



Криворучко І. А., Гоні С.-К. Т.,  
Лодяна І. М.

Харківський національний  
медичний університет

© Колектив авторів

## СУЧАСНІ МЕТОДИ СТИМУЛЯЦІЇ НЕОАНГІОГЕНЕЗУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ КРИТИЧНІЙ ІШЕМІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК

**Резюме.** У даному огляді відмічаються сучасні методи терапевтичного ангиогенезу у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок. Викладено результати багатьох клінічних досліджень ефективності використання різноманітних генних та клітинних методів та висловлено можливі причини незадовільних результатів.

**Ключові слова:** критична ішемія, неоангіогенез, клітинна терапія, генна терапія

### Вступ

Поширеність хронічної ішемії нижніх кінцівок (ХІНК) сягає 3 % населення планети, в осіб у віці більше 50 років в 9–10 % випадків, а в осіб старших за 60 років — 35–50 %. При цьому кількість хворих з ХІНК невідмінно зростає та найближчі роки складатиме 5–7 % серед населення [3]. Частота ампутацій при судинній патології як в Україні, так і за її межами досягає 59 %, а показник летальності доходить до 48 %. Летальність залишається головною проблемою в цій групі пацієнтів: 30–40 % з них живуть менше 5 років [21]. За даними TASC, подовженість життя у пацієнтів з критичною ішемією нижніх кінцівок (КІНК) від 10 до 30 % не більше 6 місяців, і 25–30 % пацієнтів може знадобитися «велика» ампутація [9].

Терапевтичний неоангіогенез видається важливою стратегією порятунку тканин при КІНК. Судинна травма або ішемія тканин активує каскад молекулярно-генетичних реакцій, головним результатом яких є мобілізація з КМ та інших джерел ПЕ, що забезпечують ревазуляризацію за рахунок утворення нових судинних формацій [18]. Вивчається можливість використання клітинних технологій для пошуку нових методів екзогенної стимуляції ангиогенезу за допомогою клітин периферійної крові, кісткового мозку, ембріональної та жирової тканин [1]. Огляду цих метод, а також генної терапії, присвячена ця стаття.

### Генна терапія

У 90 роках двадцятого сторіччя кілька дослідницьких груп встановили роль пептидних факторів росту в репарації трофічних виразок. Дослідження показали здатність факторів росту стимулювати загоєння нейропатичних виразок за умови багаторазового введення і створення високих локальних концентрацій. Остання обставина пояснюється тим, що при введенні в організм пептидні фактори росту швидко руйнуються протеолітичними ферментами. У зв'язку з цим виникла ідея введення генів ростових факторів у геном клітин,

присутніх в зоні виразки або ішемії, для забезпечення постійної експресії та створення концентрацій, близьких до фізіологічних. У якості «провідників» (векторів) генів запропоновано використовувати бактеріальні плазмиди, віруси, ліпосоми, наночастинки, метілцелюлозні диски, колагенові гелі та пов'язки.

У експерименті показана можливість стимуляції загоєння трофічних виразок за допомогою трансферу гена EGF [6], PDGF-B [15], трансформуючого фактора росту B [14], FGF-4 і фактора росту ендотелію судин (VEGF) [8].

Ключову роль у процесі ангиогенезу грає VEGF. Даний фактор вибірково стимулює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, їх попередників і моноцитів, збільшує судинну проникність, сприяє вазодилатації через посилення продукції оксиду азоту NO [27]. У пілотних дослідженнях показана можливість і короткострокова безпечність стимуляції ангиогенезу у хворих з КІНК при внутрішньом'язовому введенні в зону ішемії гена VEGF із застосуванням як вектора плазмид і аденовірусів. Генна терапія приводила до достовірного збільшення показників гомілковоплечевого індексу (ГПІ) та попередження ампутацій кінцівок у частини хворих [5]. У подвійному сліпому плацебо-контрольованому рандомізованому клінічному дослідженні (РКІ), що включало 54 пацієнта з ЦД ТА КІНК, введення плазмиди з VEGF165 покращувало показники кровотоку (гомілково-плечовий і пальці-плечовий індекси,  $p = 0,05$ ) і прискорювало загоєння трофічних виразок ( $p = 0,01$ ), проте статистично значущого зниження частоти ампутацій до сотого дня спостереження досягти не вдалося [23].

