

ПЛАКСА
Игорь Леонидович

**ГЕНОПОСРЕДОВАННАЯ ИНДУКЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ У
ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Калинин Роман Евгеньевич

Научный консультант: кандидат медицинских наук, доцент
Деев Роман Вадимович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, доцент кафедры кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии Казанской государственной медицинской академии – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Максимов Александр Владимирович

доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии, эндоскопии и колопроктологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заслуженный врач Российской Федерации
Бурлева Елена Павловна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» июня 2019 года в « » часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.052.02, созданного на базе ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, ГБУЗ Московской области «Московской областной научно-клинический институт им. М.Ф. Владимирского», по адресу: 105203, Москва, Нижняя Первомайская, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеки Института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, по адресу: 105203, Москва, Нижняя Первомайская, 65 и на сайте www.pirogov-center.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года

Учёный секретарь объединённого
Диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Матвеев Сергей Анатольевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Диабетическая нейропатия (ДН) является наиболее распространённым осложнением сахарного диабета (СД) (Boulton A.J.M., 2004). Наличие ДН определяет высокий риск развития язвенных дефектов стоп и последующей ампутации нижних конечностей у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС). Из работ Г.Р. Галстяна (2009), Р.Е. Калинина и соавт. (2017) известно, что в 15-50%, то есть почти в половине случаев, ведущим фактором формирования язвенных дефектов является нарушение иннервации тканей стопы вследствие поражения периферических нервов ввиду нарушения углеводного обмена и развитием диабетической нейропатии. Это обусловлено широкой распространённостью поражения периферических нервов среди больных СД - на момент постановки диагноза СД 2 типа 5-10% больных уже имеют признаки ДН разной степени выраженности, а при длительности СД более 10 лет количество больных увеличивается до 50% (Florian P.T., 2005). Морфологическим субстратом нейропатии является демиелинизация и снижение количества толстых сенсорных миелиновых волокон, которая приводит к утрате вибрационной и тактильной чувствительности по типу «носков» и «перчаток», что обусловлено наибольшей уязвимостью самых длинных волокон, ввиду чего потеря чувствительности начинается именно с кожи стоп (Галстян Г.Р., 2009). Уменьшение количества безмиелиновых интрадермальных волокон приводит к снижению или полной утрате температурной и болевой чувствительности (Frykkgberg R.G., 2006). Потеря болевой и тактильной чувствительности является триггерным фактором формирования язвенного дефекта часто выступает травматизация кожи стопы инородными предметами, обувью и т.д. (Комелягина Е.Ю., 2007).

Вследствие высокой частоты развития резистентных язвенных дефектов количество ампутаций у больных СД составляет 3,83 на 1 тыс. больных СД в год, тогда как среди лиц без СД эта цифра в 10 раз меньше: 0,38 случаев на 1 тыс. человек в год (Гурьева И.В., 2001). Серьёзной социальной проблемой является высокая смертность при ампутации конечности при наличии СД, которая в ранний послеоперационный период (30 дней) может достигать 23% (Галстян Г.Р., 2007). Продолжительность жизни у больных СД после ампутации достоверно ниже, чем у пациентов без СД - через 3 года выживаемость в этой группе в среднем составляет 50%, через 5 лет – 40%. Таким образом, учитывая число больных СД в Российской Федерации, которое по официальным данным превышает 12 миллионов человек и продолжает расти, СДС представляет для нашей страны не только медицинскую, но и социальную проблему (Ashrafi M., 2015).

Клинические и морфологические исследования показали, что генная индукция ангиогенеза обеспечивает достоверное улучшение функционального состояния больных хронической ишемией нижних конечностей благодаря улучшению перфузии тканей за счёт индукции ангиогенеза и возрастания количества сосудов микроциркуляторного русла (Deev R.V., 2017). В отдельных экспериментальных работах показан эффект фармакологической васкуляризации с использованием генноопосредованного терапевтического ангиогенеза при повреждении периферических нервов и диабетической нейропатии, что создаёт предпосылки для применения данного метода у больных СДС с наличием как ишемического, так и нейропатического компонента. Мета-анализ клинических исследований различных генных конструкций с геном VEGF показал, что их применение не сопровождается увеличением частоты развития диабетической ретинопатии и ухудшения зрения (Деев Р.В., 2016). В совокупности с данными по фармакокинетике это позволяет рассматривать препарат на основе плазмидного вектора как локальный индуктор ангиогенеза, что даёт обоснование на оценку эффективности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза с целью улучшения репаративной регенерации тканей стопы при СДС.

Цель исследования – оценить эффективность применения генной индукции ангиогенеза для коррекции диабетической нейропатии у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Задачи исследования

1. Изучить влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на репаративную регенерацию в хирургической модели нейропатии.
2. Оценить патоморфологические изменения стенки сосудов периферического нерва у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.
3. Оценить безопасность применения генной индукции ангиогенеза у больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.
4. Улучшить результаты лечения больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы за счёт коррекции нейропатического компонента.
5. На основании полученных данных сформулировать и предложить научно-обоснованный алгоритм коррекции нейропатического компонента у больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.

Научная новизна. Впервые выполнена оценка безопасности и эффективности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза для коррекции нейропатического компонента у пациентов с синдромом диабетической стопы с целью улучшения результатов лечения (международный идентификатор клинического исследования: NCT03076138). Новизна разработанных в результате исследования подходов к коррекции нейропатии в

составе комплексного лечения нейроишемической формы синдрома диабетической подтверждена патентами на изобретение:

1. Ризванов А.А., Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Салафутдинов И.И., Исаев А.А., Деев Р.В., Бозо И.Я., Плакса И.Л. Кодон-оптимизированная рекомбинантная плазида, способ стимуляции регенерации периферического нерва, способ лечения повреждённого нерва человека. Дата приоритета: 16.09.2014. Патент РФ №2558294 от 27.07.2015.

2. Бродский И.Н., Деев Р.В., Плакса И.Л., Исаев А.А. Геннотерапевтический способ лечения синдрома диабетической стопы. Дата приоритета: 30.09.2015. Патент РФ № 2599507 от 15.09.2016.

3. Исаев А.А., Деев Р.В., Плакса И.Л., Ризванов А.А., Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Салафутдинов И.И., Бозо И.Я. Способ индукции регенерации периферического нерва. Дата приоритета: 14.10.16. Патент РФ № 2639175 от 20.12.2017.

