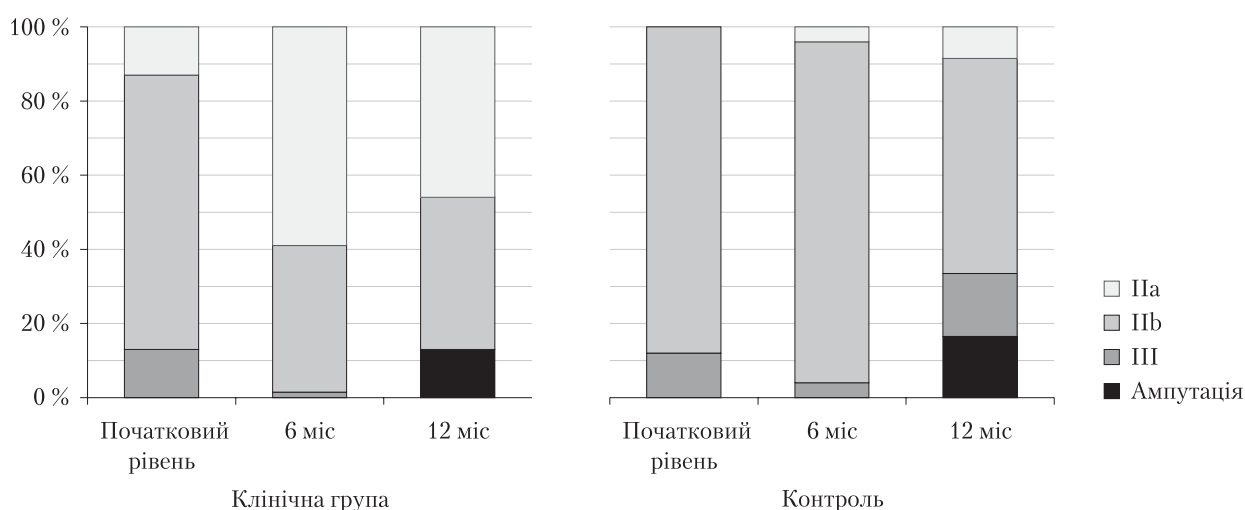


Рис. 6. Співвідношення пацієнтів усередині групи за стадією захворювання при введенні в дослідження, через 6 міс та 1 рік

Т а б л и ц я 5

Кількість ампутацій і померлих за час спостереження

Показник	Ампутації		Померли	
	ІТТ	РР	ІТТ	РР
Через 6 міс	0/0	0/0	2 (2,7 %)/0	2 (2,7 %)/0
Через 12 міс	5 (6,7 %)/2 (2 %)	5 (10,7 %)/2 (14,3 %)	3 (4 %)/1 (4 %)	3 (6,5 %)/1 (7,14 %)

ІТТ — пацієнти, введені в дослідження (75/25), РР — група пацієнтів, яких обстежили в термін 12 міс після початку дослідження (46/14).

ки стабілізує клінічний стан пацієнтів, а й значною мірою зумовлює регрес патологічної симптоматики, полегшує стан пацієнтів і поліпшує якість життя. Спостереження протягом року підтвердило стійкість позитивних зрушень і подальше поліпшення щодо ДБХ. Попри позитивні результати, належить проводити подальші дослідження із

залученням великих груп пацієнтів. Важливо оцінити вплив *veg165* на перебіг хвороби у хворих із діабетичною ангіопатією, тромбангіом. Одним із завдань подальшої роботи має стати створення ефективних схем лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок з використанням синергізму препаратів різних фармакологічних груп.

Література

1. Покровский А.В. Клиническая ангиология.— М.: Медицина, 2004.— 1696 с.
2. 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.— P. 1114–1123.
3. 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.— 377.— P. 1929–1937.
4. Deev R.V., Grigorian A.S., Potapov I.V. et al. Worldwide experience and recent trends in gene therapy of ischaemic diseases // *Angiol. Sosud. Khir.*— 2011.— 17, 2.— P. 145–154.
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. 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.— P. 874–880.
7. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy // *Circ. Res.*— 2009.— 105.— P. 724–736.
8. 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.— P. 788–794.
9. 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).— P. 1239–1312.
10. Isner J.M. Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results // *Adv. Drug Deliv. Rev.*— 1998.— 30.— P. 185–197.
11. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R. et al. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF165 // *Lancet*.— 1996.— 348.— P. 370–374.
12. Isner J.M., Walsh K., Symes J. et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease // *Circulation*.— 1995.— 91.— P. 2687–2692.
13. 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.— P. 27–34.
14. 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-blind phase II study // *Mol. Ther.*— 2002.— 6 (1).— P. 127–133.
15. 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 // *Circ. J.*— 2007.— 71.— P. 1181–1186.
16. 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.— P. 713–720.
17. 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).— P. 972–978.
18. Phases of gene therapy clinical trials. Gene therapy clinical trials worldwide, provided by the journal of Gene medicine. Mode of access: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
19. 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.— P. 58–65.
20. 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.— P. 1234–1243.
21. 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.— P. 1152–1161.