Певні надії в плані стимуляції ангиогенезу у хворих, які не є кандидатами для ангиохірургічного лікування, покладалися на пептиди сімейства FGF. У дослідженні I фази внутрішньом'язове введення плазмиди з геном FGF-1 (NV1FGF) достовірно ( $p < 0,01$ ) зменшувало вираженість болю в спокої, розмір виразкових дефектів і підвищувало перкутанну напругу



кисню у 51 хворого з ішемією нижніх кінцівок [17]. У багатоцентровому РКД II фази показано зниження ризику всіх ампутацій у 2 рази ( $HR = 0,498$ ,  $p = 0,015$ ), високих ампутацій — в 2,7 разу ( $HR = 0,371$ ,  $p = 0,015$ ) за восьмикратного внутрішньом'язового введення NV1FGF у 125 хворих з ішемією та трофічними виразками нижніх кінцівок [24]. Однак у найбільш великому РКД III фази TAMARIS, що включало 525 хворих з КІНК (з них 53 % хворих з ЦД), не виявлено відмінностей у ризику ампутацій і смерті при введенні NV1FGF або плацебо протягом року спостереження ( $HR = 1,11$ ,  $p = 0,48$ ) [10].

Інші наукові групи досліджують ефективність генотерапевтичного препарату з геном HGF. Завершилася III фаза клінічних досліджень аналогічного по складу препарату, введення якого було виконано 27 пацієнтам КІНК. Через 12 тижнів у 70 % з пацієнтів зазначеної групи спостерігалось статистично значуще зниження болю у спокої, зменшення розмірів виразкових уражень шкіри, збільшення гомілково-плечового індексу та поліпшення якості життя [19].

В якості цільового гена ряд розробників досліджують нуклеотидну послідовність, що кодує SDF. Механізм дії SDF полягає у залученні клітинних джерел (насамперед, ендотеліальних прогеніторних клітин) з кісткового мозку, кровотоку, «периферійних тканин» в цільову область по градієнту концентрації.

У клінічному дослідженні застосування гена HIF-1 $\alpha$  у складі аденовірусного вектора для лікування пацієнтів з ХІНК виявилось не ефективним [11].

Незважаючи на позитивні результати, отримані в окремих дослідженнях, мета-аналіз 12 РКД, присвячених лікуванню облітеруючих захворювань периферійних артерій за допомогою ангіогенних факторів росту (VEGF, FGF, HGF, Del-1, HIF-1 $\alpha$ ), не виявив достовірного впливу даного виду лікування на частоту ампутацій і динаміку загоєння виразок [12]. Клінічна ефективність генної терапії КІНК потребує подальших досліджень.

### Клітинна терапія

В експериментальних моделях КІНК для неоангіогенезу були використані різні типи клітин. Дослідження показали, що в ангіогенезі можуть брати участь: моноклеарні клітини (МНК) кісткового мозку (КМ) і гемопоетичні стовбурові клітини (СК), мобілізовані ендотеліальні прогеніторні клітини, клітини строми кісткового мозку, стовбурові клітини, виділені з жирової тканини [20] та інші.

Перше клінічне дослідження по застосуванню стовбурових клітин у лікуванні КІНК опу-

бліковано в 2002 р. E. Tateishi-Yuyama et al., у ньому досліджували ефективність імплантації аутологічних МНК з КМ [25]. Дослідження показало, що трансплантація аутологічних МНК КМ є безпечною й ефективною процедурою для проведення терапевтичного ангіогенезу.