Научно-практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления о значении ангиологического звена в патоморфогенезе диабетической нейропатии у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы. Результаты исследования могут быть использованы в разработке новых подходов к комплексному лечению нейроишемической формы синдрома диабетической стопы в формате клинических исследований на больших группах больных. Получены экспериментальные и клинические данные, которые служат предпосылкой к клиническому применению геннотерапевтической индукции ангиогенеза в лечении больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Современное комплексное лечение нейроишемической формы синдрома диабетической стопы не является исчерпывающим с позиции влияния на патогенез и клиническую симптоматику, что требует разработки дополнительных методов лечения.

2. Сосудистый компонент в патоморфогенезе нейропатии при нейроишемической форме синдрома диабетической стопы является одним из основных факторов патогенеза.

3. Генноопосредованная индукция ангиогенеза обеспечивает сокращение сроков реиннервации конечности, что, по данным экспериментальных исследований, выражается в увеличении количества осевых цилиндров в дистальном отрезке периферического нерва, улучшении показателей электронейромиографии и функционального статуса конечности.

4. Применение генноопосредованной индукции ангиогенеза у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы безопасно и не вызывает

развития местных, системных воспалительных реакций и новообразований в течение, как минимум, 6 месяцев после применения.

5. Генноиндуцированной ангиогенез у больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы, проходящих лечение в хирургических стационарах, является безопасным и эффективным, но требует проверки на больших группах. Показано, что внутримышечное введение pl-VEGFA обеспечивает снижение выраженности проявлений диабетической нейропатии, сокращение сроков заживления язвенного дефекта и увеличение кровообращения нижних конечностей.

Публикации и апробация диссертации. Основные положения диссертации были представлены и обсуждены 11 декабря 2018 года на совместном заседании кафедр сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии; онкологии; анатомии; хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО; общей хирургии; гистологии, патологической анатомии и медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №1 от 11.12.2018).

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на 6 международных и 11 всероссийских научных конференциях.

По теме исследования:

- выдано **3 патента** РФ на изобретения; на один из патентов РФ через стадию международной патентной заявки получены патенты Европы, Украины и решение о выдаче патента США;
- опубликовано **21 печатная работа**, из которых 2 - в журналах, входящих в международные цитатно-аналитические базы данных, 6 – в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России.

Вклад автора в проведенное исследование. Автор лично разработал протокол клинического исследования безопасности и эффективности генноопосредованной индукции ангиогенеза при синдроме диабетической стопы; принимал непосредственное участие в организации, проведении исследования и отборе пациентов. После включения больных в исследование выполнял динамическую оценку показателей диабетической нейропатии, раневого процесса, а также курировал выполнение комплекса лечебных мероприятий, которые предусмотрены клиническими рекомендациями по ведению пациентов с синдромом диабетической стопы. Непосредственно участвовал в регистрации нежелательных явлений после применения геннотерапевтической конструкции.

Лично провёл морфологическое исследование патогистологических изменений тканей у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы. Участвовал в организации и выполнении экспериментальных исследований, в оперировании лабораторных животных, их послеоперационном наблюдении, последующем выведении из эксперимента, извлечении фрагментов седалищного нерва, а также непосредственно выполнял гистологическое исследование экспериментального материала. Автор провел качественную и количественную оценку данных результатов нейрофизиологических и функциональных тестов, гистологических препаратов, включая гистоморфометрический анализ, выполнил статистический обработку полученных результатов, участвовал в их интерпретации, принимал активное участие в написании тезисов научных работ, научных статей (оригинальные исследования и обзоры), заявок на выдачу патентов на изобретения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, экспериментальной, морфологической и клинической частей с изложением и оценкой результатов собственных исследований, глав, посвященных оценке эффективности и безопасности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза у пациентов с синдромом диабетической стопы, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 24 отечественных и 209 зарубежных источников. Материал иллюстрирован 41 рисунком и 15 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В диссертационной работе выполнен анализ применения геннотерапевтической конструкции, являющейся сверхскрученной формой плазмиды pI-VEGFA, кодирующей эндотелиальный сосудистый фактор роста изоформы VEGF165, для улучшения результатов лечения пациентов с СДС (рис. 1). Примененная генная конструкция является действующим веществом лекарственного препарата «Неоваскулген» (ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», РУ ЛП-000671 от 28.09.11). Непосредственно препарат представляет собой стерильный лиофилизат, который растворяется водой для инъекций в объеме 2 мл. После введения в ткани реципиента генные конструкции поступают в клетки, что приводит к синтезу терапевтического белка самой клеткой. Произведенный клеткой терапевтический белок, кодируемый поступившей генной конструкцией, обеспечивает характерный для него биологический эффект – индукция ангиогенеза в зоне введения.

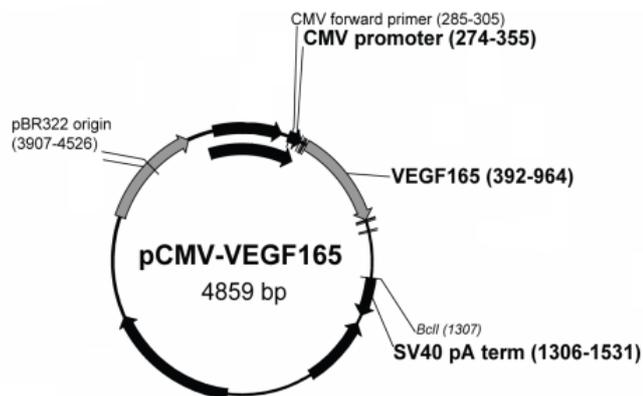


Рис. 1. Схема плазмидной ДНК с геном *VEGFA*.