Фаза 2б-3 клинического исследования генноиндуцированного терапевтического ангиогенеза (vegf165) и отсроченное наблюдение за пациентами с хронической ишемией нижних конечностей IIa—III стадий

Р.В. Деев¹, И.Я. Бозо¹, Н.Д. Мжаванадзе², Е.Г. Нерсисян³, О.В. Чухраля¹,
А.А. Рожко¹, П.Г. Швальб², Ю.В. Червяков³, И.Н. Староверов³, Р.Е. Калинин²,
Д.А. Воронов⁴, А.В. Гавриленко⁴, С.Л. Киселев^{1,5}, А.А. Исаев¹

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, РФ

² Рязанский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова, РФ

³ Ярославская государственная медицинская академия, РФ

⁴ Российский научный центр хирургии имени Б.В. Петровского, Москва, РФ

⁵ Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова, Москва, РФ

Цель работы — исследовать эффективность и безопасность геннотерапевтического плазмидного препарата на основе гена vegf165 в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза IIa—III стадий.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 100 больных: 75 лиц составили клиническую группу, 25 — группу контроля. Срок наблюдения — 6 мес по основному протоколу и 6 мес в процессе отсроченного наблюдения. Регистрировали случаи нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений, оценивали длину дистанции безболевого ходьбы, транскутанное напряжение кислорода, лодыжечно-плечевой индекс, линейную скорость кровотока, у 30 % пациентов выполняли рентгеноконтрастную ангиографию, у всех больных оценивали качество жизни.

Результаты и обсуждение. Установлено, что генная плазмидная конструкция безопасна. Ее применение в составе комплексного лечения у неоперабельных пациентов сопровождается статистически значимым увеличением дистанции безболевого ходьбы в среднем на 167,2 %, лучший результат получен у больных хронической ишемией нижних конечностей III стадии — прирост 547,5 % за год; различия между группами достигли достоверности: $p = 0,001$ за 6 мес и $p = 0,004$ за 1 год. Также статистически значимо увеличился показатель транскутанного напряжения кислорода. Величины прироста лодыжечно-плечевого индекса и линейной скорости кровотока достигли статистической значимости.

Выводы. Генный препарат существенно влияет на микрогемодинамику в ишемизированной конечности и эффективен у больных с хронической ишемией нижних конечностей стабилизирует клиническое состояние пациентов, вызывает регресс патологической симптоматики и улучшает качество жизни.

Ключевые слова: плазмидные ДНК, VEGF, терапевтический ангиогенез, хроническая ишемия нижних конечностей, генная терапия, клиническое исследование.

2b-3 phase of clinical trial of gene-induced therapeutic angiogenesis (vegf165) and follow-up monitoring of patients with stage IIa—III of chronic lower limb ischemia

R.V. Deev¹, I.Y. Bozo¹, N.D. Mzhavanadze², E.G. Nersesyan³, O.V. Chuhralya¹,
A.A. Rozhko¹, P.G. Shvalb², Y.V. Chervyakov³, I.N. Staroverov³, R.E. Kalinin²,
D.A. Voronov⁴, A.V. Gavrilenko⁴, S.L. Kiselev^{1,5}, A.A. Isaev¹

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russian Federation

² I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

³ Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russian Federation

⁴ B.V. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

⁵ N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russian Federation

The purpose – to examine the efficacy and safety of a gene-therapeutic plasmid drug based on gene vegf165 in the complex treatment of patients with stage IIa—III of chronic lower limb ischemia of atherosclerotic genesis.

Materials and methods. 100 patients were enrolled in the clinical trial: 75 persons composed the clinical group, 25 – the control group. The observation period consisted of 6 months under the main protocol, and 6 months of the follow-up monitoring. We registered all cases of adverse and serious adverse events, estimated a pain-free walking distance, transcutaneous oxygen pressure, ankle-brachial index, blood flow linear velocity, quality of life; in 30 % of patients X-ray contrast angiography was made.

Results and discussion. The safety of the plasmid gene construction was proved. Its application in the complex treatment of inoperable patients resulted in a statistically significant increase of pain-free walking distance by average of 167.2 %; the best result was obtained in patients with chronic lower limb ischemia of III stage – a gain of 547.5% for the year; the intergroup difference approached significance: $p = 0.001$ for 6 months and $p = 0.004$ for 1 year. Also a transcutaneous oxygen pressure increased significantly. Growth of ankle-brachial index and blood flow linear velocity reached statistical significance.

Conclusions. The use of the gene drug appreciably influences the microhemodynamics in the ischemic limb and is clinically effective in patients with chronic lower limb ischemia; it stabilizes clinical condition of patients, causes regression of pathological symptoms and improves quality of life.

Key words: plasmid DNA, VEGF, therapeutic angiogenesis, chronic lower limb ischemia, gene therapy, clinical trial. □

РЕКЛАМА