У двох дослідженнях пацієнтам з КІНК проводилася трансплантація попередників ЕК в поєднанні з введенням судинних факторів росту. Отриманий стійкий ефект через 6 місяців з моменту трансплантації. Автори також вказують на безпеку та ефективність методики [7, 13]. P.P. Huanget al. (2004) запропонували інший підхід до аутологічної трансплантації МНК мобілізованих в периферійну кров за допомогою G-CSF. Через 3 місяці спостережень основні клінічні симптоми значно покращились більш ніж у половини хворих. При ангіографії відзначалося істотне поліпшення колатерального кровотоку. Однак необхідна при отриманні аутологічних МНК КМ з периферійної крові стимуляція КМ є серйозним навантаженням для ослабленого хворобою організму і є небажаною для багатьох пацієнтів старшої вікової групи [4].

Подвійне сліпе пілотне дослідження показало, що застосування трансплантації аутологічних СК КМ достовірно призводить до зменшення вираженості болю у спокої і подовженню періоду до ампутації у дослідної групи в порівнянні з контрольною групою, що отримувала плацебо у вигляді периферійної крові [22].

Виділення жирової тканини людини малотравматичне та відносно безпечне, не вимагає інтенсивної медикаментозної підготовки пацієнта. Як показують результати доклінічних і клінічних досліджень, у пацієнтів з ХІНК трансплантація мультипотентних стромальних клітин, що отримують з аутологічної жирової тканини, здатна стимулювати процеси ангіогенезу, який призводить до зниження ішемічного впливу за рахунок активізації регенераторних сил м'яза [2].

Пізніші публікації результатів пілотних клінічних досліджень Н. С. Lee і співав. [26] підтверджують ефективність і безпеку застосування ендотеліальних клітин-попередників, що виділені з жирової тканини. За допомогою цифрової ангіографії виявлено формування чисельних колатеральних судинних мереж, в результаті чого по закінченні 6 міс у 66,7 % пацієнтів відзначено зменшення вираженості болю у стані спокою та значне збільшення відстані безболісної ходьби.

Розглядається можливість застосування прогеніторних клітин фетальних тканин, які володіють набагато більш високою здатністю до проліферації, ніж дорослі мультипотентні клітини. Результати експериментів, проведе-



них *in vitro* та *in vivo*, свідчать про високий потенціал до диференціації в ангиобласти і ендотеліоцити прогеніторних клітин фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації. Доклінічні дослідження підтвердили проангіогенний і проліферативний ефект трансплантації мезенхімальних стромальних клітин, реалізований за допомогою стимуляції ангиогенних і мітогенних сигнальних шляхів [10].

Ще однією методикою, недостатньо вивченою в плані застосування у судинній хірургії, є використання багатой тромбоцитами плазми (БТП). «Галас навколо БТП виразно прийшов перед наукою», — сказав Веллінгтон Хсу, доктор медичних наук, доцент ортопедичної хірургії та нейрохірургії Північно-Західного університету «Feinberg School of Medicine» — «У медицині, ми покладаємося на наукові дані, щоб підтримати оптимальне використання процедур, але з БТП, так не сталося. Інтерес до БТП стрибнув далеко попереду дослідження». БТП не містить будь-яких ліків або хімічних речовин. «БТП є цілком природним і використовує власні тромбоцити крові пацієнта для підвищення біологічного процесу загоєння в організмі» — сказав Майкл Террі, доктор медичних наук, ад'юнкт-професор ортопедичної хірургії в «Feinberg School of Medicine», — «є дуже мало задокументованих ускладнень, що пов'язані з БТП, це безпечний метод, та він показав хороші результати у багатьох випадках». Сім основних факторів росту, які містяться в багатій тромбоцитами плазмі: тромбоцитарний фактор росту (PDGF-aa, PDGF-

bb, PDGF-ab), трансформуючий фактор росту (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2), фактор росту ендотелію судин (VEGF) і фактор росту епітелію (EGF). Ці природні фактори росту знаходяться в біологічно зумовлених співвідношеннях [20].