Диссертационное исследование состояло из трёх частей – экспериментальной, клинико-морфологической и клинической. Экспериментальный раздел диссертационного исследования выполнен в два этапа. В ходе первого этапа проводилась оценка специфической ангиогенной активности рI-*VEGFA* в модели хорионаллантоисной мембраны (ХАМ), которая является провизорным органом у птиц и выполняет функции жизнеобеспечения эмбриона, путём помещения стерильного бумажного фильтра содержащего рI-*VEGFA* на её поверхность и последующего изготовления из ХАМ препаратов для световой и электронной микроскопии. В ходе второго этапа выполнялась оценка влияния рI-*VEGFA* на эффективность репаративной регенерации седалищного нерва в хирургической модели нейропатии на животных (крысы породы Вистар). При этом использовались две модели - перерезка седалищного нерва с последующим сшиванием («перерезка-сшивание») и аутонервная вставка («аутонервная вставка»). рI-*VEGFA* вводилась непосредственно в седалищный нерв после восстановления его целостности. Для оценки эффекта рI-*VEGFA* применялось гистологическое исследование с оценкой плотности осевых цилиндров в дистальном фрагменте пересечённого нерва на сроках 30 и 60 суток, а также оценивалась функция конечности на сроках 15; 30; 45; 60 суток.

Во второй части исследования была выполнена морфологическая оценка структурных изменений периферических нервов у пациентов с СДС с целью определения точек приложения для применения генноопосредованной индукции ангиогенеза рI-*VEGFA*. В качестве модельного объекта для оценки паттерна поражения микроциркуляторного русла периферических нервов у пациентов с СД был выбран икроножный нерв. Материалом для исследования являлись фрагменты икроножного нерва, костей предплюсны, окружающие их мягкие ткани больных нейропатической формой СДС, которые были получены в ходе корректирующей остеотомии или ампутации конечности на уровне нижней трети голени вследствие утраты опорной функции.

Третий раздел включал проведение клинического исследования по оценке безопасности и эффективности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза р1-VEGFA у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы. Исследование было спланировано как интервенционное, двуцентровое, проспективное, неконтролируемое, неослепленное. Все больные перед включением в исследование были информированы о целях и задачах исследования, потенциальной пользе от участия и возможных рисках (международный идентификатор на ClinicalGovTrial: NCT02538705). Препарат сохранялся в виде лиофилизата, который разводился в 5 мл воды для инъекций непосредственно перед применением. Раствор вводился внутримышечно, в мышцы голени, двукратно, по 1,2 мг с интервалом в 14 дней (суммарная доза 2,4 мг), в ходе 4-5 инъекций (согласно инструкции по применению). Пациенты получали стандартную комплексную терапию в соответствии с «Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» по ведению нейроишемической формы СДС, включавшую применение разгрузки конечности в виде ношения профилактической и ортопедической обуви для больных диабетом, местного лечения, контроля гликемии и т.д. Продолжительность исследования составила 6 месяцев с контрольными сроками обследования: при включении в исследование, на 14, 30, 90 и 180 сутки. Оценка безопасности осуществлялась на протяжении всех 6 месяцев путем регистрации нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений. Для оценки влияния ангиогенной терапии на выраженность диабетической нейропатии в динамике были использованы стандартные шкалы нейропатического симптоматического счёта (НСС), нейропатического дисфункционального счёта (НДС), а также Мичиганский опросник для скрининга нейропатии. Для оценки динамики раневого процесса осуществлялось измерение площади язвенного дефекта при помощи планиметрического исследования по методике В.Ф. Хотиняна - на язвенный дефект накладывалась стерильная пленка целлофана, на которой затем обозначались контуры язвы. Затем определение площади дефекта с использованием миллиметровой бумаги производилось по следующей формуле: $S=L/4-K-C$, где S - площадь язвы; L - периметр язвы; K - коэффициент регрессии (для ран близких по форме к квадратным - 1,013, для ран с неправильными контурами - 0,62); C - константа (для ран близких по форме к квадратным - 1,29, для ран с неправильными контурами - 1,016). Для выявления различий между измерениями показателей в разное время с учетом небольшой величины выборок применили критерий Уилкоксона, оценивающий медианную разность двух выборок, с уровнем значимости 0,05.)

Результаты исследования

Генноопосредованная ангиогенная индукция в эксперименте *in vivo*. При анализе специфической активности плазмидной ДНК с геном эндотелиального сосудистого фактора роста в модели хорион-аллантаисной мембраны было показано, что введение экзогенного гена VEGFA сопровождается изменениями формы эндотелиальных клеток сосудов ХАМ, появлением повышенной складчатости мембраны, формированием большого числа отшнуровывающихся мембранных везикул. В увеличивающихся объёмах цитоплазмы получает развитие гранулярный эндоплазматический ретикулум, являющийся плацдармом для синтеза экспортных белковых продуктов. Эти изменения соответствуют эффектам VEGF в тканях, а именно – запуск миграции эндотелия, синтез им различных веществ, направленных на рост и развитие сосудистой сети. В совокупности выявленные структурные изменения сосудистой стенки при воздействии pl-VEGFA позволяют рассматривать данную геннотерапевтическую конструкцию как локальный индуктор ангиогенеза.

При оценке влияния генноопосредованной индукции ангиогенеза на репаративный нейрогенез в хирургической модели нейропатии седалищного нерва было показано, что применение генноопосредованной индукции ангиогенеза на обоих сроках после травмы сопровождалось достоверным увеличением плотности осевых цилиндров в дистальном фрагменте периферического нерва. На сроке 60 суток прирост показателя по сравнению с группой контроля был более выражен – на 25% и 57% соответственно, что может свидетельствовать о нарастании репаративного нейрогенеза при индукции роста и развития сосудов (табл. 1). Аналогичная тенденция была обнаружена у животных в модели «аутонервная вставка» - введение pl-VEGFA обеспечило достоверное увеличение плотности осевых цилиндром дистальнее аутовставки на обоих сроках (табл. 2), несмотря на наличие двух анастомозов. Таким образом, введение pl-VEGFA в хирургической модели нейропатии сопровождалось увеличением количества осевых цилиндров дистальнее места повреждения.

Таблица 1

Морфометрические показатели седалищного нерва в модели «перерезка-сшивание»

Параметр	Межгрупповые различия				Внутригрупповые различия	
	30 суток		60 суток		Контроль	pl-VEGFA
	Контроль	pl-VEGFA	Контроль	pl-VEGFA		
Плотность осевых цилиндров (кол-во/мм ²)	105±24	132±18 p=0,024	134±19	211±32 p=0,08	p=0,021	p=0,017

Морфометрические показатели седалищного нерва в модели «аутонервная вставка»

Параметр	Межгрупповые различия				Внутригрупповые различия	
	30 суток		60 суток		Контроль	pl-VEGFA
	Контроль	pl-VEGFA	Контроль	pl-VEGFA		
Плотность осевых цилиндров (кол-во/мм ²)	69±13	91±18 p=0,014	78±19	124±18 p=0,018	p=0,035	p=0,014

Обнаруженные положительные изменения от введения pl-VEGFA на структурном уровне коррелировали с показателями функции конечности в обеих хирургических моделях. В модели «перерезка-сшивание» введение pl-VEGFA сопровождалось сокращением срока начала восстановления показателя седалищно-функционального индекса (schiatric functional index - SFI) - уже на 14 сутках показатель функциональной активности конечности был достоверно выше, чем в группе контроля. Достоверность различий показателей сохранялась на сроках 30 и 45 суток, однако на сроке 60 суток показатели SFI в обеих группах были сопоставимы. В отличие от модели «перерезка-сшивание» в модели «аутонервная вставка» сопровождалось более отсроченным эффектом - достоверные различия показателей индекса SFI были выявлены на сроках 30 и 45 суток, в то время как на сроке 14 суток сохранялось выраженное нарушение функции конечности, как после введения воды для инъекций, так и после введения pl-VEGFA (рис. 2).

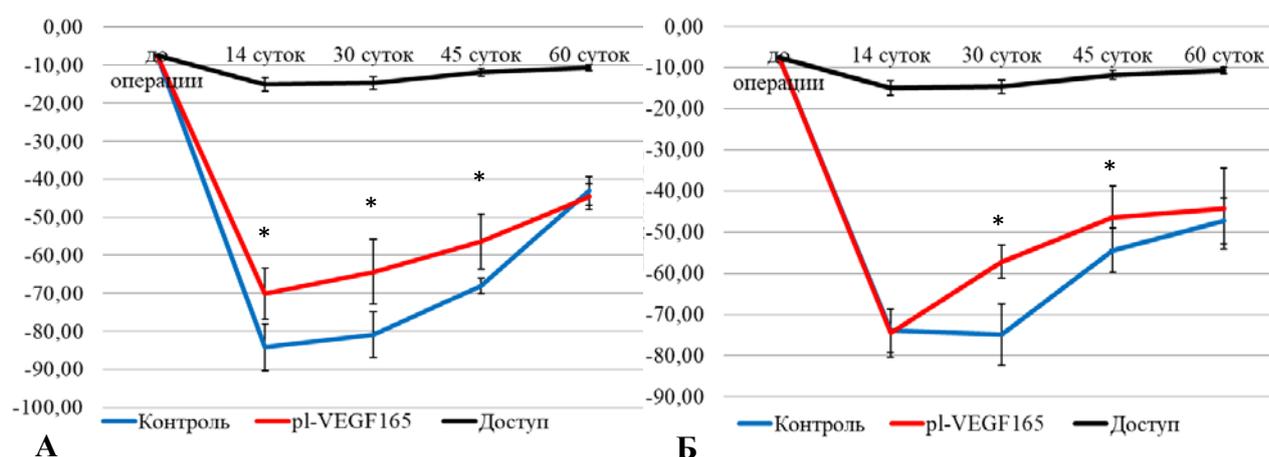


Рис. 2. Динамика изменения индекса SFI в течение 60 суток после пересечения седалищного нерва: А - в модели «перерезка-сшивание»; Б - в модели «аутонервная вставка». * - различия при сравнении с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$.

Клинико-морфологическая характеристика тканей стопы у больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы. Было показано, что наиболее распространёнными изменениями сосудов микроциркуляторного русла *p. suralis* пациентов с СДС является утолщение базальной мембраны и гиперплазия эндотелия, что становится причиной полной окклюзии просвета. Электроннограммы свидетельствуют о разрыхленности базальной мембраны капилляров, что способствует развитию паравазального отека. При этом часть эндотелиоцитов находится в состоянии выраженных изменений, часть из которых является обратимыми (рис. 3). Необратимые изменения эндотелия проявляются наличием фрагментированных клеток, клеток с гомогенизированной цитоплазмой. На фоне патогистологических изменений сосудов определяются выраженные атрофические и дегенеративные изменения в структуре нервных волокон нерва. При оценке всей площади поперечного среза отмечается диффузное снижение количества толстых миелиновых волокон, сопровождающиеся разрастанием соединительной ткани, формирующей широкие перегородки. Среди наиболее распространённых изменений следует выделить расслоение миелина, полную или частичную потерю миелина на одной из поверхностей осевого цилиндра, нарушение упорядоченности его слоев. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ведущим патоморфологическим компонентом в развитии neuropathии у пациентов с СДС являются выраженные изменения в стенке сосудов микроциркуляторного русла, приводящие к снижению перфузии и нарушению процессов репаративного гистогенеза тканей. Ввиду этого применение *pl-VEGFA* у пациентов с СДС с целью коррекции neuropathии является патогенетически обоснованным.