### Висновки

Застосування методів регенераторної медицини (генних і клітинних технологій) є перспективним напрямом у лікуванні КВНК. Потенційними кандидатами для генної та клітинної терапії є хворі, що не підлягають ангиохірургічному лікуванню.

Для терапевтичного ангиогенезу, показаного при ІХС та ХІНК, найбільш ефективними є препарати з геном VEGF, що підтверджено результатами численних клінічних досліджень [11]. Результати застосування геннотерапевтичних конструкцій з нуклеотидної послідовністю, що кодує FGF, досить суперечливі. Є підстави вважати, що нуклеїнові кислоти, що кодують інші ангиогенні фактори (HGF, HIF-1a), найменш перспективні для застосування в терапії ХІНК.

При використанні клітинних технологій відбувається збільшення судинної мережі, загоєння трофічних виразок, збільшення дистанції та швидкості ходьби, зменшення вираженості болю у спокої, що дозволяє зберегти кінцівку більшості пацієнтів

Лікування ХІНК за допомогою описаних шляхів стимуляції ангиогенезу є ефективним методом непрямой ревазуляризації, та все ж потребує подальшого вивчення.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гістологічна та імуногістохімічна характеристика стимульованого ангиогенезу внаслідок трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки / Ю. В. Поляченко, Р. В. Салютін, С. І. Мартиненко [та ін.] // Буковин. мед. вісн. — 2011. — № 1(15). — С. 69–72.
2. Клітинна стимуляція ангиогенезу як метод непрямой ревазуляризації у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок: Метод. рекомендації / Ю. В. Поляченко, Р. В. Салютін, С. С. Паляниця [та ін.] — Київ, 2011. — 28 с.
3. Пашков Д. В. Экспериментальное обоснование нового способа фармакологической и хирургической коррекции хронической ишемии конечностей : дис. ... канд. мед. наук / Д. В. Пашков. — Курск, 2007. — 138 с.
4. Adverse events during treatment of critical limb ischemia with autologous peripheral blood mononuclear cell implant / T. B. Jonsson, T. Larzon, B. Arfvidsson [et al.] // *Int. Angiol.* — 2012. — № 31(1). — P. 77–84.
5. Baumgartner I. Constitutive Expression of ph-VEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia / I. Baumgartner, A. Pieczek, O. Manor [et al.] // *Circulation.* — 1998. — № 97(12). — P. 1114–1123.
6. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of streptozotocin diabetic mice / J. Ko, H. Jun, H. Chung [et al.] // *Diabetes and Metabolism Journal.* — 2011. — № 35(3). — P. 226–235.
7. Clinical application of bone-marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone-marrow cells / T. Saigawa, K. Kato, T. Ozawa [et al.] // *Circ. J.* — 2004. — № 68. — P. 1189–1193.
8. Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice. / A. Jazwa, P. Kucharzewska, J. Leja [et al.] // *Genetic Vaccines Therapy.* — 2010. — № 8. — P. 6–9.
9. Dormandly J. A. Management of peripheral arterial disease. TASC Group. Trans Atlantic Inter-Society Consensus / J. A. Dormandly, R. B. Rotherford // *J. Vasc. Surg.* — 2000. — № 31. — P. 1-296.
10. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia / J. Belch, W. R. Hiatt, I. Baumgartner [et al.] // *The Lancet.* — 2011. — № 377 (9781). — P. 1929-1937.
11. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication / M. A. Creager, J. W. Olin, J. J. Belch [et al.] // *Circulation.* — 2011. — № 124(16). — P. 1765–1773.