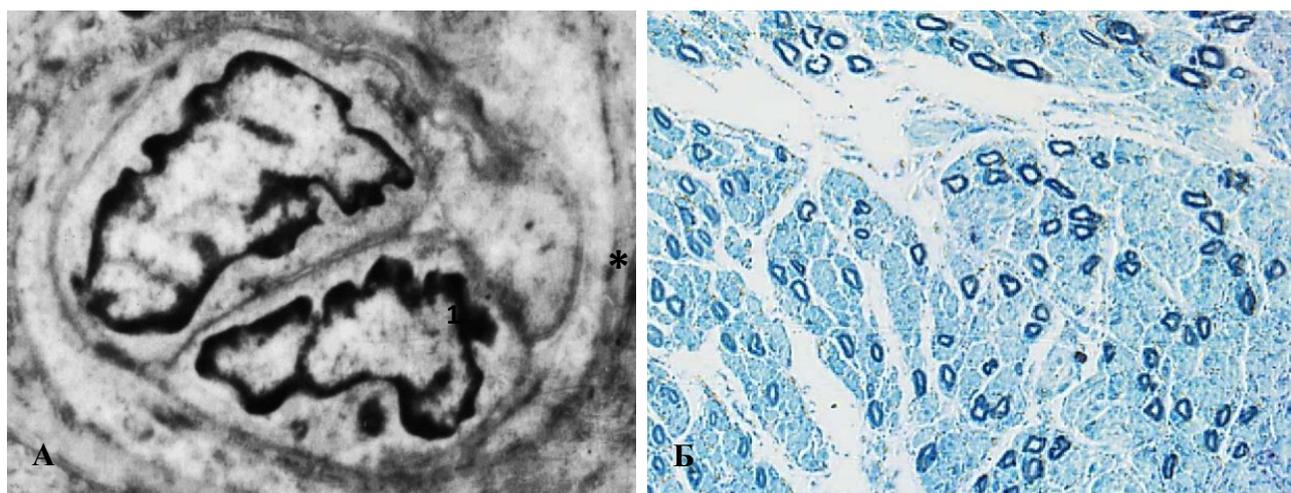


Рис. 3. Икроножный нерв у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы: А - сосуд микроциркуляторного русла с отсутствием просвета ввиду гиперплазии эндотелия и утолщения базальной мембраны; Б – мозаичная демиелинизация и частичная утрата осевых цилиндров (полутонкий срез). Окраска: А - трансмиссионная электронная микроскопия; Б – толуидиновый синий. Ув.: А × 3000; Б × 20.

Результаты клинического исследования безопасности и эффективности.

Полученные результаты экспериментальных исследований и выработанные научно обоснованные рекомендации заложили основы для первого клинического исследования генноопосредованной индукции ангиогенеза при СДС. Все пациенты перед включением в исследование были информированы о целях и задачах исследования, потенциальной пользе от участия и возможных рисках, а также подписывали добровольное информированное согласие. Выбор открытого дизайна был обусловлен тем, что *pl-VEGFA* является генным препаратом, безопасность которого в отношении пациентов с диабетической стопой ранее не была доказана. Средний возраст ($n=35$) включенных в клиническое исследование составил $62,8 \pm 8,7$ лет. Средняя продолжительность существования язвенного дефекта до включения в исследование составила $3,4 \pm 0,6$ месяца, что свидетельствует о хроническом течении раневого процесса и устойчивости к проведению комплексного лечения (табл. 3).

По глубине поражения среди больных преобладала 2 стадия по Вагнеру, что соответствует раневому дефекту, с поражением кожи, подкожной жировой клетчатки, сухожилий, но без повреждения кости - эта стадия определялась у 66% больных. У остальных 34% пациентов была 1 стадия поражения. Средняя площадь язвенного дефекта на момент включения в клиническое исследование составила $5,18 \pm 1,4$ см². По локализации язвенных дефектов преобладали больные с расположением язвенного дефекта на подошве стопы, которых было 40% (табл. 3). Среди участников исследования было 10 пациентов (29%), у которых язвенный дефект располагался в области пятки.

Все пациенты имели длительный анамнез СД 2 типа – в среднем $11,9 \pm 3,9$ лет, что определило наличие у них выраженных структурных изменений сосудистой стенки дистального кровеносного русла и наличие в структуре нейроишемической формы СДС ишемического компонента. Распределение по уровню окклюзии было следующим: проксимальное поражение - у 21 пациента (60%), дистальная окклюзия - у 8 (23%), мультифокальное поражение – 6 (17%). У подавляющего большинства пациентов атерокальциноз, что выражалось исходно высокими показателями ЛПИ. У 22 из 35 до включения в исследование ранее уже было выполнено минимум одно хирургическое вмешательство на сосудах нижних конечностей с целью коррекции ишемического компонента СДС и заживления язвенного дефекта (рис. 4). Однако, к моменту включения в исследование характер поражения магистральных артерий был таков, что не обеспечивал техническую возможность выполнения открытого и/или эндоваскулярного оперативного вмешательства. Таким образом, возможность хирургической коррекции язвенных дефектов путём воздействия на сосудистый компонент у пациентов, включённых в исследование, отсутствовала и была ограничена лишь применением консервативной терапии.

Исходные показатели пациентов, включённых в исследование.

Показатель	Значение
Число пациентов, n	35
Средний возраст, лет	62,8±8,7
Продолжительность СД, лет	11,9±3,9
НСС, Ед	6,37±0,29
НДС, Ед	10,5±0,91
Мичиганский опросник нейропатии	7,67±0,62
Продолжительность существования язвенного дефекта до включения в исследование, месяц	3,4±0,6
Площадь язвенного дефекта, см ²	5,18±1,4
Подошва	21 (60%)
Тыл	4 (28%)
Пяточная область	10 (12%)
Стадия язвенного дефекта по Вагнеру	
I	12 (34%)
II	23 (66%)
ЛПИ, Ед	0,96±0,09
ТКНК, мм ртст	35,3±1,36

Примечания: НСС – нейропатический симптоматический счёт; НДС – нейропатический дисфункциональный счёт; ТКНК – транскутанное напряжение кислорода; ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

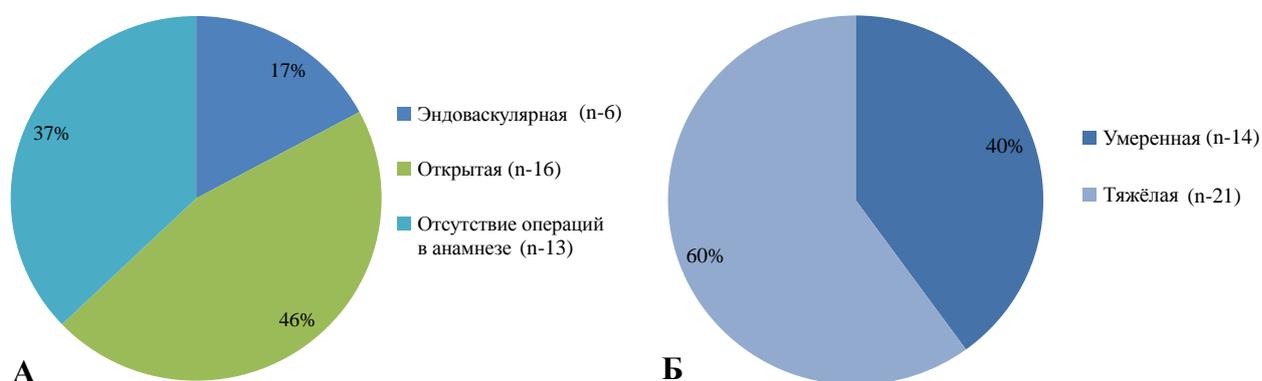


Рис. 4. А. Распределение пациентов по наличию оперативных вмешательств на сосудистом русле в анамнезе. Б. Общее распределение пациентов по степени тяжести нейропатического компонента согласно показателям нейропатического дисфункционального счёта (НДС).

У всех пациентов при включении в исследовании была выявлена ДН умеренной и тяжёлой степени выраженности. Это выражалось в широком спектре нарушения болевой, тактильной, температурной и вибрационной чувствительности, что отражает наличие у них структурных нарушений всех видов нервных волокон. Степень выраженности и распространённость процесса отражают показатели НДС (рис. 4).

Нарушение иннервации и процессов репаративного гистогенеза тканей в области язвенного дефекта коррелировало со снижением показателей ТКНК - средний показатель в исследуемой выборке составил $35,3 \pm 1,36$ мм рт ст. Средний показатель ЛПИ $0,96 \pm 0,09$ при достоверном наличии гемодинамически значимого стеноза периферических артерий, по-видимому, отражает наличие исходно у пациентов данной категории выраженного кальциноза сосудов, также известного как медиакальциноза Менкеберга.

Двукратное внутримышечное введение раствора рI-*VEGFA* по 1,2 мг с интервалом в 14 дней в мышцы голени не сопровождалось развитием нежелательных, негативных явлений или осложнений местного либо системного характера. Введение препарата было безболезненным, не требовало местного обезболивания. О краткосрочной безопасности судили по изменениям показателей общего анализа крови, биохимического анализа крови, общего анализа мочи, коагулограммы. Параметры общего и биохимического анализов крови и коагулограммы не имели достоверных изменений на протяжении всех 6 месяцев наблюдения, предусмотренных протоколом исследования. Развития опухолей, нарушения зрения и иные патологические состояния, которые могли бы косвенно свидетельствовать об осложнениях генноопосредованной индукции ангиогенеза зарегистрировано не были выявлены на всех сроках обследования.

Трём пациентам была выполнена ампутация нижней конечности на уровне бедра (большая ампутация) и двум – в пределах стопы (малая ампутация) (табл. 4). Две из трёх больших ампутации были выполнены вследствие прогрессирования ишемии на фоне выраженным структурных изменениях сосудистой стенки дистального артериального русла и невозможностью выполнения реваскуляризирующей операции, в одном случае – вследствие развития острого артериального тромбоза. Эти осложнения являлись естественным исходом длительно текущего заболевания и не связаны с применением генноопосредованной индукции ангиогенеза. Таким образом, сохранность целевой конечности к концу 6 месяца наблюдения составила 81,4%. В обоих случаях ампутация конечности в пределах стопы была обусловлена развитием инфекционных осложнений раневого процесса (флегмона). В совокупности это позволяет сделать вывод о том, что ни одно из нежелательных явлений не имеет достоверной связи с применением генноопосредованной индукции ангиогенеза.

Распределение серьёзных нежелательных явлений

Параметр	Количество (абсолютные значения)	Количество (относительное количество)
Большие ампутации	3	8,6%
Малые ампутации	2	5,8%
Онкологические заболевания	-	0%
Сердечно-сосудистые осложнения	-	0%

Введение *pl-VEGFA* сопровождалось достоверным снижением выраженности проявлений нейропатии по шкале НСС. За весь период наблюдения количество пациентов с наиболее выраженными проявлениями нейропатии (жжение, онемение, покалывание) снизилось на 40% - с 28 до 14. При этом наиболее выраженное снижение проявлений нейропатии наблюдалось в период наблюдения с 30 до 90 суток, что может отражать отсроченное действие *pl-VEGFA* по мере экспрессии и накопления целевого белка. Одновременно со снижением выраженности симптомов нейропатии, у пациентов также определялось уменьшение распространённости симптомов на наиболее дистальный сегмент нижней конечности – количество больных, которые отмечали на входе в исследование судороги на уровне стопы снизилось за всё время наблюдения с 24 (69%) до 6 (17%). Как и в случае с выраженностью нейропатического компонента у пациентов с СДС, наиболее выраженный терапевтический эффект по данному показателю наблюдался в период с 30 по 90 сутки (табл. 5).

Снижение общей выраженности и распространённости симптомов нейропатии коррелировало с тем, что частота ночных проявлений вышеописанных жалоб снизилась в 2 раза – к концу исследования большая часть пациентов (61%) отмечала появление судорог и парестезий лишь в дневное время, что безусловно отражает общее снижение выраженности проявлений нейропатии. Комплексный анализ компонентов НСС показал, что при применении *pl-VEGFA* в составе комплексного лечения сопровождалось достоверным снижением среднего показателя к концу исследования с 6,8 до 4,5 ($p=0,012$), что отражает снижение выраженности нейропатии.

Динамика показателей шкалы нейропатического счёта (НСС)

Критерий		Исходно	30 сут	90 сут	180сут
Жалобы	Жжение, онемение, покалывание (2 балла)	28 (80%)	25 (71%)	16 (45%)	14 (40%)
	Утомляемость, судороги, боль (1 балл)	7 (20%)	10 (29%)	15 (43%)	13 (37%)
	Отсутствие жалоб (0 баллов)	0 (0%)	0(0%)	4(12%)	8 (23%)
Локализация	Стопа (2 балла)	24 (69%)	21 (60%)	10 (28%)	6 (17%)
	Икры (1 балл)	10 (28%)	12 (34%)	23 (66%)	27 (77%)
	Другая (0)	1 (3%)	2 (6%)	2 (6%)	2 (6%)
Время появления симптомов	Ночью (2 балла)	14 (40%)	13 (37%)	9 (25%)	7 (20%)
	Днём и ночью (1 балл)	13 (37%)	11 (31%)	8 (23%)	7 (20%)
	Днём (0 баллов)	3 (9%)	7 (20%)	17 (49%)	21 (60%)
	Сразу после пробуждения (1 балл)	5 (16%)	4 (11%)	1 (3%)	0 (0%)
Уменьшение симптомов	При ходьбе (2)	23 (66%)	21 (60%)	14 (40%)	12 (34%)
	Сидя (1)	10 (28%)	9 (26%)	6 (17%)	5 (14%)
	Стоя (0)	2 (6%)	5 (14%)	15 (43%)	18 (52%)

Необходимо отметить, что динамика снижения показателя НСС была неоднородна в течение всего исследования – наиболее выраженный терапевтический эффект был достигнут в период с 30 по 90 сутки, что, по-видимому, отражает отсроченное действие *pl-VEGFA*, которое становится детектируемым по мере накопления в клетках VEGF и реализации ангиогенеза. Двукратное введение *pl-VEGFA* обеспечило снижение проявлений ДН, что выражалось достоверным улучшением показателя НДС с 14,5 до 7,6 ($p=0,002$). Как и в случае НСС динамика изменения показателя НДС была неоднородна в течение всего исследования и характеризовалась достижением наибольшего терапевтического эффекта в интервале с 30 по 90 сутки. Селективный анализ различных видов чувствительности, которые являются компонентами оценки НДС, показал, что применение *pl-VEGFA* обеспечило улучшение всех видов чувствительности, однако влияние на каждую из них было неоднородно.