12. Hammer A. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease – a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials / A. Hammer, S. Steiner // *Vasa*. — 2013. — № 42 (5). — P. 331-339.
13. Higashi Y. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with limb ischemia / Y. Higashi, M. Kimura, K. Hara // *Circulation*. — 2004. — № 109. — P. 1215-1218.
14. Lee P-Y. Electroporatic Delivery of TGF- $\beta$  Gene Works Synergistically with Electric Therapy to Enhance Diabetic Wound Healing in db/db Mice / P-Y Lee, S. Chesnoy, L. Huang // *J Investig Dermatol*. — 2004. — № 123(4). — P. 791-798.
15. Gene Therapy With Platelet-Derived Growth Factor B Sustains Accelerated Healing of Diabetic Wounds Over Time / L-X. Man, J. C. Park, M. J. Terry [et al.] // *Annals of Plastic Surgery*. — 2005. — № 55 (1). — P. 81-86.
16. H. Novel autologous cell Therapy in Ischemic Limb Disease Through Growth Factor Secretion by Cultured Adipose Tissue-Derived Stromal Cells / H. Nakagami, K. Maeda, R. Morishita // *Arterioscler., Thromb., and Vasc. Biol.* — 2005. — № 25. — P. 25-42.
17. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: Preliminary results of a phase I trial / A. J. Comerota, R. C. Throm, K. A. Miller [et al.] // *Journal of vascular surgery* : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter. — 2002. — № 35(5). — P. 930-936.
18. S. Therapeutic Angiogenesis With Intramuscular NV1F-GF Improves Amputation-free Survival in Patients With Critical Limb Ischemia / S. Nikol, I. Baumgartner, E. Van Belle [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2008. — № 16(5). — P. 972-978.
19. Pepper M. S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside / M. S. Pepper // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1997. — № 17. — P. 605-619.
20. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia / H. Shigematsu, K. Yasuda, T. Iwai [et al.] // *Gene Ther.* — 2010. — № 17(9). — P. 1152-1161.
21. Robert E Marx, DDS. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? // *Implant dentistry*. — 2001. — Vol. 10, N. 4
22. Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up / G. Dorros, M. R. Jaff, A. M. Dorros [et al.] // *Circulation*. — 2001. — № 104. — P. 2057-2062.
23. The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical limb ischemia: implications for clinical trial design / E. Benoit, T. F. Jr. O'Donnell, M. D. Iafrati [et al.] // *J. Transl. Med.* — 2011. — № 9. — P. 165-174.
24. 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 / Y. H. Kusumanto, V. van Weel, N. H. Mulder [et al.] // *Human Gene Therapy*. — 2006. — № 17(6). — P. 683-691.
25. Lee H. C. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study / H. C. Lee, S. G. An, H. W. Lee [et al.] // *Circ. J.* — 2012. — № 76(7). — P. 1750-1760.
26. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and randomized controlled trial / E. Tateishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara [et al.] // *Lancet*. — 2002. — № 360. — P. 427-435
27. Yla-Herttuala S. Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. / S. Yla-Herttuala, T.T. Rissanen, I.Vajanto, J. Hartikainen // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2007. — № 49(10). — P. 1015-1026

**СОВРЕМЕННЫЕ  
МЕТОДЫ СТИМУЛЯЦИИ  
НЕОАНГИОГЕНЕЗА  
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ  
КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ  
НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ.**

*И.А. Криворучко,  
С.-К.Т. Гони, И. М. Лодяная*

**MODERN METHODS  
OF STIMULATION OF  
NEOANGIOGENESIS WITH  
CHRONIC CRITICAL LIMB  
ISCHEMIA.**

*I. A. Krivoruchko,  
S.-K. T. Goni, I. M. Lodyanaya*

**Резюме.** В данном обзоре отмечаются современные методы терапевтического ангиогенеза у больных хронической ишемией нижних конечностей. Изложены результаты многих клинических исследований эффективности использования различных генных и клеточных методов и высказанные возможные причины неудовлетворительных результатов.

**Ключевые слова:** Критическая ишемия, неоангиогенез, клеточная терапия, генная терапия.

**Summary.** In this review, the modern methods of therapeutic angiogenesis in patients with chronic limb ischemia are observed. The results of many clinical trials of the use of various methods of gene and cell therapy and possible reasons for poor outcome are expressed.

**Key words:** *critical ischemia, neoangiogenesis, cell therapy, gene therapy*