Наиболее выраженные изменения показателей наблюдались в индексах температурной и тактильной чувствительности – в обоих случаях различия показателей к концу исследования достигли статистической достоверности. Несмотря же на наличие положительной динамики показателей индексов болевой и вибрационной чувствительности различия не достигли статистической достоверности (табл. 6). Применение *pl-VEGFA* также обеспечило частичное восстановление рефлексов. Наиболее выраженный терапевтический эффект был достигнут в отношении коленного рефлекса – различия значений показателей достигли уровня статической достоверности на 90 сутки. Напротив, несмотря на положительную динамику показателей индекса ахиллова рефлекса различия значений не достигли достоверной значимости. Выявленные различия динамики показателей рефлексов могут быть обусловлены различной длиной нервных волокон – известно, что при ДН у больных СДС наиболее выраженным структурным изменениям подвергаются более длинные аксоны нейронов. Таким образом, положительное влияние от введения *pl-VEGFA* выразалось не только улучшением чувствительности кожи, что является важным фактором предотвращения развития язвенных дефектов, но и способствовало восстановлению рефлексов. Учитывая, что утрата ахиллова рефлекса у больных ДН является одним из факторов риска развития язвенных дефектов в будущем, положительный эффект *pl-VEGFA* может иметь важную роль в рамках профилактики развития их у больных в будущем.

Таблица 6

Динамика индекса разных видов чувствительности. * – внутригрупповые различия с исходным показателем статистически значимы, $p < 0,05$.

Вид чувствительности	Исходно	30 суток	90 суток	180 суток
Температурная	3,2	3,1	2,3	2,1*
Болевая	2,5	2,4	2,0	2,2
Тактильная	3,1	2,8	2,4	1,8*
Вибрационная	2,2	2,0	2,0	1,9

Динамическая оценка субъективного восприятия выраженности симптомов нейропатии показала, что применение генноопосредованной индукции ангиогенеза обеспечило снижение выраженности жалоб, что отражает динамика показателя Мичиганского опросника нейропатии – к концу 6 месяца средний его значение снизилось с 7,6 до 4,4 ($p=0,012$). Это сопровождалось улучшением перфузии тканей стопы, что проявлялось в возрастании напряжения кислорода с $35,3 \pm 1,36$ до $41,0 \pm 1,26$ мм рт ст ($p=0,043$), при этом наибольший прирост наблюдался в течение первых трёх месяцев. ЛПИ к концу исследования возрос на 20% с $0,96 \pm 0,09$ до $1,16 \pm 0,09$ ($p=0,132$). Несмотря на наличие у

всех пациентов выраженного ишемического компонента вследствие поражения дистального кровеносного русла, данный показатель изначально почти соответствовал нормальному значению, что может быть связано с кальцинозом сосудистой стенки.

К концу первого месяца после введения первой дозы рI-VEGFA у 68% пациентов (n=24) отмечалось уменьшение площади менее чем на 30%, при этом среднее значение снизилось с $4,77 \pm 1,21 \text{ см}^2$ до $4,42 \pm 1,22 \text{ см}^2$ ($p=0,074$). В течение следующих двух месяцев у большей части больных отмечалась положительная динамика репаративной регенерации тканей в области язвы, что привело к полному заживлению ран у 42% больных (n=15). Средний показатель площади язвенного дефекта к концу 3 мес. сократился в среднем на 53% - с $4,77 \pm 1,21 \text{ см}^2$ до $2,22 \pm 0,65 \text{ см}^2$ ($p=0,012$), к концу исследования на 83% (до $1,28 \pm 0,36 \text{ см}^2$, $p=0,008$). Средняя скорость заживления на протяжении всего исследования составила $2,2 \text{ мм}^2/\text{сутки}$. При этом скорость заживления в течение первых 30 суток была $1,1 \text{ мм}^2/\text{сутки}$, с последующим увеличением до $3,6 \text{ мм}^2/\text{сутки}$ с 30 до 90 суток. Начиная с 90 суток было отмечено снижение скорости заживления до $1,5 \text{ мм}^2/\text{сутки}$. Учитывая продолжительное время существования раны до включения в исследование, такая тенденция сокращения площади свидетельствует об изменении условий репаративной регенерации тканей (табл. 7).

Таблица 7

Динамика заживления язвенного дефекта

Исход лечения	1 месяц n (%)	3 месяца n (%)	6 месяцев n (%)
Полное заживление	1 (2,8%)	15 (42%)	23 (65,7%)
Уменьшение площади на 70%	4 (11,4%)	4 (11,4%)	3 (8,5%)
Уменьшение площади на 50%	2 (5,8%)	5 (14,2%)	0 (0%)
Уменьшение площади менее 50%, но более 30%	2 (5,7%)	3 (8,5%)	1 (2,9%)
Уменьшение площади менее 30%	24 (68,5%)	6 (17%)	3 (8,5%)
Увеличение площади	2 (5,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Ампутация выше колена	0 (0%)	1 (2,8%)	2 (8,6%)
Малая ампутация в пределах стопы	0 (0%)	1 (2,8%)	2 (5,8%)

Таким образом, применение *pl-VEGFA* в составе комбинированного лечения позволило добиться полного закрытия ран у 66% пациентов (n=23), несмотря на длительное предшествующее существование язвенного дефекта на фоне проведения стандартного комплексного лечения. При этом заживление большей части из них (n=15) наблюдалось на сроке 3 месяца. Напротив, отсутствие положительного эффекта к этому времени являлось неблагоприятным прогностическим фактором – как правило, у этой категории больных открытая рана сохранялась и к концу исследования или им была выполнена ампутация. Это коррелировало с показателями ТКНК, что отражает улучшение условий репаративной регенерации на фоне индукции ангиогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Индукция ангиогенеза в области регенерации периферического нерва в хирургической модели нейропатии приводит к оптимизации условий репаративного процесса, что выражается в достоверным увеличении количества осевых цилиндров в дистальном отрезке периферического нерва, менее выраженном сдвиге состава поперечнополосатых скелетных мышечных волокон и более раннем восстановлении функции нижней конечности в эксперименте.
2. Патоморфологические изменения сосудистой стенки капилляров нерва у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы выражались в утолщении базальной мембраны, окклюзии просвета сосудов, пролиферацией эндотелиоцитов, что сопровождалось массивной мозаичной демиелинизацией, диффузным снижением количества осевых цилиндров, а также дистрофическими изменениями и гибелью лейкоцитов в периферическом нерве.
3. Применение генной индукции ангиогенеза периферического нерва при диабетической нейропатии у больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы безопасно и не приводит к развитию осложнений в течение 6 месяцев после введения *pl-VEGFA*.
4. При местном введении *pl-VEGFA* пациентам с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы отмечается снижение выраженности диабетической нейропатии, что проявляется достоверным улучшением показателей нейропатического симптоматического счёта, нейропатического дисфункционального счёта, а также Мичиганского опросника нейропатии.
5. Алгоритм лечебно-диагностической помощи больным при невозможности хирургической коррекции макроангиопатии должен включать коррекцию нейропатического компонента за счёт индукции ангиогенеза в нерве и периневральных тканях.

Практические рекомендации

1. Генноопосредованная индукция ангиогенеза рI-VEGFA обеспечивает оптимизацию условий репаративной регенерации периферических нервов, что может быть использовано для улучшения результатов лечения пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.
2. Одним из компонентов комплексного лечения больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы должно быть восстановление кровообращения в периферических нервах посредством генноопосредованной индукции ангиогенеза рI-VEGFA при невозможности выполнения хирургического или эндоваскулярного вмешательства на артериях конечности для восстановления магистрального кровотока.
3. Генноопосредованная индукция ангиогенеза должна выполняться у больных нейроишемической формой синдрома диабетической стопы посредством двукратного введения по 1,2 мг с интервалом в 14 суток внутримышечно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патенты на изобретения

1. Ризванов А.А., Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Салафутдинов И.И., Исаев А.А., Деев Р.В., Бозо И.Я., Плакса И.Л. Кодон-оптимизированная рекомбинантная плазида, способ стимуляции регенерации периферического нерва, способ лечения повреждённого нерва человека. Дата приоритета: 16.09.2014. Патент РФ №2558294 от 27.07.2015.
2. Бродский И.Н., Деев Р.В., Плакса И.Л., Исаев А.А. Геннотерапевтический способ лечения синдрома диабетической стопы. Дата приоритета: 30.09.2015. Патент РФ № 2599507 от 15.09.2016.
3. Исаев А.А., Деев Р.В., Плакса И.Л., Ризванов А.А., Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Салафутдинов И.И., Бозо И.Я. Способ индукции регенерации периферического нерва. Дата приоритета: 14.10.16. Патент РФ № 2639175 от 20.12.2017.

Научные статьи

1. Плакса И.Л., Бозо И.Я., Краковский М.М., Исаев А.А., Деев Р.В. Морфофункциональная характеристика сердца после генной индукции ангиогенеза в модели инфаркта миокарда / И.Л. Плакса // Вопросы морфологии 21 века. — 2015. — №4. — С. 159-165.
2. Деев Р.В., Плакса И.Л., Чекмарёва И.А., Галстян Г.Р., Сучков И.А., Матвеев С.А. Патогистологические изменения тканей стопы у пациентов с терминальными формами диабетической ангио-нейропатии / Р.В. Деев // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. —2016. — Т.11(2). — С. 69 — 75.

3. Деев Р.В., Плакса И.Л., Матвеев С.А. Генная терапия диабетической нейропатии / Р.В. Деев // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. — 2015. — №1. — С. 129-134.
4. Насыбуллина Д.Д., Тимурханов И.М., Плакса И.Л., Чекмарева И.А., Мжаванадзе Н.Д., Деев Р.В., Крылов А.А. Патологическая гистология «стопы Шарко» / Д.Д. Насыбуллина // Наука молодых. — 2016. — С. 14 —26.
5. Деев Р.В., Калинин Р.Е., Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Плакса И.Л., Мжаванадзе Н.Д., Поздеев Д.В., Далгатов Г.Д., Исаев А.А. Отдаленные результаты применения рl-VEGF165 при хронической ишемии нижних конечностей вследствие облитерирующего атеросклероза / Р.В. Деев // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. — 2015. — №4. — С. 43-49.
6. Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе, А.А. Крылов, И.Л. Плакса, А.А. Исаев, Р.В. Деев Регенеративные технологии в лечении синдрома диабетической стопы / Р.Е. Калинин // Гены & Клетки. — 2017. — 12(1). — С. 15-26.
7. Деев Р.В., Плакса И.Л., Бозо И.Я., Мжаванадзе Н.Д., Сучков И.А., Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Калинин Р.Е., Исаев А.А., Матвеев С.А. Результаты 5-летнего наблюдения за пациентами с заболеваниями периферических артерий после генной терапии / Р.В. Деев // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. — 2018. — №3. — С. 61-66.
8. Deev R., Plaksa I., Bozo I., Isaev A. Results of an international postmarketing surveillance study of pl-VEGF165 safety and efficacy in 210 patients with peripheral arterial disease / R. Deev // Am J Cardiovasc Drugs. — 2017. — Vol. 17(3). — P. 235–242.
9. Deev R.V., Plaksa I.L., Bozo I.Y., Isaev A.A. Results of 5-year follow-up study in patients with peripheral artery disease treated with PL-VEGF165 for intermittent claudication / R.V. Deev // Ther Adv Cardiovasc Dis. — 2018. — Vol. 12(9). — P. 237–246.

Список использованных сокращений

ДН – диабетическая нейропатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

СД – сахарный диабет

СДС – синдром диабетической стопы

рl-*VEGFA* – плазмидная ДНК, несущая ген сосудистого эндотелиального фактора роста-А165

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста