

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. академика И.П. ПАВЛОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Плакса Игорь Леонидович

Генноопосредованная индукция ангиогенеза для коррекции  
диабетической нейропатии у пациентов с синдромом  
диабетической стопы

14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор Калинин Роман Евгеньевич

Научный консультант:  
кандидат медицинских наук, доцент Деев Роман Вадимович

Рязань – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
1.1. Патоморфогенез нейропатии при хирургических заболеваниях.....	25
1.1.1 Диабетическая нейропатия при синдроме диабетической стопы.....	25
1.1.2 Нейропатия при повреждении периферических нервов.....	29
1.1.3. Сосуды периферических нервов как точка приложения для коррекции нейропатического компонента хирургических заболеваний.....	33
1.2 Доклинические исследования рекомбинантного эндотелиального сосудистого фактора роста.....	35
1.2.1. Модель диабетической нейропатии.....	35
1.2.2. Хирургическая модель нейропатии.....	38
1.3. Генноопосредованная индукция ангиогенеза для коррекции нейропатии при хирургической патологии.....	40
1.3.1. Доклинические исследования.....	41
1.3.2. Клинические исследования.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.1. Характеристика генной конструкции.....	50
2.2. Анализ генноопосредованной индукции ангиогенеза в эксперименте <i>in vivo</i> .....	53
2.2.1. Оценка специфической активности плазмидной ДНК с геном эндотелиального сосудистого фактора роста в модели хорион-аллантоисной мембраны.....	53
2.2.2. Оценка генноопосредованной индукции ангиогенеза плазмидной ДНК с геном VEGFA в хирургической модели нейропатии седалищного нерва.....	55

2.3. Клинико-морфологическая характеристика пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.....	62
2.4. Клиническое исследование безопасности и эффективности генноопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы.....	63
2.4.1. Основания к проведению клинического исследования безопасности и эффективности <i>pl-VEGFA</i> .....	63
2.4.2. Характеристика пациентов.....	63
2.4.3. Дизайн клинического исследования.....	64
2.4.4. Оценка безопасности.....	65
2.4.5. Оценка эффективности.....	66
2.5. Статистическая обработка данных.....	69
ГЛАВА 3. ГЕНООПОСРЕДОВАННАЯ АНГИОГЕННАЯ ИНДУКЦИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO.....	71
3.1. Специфическая активность плазмидной ДНК с геном эндотелиального сосудистого фактора роста в модели хорион-аллантаисной мембраны.....	71
3.2. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на репаративный нейрогенез в хирургической модели нейропатии седалищного нерва.....	76
3.2.1. Результаты гистологического анализа.....	76
3.2.2. Результаты оценки функции конечности.....	81
ГЛАВА 4. КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕЙ ПРИ НЕЙРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ.....	85
4.1. Структурные изменения стенки сосудов икроножного нерва.....	85
4.2. Структурные изменения волокон периферических нервов.....	87
4.3. Структурные изменения поперечнополосатой мышечной ткани у пациентов с синдромом диабетической стопы.....	89
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ.....	92

5.1. Оценка безопасности и эффективности генноопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы .....	100
5.2. Эффективность генноопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы.....	102
5.2.1. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на нейропатический компонент.....	102
5.2.2. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на гемодинамику.....	111
5.2.3. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на раневой процесс.....	112
5.3. Обсуждение результатов клинического исследования.....	114
ВЫВОДЫ .....	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	132
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A max – амплитуда М-ответа

БЗ – базальная мембрана

ДН – диабетическая нейропатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Дл – длительность М-ответа

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

Лп – латентный период

СД – сахарный диабет

СДС – синдром диабетической стопы

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТКНК – транскутанное напряжение кислорода

ФР – фактор роста

УЗДС - цветное ультразвуковое дуплексное сканирование

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ЭК – эндотелиальные клетки

CGRP (Calcitonin gene-related peptide) – белок связанный с геном кальцитонина

FGF (Fibroblastic Growth Factor) - фактор роста фибробластов

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) - гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор

GMP (Good Medicine Practice) – надлежащая производственная практика,

GTP – надлежащая тканевая практика

HIF-1a (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) - индуцированный гипоксией фактор-1a

HGF (Hepatocyte Growth Factor) - гепатоцитарный фактор роста

IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) – инсулиноподобный фактор роста-1

IQR (Interquartile Range) – межквартильный размах

NGF (Nerve Growth Factor) – фактор роста нервов

NSS (Neuropathic Symptom Score) – шкала нейропатического симптоматического счёта

NDS (Neuropathic Dysfunctional Score) – шкала нейропатического дисфункционального счёта

MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) – митоген-активированная протеинкиназа

Me (Mediana) – медиана

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) - моноцитарный хемотаксический фактор-1

MMPs (Matrix metalloproteinases) – матричные металлопротеиназы

PDGF (Platelet-derived Growth Factor) - тромбоцитарный фактор роста

p1-VEGFA – плазмидная ДНК, несущая ген сосудистого эндотелиального фактора роста-A165

pO<sub>2</sub> – парциальное давление кислорода

SDF (Stromal cell-derived factor-1) – стромальный клеточный фактор

TGF-beta1 (Transforming growth factor beta 1) - трансформирующий фактор роста - бета 1

TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) - фактор некроза опухоли-альфа

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) – вазоактивный интестинальный пептид,

R (Receptor) – рецептор

$\sigma$  – стандартное отклонение

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования.**

Диабетическая нейропатия (ДН) является наиболее распространённым осложнением сахарного диабета [209, 42]. Наличие диабетической нейропатии 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 [1, 10]. 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% [75]. 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 [1]. Уменьшение количества безмиелиновых интрадермальных волокон приводит к снижению или полной утрате температурной и болевой чувствительности [76]. Потеря болевой и тактильной чувствительности является триггерным фактором формирования язвенного дефекта часто выступает травматизация кожи стопы инородными предметами, обувью и т.д. [14, 84]. Так, в одном из исследований было показано, что наличие гиперкератоза у пациента с ДН ассоциировано с 77-кратным увеличением риска образования язвенного дефекта [163].

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 [6]. Серьезной социальной проблемой является высокая смертность при ампутации конечности при наличии СД, которая в ранний послеоперационный период (30 дней) может достигать 23% [2]. 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 [33, 150].

Кроме создания условий для развития раневых дефектов кожи на фоне снижения чувствительности, нарушение иннервации тканей препятствует заживлению вследствие нарушения процессов репаративной регенерации тканей [80]. Известно, что ряд нейромедиаторов регулируют миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеточных элементов в области кожной раны на протяжении всех этапов заживления. Например, во время фазы альтерации альфа-кальцитонин-ген родственный пептид (Calcitonin Gene Related Peptide – CGRP) и фактор роста нервов (Nerve Growth Factor – NGF) обеспечивают вазодилатацию сосудов в зоне повреждения [59, 60, 110]. Субстанция Р индуцирует пролиферативную активность фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеточных элементов во время пролиферативной фазы, что обеспечивает формирование грануляционной ткани [199, 216]. Во время фазы ремоделирования CGRP и вазоактивный интестинальный пептид (vasointestinal peptide – VIP) обеспечивают регуляцию активности матричных металлопротеиназ и снижает синтез коллагена-1 и коллагена-3, тем самым формируя оптимальное микроокружение для формирования зрелого соединительнотканного рубца



[56, 78, 83]. Однако при СД происходит нарушение процессов нервной регуляции репаративной регенерации вследствие снижения локальной концентрации NGF и субстанции P, ввиду уменьшения самих интрадермальных нервных волокон и экспрессии самих факторов роста [22, 103, 146]. Таким образом, поражение периферических нервов у пациентов с СДС не только предрасполагает к развитию язвенных дефектов вследствие утраты чувствительности, но и препятствует достижению оптимальных условий репаративной регенерации ввиду нарушения молекулярных межклеточных взаимодействия.

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению СДС при преобладании в генезе заболевания нейропатического компонента является осуществление разгрузки конечности и достижение равномерного распределения давления на стопу, что позволять в части случаев нивелировать утрату чувствительности и снизить давление на раневой дефект [104]. Однако даже в случае соблюдения пациентом режима разгрузки конечности и применении вспомогательных методов местной терапии остаётся около 10-15% процент незаживающих язвенных дефектов, что обусловлено нарушением репаративной регенерации тканей вследствие нарушения их иннервации. В то же время по данным мета-анализа у 40% больных в течение первого года после достижения заживления развивается рецидив, в течение 5 лет – у 65% [3].

Очевидно, что столь высокая частота рецидива обусловлена отсутствием эффективных патогенетических средств коррекции нейропатического компонента – даже в случае достижения полного закрытия язвенного дефекта нарушение чувствительности и иннервации тканей стопы продолжают нарастать [70]. В ходе самого большого клинического исследования DCCT (Diabetic Complication and Control Trial) было показано, что даже при жёстком контроле углеводного обмена, вероятность развития ДН удаётся снизить в течение 5 лет лишь на 60% [161]. Это позволяет

предполагать, что «идеальный» контроль гликемии либо не может быть достигнут почти в половине случаев, либо сама гипергликемия не является единственным механизмом патогенеза заболевания. В ходе исследований DCCT и UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) при СД продемонстрировали, что часто при применении препаратов инсулина больные придерживаются пограничных показателей концентрации глюкозы крови (6,7-10 ммоль/л и 6 ммоль/л в обоих исследованиях соответственно), чтобы избежать гипогликемии [157]. Также существует точка зрения, что для развития ДН, достаточно незначительного периодического подъёма концентрации глюкозы крови. Аргументом этому является развитие ДН у пациентов с предиабетом [29]. Широкая распространённость ДН при СДС и значимая роль нейропатического компонента в генезе язвенных дефектов диктует необходимость поиска средств коррекции данного состояния с целью улучшения результатов лечения больных и снижения количества ампутаций.

В работе Р.В. Деева и соавт. (2016) показано, что основой патоморфогенеза нейропатического компонента у пациентов с СДС являются глубокие структурные изменения сосудов микроциркуляторного русла периферического нерва [19]. В отдельных публикациях авторы выделяют выраженную гиперплазию эндотелия эндоневральных капилляров, что сопровождается снижением площади просвета эндоневрального капилляра и даже его полной окклюзией [47, 131]. При этом количество «закрытых» капилляров на поперечном срезе эндоневрального капилляра может достигать 38% от общего их количества [69]. Наличие корреляции между относительным количеством нефункционирующих капилляров и тяжестью ДН при СД 2 типа отражает патогенетическое значение структурных изменений эндоневральных капилляров в развитии нейропатии [132]. Также в одном исследовании было показано, что имеется достоверная корреляция между таким критерием пролиферации эндотелия, как отношение числа ядер

эндотелиальных клеток к количеству эндоневральных капилляров и тяжестью ДН [133]. Другим характерным морфологическим изменением структуры эндоневрального капилляра является утолщение базальной мембраны [91, 184]. В норме толщина базальной мембраны эндоневрального капилляра составляет 1-4 мкм. При ДН в некоторых случаях исследователями наблюдалось увеличение её толщины до 12 мкм за счёт увеличения количества концентрических слоёв до 17 при 10 в норме [82, 118, 178, 179]. Причина увеличения толщины базальной мембраны остаётся недостаточно ясна, но в отдельных экспериментах *in vitro* в культуре эндотелиальных клеток и перицитов было показано, что под влиянием продуктов гликолиза наблюдалось значительное увеличение синтеза фибронектина, коллагена 4 типа и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 в модели СД [45]. В исследовании R. Malik и соавт. (1992) были получены данные о достоверной корреляции увеличения толщины базальной мембраны с такими показателями тяжести ДН, как снижение скорости проведения, количества миелиновых волокон и вибрационной чувствительности [134]. В другом исследовании было продемонстрировано, что, по-видимому, утолщение базальной мембраны эндоневральных капилляров является одним из наиболее ранних признаков ДН, так как у пациентов с СД его наличие достоверно коррелировало с вероятностью развития ДН в будущем [92]. Таким образом, сегодня накоплен достаточно большой объём данных в пользу того, чтобы рассматривать структурные изменения микроциркуляторного русла периферического нерва как точку приложения для разработки новых средств коррекции нейропатического компонента у больных СДС. Кроме того, отдельные из работ свидетельствуют о прямой взаимосвязи между степенью развития структурных изменений и выраженностью клинических проявлений.

Другой актуальной проблемой для врачей хирургического профиля являются повреждения периферических нервов. По данным

эпидемиологических исследований травма периферических нервов различной этиологии составляет 3-10% в структуре заболеваний периферической нервной системы [64, 95, 149]. Травматические поражения периферических нервов верхних конечностей составляют более 70% всех травм нервных стволов, из которых значительно преобладают срединный и локтевой нервы [51, 165, 192]. Длительность восстановительного периода (год и более), снижение качества жизни пациентов трудоспособного возраста, высокая частота инвалидизации обуславливают необходимость поиска средств коррекции репаративной регенерации периферического нерва [68, 102, 195]. Выбор способа восстановления целостности периферического нерва обусловлен характеристиками травматического повреждения в каждом конкретном случае: механизм травмы, время от момента получения травмы до выполнения хирургического пособия, протяжённость дефекта периферического нерва и т.д. [58, 137]. Однако, несмотря на развитие хирургических технологий восстановления целостности нерва, даже при самых благоприятных условиях, как правило, происходит лишь частичное восстановление функции иннервируемой конечности, что обусловлено ограниченным потенциалом репаративной регенерации периферических нервных волокон [143].

Хорошо известно, что пересечение периферического нерва индуцирует его необратимые структурные изменения, которые наиболее выражены в дистальной части [8, 81, 100, 167]. Этот процесс в целом известен как уоллеровская дегенерация, был впервые описан 160 лет назад Августом Уоллером (1850), который в эксперименте на языкоглоточном нерве лягушки описал патоморфологические изменения нерва после его пересечения [212]. Стремительный процесс гибели фрагмента аксона дистальнее места пересечения был выделен в качестве основного морфологического субстрата. Практически одновременно с гибелью дистальной части аксонов в проксимальной части поврежденного нерва начинаются процессы

репаративной регенерации: рост осевых цилиндров из проксимального отдела на периферию, которые обеспечивают реиннервацию и, таким образом, восстановление функции [5, 194].

Исследование спрутинга при травматических нейропатиях у людей выявило совпадение сроков и эффективности развития компенсации с экспериментальными данными [202, 224]. Существует большое количество работ, в которых показано, что степень восстановления утраченной функции непосредственно зависит от обеспечения оптимальных условий репаративной регенерации периферического нерва: наличие адекватного уровня кровообращения в зоне повреждения, степень выраженности воспалительного ответа и т.д. [97, 126]. Технологические возможности позволяют восстановить непрерывность нерва на уровне отдельных пучков, но даже эти усилия не всегда обеспечивают желанный результат вследствие недостаточно оптимальных условий микроокружения, которые приводят к нарушению межклеточных молекулярных взаимодействий и не позволяют реализовать максимально эффективно хирургический подход [9, 96].

Одним из основных лимитирующих факторов репаративной регенерации при повреждении периферических нервов является обеспечение его достаточного кровоснабжения [125, 154, 180, 225]. В ряде экспериментальных работ было показано, что одной из основных причиной нарушения репаративной регенерации периферического нерва является недостаточная активность ангиогенеза в центральной части диастаза [169]. В отдельных исследованиях продемонстрировано, что эндотелиоциты являются, своего рода, «проводниками» аксонов при движении в направлении к иннервируемым тканям, что указывает на тесные межклеточные молекулярные взаимодействия этих клеточных элементов [12, 230]. Таким образом, одним из возможных подходов к оптимизации регенерации волокон периферических нервов является применение методов,

которые были бы направлены на индукцию процессов ангиогенеза в зоне повреждения.

Представленные данные в совокупности позволяют рассматривать сосудистый компонент периферических нервов как точку приложения для коррекции нейропатии в генезе ряда хирургических заболеваний. Процесс репаративной регенерации периферических нервных волокон, в равной степени как и ангиогенез, обеспечиваются сложными межклеточными ауто- и паракринными механизмами цитокинов и факторов роста. Их значение в процессе репаративного гистогенеза чрезвычайно разнообразно – они оказывают влияние на пролиферацию, рост, миграцию и дифференцировку всех клеточных элементов, которые участвуют в процессе репаративной регенерации периферического нерва [94]. Предпринимаются многочисленные попытки коррекции и влияния на различные компоненты репаративной регенерации, путём введения в область повреждения рекомбинантных факторов роста [37, 85, 114, 121]. Одним из наиболее хорошо изученных факторов роста, участвующих в равной степени как в репаративной регенерации периферических нервов, так и в ангиогенезе, является сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) [156, 166].

VEGF — это димерный 34–42 кДа дисульфид-связанный гликопротеин. VEGF индуцирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток (ЭК). Долгое время после открытия VEGF фактор рассматривался лишь как индуктор ангиогенеза и потенциальный терапевтический агент для лечения различных заболеваний ишемического генеза [55, 124, 129, 139]. Но позже были получены данные о его нейропротективных свойствах в отношении клеточных элементов нервной системы [196, 226]. Было показано, что VEGF индуцирует пролиферацию шванновских клеток, астроцитов, микроглии, нейронов коры головного мозга [222, 223]. В экспериментальной модели травмы седалищного нерва было

показано значительное увеличение экспрессии VEGF и Flt-1 (рецептор VEGF II типа) в спинном мозге на уровне поясничного отдела позвоночника в ответ на повреждение [90]. Таким образом, результаты фундаментальных исследований межклеточных молекулярных взаимодействий в ходе восстановления периферического нерва послужили предпосылкой для применения рекомбинантного VEGF в качестве дополнительного терапевтического компонента для индукции его репаративной регенерации.

Несмотря на демонстрацию эффективности этого подхода в формате доклинических исследований на моделях повреждения периферических нервов различного генеза существует ряд ограничений внедрения данного подхода в клинику. После введения факторы роста быстро подвергаются разрушению в тканях и периферическом кровотоке, что значительно снижает их терапевтический эффект и не позволяет создать необходимую концентрацию в месте воздействия [28, 122]. Это обстоятельство обуславливает необходимость увеличения дозы рекомбинантного фактора роста и кратности, что создаёт опасность развития осложнений и побочных эффектов. Кроме того, при рассмотрении возможности использования рекомбинантных белков с целью коррекции диабетической нейропатии становится очевидно, что лишь небольшая концентрация вводимого фактора окажет своё воздействие на периферический отдел нервной системы [54, 155]. Также остаётся неизвестной способность проникновения рекомбинантных белков через гемато-невральный барьер [217].

В связи с ограничениями применения рекомбинантных белков и невозможностью их интеграции в клиническую практику параллельно сформировалось направление, основным технологический вектор которого заключается в применении геннотерапевтических конструкций для достижения продолжительной экспрессии цитокина в зоне интереса [67, 98, 113]. Геннотерапевтические конструкции в своем составе содержат, как правило, один ген или их комбинацию. Их выбор определяется тем

терапевтическим эффектом, который необходимо достичь в отношении конкретной нозологии. Наиболее демонстративно принцип действия генных препаратов реализуется на примере моногенных заболеваний, где целью применения геннотерапевтической конструкции является доставка в клетки пациента функционально активного гена, экспрессия которого позволит компенсировать дефект собственного гена [135]. По мнению В.Л. Киселёва и Р.В. Деева (2014) для реализации процесса переноса генетической информации внутрь клетки – трансфекции, применяются различные методы, которые принципиально делятся на вирусные и не вирусные [13]. После проникновения генной конструкции внутрь ядра, запускается процесс экспрессии гена, интегрированного в состав препарата. Клетки-мишени становятся своего рода «биореакторами» белков, продуцируемых пролонгированно и определяющих лечебный эффект [65, 221, 170].

Анализ данных литературы показывает, что к настоящему времени в мире выполнено значительное число работ, которые демонстрируют принцип генноопосредованного терапевтического (индуцированного) ангиогенеза в моделях ишемии [228]. Типичными детектируемыми при этом изменениями являлись: увеличение плотности сосудов микроциркуляторного русла, улучшение перфузии и функции. Развернутые доклинические исследования показали, что невирусный генный трансфер – плазмидные препараты являются безопасными, как с точки зрения токсических, так и с точки зрения мутагенных и канцерогенных эффектов [40, 71 87]. Геннотерапевтические конструкции, в которых в качестве вектора были использованы плазмиды показали удовлетворительную безопасность и убедительную специфическую эффективность у животных. Их эффекты были изучены в различных экспериментальных моделях острой и хронической ишемии миокарда, нижних конечностей и т.д. На основании этого опыта можно сделать ряд основных выводов.



Во-первых, практически во всех случаях введение генов факторов роста индуцировало развитие новых коллатералей и капилляров, которые со временем не регрессируют [119, 172, 203];

Во-вторых, улучшение перфузии тканей наблюдалось вне зависимости от метода введения терапевтического агента: внутривенного, внутримышечного или интраартериального [88, 160, 171, 220];

В-третьих, при использовании генов не отмечалось развития значимых негативных побочных эффектов, в то время как при введении белковых факторов роста в ряде случаев наблюдались системные реакции в виде гипотензии, аллергии [206, 176]. При этом наиболее эффективным в индукции ангиогенеза показал себя ген *VEGF* [27, 31, 36]. Таким образом, на основании анализа существующей литературы в совокупности с существующим запросом со стороны практической медицины на улучшение результатов лечения больных с синдромом диабетической стопы были сформулированы цель и задачи исследования.

### **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 и эффективность 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 синдромом диабетической стопы.

### **Научная новизна**

Впервые выполнена оценка безопасности и эффективности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза для коррекции диабетической нейропатии 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 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 (приложение 1).

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 (приложение 2).

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 (приложение 3).

Изобретение «Кодон-оптимизированная рекомбинантная плазмида, способ стимуляции регенерации периферического нерва, способ лечения поврежденного нерва человека» (патент № 2558294С) вошло в перечень Роспатента как «100 лучших изобретений России» в 2017 году.

### **Теоретическая значимость**

Теоретические основы учения о гистогенезе и регенерации позволяют полнее раскрыть сложные процессы, которые происходят в области повреждения органа, где возникает сложная клеточно-дифференциальная и пространственно-временная организация тканей. Общеизвестно, что одним из основных этапов восстановления костной ткани является ангиогенез - формирование и рост сосудов, которые обеспечивают оксигенацию и репаративную регенерацию нервных волокон. Низкий уровень перфузии является одним из основных факторов развития неэффективной репаративной регенерации периферического нерва, при котором не удаётся достичь восстановления функции конечности. Таким образом, теоретическая значимость настоящей работы заключается в попытке оценить влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на восстановление периферического нерва.

### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты исследования расширяют представления о значении ангиологического звена в патоморфогенезе диабетической нейропатии у пациентов с синдромом 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. Стандартное хирургическое лечение 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 у при синдроме 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 синдромом 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 синдромом диабетической стопы, проходящих лечение в хирургических стационарах, является безопасным и эффективным, но требует проверки на больших группах. Показано, что внутримышечное введение р1-VEGFA обеспечивает снижение выраженности проявлений диабетической нейропатии, сокращение сроков заживления язвенного дефекта и увеличение кровообращения нижних конечностей.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на международных и российских научных конференциях.

1. XXIX Международная конференция Российского Общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления и отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (26-29 июня 2014, Рязань).
2. Конференция «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» (2-6 сентября 2014, Новосибирск).
3. 2-й Международный конгресс «Раны и раневые инфекции с конференцией: проблемы анестезии интенсивной терапии раневых инфекций» (14-17 октября 2014, Москва).
4. Межрегиональная научно-практическая конференция «Стратегия хирургического лечения различных форм синдрома диабетической стопы» (29 октября 2014, Воронеж).
5. Всероссийская научная конференция студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (16 сентября 2015, Рязань).
6. XXX Международная конференция Российского Общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления в лечении сосудистых больных» (25–27 июня 2015, Сочи).
7. Конференция «Неотложная хирургия» (27 мая 2016, Иркутск).
8. Научно-практической конференции «ХИРУРГИЯ – XXI век: соединяя традиции и инновации» (6 июня 2016 года, Москва).
9. Конференция Start-Up Village (2 июня 2016, Москва).
10. 3-й международный конгресс «Раны и раневые инфекции» (24 ноября 2016, Москва).
11. Конференция «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (5-6 октября 2017, Рязань).

12. Конференция Start-Up Village (2-3 июня 2017, Москва).
13. 4rd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Symposium – World Congress (8-11 сентября 2015, Бостон, США).
14. NHLBI Symposium on Cardiovascular Regenerative Medicine (29-30 сентября 2015, Бетесда, США).
15. ESVS 4th Spring Meeting (13-14 мая 2016, Лондон, Великобритания).
16. 27th world congress of the international union of angiology (5-8 октября 2016, Лион, Франция).
17. Changing the Face of Modern Medicine: Stem Cells & Gene Therapy (18-20 октября 2016, Флоренция, Италия).

### **Публикации**

По теме исследования опубликовано 21 печатная работа, из них 6 – в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 2 – в журналах, входящих в международные цитатно-аналитические базы данных, получено 3 патента РФ на изобретения.

### **Личное участие автора**

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 статистическую 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.

### **Степень достоверности**

Достоверность полученных результатов обеспечена применением широкого спектра различных методов исследования в эксперименте и в ходе клинического исследования. Эксперимент был выполнен в модели наиболее оптимальной для оценки влияния генноопосредованной индукции ангиогенеза на репаративную регенерацию нерва, что обеспечивает получение наиболее достоверных данных. Внедрение в работу морфологического исследования структурных изменений периферического нерва у больных СДС позволило выделить у этой категории пациентов патогенетически обоснованную точку приложения для применения генноопосредованной индукции ангиогенеза. После подтверждения рабочей гипотезы в эксперименте, было выполнено клиническое исследование для оценки безопасности и эффективности генноопосредованной индукции

ангиогенеза у больных СДС, для чего были применены общепринятые и наиболее объективные критерии оценки безопасности и эффективности.

### **Объём 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.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Патоморфогенез нейропатии при хирургических заболеваниях

#### 1.1.1. Диабетическая нейропатия при синдроме диабетической стопы

Согласно определению, принятому на конференции в Сан-Антонио (США), ДН – это заболевание периферической нервной системы, имеющее клинические проявления или протекающее субклинически, развивающееся у пациента с СД при отсутствии других причин нейропатии. По данным Международной ассоциации диабета ДН является одним из самых частых осложнений СД у хирургических больных, которое определяет высокий риск формирования язвенных дефектов кожи стоп и, как следствие, ампутаций нижних конечностей [173]. По данным эпидемиологических исследований распространённость ДН среди больных СД сильно варьирует в зависимости от используемых критериев постановки диагноза и методов исследования [182]. Так, мультицентровое исследование с участием более 6 тысяч больных СД с применением экспресс методов диагностики снижения тактильной, вибрационной и болевой чувствительности показало, что признаки заболевания имеются у 28,5% участников [77]. Напротив, при применении более точного электрофизиологического исследования для оценки скорости проведения импульса и амплитуды потенциала нервных волокон икроножного нерва, проявления ДН были выявлены более чем у 90% [35, 152].

По данным Г.Р. Галстяна (2006) среди больных СД хирургического профиля нейропатия является ведущей причиной развития СДС [4]. Показано, что наличие ДН у пациентов с СД сопровождается увеличением риска формирования язвенного дефекта в 8-18 раз, а ампутации в 2-15 раз [144]. Вклад нейропатического компонента в патогенезе СДС находит своё отражение в отдельных исследованиях, где авторы показывают высокую прогностическую значимость снижения вибрационной, температурной и болевой чувствительности в отношении формирования язвенных дефектов и

ампутаций нижних конечностей [231]. Столь значимая роль ДН в патогенезе хирургической патологии обусловлена совокупностью факторов, которые детерминируют высокий риск развития язвенного дефекта у больных данной группы. Основными среди них являются следующие:

А. Высокая уязвимость кожи стоп у пациентов с СД вследствие утраты чувствительности. Данный фактор обусловлен паттерном поражения периферических нервных волокон – нарушение проводимости импульса вследствие демиелинизации самые длинные волокна, которые обеспечивают иннервацию кожи стопы, подвергаются снижению количества толстых сенсорных миелиновых волокон приводит к утрате вибрационной и тактильной чувствительности по типу «носков» и «перчаток» [43, 44];

Б. Нарушение процессов репаративного гистогенеза вследствие утраты иннервации тканей в области дефекта кожи. Этот фактор обусловлен снижением количества интрадермальных нервных волокон, которые обеспечивают создание в области заживления концентрации нейромедиаторов, обеспечивающих регуляцию миграции, пролиферации и дифференцировку клеточных элементов. Результатом этого является нарушение естественного процесса репаративного гистогенеза, что проявляется хроническим течением раневого процесса при СД [30].

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению СДС в зависимости от степени преобладания нейропатического компонента в патогенезе язвенных дефектов принято выделять следующие формы:

- нейропатическая - формирование язвенных дефектов при данной форме обусловлено исключительно нарушением иннервации тканей нижних конечностей [181];

- нейроишемическая - при данной форме причиной также может быть травматизация и деформация стопы, как при нейропатической форме, однако резистентность к терапии обусловлена снижением артериального кровотока вследствие атеросклеротического поражения магистральных артерий [6];

- ишемическая - формирование язвенных дефектов обусловлено исключительно нарушением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей вследствие тяжелого атеросклеротического поражения сосудистой стенки [52].

Важно отметить, что ряд авторов подвергают сомнению целесообразность выделения в качестве самостоятельной формы ишемический вариант [107]. Это обусловлено широкой распространённостью ДН среди больных СДС, а также тем фактом, что структурные изменения периферических нервов при СД развиваются значительно раньше, чем дебют заболевания периферических артерий. Ввиду этого к моменту формирования клинически значимого ишемического компонента, у больного СДС уже есть ДН различной степени выраженности [177]. Таким образом, доступные на сегодня данные позволяют сделать вывод, что нейропатический компонент является одним из основных факторов развития СДС [41, 151, 163].

На сегодняшний день известно, что основой нарушения иннервации при ДН являются глубокие структурные изменения тканей периферического нерва [105, 211]. По данным Р.В. Деева и соавт. (2016) морфологическим субстратом ДН является диффузное снижение количества толстых миелиновых волокон, что сопровождается разрастанием волокнистой соединительной ткани [7]. Среди наиболее распространённых изменений следует выделить расслоение миелина (по типу «луковичной шелухи»), скручивание миелиновых оболочек, полную или частичную его потерю на одной из поверхностей осевого цилиндра, нарушение упорядоченности слоев. При этом степень выраженности нейропатии и утраты чувствительности непосредственно зависит от степени выраженности описанных структурных изменений [74, 231].

По данным работ последних лет всё больше исследователей выделяют в качестве ведущего фактора развития этих морфологических изменений у пациентов с СДС поражение микроциркуляторного русла периферического

нерва [201]. В большинстве работ данные выводы были сделаны на основании морфологического анализа *vasa nervorum* икроножного нерва, что обусловлено хорошей доступностью нерва для этой манипуляции и меньшей функциональной значимостью, ввиду отсутствия моторных нервных волокон и риска развития впоследствии неврологического дефицита [210]. Анализ литературы позволяет выделить основные структурные изменения стенки сосудов микроциркуляторного русла периферического нерва у больных СДС, которые детерминируют развитие нейропатического компонента:

- гиперплазия эндотелия, которая по данным отдельных работ сопровождается снижением площади просвета эндоневрального капилляра или даже его полной окклюзией [205]. Количество закрытых капилляров на поперечном срезе эндоневрального капилляра при этом может достигать 38% от общего их количества, при этом в отдельных работах показана достоверная корреляция между относительным количеством не функционирующих капилляров с выраженностью нейропатического компонента при СД II типа [34, 145, 183];

- утолщение базальной мембраны. В норме толщина базальной мембраны эндоневрального капилляра составляет 1-4 мкм, однако при ДН наблюдается увеличение её толщины до 12 мкм [164, 197]. Толщина стенки *vasa nervorum* при этом может увеличиваться в 3 раза, что обусловлено значительным увеличением синтеза фибронектина, коллагена 4 типа и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 перицитами [168, 179]. В исследовании R. Malik (1982) была показана корреляция между толщиной базальной мембраны, снижением скорости проведения и количества миелиновых волокон [82]. Есть данные, что утолщение базальной мембраны эндоневральных капилляров является одним из наиболее ранних признаков ДН, так как наличие у больных СД его наличие достоверно коррелирует с риском развития нейропатии в будущем [118]. Следствием описанных морфологических изменений в структуре эндоневральных капилляров

является снижение васкуляризации и оксигенации клеточных структур периферического нерва.

На основании представленных данных были сделаны следующие выводы:

- диабетическая нейропатия является одним из основных компонентов патогенеза язвенных дефектов у больных СДС, что обусловлено как утратой чувствительности, так и нарушением процессов репаративной регенерации в кожной ране;

- ведущим фактором развития патогистологических изменений периферических нервов являются морфологические изменения сосудистой стенки *vasa nervorum*, которые обуславливают снижение васкуляризации и оксигенации тканей периферического нерва.

Таким образом, с позиции клинической необходимости и современных представлений о патогенезе нейропатического компонента у больных СДС необходим поиск средств, которые были бы направлены на коррекцию сосудистого звена ДН.

### **1.1.2. Нейропатия при повреждении периферических нервов**

Ежегодно в мире проводится свыше 2 млн хирургических операций, которые направлены на восстановление целостности периферических нервов после травмы [99]. По данным отечественных авторов, повреждения структур периферической нервной системы составляют среди травм опорно-двигательного аппарата от 1,5 до 5,4%, при этом 89,5% из них приходится на верхнюю конечность [64]. Нарушения целостности нервных стволов определяются у 12,8% всех пациентов с травмой кисти, при этом почти 60% из них обусловлены производственной травмой [50, 149, 192]. Несмотря на широкое применение различных подходов и методов лечения, степень инвалидизации этой группы больных всё ещё достаточно высока [165].

Структура повреждений периферических нервов неоднородна и в зависимости от степени нарушения непрерывности составляющих его структур выделяют следующие формы [102].

А. Нейропраксия – сохранение непрерывности аксона (или дендрита) от тела клетки до органа или эффектора. Причиной этого вида повреждения обычно является тракция или компрессия, с развитием локальной демиелинизации в зоне повреждения и временного блока проведения. Расстройства поверхностной и болевой чувствительности, а также нарушения симпатической иннервации транзиторны. Однако в отдельных случаях при сохранении действия повреждающего агента (например, компрессирующий рубец), может возникнуть необходимость выполнения неврилиза [68, 137, 195];

Б. Аксонотмезис – нарушение непрерывности нервных волокон, при сохранении целостности оболочек нерва. Причиной обычно выступает компрессия, тракция, ишемия (переломы, интраневральные инъекции, замерзание). При аксонотмезисе нервное волокно подвергается уоллеровской дегенерации дистальнее места повреждения, однако сохранение непрерывности соединительнотканного футляра обеспечивает оптимальные условия репаративного нейrogenеза. Клинически данный вид повреждения проявляется полным нарушением моторной, сенсорной и вегетативной функций, однако восстановление обычно полное, но зависит от дистанции, которую необходимо преодолеть регенерирующим волокнам [46, 179];

В. Нейротмезис - полное нарушение целостности всех структур периферического нерва, причиной чего являются ранения, переломы костей, ятрогенные повреждения или онкологические заболевания. При данной форме повреждения спонтанное восстановление функции отмечается крайне редко и почти всегда требует хирургического лечения, эффективность которого зависит от хирургической техники, протяжённостью диастаза между концами пересечённого нерва, а также расстоянием, которое

необходимо преодолеть регенерирующим волокнам. Как правило, травма периферического нерва сопровождается формированием дефекта различной протяжённости, вследствие чего такой подход невозможен. В этой ситуации «золотым стандартом» восстановления целостности нерва является использование аутонервной вставки для устранения протяжённого дефекта. В качестве аутовставки может быть использован функционально менее значимый нерв [185, 204]. Очевидно, что при нейротмезисе условия для репаративного нейрогенеза наименее благоприятны, что обуславливает наибольшую актуальность разработки средств коррекции именно при данной форме повреждения.

В зависимости от клинической ситуации для восстановления непрерывности периферического нерва применяют следующие методы.

А. Сшивание пересечённого нерва за счёт создания анастомоза конец-в-конец. Данный способ коррекции повреждения возможен лишь при, так называемой, «идеальной» ситуации, то есть при отсутствии диастаза, коротком промежутке времени от момента повреждения нерва до оказания квалифицированной хирургической помощи и т.д. К сожалению, ввиду большого количества лимитирующих факторов применение данного метода весьма ограничено и по данным литературы применяется лишь у 13-27% пациентов [93, 136, 140].

Б. Применение нервной аутовставки с целью устранения протяжённого диастаза. В качестве аутовставки может быть использован функционально менее значимый нерв; в подавляющем большинстве случаев это икроножный нерв, который, как известно, является чувствительным, а значит его утрата не сопровождается развитием двигательных нарушений [58; 143].

С. Использование различных искусственных проводников (кондуитов), которые представляют собой тубулированные структуры, предназначенные для устранения протяжённого дефекта тканей периферического нерва и создания благоприятных условий для его регенерации [147].

Каждый из этих методов направлен на максимальную оптимизацию условий репаративной регенерации периферического нерва. Однако, несмотря на развитие хирургических технологий восстановления целостности нерва, даже при самых благоприятных условиях, как правило, происходит лишь частичное восстановление функции иннервируемой конечности, что обусловлено ограниченным потенциалом репаративной регенерации периферических нервных волокон. Это детерминирует постоянный поиск врачами хирургического профиля новых методов и технологий, которые бы позволили оптимизировать процессы репаративной регенерации периферических нервов и, таким образом, улучшить результаты лечения.

Результаты многочисленных экспериментальных работ и клинические данные свидетельствуют, что эффективная репаративная регенерация при хирургическом восстановлении непрерывности периферического нерва может быть достигнута лишь при условии достаточного его кровоснабжения, что возможно (при сочетанных травмах) лишь при обязательном восстановлении артерии в условиях первичного вмешательства и(или) при высокой степени васкуляризации окружающего нерв ложа [126, 215]. Несоблюдение или невозможность реализовать это условие определяет высокий риск неудачи реконструкции периферического нерва вследствие развития невромы в зоне повреждения или некроза нервного трансплантата до того, как сформируются новообразованные сосуды.

Для улучшения васкуляризации периферического нерва с целью оптимизации условий репаративной регенерации был разработан ряд хирургических приёмов. Одним из наиболее известных подходов является создание васкуляризированных нервных трансплантатов, который был впервые применён в клинической практике Taylor G.I. и Nam P.J. в 1976 году [200]. Позже в работах отечественных авторов было показано, что использование нервного трансплантата на питающих сосудах имеет очень



важное преимущество, что обусловлено поддержанием хорошего кровоснабжения даже при помещении трансплантата в рубцово-измененную реципиентную область при значительной собственной длине (более 10 см). Результаты васкуляризованной аутонейропластики срединного и локтевого нервов обеспечивают лучшие результаты по сравнению с обычной аутонервнопластикой [109]. К сожалению, данный вид реконструктивного вмешательства имеет ряд существенных ограничений и требует сложного технического исполнения, ввиду чего применяется редко. Таким образом, арсенал хирургических способов коррекции кровоснабжения в области травмы периферического нерва достаточно ограничен, а сами методы трудоёмки и не могут быть применены широко в рутинной практике.

### **1.1.3. Сосуды периферических нервов как точка приложения для коррекции нейропатического компонента хирургических заболеваний**

Приведённые выше результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований позволяют сделать вывод, что сосудистый компонент репаративной регенерации периферического нерва является важным звеном патогенеза ряда хирургических заболеваний. В связи с этим является актуальным поиск средств, направленных на коррекцию структурных изменений стенки сосудов микроциркуляторного русла периферического нерва и недостаточность ангиогенеза в зоне его повреждения. Ввиду этого в течение последних 15-20 лет многочисленные коллективы ведут поиск новых способов улучшения результатов лечения этой категории пациентов при помощи селективного воздействия на сосудистый компонента [32].

Одним из наиболее хорошо изученных кандидатов является эндотелиальный сосудистый фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF). С тех пор как он был впервые выделен итальянским исследователем Наполеоном Феррара в 1989 году, его механизм действия

был изучен достаточно подробно [73]. Изначально некоторое время считалось, что VEGF обладает исключительно ангиогенными свойствами, ввиду чего с его применением было проведено достаточно много клинических исследований с целью определения его эффективности при различных заболеваниях, в патогенезе которых, ведущую роль играет ишемия [89, 218]. Однако в 2000 году в нескольких экспериментальных работах было показано, что VEGF обеспечивает индукцию роста аксонов клеток спинномозгового узла [190]. В эксперименте *in vitro* на культуре нейронов коры головного мозга мыши был продемонстрирован нейропротективный эффект VEGF, который выражался в увеличении выживаемости клеток в ответ на гипоксию за счёт ингибирования каспазы-3 – одной из основных протеаз, реализующих апоптоз клетки [106]. На моделях нокаутных мышей по гену, кодирующему элемент промотера VEGF, было показано значительное снижение экспрессии VEGF в спинном мозге, что выражалось прогрессирующей дегенерацией моторных нейронов [214]. Позднее в 2005 году нейропротективный эффект VEGF был показан при введении рекомбинантного белка в боковой желудочек головного мозга крысы с моделью бокового амиотрофического склероза, что позволило достоверно отсрочить развитие паралича с 17 дней до 22 дней [193]. В ходе дальнейшего изучения свойств этого цитокина, были получены данные о наличии нейропротективного эффекта *in vitro* в отношении нейронов гиппокампа, спинномозгового узла и нейронов сетчатки при токсическом или ишемическом на них воздействии [61]. У крыс с моделью стрептозоцин-индуцированного СД 1 типа было обнаружено достоверное увеличение экспрессии VEGF в седалищном нерве и поясничном спинномозговом ганглии спустя 12 недель после развития гипергликемии, что, по-видимому, свидетельствует о важной роли VEGF в функционировании периферического нерва при патологическом состоянии [174]. В совокупности накопленные экспериментальные данные позволили понять, что VEGF обладает не только

ангиогенными свойствами, но также оказывает нейропротективный и антиапоптотический эффект при воздействии на нейроны повреждающих факторов.

Другой предпосылкой для рассматривания данного фактора роста в качестве терапевтического агента для коррекции нейропатии стали данные о значимой роли VEGF в поддержании нормального уровня кровообращения в периферическом нерве. Доказательством этому явились многочисленные случаи развития токсической нейропатии у пациентов, получающих препараты-антитела к VEGF («Авастин») или ингибиторы рецепторов к VEGF («Луцентис»). Ведущим механизмом патогенеза при этом является апоптоз эндотелиальных клеток *vasa nervorum* и снижение количества эндоневральных капилляров [207].

Таким образом, понимание ангиогенных и нейропротективных свойств VEGF привело к формированию гипотезы о том, что внесение данного фактора роста в область повреждения периферического нерва позволит улучшить его васкуляризацию [186]. В совокупности с данными о важной роли сосудистого компонента в патоморфогенезе нейропатий это явилось основанием для оценки возможности применения VEGF-опосредованной индукции ангиогенеза в моделях диабетической и травматической нейропатий.

## **1.2. Доклинические исследования рекомбинантного эндотелиального сосудистого фактора роста**

### **1.2.1. Модель диабетической нейропатии**

Оценка эффективности применения рекомбинантного VEGF при диабетической нейропатии была выполнена в ходе многочисленных экспериментальных исследований. В большинстве работ состояние условно соответствующее СД у человека моделировалось при помощи введения животному химических веществ, обладающих высокой селективной

токсичностью по отношению к инсулоцитам – аллоксан или стрептозоцин [198]. Это обеспечивало достижение устойчивого увеличения концентрации глюкозы в крови, с развитием структурных изменений периферического нерва, которые в некоторой степени соответствуют изменения у пациентов с СД. Например, у крыс с аллоксан-индуцированным СД спустя 2 года после индукции были выявлено утолщение базальной мембраны эндоневральных капилляров [53]. При помощи электродной полярографии было показано, что у крыс со стрептозоцин-индуцированным диабетом на протяжении 4 месяцев после развития гипергликемии наблюдается достоверное снижение эндоневрального кровотока, которое было зафиксировано уже через 1 неделю после введения стрептозоцина [115]. К сожалению, данная экспериментальная модель обладает рядом существенных недостатков. Во-первых, индукция сахарного диабета сопровождается очень высокой смертностью экспериментальных животных, что не позволяет достичь хорошей воспроизводимости модели. Во-вторых, степень развития структурных изменений и утраты чувствительности широко варьирует среди животных. Таким образом, данные факторы характеризуют низкую воспроизводимость экспериментальной модели. Таким образом, ни одна из существующих моделей не позволяет в полной степени воспроизвести все факторы патогенеза ДН у больных СДС, что обусловлено многолетним течением заболевания, значительной ролью коморбидных состояний в развитии данного осложнения, таких как ожирение, гиперхолестеринемия, артериальная гипертензия и т.д [227]. Также непреодолимым препятствием в моделировании СДС у животных является отсутствие ревалентных моделей сахарного диабета, позволявших бы воспроизводить ключевой фактор развития СДС и диабетической нейропатии – многолетнее течение СД. В случае всех применяемых на сегодняшний день моделей, единственный фактор который удаётся воспроизвести, является увеличение концентрации глюкозы в крови. Однако это не позволяет смоделировать те глубокие

изменения в экспрессии генов, приводящих к нарушению пролиферации, дифференцировки и миграции клеточных элементов тканей периферического нерва, что в конечном итоге и приводит к нарушению процессов репаративной регенерации и утрате чувствительности [191]. Всё это явилось причиной определённого компромисса, выражающегося в том, что все результаты доклинических исследований по оценке эффективности применения средств коррекции нейропатии могут быть лишь условно транслированы на человека.

В серии экспериментов *in vivo* введение VEGF статистически достоверно улучшало скорость проведения по моторным и сенсорным нервным волокнам седалищного нерва у животных с моделью нейропатии на фоне стрептозоцин-индуцированного СД [101]. В одном эксперименте применение VEGF способствовало снижению сенсорного дефицита и сохранению количества толстых миелиновых сенсорных волокон у мышей с моделью пиридоксин-индуцированной токсической нейропатией, для которой характерно преимущественное снижение проприоцептивной чувствительности [208]. На основании ряда исследований были сделаны предположения, что нейропротективный эффект цитокинов при СД заключается в нескольких механизмах. Так, Т. Huanq (2003) в эксперименте *in vitro* на культуре клеток спинномозгового ганглия крыс со стрептозоцин-индуцированным СД показал достоверное отсутствие снижения дельта-пси мембраны митохондрий в сравнении с клетками культуры, к которым не осуществлялось добавления рекомбинантного белка [208]. Введение VEGF крысам со стрептозоцин-индуцированным СД препятствует активации митоген-активируемых протеин-киназ и нарушению аксонального транспорта [159].

### 1.2.2. Хирургическая модель нейропатии

Для оценки эффективности применения VEGF при травме периферического нерва в большинстве работ была использована экспериментальная модель с пересечением седалищного нерва, которая на сегодняшний день является наиболее простой и воспроизводимой. Применение VEGF в составе матрикеля, заполняющего кондуит, индуцирует спрутинг аксонов, что проявляется увеличением количества аксонов в кондуите на единицу площади поперечного среза [94]. Использование гранул полимолочной кислоты с VEGF в графте, выполненном из аутоветны, на модели травмы с протяжённым дефектом малоберцового и большеберцового нервов, достоверно улучшает функциональный индекс нервов и увеличение количества миелиновых волокон в графте [111]. VEGF в эксперименте индуцирует деление и миграцию шванновских клеток в графте в дистальном направлении, что коррелирует с увеличением количества капилляров и миелиновых волокон [189]. Введение VEGF в комбинации с BDNF в кавернозные тела, на модели травмы кавернозного нерва крысы, приводило к восстановлению утраченной иннервации и эректильной функции [232].

Таким образом, VEGF-опосредованная локальная индукция ангиогенеза сопровождается оптимизацией условий репаративной регенерации, что проявляется рядом детектируемых эффектов в моделях *in vivo*:

- полное или частичное восстановление различных видов чувствительности (тактильная, болевая, проприоцептивная) у животных с моделью сахарного диабета;
- сокращение сроков восстановления функции конечности при травме периферического нерва [156].

Полученные данные позволили исследователям сделать вывод о том, что увеличение локальной концентрации VEGF в периферическом нерве может быть эффективным инструментом коррекции нарушения его

васкуляризации. Несмотря на это, внедрение рекомбинантного VEGF в клиническую практику встретило ряд серьёзных препятствий, которые обусловлены в большей степени особенностями данного класса веществ:

- быстрое разрушение рекомбинантного VEGF в тканях и периферическом кровотоке [120];
- необходимость выполнения регулярных инъекций с целью достижения необходимой локальной концентрации [86].

Данные факторы, которые не были столь значимы при проведении экспериментальных исследований, послужили причиной того, что данный подход не был интегрирован в рутинную практику [123]. По мере осознания недостатков применения рекомбинантного VEGF сформировалось направление, технология которого заключается в применении геннотерапевтических конструкций, которые состоят из терапевтического гена (в виде кДНК или РНК) и системы его доставки (вектор) внутрь клетки. Векторы разделяются на две основные группы – вирусные и невирусные [113]. В первом случае трансген заключается в частицу ретро-, ленти-, аденовируса или адено-ассоциированного вируса и др., а во втором – в плазмиду – кольцевую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ряд вспомогательных последовательностей, обеспечивающих экспрессию трансгена [116]. Вирусная и невирусная системы доставки отличаются по эффективности трансфекции. В первом случае до 40% и более генных конструкций поступают в клетки-мишени, а во втором – показатель не превышает 1-2% в виду размеров и отрицательного заряда «голой» плазмидной ДНК. Предложены подходы (физических, химических), обеспечивающие повышение эффективности трансфекции плазмидной ДНК до 8-10% [57]. Важно также отметить, что ряд вирусных векторов (ретро-, лентивирусные и др.) встраиваются в геном. Иными словами, экспрессия трансгена, который они переносят, длительная, в то время как остальные, в том числе плазмидная ДНК, в геном не интегрируются, поэтому

экспрессируются временно, в течение 10-14 сут. В отличие от применения рекомбинантных белков этот подход обеспечивает достижение длительного увеличения экспрессии VEGF и локальной его концентрации в зоне введения, что позволяет нивелировать основные недостатки применения рекомбинантных белков при одновременно сохранении его терапевтических свойств.

### **1.3. Генноопосредованная индукция ангиогенеза при коррекции нейропатии при хирургической патологии**

#### **1.3.1. Доклинические исследования**

Первая опыт применения плазмидного вектора с геном *VEGF* с целью коррекции васкуляризации периферического нерва при ДН была впервые предпринята Джеффри Иснером и др. (2001) на крысах со стрептозоцин-индуцированным СД и новозеландских кроликах с алоксон-индуцированного СД. В качестве активного компонента в одной из оцениваемых плазмид использовался ген *VEGF165*, в другой – ген *VEGF2*. Генные конструкции вводились двукратно в мышцы бедра и передней конечности на 12 и 26 неделях после индукции СД, для контроля использовались животные, которым после индукции диабета, не выполнялось введения плазмид. Электрофизиологические исследования у крыс спустя 12 недель после введения стрептозоцина показали, что у всех животных наблюдалось значительное снижение скорости проведения по моторным и сенсорным нервным волокна –  $34,2 \pm 1,7$  м/с и  $35,2 \pm 1,8$  м/с соответственно, против  $55,5 \pm 2,0$  м/с и  $62,6 \pm 3,1$  м/с у здоровых животных. Однако на фоне применения генных конструкций как с геном *VEGF165*, так и с *VEGF2* спустя 10 недель после их введения электрофизиологические показатели вернулись к нормальным значениям. По данным ЛДФ седалищного нерва определялось улучшение его перфузии на фоне генной терапии, что выражалось в достоверном увеличении объёмного кровотока. Также по данным



флюоросцентной ангиографии отсутствовало снижение количества сосудов седалищного нерва, что было характерно у животных, которым не осуществлялось введения генных конструкций. Аналогичные тенденции показателей наблюдались и у новозеландских кроликов, которым вводилась только плазида, содержащая ген *VEGF2*. Результаты позволили исследователям сделать вывод, что плазмидный вектор может эффективно применяться с целью трансфера и экспрессии VEGF для коррекции нейропатии у больных СД [175]. Другим способом достижения увеличения эндогенного синтеза VEGF было использование плазмидной конструкции, кодирующей цинк-фингерный фактор транскрипции (Zinc Finger Protein Transcription Factor - ZFP-TF). В эксперименте *in vitro* было показано достоверное увеличение экспрессии VEGF-A после внесения в культуру клеток плазмидной конструкции с геном *ZFP-TF*. Внутримышечное введение крысам с моделью стрептозоцин-индуцированного СД плазмиды, содержащей ген *ZFP-TF*, спустя 2 недели после индукции, сопровождалось достоверным улучшением электрофизиологических показателей 4 недели после введения [162].

В экспериментальных работах по травме периферического нерва было показано, что интраоперационное введение плазмиды, содержащей последовательность гена *VEGF*, в дистальную культю, обеспечивает достоверное увеличение количества миелиновых волокон на единицу площади поперечного среза участка дистальнее места анастомоза, что коррелировало со значительным увеличением концентрации VEGF в шванновских клетках [158]. Геннотерапевтическая конструкция может также вводиться параневрально. На модели травмы седалищного нерва *pI-VEGFA* вводилась внутримышечно и использовалась в комбинации с плёнками гиалуроновой кислоты, которыми покрывался анастомоз с целью уменьшения выраженности рубцового процесса. Внутримышечное введение препарата сопровождалось достоверным увеличением амплитуды

мышечного ответа и увеличения количества миелиновых волокон дистальнее анастомоза относительно использования их по отдельности [233]. В исследовании F. Wang (2015) был показан дозозависимый эффект p1-*VEGFA* при введении геннотерапевтической конструкции интраневарально после сшивания культей седалищного нерва конец-в-конец. При применении большей дозировки был получен наиболее выраженный прирост нейрофизиологических показателей, меньшее снижение индекса массы икроножной мышцы [66]. Таким образом, данные экспериментальных исследований, свидетельствующие о возможности применения генных конструкций с целью улучшения регенерации периферических нервов, явились предпосылкой для проведения исследования в клинике с целью оценки возможности применения данного подхода для лечения повреждений периферических нервов у человека.

В работах Р.Ф. Масгутова и соавт. (2011) был предложен способ стимулирования реваскуляризации и регенерации аутонервной вставки с помощью локального введения в периферический нерв плазмиды pBud-*VEGF-FGF2*, экспрессирующей одновременно два фактора роста - VEGF и FGF2. В экспериментальной работе в модели травмы седалищного нерва ими было показано, что применение 45 мкг плазмиды обеспечивает достоверное увеличение количества осевых цилиндров в дистальном фрагменте периферического нерва через 60 сут. на 98,4% по сравнению с группой контроля. Также индукция репаративной регенерации на структурном уровне коррелировала с более ранним восстановлением иннервации, что выражалось в достоверном увеличении амплитуды суммарного потенциала икроножной мышцы по данным стимуляционной электронейромиографии. Таким образом, было показано, что прямое введение плазмиды pBud-*VEGF-FGF2* в проксимальный и дистальный отрезки нерва, а также в саму аутонервную вставку, стимулирует регенерацию седалищного нерва крысы и восстанавливает двигательную активность [17].

В более поздней работе тех же авторов было исследовано воздействие введения взвеси ММСК жировой ткани человека на процесс регенерации седалищного нерва крысы. В эксперименте с помощью электронейромиографии (ЭНМГ) авторы оценили воздействие ММСК на восстановление микроциркуляции в соединительнотканых структурах седалищного нерва после вшивания аутонервной вставки, а также реакцию нейронов спинального ганглия L5 на травму и воздействие генного препарата. Было установлено, что такого рода клеточная терапия способствует выживанию нейронов спинального ганглия L5, восстановлению микроциркуляции в области травмы, а также оптимизирует двигательные показатели в конечности у животного [15].

Вместе с тем, использование такого направления ассоциировано с большим количеством нерешённых технологических задач, связанных с разработкой клеточных продуктов и их последующего внедрения в клиническую практику. В связи с этим разработка лекарственных препаратов на основе плазмидных векторов, в том числе и в области нейрохирургии, на сегодняшний день более оптимальным методов [12].

В работах Е.В. Парфёновой и соавт. (2014) было показано, что внутримышечное введение плазмидной конструкции с геном *HGF* вокруг повреждённого периферического нерва обеспечивает сокращением сроков репаративной регенерации. По данным экспериментального исследования в модели пересечения седалищного нерва применение 100 или 200 мкг рС4W-*hHGF* обеспечило достоверное увеличение количества осевых цилиндров в три раза по сравнению с группой контроля. Результаты морфометрического анализа коррелировали с результатами оценки функционального показателя конечности и электронейромиографии, что выражалось в сокращении сроков восстановления седалищного функционального индекса. Полученные данные позволили авторам продемонстрировать безопасность и эффективность генноопосредованной индукции в отношении травмы периферического

нерва, что позволило им начать процесс начала клинических исследований [130].

По данным В.А. Ткачука и соавт. (2017) индукция регенерации периферического нерва при травматическом повреждении может быть достигнута посредством внутримышечного введения вокруг повреждённого нерва плазмиды с геном мозгового нейротрофического фактора (Brain Derived Neurotrophic Factor – BDNF), который считается одним из основных нейротрофических факторов, участвующих в поддержании функционирования и регенерации нервной ткани. По мнению авторов, в последние годы BDNF рассматривают как терапевтическую мишень, на основании полученных данных о том, что BDNF улучшает регенерацию нейронов. В доклиническом исследовании было установлено, что параневральное введение геннотерапевтической плазмидной конструкции обеспечивает достоверное сокращение сроков восстановления иннервации, что выражается как в увеличении количества осевых цилиндров на контрольных сроках, так и в более раннем восстановлении конечности [21]. Полученные данные позволили коллективу авторов начать проведение клинических исследований генного лекарственного препарата на основе невирусной плазмидной конструкции, содержащей ген BDNF для индукции регенерации периферического нерва у человека. По результатам первой фазы клинических исследований этот кандидат в препараты является безопасным для человека, что позволило инициировать проведение двойного слепого плацебо-контролируемого исследования, которое должно продемонстрировать первые результаты касающиеся эффективности препарата у пациентов с травмами периферических нервов [112].

Учитывая, что микроциркуляторное русло является важным звеном патогенеза нейропатии при хирургических болезнях, ряд коллективов предпринял попытки его коррекции при помощи генноопосредованной индукции ангиогенеза. Возможность улучшения результатов репаративной

регенерации периферического нерва была продемонстрирована в работах ряда отечественных коллективов. Так, по данным Ю.А. Чельшева и др. (2012) применение в составе полимерного кондуита геннотерапевтических конструкций с генами *VEGF* и *FGF* позволяет добиться улучшения результатов посттравматической регенерации периферического нерва в виде более полного восстановления двигательной и чувствительной функций в эксперименте [20]. На основании полученных данных автор предполагает, что внедрение данной технологии в клинику позволит обеспечить улучшение результатов лечения повреждений периферических нервов и сократить сроки госпитализации. Коллектив авторов Московского государственного университета в модели травмы седалищного нерва продемонстрировали, что индукция регенерации возможна также при помощи применения генов других факторов роста, как например *HGF* [38]. В работах А.А. Ризванова и др. (2014) было показано, что применение генной индукции ангиогенеза путём введения конструкции непосредственно в повреждённый нерв обеспечивает улучшение результатов хирургического лечения травмы периферического нерва [16, 17].

Таким образом, результаты доклинических исследований с применением различных моделей нейропатии позволили сделать несколько важных выводов:

- введение плазмиды с геном *VEGF* в периферический нерв или окружающие ткани обеспечивает длительное увеличение локальной концентрации *VEGF*, что сопровождается индукцией ангиогенеза [142];
- геннопосредованная индукция ангиогенеза в периферическом нерве обеспечивает восстановление чувствительности и сокращением сроков восстановления функции конечности [127];
- применение геннопосредованной индукции ангиогенеза не сопровождалось развитием нежелательных явлений.

Таким образом, анализируя опубликованные результаты доклинических исследований, которые касаются применения плазмидных векторов с геном *VEGF* для коррекции нейропатии, можно заключить, что данный подход показал безопасность и высокую эффективность. Это позволило ряду коллективов перейти к регистрационным клиническим исследованиям.

### 1.3.2. Клинические исследования

Первое плацебо-контролируемое КИ под руководством Дугласа Лозордо было направлено на оценку безопасности и эффективности применения плазмиды с геном *VEGF* у пациентов с ДН. Препарат вводился двукратно с интервалом в 14 суток в ходе 8 инъекций в проекции седалищного, малоберцового и большеберцового нервов. В качестве первичного критерия эффективности использовался показатель шкалы симптомов (Symptom Score, SS), вторичных - показатели визуальной аналоговой шкалы (Visual Analog Scale, VAS) и электрофизиологические показатели проводимости икроножного нерва. Индукция ангиогенеза не сопровождалась увеличением частоты развития нежелательных реакций, а применение плазмиды с геном *VEGF* обеспечило достоверное улучшение по первичному показателю [26]. Вторая фаза рандомизированного, двойного слепого клинического исследования с применением плазмиды, кодирующей ген *VEGF*, была выполнена коллективом исследователей из Массачусетского университета (Бостон) под руководством А.Н.Рорпер (2005). В течение 7 лет в исследовании приняло участие 39 больных - 28 в терапевтической группе и 11, получавших плацебо, которые находились под наблюдением по условиям протокола исследования 6 месяцев. Препарат вводился подкожно в проекции предполагаемого прохождения периферических нервов – седалищного, малоберцового, большеберцового. Первичным критерием эффективности было улучшение по шкале SS (Symptom Score). В качестве вторичных

критериев были использованы нейрофизиологические показатели, изменения по шкале VAS (Visual Analog Scale), а также количественная оценка чувствительности. Результаты продемонстрировали достоверное улучшение по первичному критерию, однако разница во вторичных критериях оценки отсутствовала. Также наблюдалось большее количество осложнений в группе, получавших генный препарат, однако увеличение не достигло статистической достоверности. Сами исследователи прокомментировали результаты неоднозначно, сделав акцент на необходимость проведения дальнейших исследований с большим числом пациентом.

Одновременно с селективной оценкой эффективности геннопосредованной индукции при ДН, в мире накоплен достаточно большой опыт исследований данного подхода при хирургической патологии - СДС. Несмотря на то, что в большинстве из них фокус интересов исследователей был ориентирован на влияние ангиогенной терапии на язвенный дефект, в части из них также выполнялась оценка нейропатического компонента. Впервые данный подход был реализован коллективом из США в ходе 1-2 фазы КИ по оценке безопасности и переносимости *Ad-5PDGF-B* (GAM501) у 15 больных с резистентными язвами при нейропатической форме СДС. Препарат наносился непосредственно на раневой дефект в составе коллагенового геля в комбинации со стандартным лечением, включавшим разгрузку конечности и хирургическую обработку дефекта. Применение GAM501 не сопровождалось развитием нежелательных реакций, полного закрытия язвы на фоне комбинированного лечения удалось добиться у 12 пациентов из 15 [128]. Было показано, что применение *Ad-5PDGF-B* безопасно и обладает хорошей переносимостью, что в дальнейшем позволило разработчикам провести двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование с участием 210 пациентов с нейропатическими язвенными дефектами. Исследование закончено, но его результаты не были опубликованы, поэтому остаётся

неизвестным насколько препарат эффективен. Таким образом, несмотря на демонстрацию эффективности генноопосредованного подхода в коррекции нейропатии в формате доклинических исследований, опыт их применения по отношению к пациентам с хирургической патологией пока ограничен несколькими исследованиями.

На основе анализа литературы в совокупности с существующим запросом хирургов и больных на улучшение результатов лечения была сформулирована гипотеза о том, что применение генноопосредованной индукции ангиогенеза позволит оптимизировать условия репаративного нейрогистогенеза у пациентов с хирургической патологией. В настоящей работе была использована геннотерапевтическая конструкция с геном *VEGF*, которая является активным действующим компонентом зарегистрированного препарата «Неоваскулген» [63].

Ранее в работе Н.Д. Мжаванадзе и др. (2014) было показано, что генноопосредованная индукция ангиогенеза при помощи этой молекулы в экспериментальной модели острой ишемии нижних конечностей обеспечивает увеличение количества сосудов микроциркуляторного русла и сопровождается более выраженной регенерацией поперечно-полосатой мышечной ткани четырехглавой мышцы бедра [62]. Позже были изучены особенности распределения плазмидной генотерапевтической конструкции с геном сосудистого эндотелиального фактора роста – было установлено, что введение *pl-VEGFA* сопровождалось исключительно локальным увеличением концентрации *VEGF165*, что свидетельствует об отсутствии системного действия препарата [24]. Таким образом, системный эффект препарата, выражающийся в возможности индукции роста сосудов в тканях, отдаленных от места введения, отсутствует. В дальнейшем трансляция этого подхода в клиническую практику у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей обеспечили получение эффективного инструмента улучшения функционального состояния больных [18].



В свою очередь в исследовании А.А. Крылова и соавт. (2018) было показано, что воздействие на сосудистый компонент у пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета позволяет оптимизировать процессы репаративной регенерации кожной раны. Было показано, что введение *pl-VEGFA* обеспечивает сокращение сроков заживления язвенных дефектов и количества ампутаций у пациентов с ХИНК и КИНК [11].

Первый отечественный опыт применения геннопосредованной индукции ангиогенеза с целью коррекции сосудистого компонента нейропатии у пациентов хирургического профиля содержится в данном диссертационном исследовании, в основу которого заложена идея проверить теоретически обоснованные данные о влиянии ангиогенеза на процессы репаративной регенерации периферического нерва в экспериментальное исследование и практическую концепцию применения генной индукции ангиогенеза для стимуляции репаративного процесса при синдроме диабетической стопы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика генной конструкции

В диссертационной работе выполнен анализ применения геннотерапевтической конструкции, являющейся сверхскрученную формой плазмиды pI-*VEGFA*, кодирующей эндотелиальный сосудистый фактор роста изоформы VEGF165, для лечения травмы периферического нерва в эксперименте на животных и в клиническом исследовании у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы.

Геннотерапевтическая конструкция pI-*VEGFA* разработана ПАО «Институт стволовых клеток человека» (Москва), произведена в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва) и зарегистрирована 28.09.2011 на территории РФ под торговым наименованием: Неоваскулген® для применения у пациентов со II-III стадией хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза [23]. Активный компонент препарата представляет собой кольцевую ДНК, состоящую из терапевтического гена (*VEGF*, при экспрессии которого синтезируется изоформа, состоящая из 165 аминокислот) и вспомогательных последовательностей: фрагмента регуляторного участка (22 нуклеотидных пары), определяющего транскрипцию гена; сигнала сплайсинга, сигнала полиаденилирования и терминатора транскрипции SV40, обеспечивающих синтез мРНК, а также участков, необходимых для эффективного биосинтеза плазмидной ДНК в клетках штамма - продуцента *E. Coli* (рис. 1).

Известно, что при эндоцитозе плазмиды внутрь клеток млекопитающих происходит выработка VEGF, который после синтеза и выделения из клеток-продуцентов активирует эндотелиоциты, что приводит к росту кровеносных сосудов местно – т.е. в области введения. Принято считать, что проникновение плазмиды внутрь клеток (эндоцитоз) – это вероятностный процесс. Важно подчеркнуть, что размножаться в клетках млекопитающих плазмидная ДНК не может. Молекулярная масса плазмиды – 2817091,85

г/моль. Размер – 4559 пар оснований. Молекулярная масса – 2817091,85 г/моль. Описано не менее трёх структурно близких рецепторов VEGF, расположенных на поверхности эндотелиальных клеток, наиболее важными из них принято считать рецептор VEGF 1 типа (Flt-1) и рецептор VEGF 2 типа (KDR/Flk-1). Они представляют собой рецепторные тирозинкиназы, которые после биохимической реакции с молекулами VEGF подвергаются фосфорилированию. Их активация ведёт к запуску многочисленных внутриклеточных пост-рецепторных сигнальных каскадов, обеспечивающих избирательную активацию проангиогенных генов, перестройку цитоскелета, миграцию клеток эндотелия, их пролиферацию и ряд других процессов. Таким образом указанный фактор роста выступает при ангиогенеза как ауто- и паракринный фактор регуляции ангиогенеза.

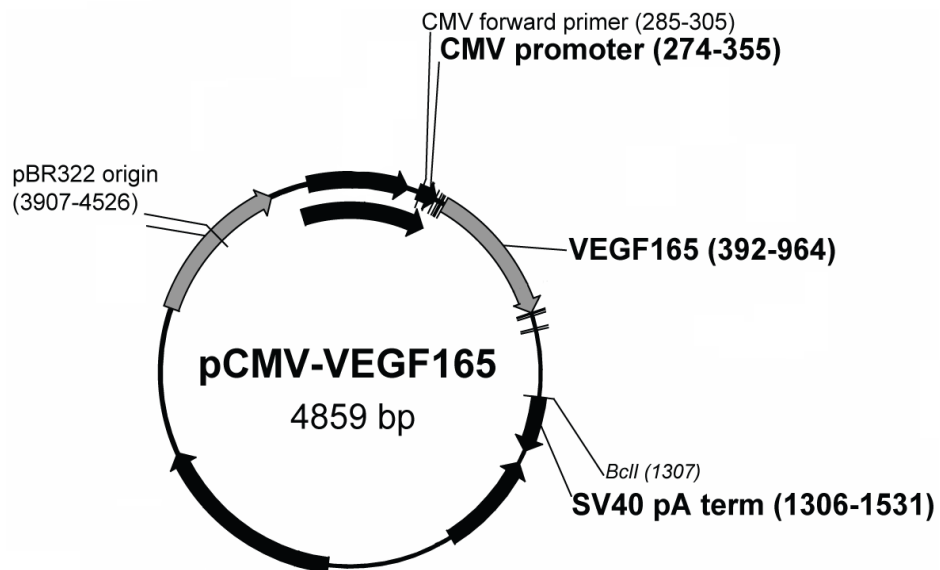


Рис. 1. Схематичное изображение геннотерапевтической конструкции pl-*VEGFA*

Особенностью сверхскрученной кольцевой ДНК является чувствительность к разрыву одной из 9116 фосфодиэфирных химических связей. Молекула ДНК с единственной разорванной связью теряет сверхскрученность, переходя в релаксированную кольцевую форму (родственное соединение). По имеющимся научным данным, релаксированная кольцевая ДНК не способна эффективно проникать в клетки и более чувствительна к распаду в кровотоке.

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. Иными словами, клетки организма работают как «биореакторы» данного белка, продуцируя его в течение контролируемого периода времени (10-14 сут. в случае плазмидной ДНК, которая не встраивается в геном). Произведенный клеткой терапевтический белок, кодируемый поступившей генной конструкцией, обеспечивает характерный для него биологический эффект. Такое селективное воздействие на белок-синтетическую функцию клеток, позволяющее увеличить продукцию необходимого фактора роста, цитокина в зоне введения препарата или транскрипционного фактора в клетках-мишенях, крайне востребовано в «регенеративной медицине», так как локальное увеличение концентрации всего одного или нескольких ключевых биологически активных веществ способно индуцировать миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток, синтез ими необходимых компонентов межклеточного матрикса, регуляторных молекул, тем самым существенно повысить активность репаративной регенерации тканей, стимулировать ангиогенез и нейрогенез [219].

## **2.2. Анализ генноопосредованной индукции ангиогенеза в эксперименте *in vivo***

Экспериментальный раздел диссертационного исследования выполнен в два этапа. В ходе первого этапа проводилась оценка специфической ангиогенной активности *pl-VEGFA* в модели хорионаллантоисной мембраны (ХАМ), которая является провизорным органом у птиц и выполняет функции жизнеобеспечения эмбриона. В ходе второго этапа выполнялась оценка влияния *pl-VEGFA* на сосудистый компонент репаративной регенерации периферического нерва. Ввиду отсутствия хорошо воспроизводимых моделей ДН для оценки возможности применения генноопосредованной индукции ангиогенеза в работе была использована более универсальная и воспроизводимая хирургическая модель пересечения периферического нерва, которая, хоть и не позволяет воспроизвести все существующие компоненты патогенеза повреждения периферического при СД, может быть успешно использована для проверки рабочей гипотезы в формате данного диссертационного исследования.

### **2.2.1. Оценка специфической активности плазмидной ДНК с геном эндотелиального сосудистого фактора роста в модели хорионаллантоисной мембраны**

Куриные эмбрионы инкубировали при 37°C и 70% влажности. На 8 день со стороны воздушной камеры при помощи стоматологической бормашины Strong 210/105L (Южная Корея) вырезали отверстие 2 см<sup>2</sup>. На обнаженную ХАМ помещали стерильный бумажный фильтр (1 см<sup>2</sup>), пропитанный 50 мкл буфера TE, содержащего *pl-VEGFA* (экспериментальная группа, n=5) или не содержащего плазмидную ДНК (группа контроля, n=5) (рис. 2). Затем отверстия в скорлупе герметизировали парафином. Через 96 часов ХАМ вместе с подскарлупной пленкой фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине [153].

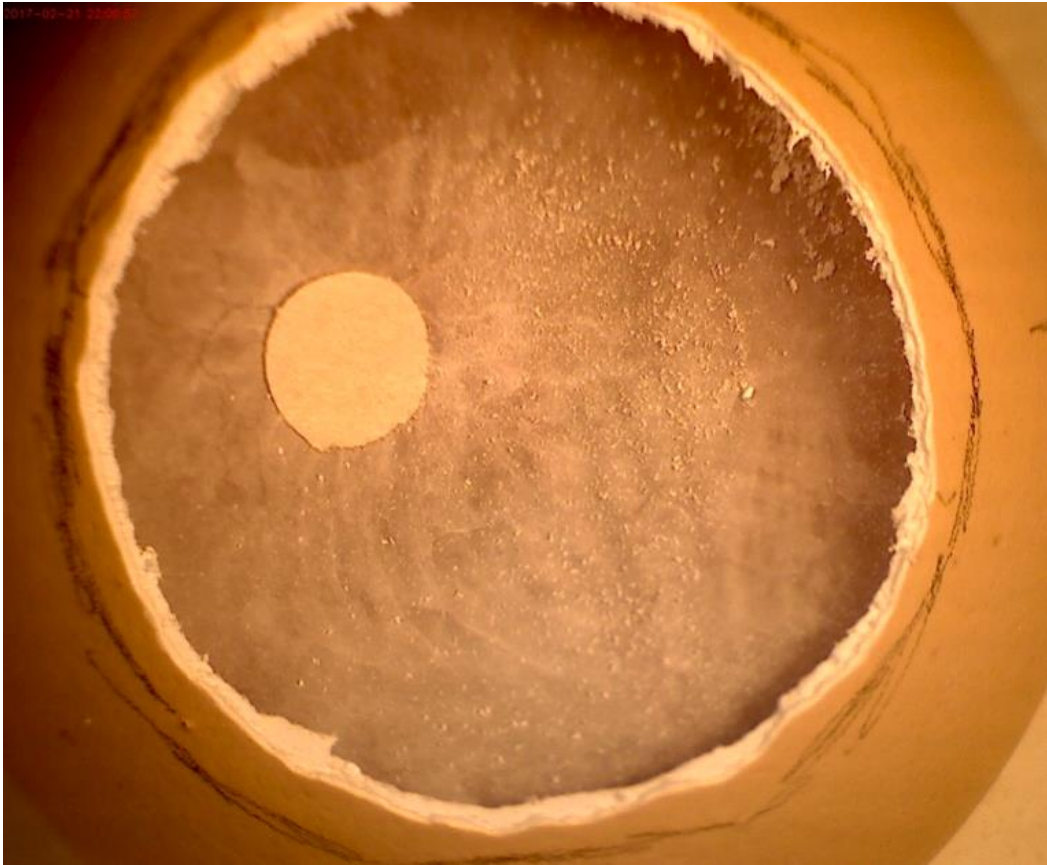


Рис. 2. Модель для оценки ангиогенного эффекта pl-*VEGFA* на хорионлантоисной мембране - нанесение на ХАМ во вскрытом яйце диска из фильтровальной бумаги содержащей pl-*VEGFA*

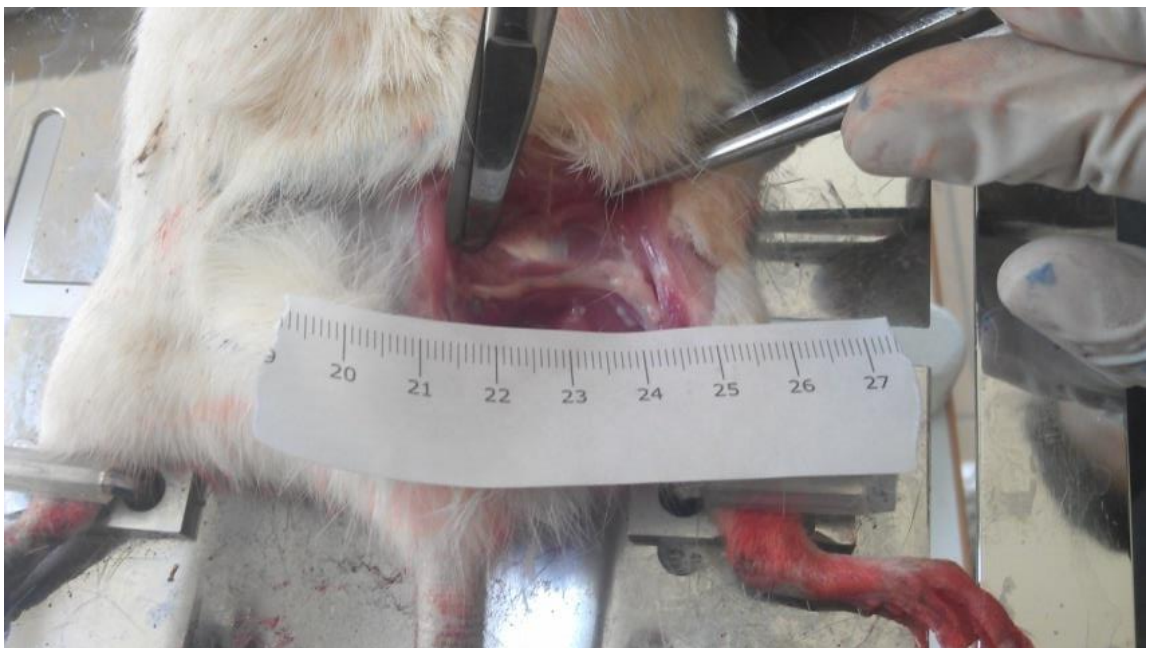


Рис. 3. Аутонервная вставка в дефекте седалищного нерва у экспериментальной крысы

Из ХАМ изготавливали препараты для световой и электронной микроскопии. При морфометрическом анализе полутонких срезов оценивались следующие параметры: диаметр ядра ЭК, высота ЭК и ширина ЭК. При морфометрическом анализе электроннограмм оценивались параметры: площадь ядра, площадь цитоплазмы и их соотношение (ядерно-цитоплазматическое соотношение, ЯЦС).

### **2.2.2. Оценка генноопосредованной индукции ангиогенеза плазмидной ДНК с геном VEGFA в хирургической модели нейропатии седалищного нерва**

Исследование проведено на белых самцах крыс породы Вистар массой 250-300 г. (n=30). Работа проведена в 2015 году на базе вивария Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и одобрена Локальным этическим комитетом. Животные вивария содержались надлежащим образом.

*Экспериментальная модель нейропатии седалищного нерва.* Животные были наркотизированы внутрибрюшинным введением хлоралгидрата (400 мг/кг). После послойного рассечения кожи и мышц на уровне середины задней поверхности бедра выделяли седалищный нерв. Исследование проводилось на двух моделях травмы: перерезка седалищного нерва с последующим сшиванием («перерезка-сшивание») и аутонервная вставка («аутонервная вставка»).

В модели «перерезка-сшивание» осуществлялось одномоментное пересечение седалищного нерва и сшивание культей нерва конец-в-конец 4 швами нитью 10.0 (Surgipro II Monofilament Polypropylene, Syneture, США). В модели «аутонервная вставка» осуществлялось рассечение седалищного нерва в двух местах на расстоянии 0.5 см друг от друга с формированием дефекта длиной 0.5 см. После этого фрагмент иссечённого нерва вшивался в

область дефекта с соблюдением конуса роста аксонов путём наложения по 2 шва с каждой стороны вставки нитью 10.0 (рис. 3).

Внутри каждой экспериментальной модели («перерезка-сшивание» и «аутонервная вставка») животные были разделены на 2 группы в зависимости от вводимого препарата: животным первой группы (контроль) после восстановления целостности нерва осуществляли введение воды для инъекций (Новосибхимфарм, Россия), животным второй подгруппы вводили *pl-VEGFA*. Также для оценки влияния введения жидкости в седалищный нерв отдельно была выделена группа ложно-оперированных, которым после выполнения доступа осуществляли введение в седалищный нерв воды для инъекций без его пересечения. Выведение животных осуществлялось на сроках 30 и 60 суток после выполнения операции. Распределение животных по группам и срокам выведения из эксперимента представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение животных по группам

Название модели	Вводимый препарат	30 сутки	60 сутки	Общее число животных
«перерезка-сшивание»	Вода для инъекций	4	3	7
	<i>pl-VEGFA</i>	4	3	7
«аутонервная вставка»	Вода для инъекций	4	3	7
	<i>pl-VEGFA</i>	3	3	6

Интраневральное введение осуществляли интраоперационно сразу после восстановления целостности периферического нерва. В модели «перерезка-сшивание» препарат вводили в проксимальный и дистальный отрезки седалищного нерва, отступая 1 мм от линии шва (экспериментальные группы: 45 мкг плазмидной ДНК в 15 мкл воды для инъекции на точку введения, всего 30 мкл). В модели «аутонервная вставка» растворы вводили в



3 точки - в саму вставку и отступая 2,5 мм от линии шва (экспериментальные группы: 45 мкг плазмидной ДНК в 10 мкл воды для инъекции на точку введения, всего 30 мкл). В группе «ложно-оперированных» после выполнения доступа в седалищный нерв вводили 30 мкл воды для инъекций в три точки без предварительного пересечения нерва.

*Патогистологический анализ.* После выведения животных из эксперимента для анализа структурных изменений после денервации для гистологического анализа забирали фрагмент седалищного нерва в области операции и икроножную мышцу на стороне операции. Схема выделения седалищного нерва для гистологического анализа представлена на рисунке 4.

Для изготовления полутонких срезов фрагменты седалищного нерва образцы фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде и 1% растворе четырехоксида осмия. Дегидратацию проводили спиртами с восходящими концентрациями, затем заливали в эпон-аралдит. Срезы окрашивали толуидиновым синим согласно стандартной методике. Фрагменты икроножных мышц фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки и заливки в парафин изготавливали поперечные срезы мышечных волокон толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и ставили иммуногистохимическую реакцию с антителами, которые представлены в табл. 2.

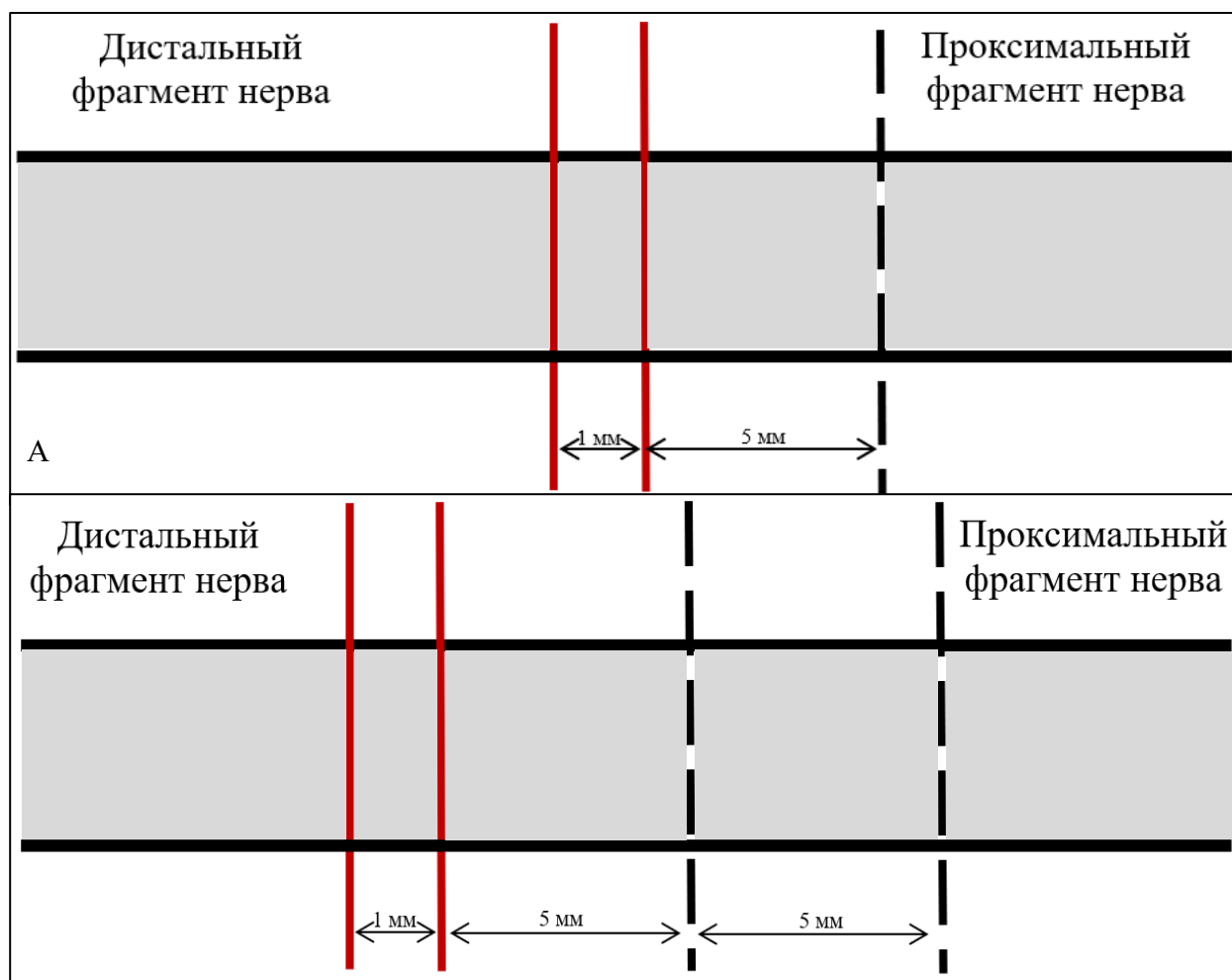


Рис 4. Схема получения фрагментов периферического нерва для выполнения морфологического анализа. Фрагмент интереса выделен красным цветом. А – модель «конец-в-конец», Б – модель «аутонервная вставка»

Таблица 2

Характеристика антител для иммуногистохимического исследования

Антитела	Клон	Разведение	Производитель
К мышечному миозину (быстрый тип)	MY-32	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США)
К мышечному миозину (медленный тип)	NOQ7.5	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США)
К нейрофиламентам	2F11	1:100	Dako (США)

*Гистоморфометрия.* Для сравнительной оценки влияния геннопосредованной индукции ангиогенеза на восстановление периферического нерва выполнялась оценка плотности осевых цилиндров (кол-во/мм<sup>2</sup>) в дистальном фрагменте седалищного нерва, относительно пересечения. Для сравнительного анализа структурных изменений тканей икроножной мышцы на сроках 30 и 60 сутки были использованы морфометрические показатели, которые представлены в таблице 3.

Таблица 3

## Морфометрические показатели икроножной мышцы

№	Содержание методики	Решаемая задача	Морфометрический показатель	Ед
1.	ИГХ исследование с антителами к нейрофиламентам	Оценка количества нервных волокон в составе поперечного среза мышцы	Количество нервных волокон на 100000 мышечных волокон (КНВ)	Ед
2.		Оценка средней площади нервных волокон на срезе	Средняя площадь нервных волокон на срезе (СПНВ)	мкм <sup>2</sup>
3.	ИГХ исследование с антителами к мышечному миозину (быстрый тип)	Оценка количества быстрых мышечных волокон в составе икроножной мышцы	Средняя площадь быстрых мышечных волокон (ПБМВ) в 10 полях зрения при увеличении ×400	мкм <sup>2</sup>
4.	ИГХ исследование с антителами к мышечному миозину (медленный тип)	Оценка количества медленных мышечных волокон в составе икроножной мышцы	Средняя площадь медленных мышечных волокон (ПММВ) в 10 полях зрения при увеличении ×400	мкм <sup>2</sup>
5.	ИГХ исследование с антителами к мышечному миозину (медленный и быстрый типы)	Оценка соотношения быстрых и медленных мышечных волокон	Соотношение числа быстрых мышечных волокон (ЧБМВ) к общему числу всех мышечных волокон	%

Примечание: ИГХ - иммуногистохимическое исследование

*Оценка функции конечности.* Для оценки динамики восстановления функции конечности на сроках 15, 30, 45 и 60 сутки после операции выполняли «Тест ходьбы на дорожке» («Walking track analysis»). Для этого была использована специальная маршрутная дорожка (ширина – 9 см, длина – 45 см, высота – 9 см) с боковыми стенками, по которой крыса может передвигаться лишь в одном направлении. Поверхность дорожки при этом выстилалась белой бумагой. Задние лапы крысы покрывались специальной тушью, после чего крысу переносили на дорожку. В результате прохождения дорожки на белой бумаге оставались отпечатки от лап. На основании совокупности показателей отпечатков подошвенных поверхностей обеих лап подсчитывали функциональный индекс с целью оценки функционального состояния конечности в динамике выполнялось исследование седалищно-функционального индекса (schiatic functional index - SFI) (рис. 5). После измерения основных показателей отпечатков по подсчет SFI выполнялся по формуле Мединачели:  $SFI = ((ETO\text{F}-NTO\text{F})/NTO\text{F})) + ((NPL-EPL)/EPL)) + ((ETS-NTS)/NTS)) + ((EIT-NIT)/NIT)) \times 220/4$  [256]. Все параметры вычисляются как по отпечатку здоровой лапы, так и по отпечатку оперированной (рис. 6).

*Нейрофизиологическое исследование.* С целью оценки восстановления иннервации мышц нижней конечности в динамике всем животным на сроках 30 и 60 суток выполнялась электронейромиография (ЭНМГ) при помощи прибора «Нейро-МВП-Микро» (Россия). Раздражающие игольчатые электроды вводили в область тазобедренного сустава, в проекции седалищного нерва. В ходе ЭНМГ выполнялась оценка следующих показателей: амплитуда М-ответа (А max), латентный период М-ответа (Лп) и длительность М-ответа (Дл).

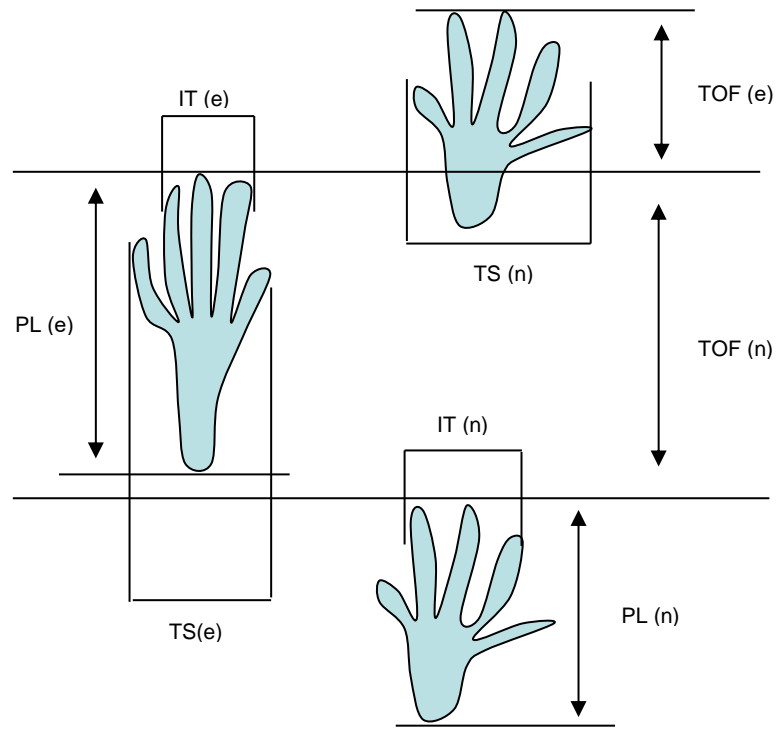


Рис. 5. Основные показатели отпечатков подошвенных поверхностей: TOF – дистанция от пальцев одной лапы до пальцев другой лапы; TOF (e) - от пальцев экспериментальной конечности до пальцев нормальной конечности; TOF (n) - от пальцев нормальной конечности до пальцев экспериментальной конечности; PL (print length – длина отпечатка) – от пятки до 3 пальца одной лапы; IT (intermediary toe spread – ширина между пальцами) – между вторым и четвёртым пальцами одной лапы; TS – между 1 и 5 пальцами одной лапы

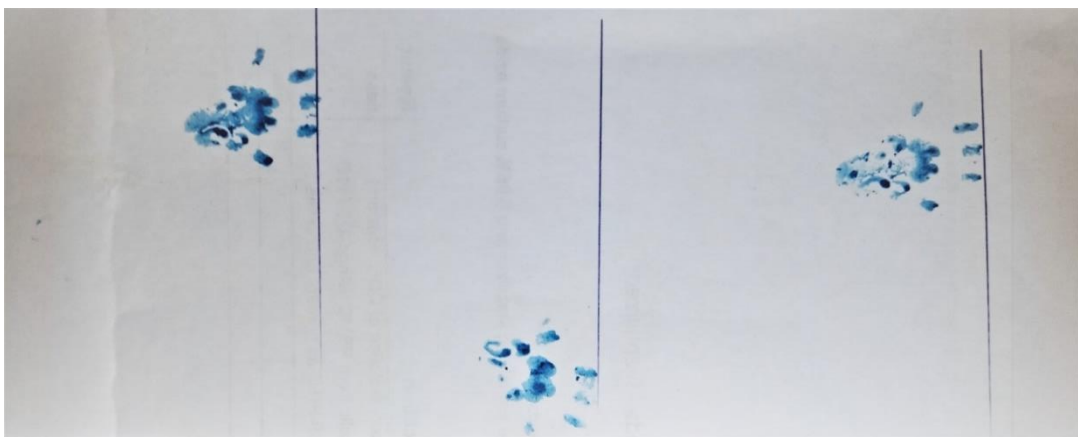


Рис. 6. Отпечатки лап крысы после прохождения по дорожке из белой бумаги при выполнении функционального теста «Тест ходьбы на дорожке», по которым выполнялся расчёт седалищно-функционального индекса

### 2.3. Клинико-морфологическая характеристика пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы

Материалом для исследования являлись фрагменты костей предплюсны, окружающие их мягкие ткани и фрагменты икроножного нерва (n. suralis) голени больных нейропатической формой СДС (стопа «Шарко»), которые были получены в ходе коррегирующей остеотомии (n=6) и ампутации конечности на уровне нижней трети голени вследствие утраты опорной функции (n=4).

Таблица 4

Характеристика пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы

Показатель	Значение
Число пациентов, n	10
Средний возраст, год	64,7±4,5
Продолжительность СД, год	10,6±2,4
Продолжительность существования язвенного дефекта до включения в исследование, месяц	5,8±1,4
Локализация язвенного дефекта	
Подошва	5
Тыл	1
Пяточная область	4
Предшествующее хирургическое лечение	
Да	21 (60%)
Нет	14 (40%)
Другие проявления сахарного диабета	
Диабетическая ретинопатия	3
Диабетическая нефропатия	1

В качестве модельного объекта для оценки паттерна поражения микроциркуляторного русла периферических нервов у пациентов с СД был выбран икроножный нерв. Фрагменты икроножного нерва фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Микропрепараты изготавливались по стандартной методике. Выполнялась окраска срезов гематоксилином и эозином. Все изготовленные гистологические препараты были изучены на микроскопе Zeiss Axio Imager Z2 (Zeiss AG, Германия) с видеокамерой и программным обеспечением Axio Vision. Для исследования ультраструктурных изменений сосудистой стенки *vasa nervorum* образцы периферического нерва фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде и 1% растворе четырехоксида осмия. Дегидратацию проводили спиртами с восходящими концентрациями, затем заливали в эпон-аралдит.

## **2.4. Клиническое исследование безопасности и эффективности геннопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы**

### **2.4.1. Основания к проведению клинического исследования безопасности и эффективности *pl-VEGFA***

Все больные перед включением в исследование были информированы о целях и задачах исследования, потенциальной пользе от участия и возможных рисках. Основанием для проведения пилотного клинического исследования явились разрешения локального этического комитета Рязанского медицинского государственного университета (№2 от 02.10.2014) и Видновской районной клинической больницы (№13 от 06.10.2014) (международный идентификатор на ClinicalGovTrial: NCT02538705).

### **2.4.2. Характеристика пациентов**

Пилотное клиническое исследование проводилось с участием больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы (n=35) в

соответствии с критериями включения и невключения, которые представлены ниже.

Критерии включения:

- возраст от 40 лет;
- нейроишемическая форма синдрома диабетической стопы;
- длительно не заживающий язвенный дефект на фоне проводимой стандартной терапии (не менее 3 месяцев) ограниченный стопой и отсутствие тенденции к заживлению;
- глубина язвенного дефекта по Вагнеру 1-2 степень;
- наличие гемодинамически значимых поражений магистральных артерий нижних конечностей по данным ангиографии и/или УЗДГ;
- отсутствие срочных показаний к ампутации;
- возможность осуществления ежедневного контроля гликемии с поддержкой уровня гликированного гемоглобина до 10%;
- наличие письменного информированного согласия пациента.

Критерии невключения:

- выраженная деформация стопы;
- наличие гнойно-деструктивных поражений стопы (абсцесс, флегмона);
- недавняя (менее 3 месяцев) операция или эндоваскулярное вмешательство на артериях нижних конечностей или недавний (менее 3 месяцев) тромбоз глубоких вен нижних конечностей.

### **2.4.3. Дизайн клинического исследования**

Исследование было спланировано как открытое, проспективное, двухцентровое. Пациенты получали стандартную комплексную терапию в соответствии с «Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» по ведению нейроишемической формы СДС, включавшую применение разгрузки конечности, местного лечения, контроля гликемии и т.д. Применение цилостазола и простагландинов было исключено



не менее чем за 3 месяца до включения в исследование. Продолжительность исследования составила 6 месяцев с контрольными сроками обследования: при включении в исследование, 14, 30, 90 и 180 сут. (рис. 7). Все пациенты перед включением в исследование были информированы о целях и задачах исследования, потенциальной пользе от участия и возможных рисках. Все больные подписывали добровольное информированное согласие. Протокол исследования проходил одобрение локальными этическими комитетами (международный идентификатор на ClinicalGovTrial: NCT02538705).

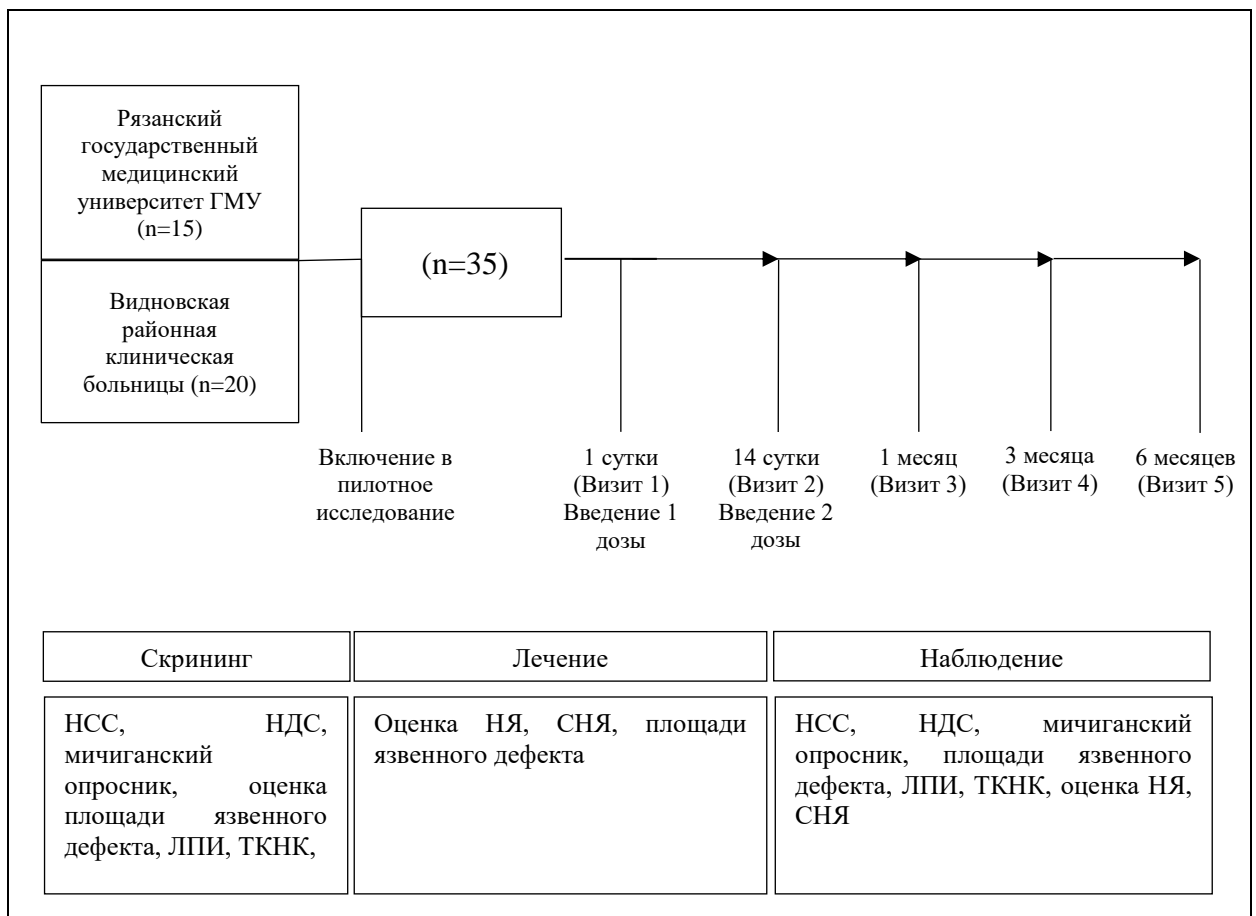


Рис. 7. Дизайн клинического исследования по оценке безопасности и эффективности применения *pl-VEGFA* при синдроме диабетической стопы

#### 2.4.4. Оценка безопасности

Оценка безопасности осуществлялась на протяжении всех 6 месяцев путем регистрации нежелательных явлений (НЯ) и серьёзных нежелательных явлений (СНЯ). Нежелательным явлением является любое неблагоприятное

медицинское событие, которое возникло в ходе исследования (от момента подписания информированного согласия до стечения 30 дней после последнего визита по исследованию или проведения последней процедуры, связанной с исследованием, независимо от того, рассматривается ли оно как связанное с применением исследуемого препарата, процедурой исследования или нет.

Серьезным нежелательным явлением является любое неблагоприятное медицинское событие, отвечающее определению НЯ, которое, кроме того, при любой дозе:

- приводит к смерти;
- угрожает жизни;
- приводит к стойкой или значимой недееспособности/инвалидности;
- приводит к госпитализации в стационар или продлению текущей госпитализации;
- любое неблагоприятное медицинское событие, которое может не сразу угрожать жизни и приводить к смерти или госпитализации, но с медицинской и научной точки зрения может представлять угрозу для субъекта исследования или потребовать вмешательства для предотвращения любого из перечисленных выше исходов.

#### **2.4.5. Оценка эффективности**

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.

*Шкала нейропатического симптоматического счёта.* Для подсчета НСС участники исследования заполняли опросник, в котором проводили

анализ наличия и выраженности следующих симптомов нейропатии: парестезии, жжения, онемения, боли, судорог, гиперестезии. Каждому симптому присваивается балл: 0 баллов при его отсутствии, 1 балл при наличии симптома и 2 балла при усилении симптоматики ночью. Общая сумма баллов составляет значение шкалы НСС (приложение 4).

*Шкала нейропатического дисфункционального счёта.* Количественная оценка степени тяжести периферической полинейропатии проводится в соответствии со шкалой, разработанной M.J. Young в 1986 г. и рекомендованной Европейской Ассоциацией по Изучению Диабета [229] (приложение 5). Порог тактильной чувствительности в формате шкалы НДС оценивался при помощи 10 г (5.07 Semmes-Weinstein) монофиламента. Исследование чувствительности выполнялось при спокойном и расслабленном состоянии.

Болевая чувствительность исследовалась при помощи неврологической ручки. Болевая чувствительность считалась не нарушенной, если пациент чувствует боль на всей поверхности исследования. Порогом нарушения болевой чувствительности считался уровень, с которого больной начинает ощущать боль от укола. Например, указывает на то, что он ощущает боль с середины стопы, следовательно, болевая чувствительность снижена до уровня середины стопы.

Температурную чувствительность оценивали при помощи термического наконечника (Tip-term). Порогом температурной чувствительности считался тот уровень, с которого начинает ощущаться разница температур. Например, пациент указывает на то, что он ощущает холод и тепло на уровне колена, следовательно, температурная чувствительность снижена до уровня колена.

Оценка порога вибрационной чувствительности оценивалась при помощи градуированного неврологического камертона (tuning fork), вибрирующего с частотой 128 Гц. Основание вибрирующего камертона

устанавливалось на участки костных выступов. Прибор располагался перпендикулярно исследуемой зоне с постоянным давлением.

*Мичиганский опросник.* Данный опросник основан на анализе субъективных жалоб пациента ассоциированных с нейропатией и является согласно рекомендациям «Алгоритмам специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» одним из инструментов для динамической оценки выраженности проявлений нейропатии (приложение б).

*Транскутанное напряжение кислорода (ТКНК).* Измерения чрескожно определяемого напряжения кислорода в тканях проводили с помощью прибора ТСМ-2 фирмы «Radiometer» (Дания). Во время измерения пациент находился горизонтально на спине с выпрямленными конечностями. Фиксация датчика осуществлялась по стандартной технологии, рекомендуемой фирмой–изготовителем прибора в первом межпальцевом промежутке на тыле стопы. Показатели регистрировались не ранее, чем через 20 мин. после помещения откалиброванного датчика на место измерения.

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. 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).

## 2.5. Статистическая обработка данных

Все анализы безопасности и эффективности осуществлялись с использованием методов описательной статистики. Суммарная статистика включает: количество (N), среднее, стандартное отклонение (STD), медиану, минимум (min) и максимум (max) для непрерывных переменных и абсолютную частоту (n) и процент (%) для категориальных переменных. При оценке эффективности были также рассчитаны доверительные интервалы для соотношений (дихотомические переменные) и среднее (непрерывные переменные), с допущением нормального распределения. Для оценки статического различия показателей использовались параметрические и непараметрические статистические критерии.

1. Анализ соответствия вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Наиболее точным способом анализа соответствия вида распределения признака закону нормального распределения является проверка статистических гипотез о виде распределения. При априори неизвестных значениях среднего и стандартного отклонения следует использовать критерий Шапиро-Уилка. По результатам анализа можно принять одну из гипотез: нулевую гипотезу (при  $p > 0,05$ ) – распределение исследуемого признака в генеральной совокупности соответствует закону нормального распределения; альтернативную гипотезу (при  $p < 0,05$ ) – распределение исследуемого признака в генеральной совокупности не соответствует закону нормального распределения.

2. Описание количественных данных в зависимости от вида их распределения. Вычислялись меры центральной тенденции: среднее значение, медиана, а также меры рассеяния: среднее квадратическое отклонение, стандартная ошибка среднего, доверительный интервал, нижний (25%) и верхний (75%) квантили.

3. Сравнение групп по качественным порядковым (стадия заболевания) и бинарным признакам (ампутация, летальный исход, окклюзия

зоны реконструкции, наличие критическое ишемии) с помощью построения таблиц сопряженности  $2 \times 2$  и использованием методики  $\chi^2$  с поправкой Йетса и точного критерия Фишера.

Для проведения статистического анализа и моделирования использовался ноутбук SAMSUNG NP300E5X с объемом ОЗУ 4 Гб и тактовой частотой 2,5 МГц в стандартной конфигурации. В исследовании использовались пакеты прикладных программ: Statistica for Windows 10.0 (ANOVA/VANOVA) – для статистического анализа, MS Office 2010 и MS Excel 2010 – для организации и формирования матрицы данных и чертежа графиков.

### **ГЛАВА 3. ГЕННООПОСРЕДОВАННАЯ АНГИОГЕННАЯ ИНДУКЦИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO**

Для проверки гипотезы о положительном влиянии генноопосредованной ангиогенной индукции на репаративный процесс в нерве было выполнено экспериментальное исследование. Оценка ангиогенной активности геннотерапевтической конструкции *pl-VEGFA* и её влияние на строение сосудистой стенки было выполнено на модели хорион-аллантаисной мембраны, которая позволяет в наилучшей степени визуально оценить рост и формирование новых сосудов. После этого в модели травмы периферического нерва выполнялась оценка влияния генноопосредованной ангиогенной индукции на репаративную регенерацию периферического нерва.

#### **3.1. Специфическая активность плазмидной ДНК с геном эндотелиального сосудистого фактора роста в модели хорион- аллантаисной мембраны**

Через 5 суток после нанесения раствора *pl-VEGFA* на поверхность ХАМ было осуществлено вскрытие скорлупы в области воздушной камеры. При внешнем осмотре отмечено, что в экспериментальной группе развитие сосудов в ряде случаев проходило более интенсивно, что подтверждалось морфометрически – количество ветвлений (вплоть до третьего порядка) превосходило этот показатель в контроле, что согласуется с данными, полученными ранее другими авторами с аналогичным классом индукторов роста сосудов, имелись различия и в диаметре новообразованных сосудов (рис. 8, 9).

При анализе полутонких срезов ХАМ контрольной группы различаются эндотелиальные клетки (ЭК) уплощенной формы и плотно прилегающие к базальной мембране (БМ). Ядро занимает большую часть цитоплазмы ЭК. БМ – тонкая, непрерывная. При изучении полутонких срезов

опытной группы были выявлены следующие особенности строения сосудистой стенки.

При электронной микроскопии ХАМ контрольной группы было установлено, что строение стенки капилляров соответствует обычной структуре (рис. 10). ЭК имеют уплощенную форму, причём ядро заполняет большую часть цитоплазмы клетки. На широкой апикальной поверхности располагаются единичные выступы плазмолеммы в просвет сосуда. Межклеточная адгезия клеток обеспечена щелевыми контактами. ЭК приподняты над БМ, последняя – тонкая, непрерывная.

При анализе электроннограмм опытной группы, подвергшейся воздействию экзогенного гена *VEGFA*, были выявлены значимые изменения (рис. 11, 12). ЭК сложной формы, с многочисленными отростками, выступающими в просвет сосуда, причём ядра занимают меньшую часть цитоплазмы. Различима зона расширенных щелевых контактов между ЭК. Выявляются дефекты в БМ, через которые происходит миграция ЭК. Ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС) эндотелиоцитов в группе контроля в 1,6 раза меньше ЯЦС опытной группы и составляет  $0,87 \pm 0,14$  и  $0,54 \pm 0,36$  в опытной. По-видимому, описанные ультраструктурные изменения могут быть результатом воздействия введённого экзогенного гена *VEGFA*.

Обнаруженные морфологические феномены свидетельствуют о том, что в ЭК активируется перестройка цитоскелета, усиливается их метаболическая активность. Эти явления сопровождаются изменениями формы клетки, 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. В целом, ультраструктурная картина свидетельствует об усилении гистогенетических явлений в сосудистой стенке.



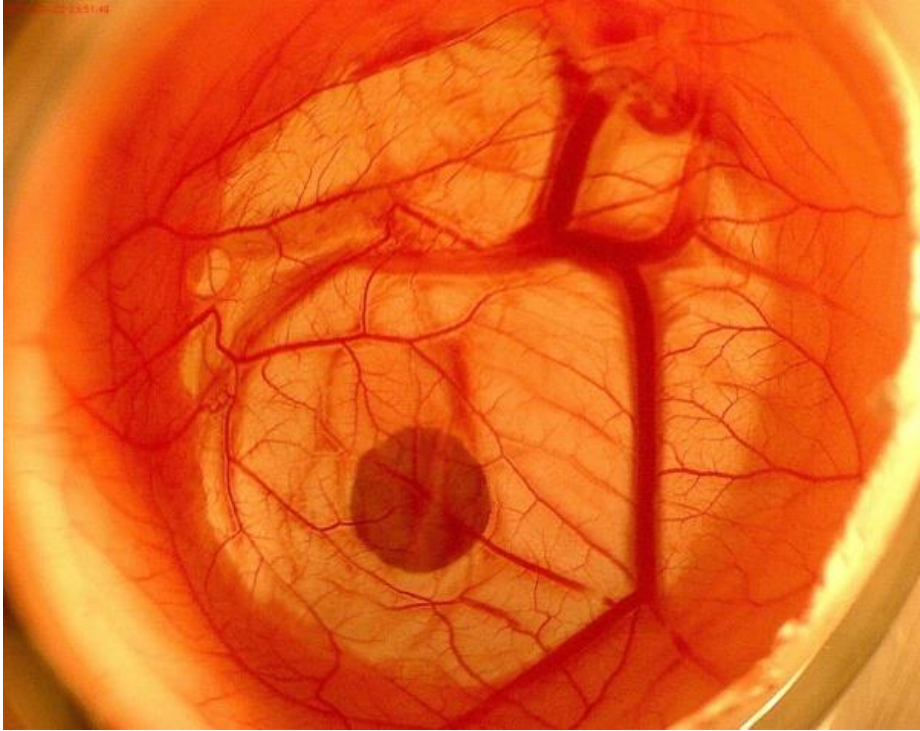


Рис. 8. Сосуды хорионлантоисной мембраны без нанесения *pl-VEGFA* – группа контроля

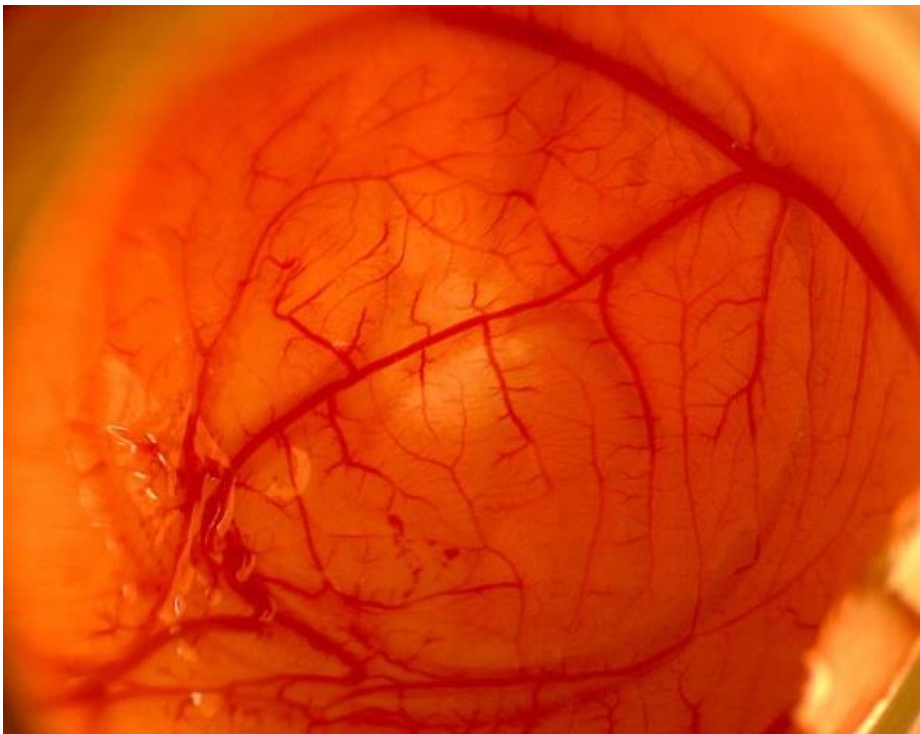


Рис. 9. Сосуды хорионлантоисной мембраны с нанесением *pl-VEGFA* - экспериментальная группа

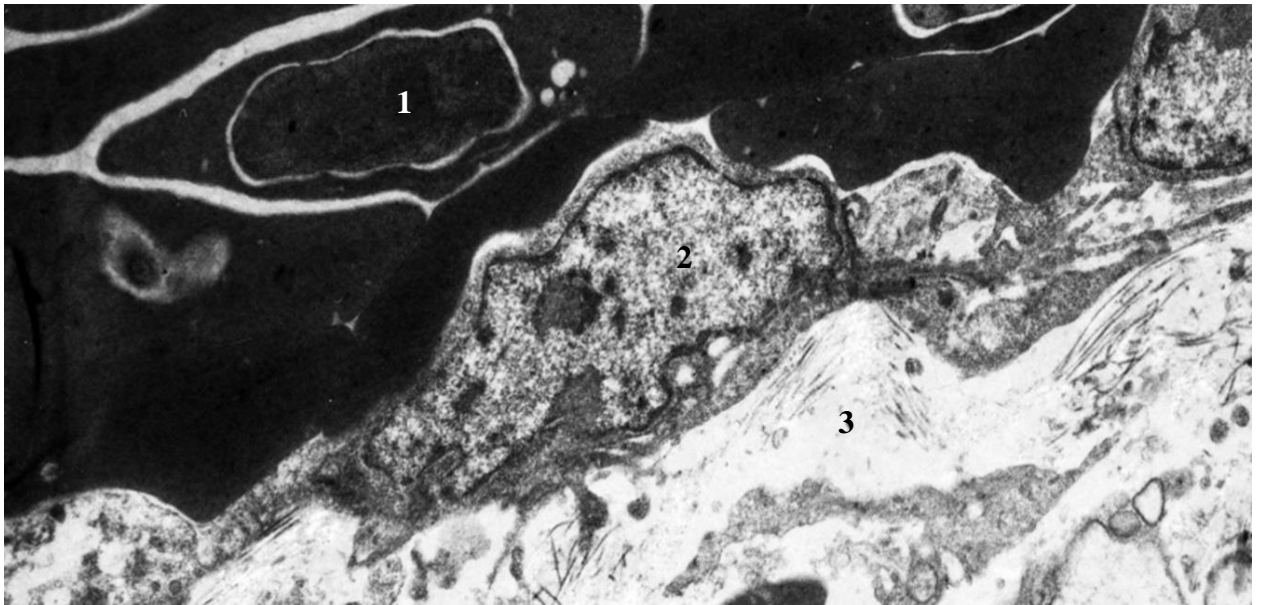


Рис. 10. Ультраструктура капилляра ХАМ в контроле (норма): 1 - ядросодержащий эритроцит в просвете сосуда; 2 - уплощенный эндотелиоцит; 3 - рыхлая базальная мембрана. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.  $\times 4000$

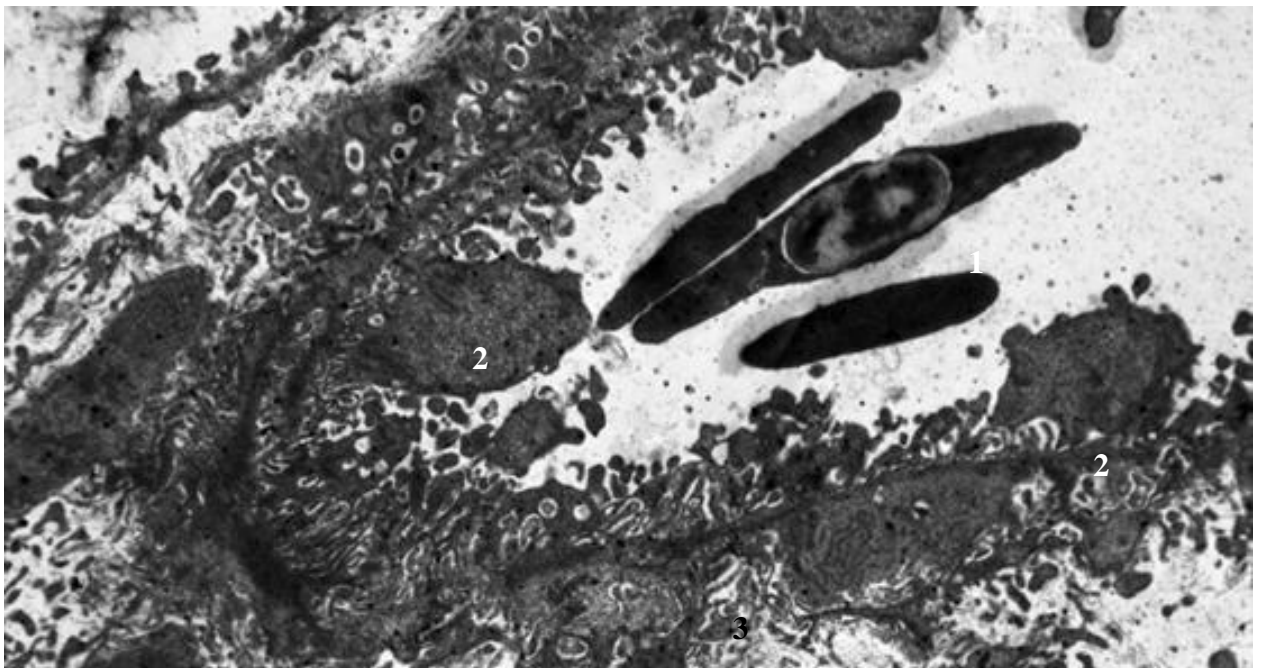


Рис. 11. Ультраструктура капилляра ХАМ после аппликации pl-VEGFA: 1 - ядросодержащие эритроциты; 2 - эндотелиоцит со складчатым и вакуолизированным апикальным и базальным отделами; 3 - рыхлая базальная мембрана. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.  $\times 4000$

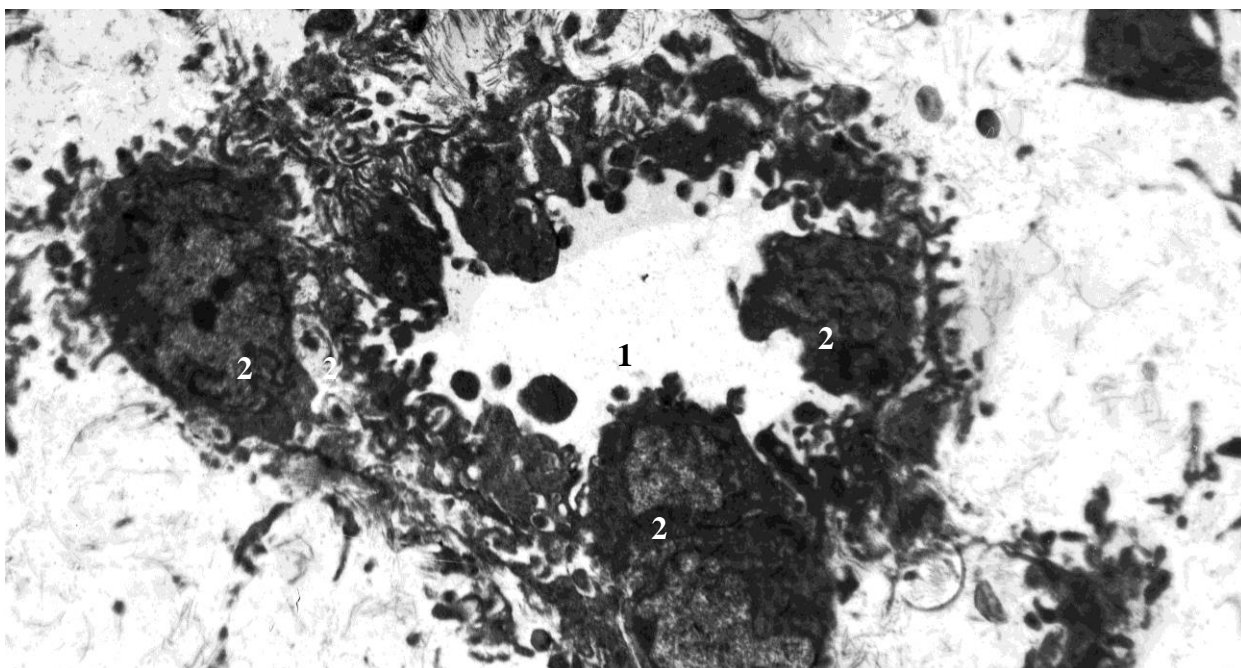


Рис. 12. Поперечный срез капилляра ХАМ после аппликации pl-VEGFA: 1 - просвет сосуда; 2 – ядра эндотелиоцитов со складчатым и вакуолизированным апикальным и базальным отделами. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.  $\times 4000$ .

Эти изменения соответствуют эффектам эндотелиального сосудистого фактора роста в тканях, а именно – запуск миграции эндотелия, синтез им различных веществ, направленных на рост и развитие сосудистой сети.

Таким образом, при воздействии экзогенного гена pl-VEGFA в строении стенки сосудов происходит изменение конформации ЭК и увеличение числа отростков на апикальной поверхности. Это сопровождается увеличением миграционной способности ЭК и уменьшением ЯЦС, увеличением протеолитической активности ЭК и разволокнением БМ. В совокупности выявленные структурные изменения сосудистой стенки при воздействии pl-VEGFA позволяют рассматривать данную геннотерапевтическую конструкцию как локальный индуктор ангиогенеза.

## **3.2. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на репаративный нейрогенез в хирургической модели нейропатии седалищного нерва**

### **3.2.1. Результаты гистологического анализа**

В хирургической модели «перерезка-сшивание» интраневральное введение *pl-VEGFA* на обоих сроках сопровождалось достоверным увеличением показателя плотности осевых цилиндром на обоих сроках, что отражает терапевтический эффект генноопосредованной индукции ангиогенеза (табл. 5). При этом 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. Необходимо также отметить, что внутригрупповые различия показателя также были более выражены при введении *pl-VEGFA*, что выражалось более выраженным приростом количества осевых цилиндров – 27% и 59% соответственно в группе контроля и при индукции ангиогенеза. Аналогичная тенденция положительного влияния генноопосредованной индукции ангиогенеза была обнаружена у животных в модели «аутонервная вставка». Введение *pl-VEGFA* обеспечило достоверное увеличение плотности осевых цилиндром дистальнее аутовставки на обоих сроках (табл. 6), несмотря на наличие двух анастомозов. Таким образом, применение генноопосредованной индукции ангиогенеза сопровождается увеличением количества осевых цилиндров в дистальном фрагменте не только при наиболее оптимальных условиях, таких формированием анастомоза «конец-в-конец», но и при наличии неблагоприятных факторов, таких как наличие двух анастомозов, обуславливающих более выраженное нарушение васкуляризации в зоне повреждения. Гистоморфометрический анализ икроножной мышцы показал, что введение *pl-VEGFA* сопровождалось увеличением нервных волокон по сравнению с группой контроля в обеих экспериментальных моделях.

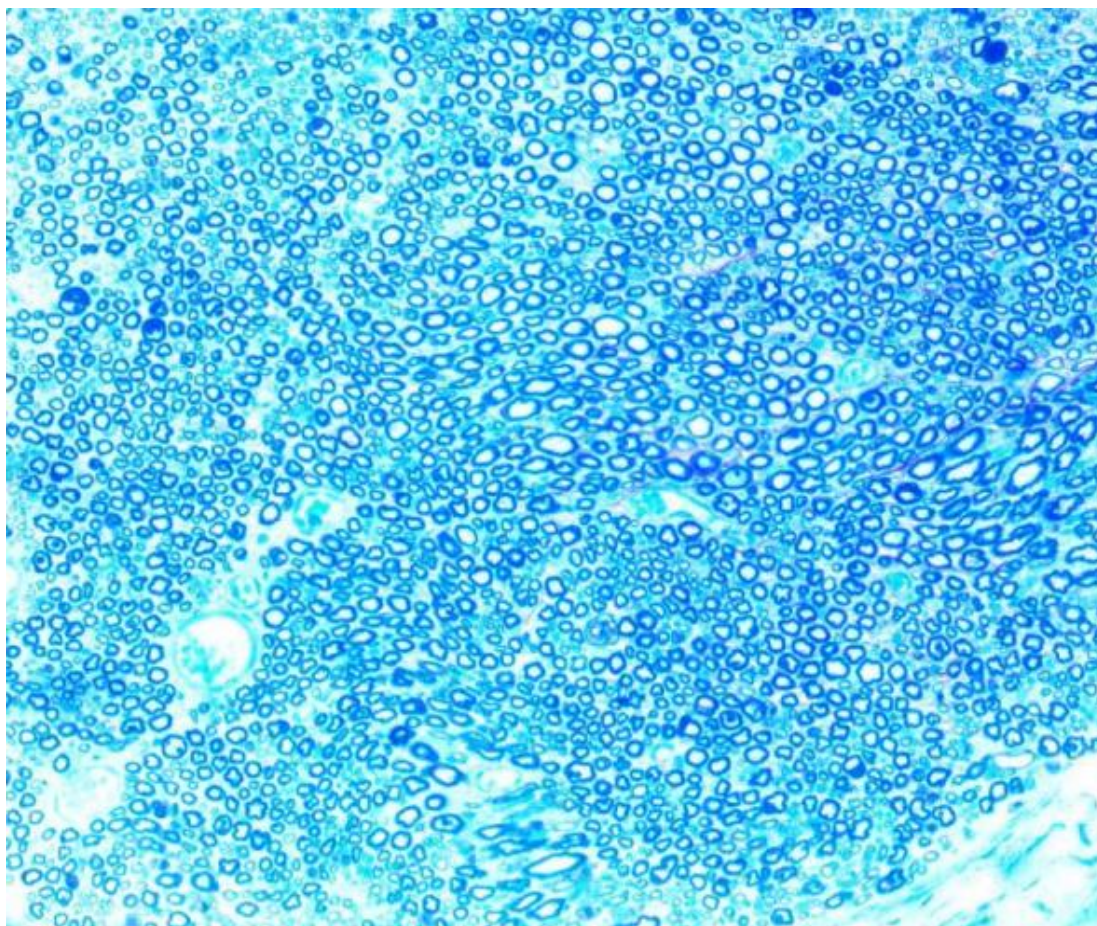


Рис. 13 Поперечный срез седалищного нерва в области проксимального фрагмента. Окраска: толуидиновый синий (полутонкий срез). Ув.:  $\times 100$

Таблица 5

Морфометрические показатели седалищного нерва в модели «перерезка-сшивание»

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

В модели «перерезка-сшивание» различия показателя достигли статистической достоверности на сроке 30 суток ( $p=0,023$ ), в то время как на сроке 60 суток значения практически не отличались (табл. 7). Это может быть обусловлено тем, что введение pI-*VEGFA* обеспечивает вначале индукцию репаративной регенерации периферического нерва за счёт активации ангиогенеза, однако в последующем это преимущество нивелируется за счёт высокой активности репаративной регенерации у выбранных экспериментальных животных. В модели «аутонервная вставка» - напротив различия показателей по сравнению с группой контроля были достоверны лишь на сроке 60 суток, что может быть связано с изначально менее благоприятными условиями репаративной регенерации - наличие двух участков пересечения в модели «аутонервная вставка» и, как следствие, двух критических точек для преодоления прорастающих аксонов может обуславливать тот факт, что результат индукции репаративной регенерации определяется позже. Увеличение количества нервных волокон за счёт индукции репаративной регенерации непосредственно после повреждения периферического нерва сопровождалось достоверным увеличением

показателя СПНВ в модели «аутонервная вставка» ( $p=0,003$  и  $p=0,005$ , соответственно на 30 и 60 сутки), в то время как в модели «перерезка-сшивание» значения были сходны на обоих сроках. Таким образом, на структурном уровне введение *pl-VEGFA* в обеих группах выразалось в увеличении количества нервных волокон в составе мышцы, что отражает увеличение интенсивности репаративной регенерации.

В обеих группах (контроль и *pl-VEGFA*) отмечалось снижение количества быстрых мышечных волокон, однако индукция ангиогенеза в зоне повреждения обеспечила менее выраженное смещение качественного состава мышечных волокон икроножной мышцы. В модели «перерезка-сшивание» введение *pl-VEGFA* на сроках 30 и 60 суток обеспечило менее выраженное смещение в сторону медленных мышечных волокон - показатель ЧБМВ был  $75,5\% \pm 6,6\%$  и  $62,6\% \pm 7,1\%$ , что было соответственно на  $5,4\%$  ( $p=0,012$ ) и  $7,8\%$  ( $p=0,002$ ) больше, чем в группе контроля (табл. 8). Схожие изменения были выявлены на обоих сроках и в модели «аутонервная вставка», где количество быстрых мышечных волокон оказалось выше соответственно на  $3,6\%$  ( $p=0,081$ ) и  $7\%$  ( $p=0,009$ ). Необходимо отметить, что в данной группе различия показателей достигли статистической достоверности только на сроке 60 суток, что может быть обусловлено исходно менее благоприятными репаративной регенерации.

Морфометрические показатели скелетной мышцы (внутригрупповые и межгрупповые различия)

	модель «перерезка-сшивание»				модель «аутонервная вставка»			
	30 суток		60 суток		30 суток		60 суток	
	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э
КНВ	21,3	23,3	19	19,5	18,6	17,4	17,4	25,5
СПНВ, мкм <sup>2</sup>	671,1	594,6	621,4	634,2	494,4	785,2	665,8	823,2

Примечания: КНВ - количество нервных волокон на 100000 мышечных волокон; СПНВ - средняя площадь нервных волокон на срезе; К – группа контроля, которым осуществлялось введение в дистальный фрагмент периферического нерва H<sub>2</sub>O; Э – экспериментальная группа, которым осуществлялось введение p1-VEGFA



## Морфометрические показатели скелетной мышцы

Внутригрупповые и межгрупповые различия								
Параметр	модель «перерезка-сшивание»				модель «аутонервная вставка»			
	30 суток		60 суток		30 суток		60 суток	
	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э
ПБМВ, мкм <sup>2</sup>	1102,2	905,4	1220,7	1109,8	878,1	770,4	943,4	1266,7
ПММВ, мкм <sup>2</sup>	1078,1	980,2	1297,5	1327,4	1068,1	780,2	1297	1327
ЧБМВ, %	70,1	75,5	54,8	62,6	72,4	68,8	60,9	53,9

Примечания: ПМБВ – средняя площадь быстрых мышечных волокон; ПММВ – средняя площадь медленных мышечных волокон; ЧБМВ – соотношение числа быстрых волокон к медленным; К- контроль, Э - эксперимент

Таким образом, на структурном уровне введение pl-VEGFA в седалищный нерв в хирургической модели нейропатии седалищного нерва сопровождалось увеличением количества осевых цилиндров дистальнее места повреждения, при этом наибольшей степени выраженности это наблюдалось в модели «аутонервная вставка», что коррелировало с менее выраженными качественными изменениями состава поперечнополосатых мышечных волокон.

### 3.2.2. Результаты оценки функции конечности

В модели «перерезка-сшивание» введение pl-VEGFA сопровождалось сокращением срока начала восстановления показателя 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 (рис. 14).

Установленные данные в некоторой степени согласуются с динамикой структурных изменений в данной группе, когда введение *pl-VEGFA* сопровождается достоверным увеличением количества нервных волокон на сроке в 30 суток, в то время как на сроке 60 суток показатели были сопоставимы. По-видимому, исходные различия значений в дальнейшем нивелируются вследствие нарастания процессов репаративной регенерации в контрольной группе. У животных, которым осуществлялось введение воды (группа «ложно-оперированных»), наблюдалось лишь незначительное транзитное снижение индекса SFI.

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. 15). Это отражает более отсроченное начало реиннервации мышечных волокон вследствие наличия двух участков пересечения. Как и в модели «перерезка-сшивание» показатели SFI практически не отличались друг от друга на сроке 60 суток.

Введение *pl-VEGFA* в модели «перерезка-сшивание» сопровождалось достоверным увеличением амплитуды мышечного ответа на 0,41 мВ и 3,04 мВ соответственно на сроках 30 и 60 суток по сравнению с группой контроля (табл. 9). Таким образом, в совокупности результаты оценки функционального состояния конечности и ЭНМГ позволяют утверждать, что интраневральное введение *pl-VEGFA* непосредственно после реконструкции седалищного нерва обеспечило индукцию репаративного гистогенеза.

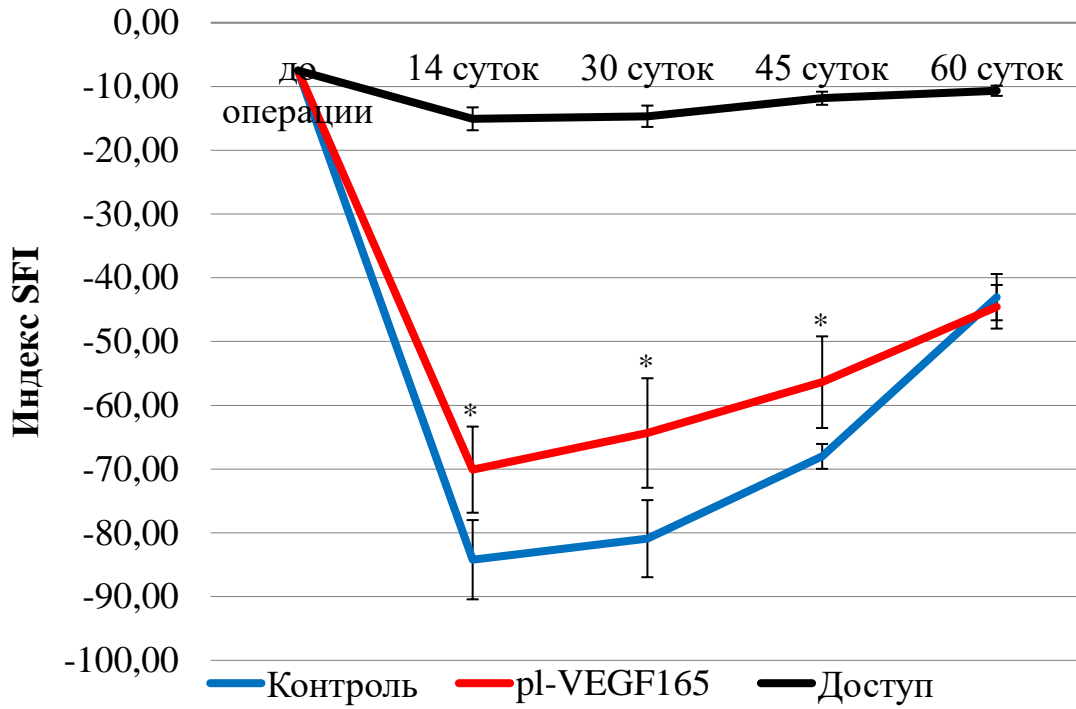


Рис. 14. Динамика изменения индекса SFI в течение 60 суток после пересечения седалищного нерва в модели «перерезка-сшивание»

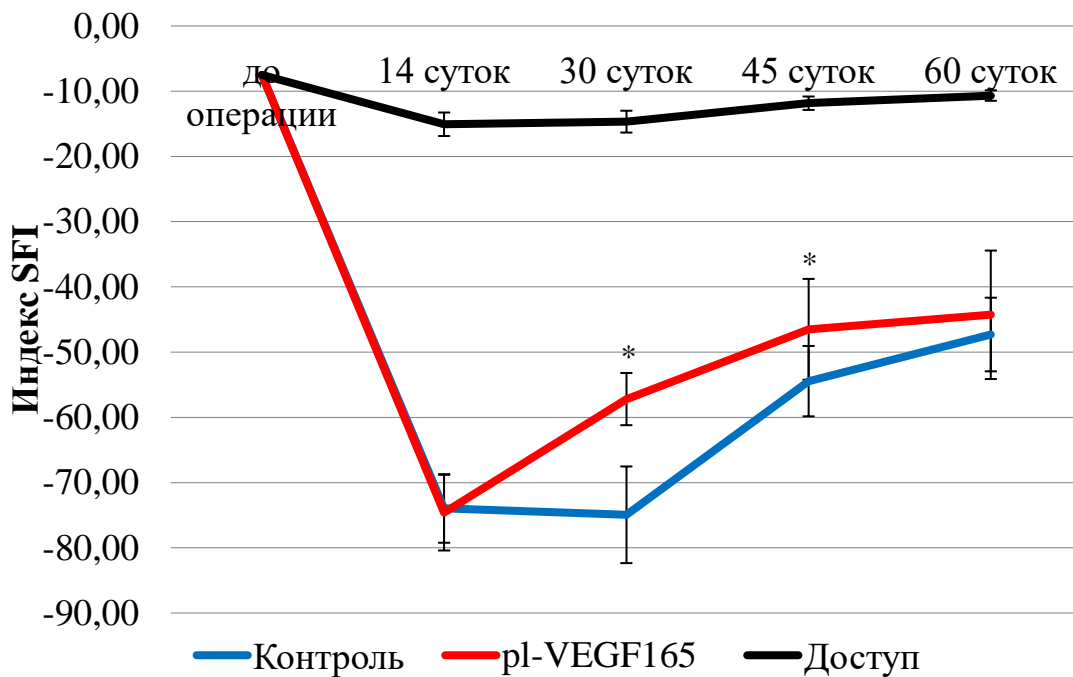


Рис. 15. Индекс SFI в течение 60 суток после травмы седалищного нерва в модели «аутонервная вставка»

Показатели М-ответа икроножной мышцы в модели «перерезка-сшивание»

Параметр	30 суток				60 суток			
	Контроль		pl-VEGFA		Контроль		pl-VEGFA	
	Оп	Кл	Оп	Кл	Оп	Кл	Оп	Кл
А max	4,89	13,6	5,30	13,7	8,88	22,5	11,9	22,3
Лп	0,65	0,52	0,58	0,69	0,58	0,53	0,55	0,5
Дл	4,89	2,16	2,16	2,16	8,88	1,63	1,84	1,72

Примечание: Оп – оперированная конечность; Кл – контрлатеральная конечность; А max - амплитуда М-ответа; Лп - латентный период, Дл – длительность М-ответа

Таким образом, результаты экспериментального исследования показывают, что индукция ангиогенеза в хирургической модели нейропатии седалищного нерва проявляется увеличением количества нервных волокон в составе мышцы, менее выраженным изменением соотношения быстрых и медленных мышечных волокон, а также более ранним восстановлением функции конечности.

Общие результаты экспериментального исследования дали основания для планирования и проведения клинического исследования.

## **ГЛАВА 4. КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕЙ ПРИ НЕЙРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

### **4.1 Структурные изменения стенки сосудов икроножного нерва**

При оценке состояния стенки сосудов (артериол и венул) надкостницы и окружающих мягких тканях определяется выраженное увеличение ее толщины вследствие гиперплазии клеточных элементов, обуславливающее значительное сужение просвета, а в некоторых сосудах и полное закрытие просвета. Наиболее распространёнными изменениями являются утолщение базальной мембраны и гиперплазия эндотелия, что становится причиной полной окклюзии просвета сосудов микроциркуляторного русла (рис. 16).

Электроннограммы свидетельствуют о разрыхленности базальной мембраны капилляров, что способствует развитию паравазального отека. Следует отметить, что ряд эндотелиоцитов находятся в состоянии выраженных изменений, часть из которых является обратимыми – общее набухание и просветление цитоплазмы, угнетение синтетической активности, крайняя узурированность линии ядерного края вплоть до формирования акантовидных ядер (рис. 17). Необратимые изменения эндотелия проявляются наличием фрагментированных клеток, клеток с гомогенизированной и вакуолизированной цитоплазмой. Также толщина стенки сосудов увеличена за счет гиперплазии гладкомышечного и фибробластического компонентов и пропитывания белками плазмы крови, в связи с чем данное состояние можно охарактеризовать как похожее на гиалиноз мелких сосудов. Изменения в структуре сосудистой стенки включают гиперплазию клеточных элементов интимы, утолщение субэндотелиального слоя, в том числе и за счет отека, приводящего к разобщению лейомиоцитов.

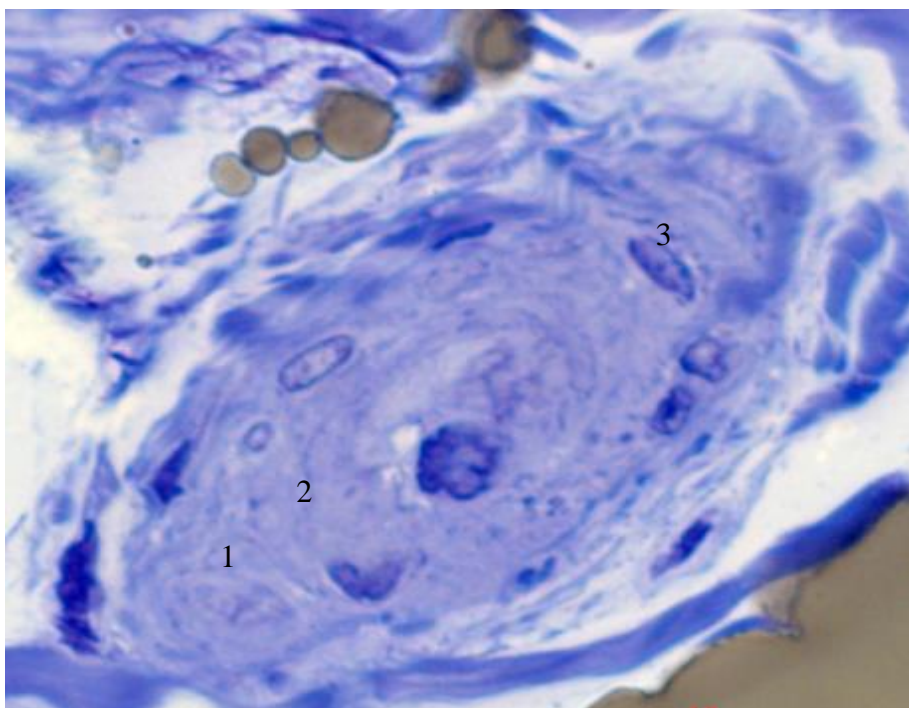


Рис. 16. Пациент В. Сосуд икроножного нерва при синдроме диабетической стопы: 1 – tunica media; 2 – базальная мембрана; 3 – ядро перицита. Окраска: толуидиновый синий (полутонкий срез). Ув.:  $\times 100$

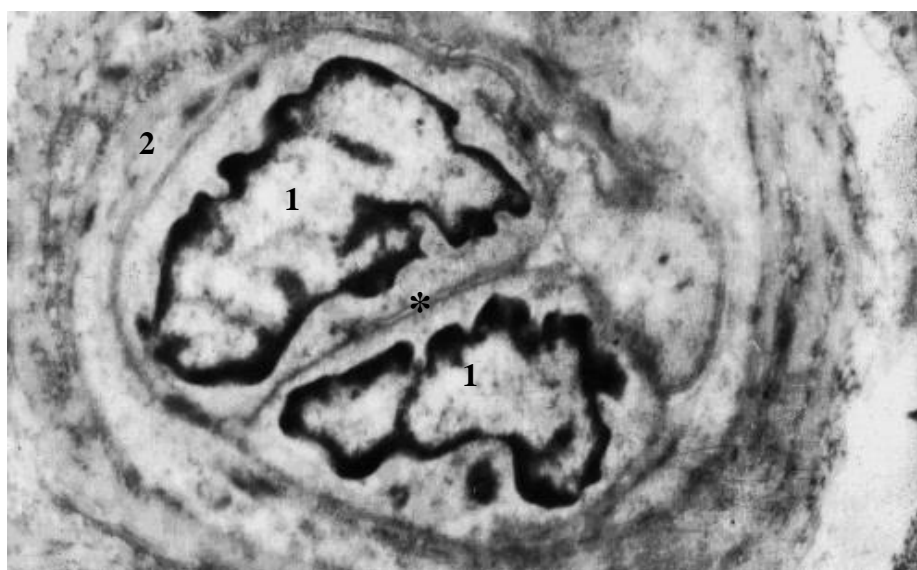


Рис. 17. Пациент С. Капилляр икроножного нерва при синдроме диабетической стопы: \* - просветы сосуда; 1 – ядра эндотелиоцитов; 2 - базальная мембрана. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.:  $\times 3000$

При электронно-микроскопическом исследовании базальной мембраны установлены ее расслоения, фокальные утолщения за счет накопления аморфного электронно малококонтрастного вещества, в некоторых участках ее целостность проследить не удастся.

#### **4.2. Структурные изменения волокон периферических нервов**

На фоне патогистологических изменений сосудов определяются выраженные атрофические и дегенеративные изменения в структуре икроножного нерва. При оценке всей площади поперечного среза отмечается диффузное снижение количества толстых миелиновых волокон, сопровождающиеся разрастанием соединительной ткани, формирующей широкие перегородки (рис. 18).

Среди наиболее распространённых изменений следует выделить расслоение миелина (по типу «луковичной шелухи»), полную или частичную потерю миелина на одной из поверхностей осевого цилиндра, нарушение упорядоченности его слоев. Одновременно с этим наблюдаются дегенеративные изменения в леммоцитах, проявляющиеся в вакуолизации цитоплазмы, нарушении конденсации хроматина и изменении формы ядра (рис. 19).

В очагах деструктивно измененного миелина отмечали наличие длинных тяжёлых леммоцитов (шванновских клеток). В леммоцитах регистрируются полиморфные изменения разной степени выраженности. Морфологическим эквивалентом напряжения и функциональной активности можно считать появление в цитоплазме леммоцитов крупных фагосом с гетерогенным содержимым, определявшим их неравномерную электронную плотность.

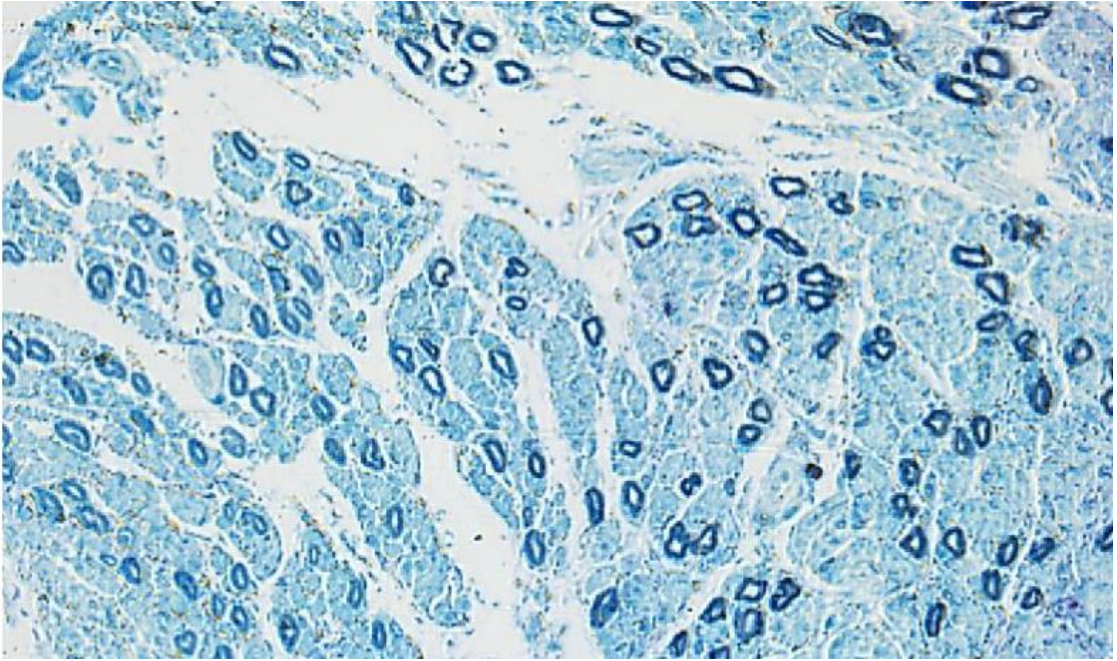


Рис. 18. Пациент С. Мозаичная демиелинизация и частичная утрата осевых цилиндров (полутонкий срез). Окраска: толуидиновый синий. Ув.:  $\times 200$

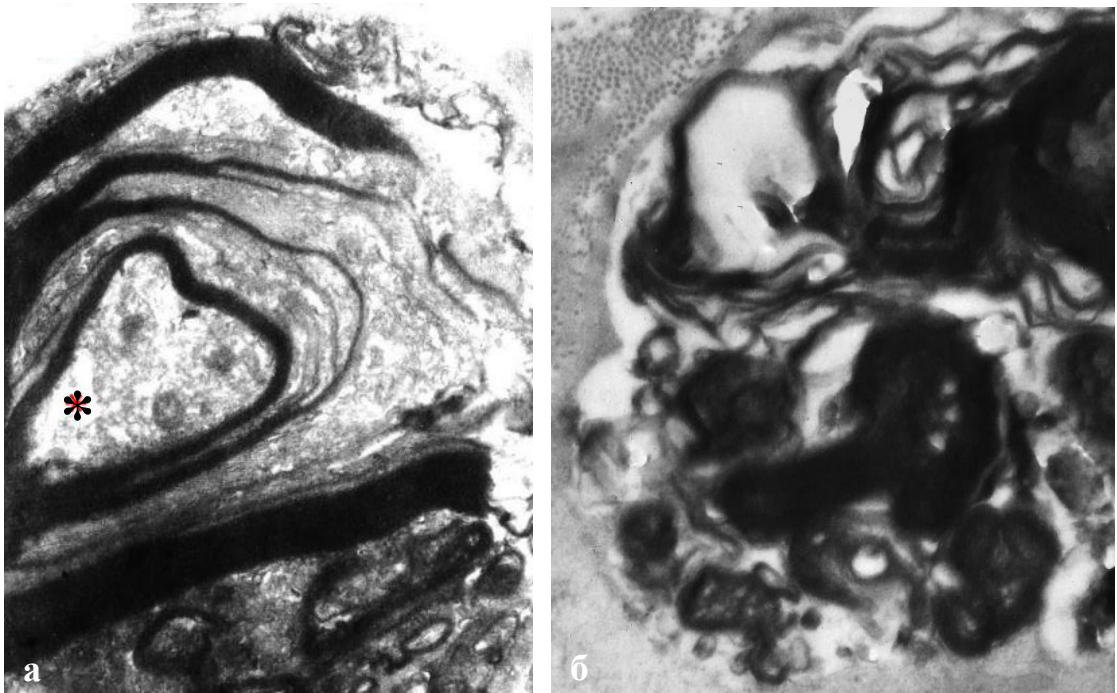


Рис. 19. Пациент А. Расслоение миелина по типу «луковичной шелухи» (а); расслоение и нарушение упорядоченности, скручивание слоев в миелине (б). Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.:  $\times 3000$



### **4.3. Структурные изменения поперечнополосатой мышечной ткани у пациентов с синдромом диабетической стопы**

В мышечной ткани определяются некроз и пролиферация клеток фибробластического дифферона. Погибшие волокна активно фагоцитируются макрофагами. На их месте формируются скопления мелких деформированных миосимпластов и мышечных трубочек, разобщённых прослойками рыхлой соединительной ткани. В совокупности данные признаки свидетельствуют о незавершенном репаративном рабдомиогистогенезе. Важной особенностью данной патологии является то, что объем повреждения всего разнообразия тканей, наличие некроза, массивов тканевого детрита не сопровождается выраженной воспалительной инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами, что, возможно, связано, в том числе и с крайне редуцированным микроциркуляторным кровотоком в этом регионе при формировании СДС. Таким образом, у пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы происходит не только клинически определяемая утрата иннервации, но и характерные патогистологические изменения в эффекторном органе, которые, также, как и при травме нерва, характеризуются глубокой структурной перестройкой. В связи с этим было в качестве модельного объекта для оценки паттерна поражения микроциркуляторного русла периферических нервов у пациентов с СД был выбран икроножный нерв, который обеспечивает иннервацию тканей нижней конечностей. В ходе морфологической части исследования установлено, что одним из главных звеньев патоморфогенеза обратимых и необратимых структурных изменений при терминальных формах диабетического поражения является нарушение строения сосудистой стенки и как следствие радикальная депривация кровообращения в микроциркуляторном звене.

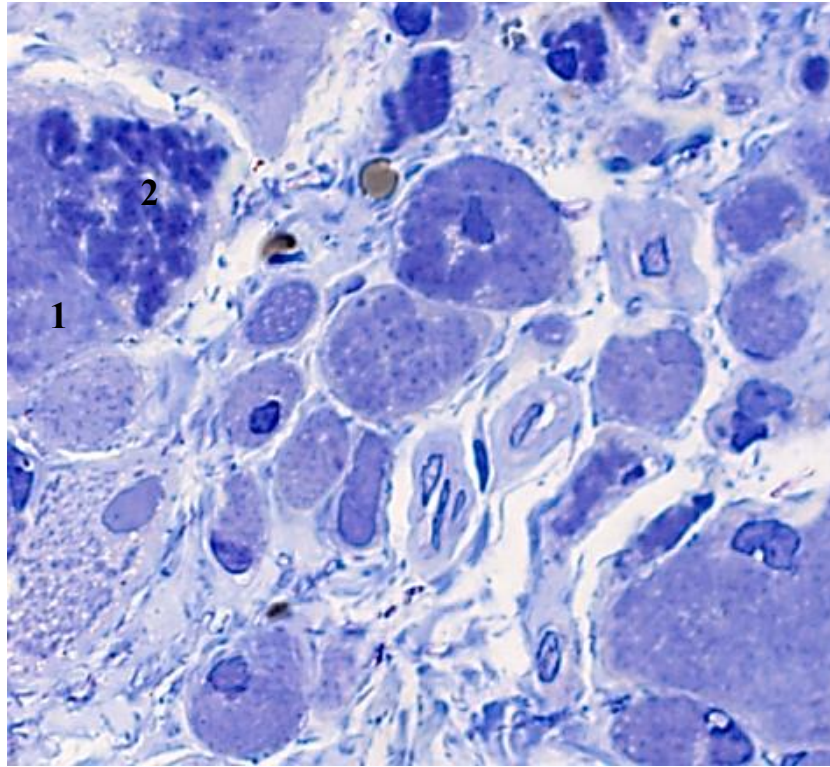


Рис. 20. Пациент А. Скелетная мышечная ткань: 1 – погибающие мышечные волокна; 2 – ядро погибающего мышечного волокна. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув.:  $\times 200$

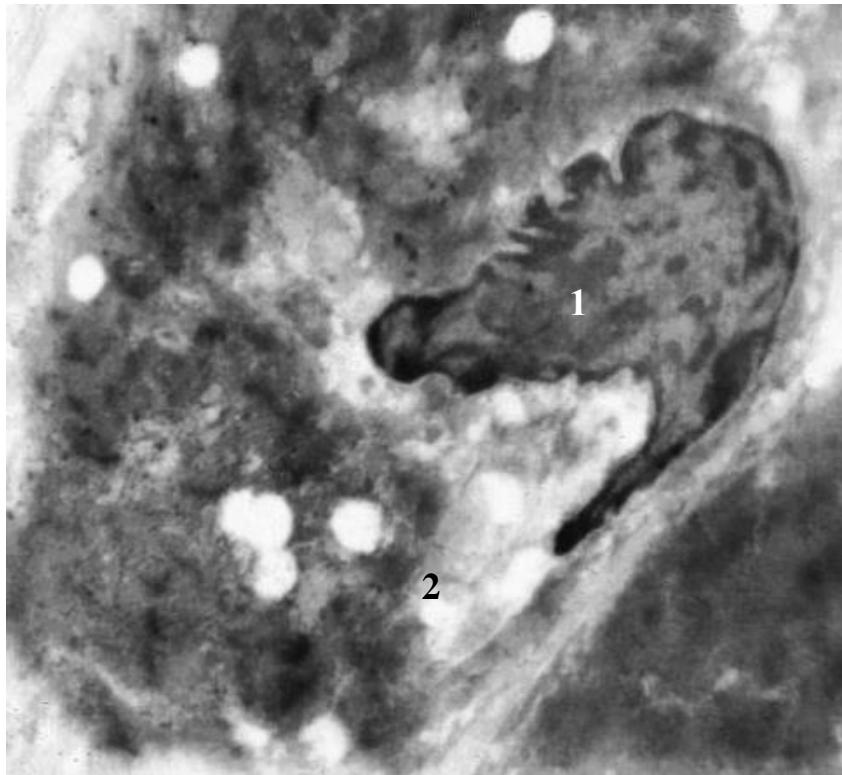


Рис. 21. Пациент А. Скелетная мышечная ткань: 1 – ядро погибающего мышечного волокна; 2 – разрушенная саркоплазма и капли жира. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув.:  $\times 9000$

Нельзя исключить, что каскад последующих изменений, включая нейросенсорные и биомеханические, являются в первую очередь следствием гипоксической гибели тканевых элементов. В этой связи одной из задач приреализации комплексного лечения таких пациентов является эффективное восстановление тканевой перфузии. В ходе клинических и морфологических исследований было показано, что, в частности, генная индукция ангиогенеза обеспечивает достоверное улучшение функционального состояния больных благодаря увеличению дистанции безболевого ходьбы, что коррелирует с возрастанием количества сосудов микроциркуляторного русла в области инъекций. Также показан эффект фармакологической васкуляризации с использованием генноопосредованного терапевтического ангиогенеза при повреждении периферических нервов. Таким образом, учитывая безопасность данного подхода у пациентов с СД, показанную по результатам мета-анализа клинических исследований с применением ангиогенной терапии, можно рассчитывать на успешную реализацию данного подхода при лечении различных форм СДС.

## ГЛАВА 5. 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. Основной целью его была оценка безопасности и признаков эффективности применения *pl-VEGFA* на группе пациентов с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы с целью дальнейшего принятия решения о целесообразности проведения широких рандомизированных исследований и внедрения данного терапевтического подхода в клиническую практику (регистрационный номер в международном реестре клинических исследований [ClinicalTrials.gov: NCT02369809](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02369809)). 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. Протокол исследования во всех клинических центрах проходил одобрение локальными этическими комитетами. 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. По гендерному признаку распределение было следующее: 17 мужского пола, 18 женского (рис. 22).

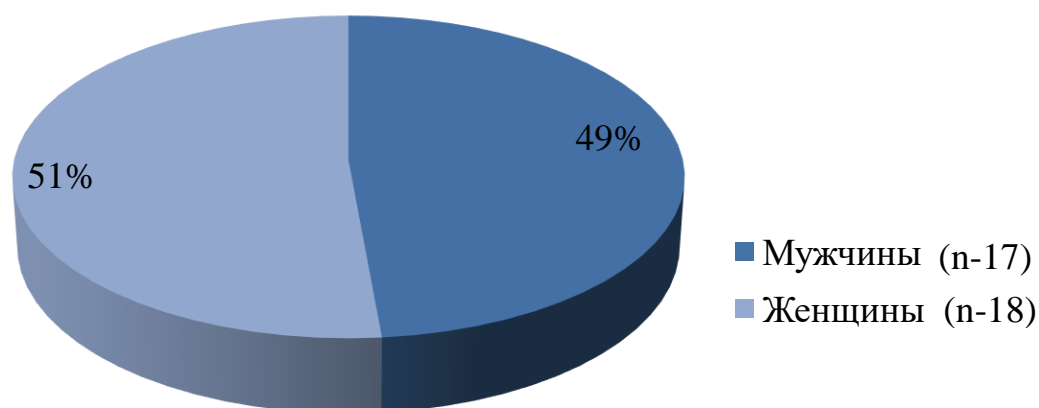


Рис. 22. Распределение пациентов по полу в рамках второго раздела клинического исследования

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. По глубине поражения среди больных преобладала 2 стадия по Вагнеру, что соответствует раневому дефекту, с поражением кожи, подкожно-жировой клетчатки, сухожилий, но без повреждения кости. Эта стадия определялась у 66% больных, что отражает наличие у большей части больных язв, проникающих до мягких тканей стопы без поражения костей и сухожилий. У остальных 34% пациентов была 1 стадия поражения, которая соответствует поверхностной язве с полной деструкцией кожи (рис. 23).

Средняя площадь язвенного дефекта на момент включения в клиническое исследование составила  $5,18 \pm 1,4$  см<sup>2</sup>. По локализации язвенных дефектов преобладали больные с расположением язвенного дефекта на подошве стопы, которых было 40% (рис. 24). Среди участников исследования было 10 пациентов (29%), у которых язвенный дефект располагался в

области пятки. По данным литературы язвенные дефекты данной локализации характеризуются наиболее резистентным течением вследствие распределения высокого давления на эту область стопы. Также среди пациентов было 4 больных СДС (11%), у которых язвенный дефект располагался на тыле стопы, что может чаще встречаться при окклюзии передней большеберцовой артерии [260].

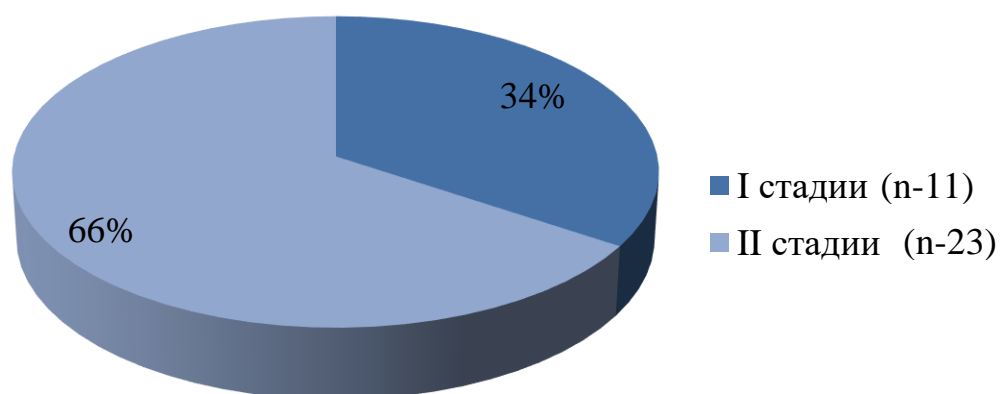


Рис. 23. Общее распределение пациентов по стадии язвенного дефекта (согласно классификации Вагнера) [138]

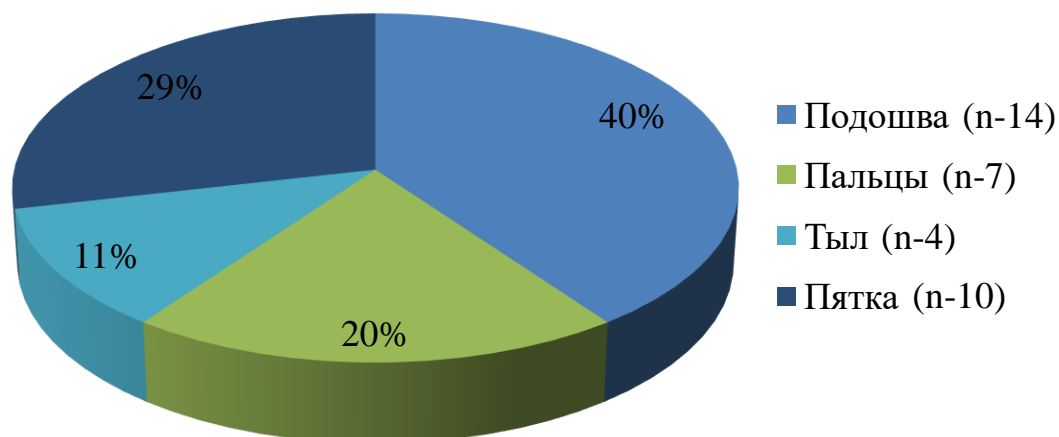


Рис. 24. Распределение пациентов по локализации язвенного дефекта на коже стопы

Все пациенты имели длительный анамнез СД – 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 СДС ишемического компонента. Распределение по уровню окклюзии было следующим: проксимальное поражение - у 21 пациента (60%), дистальная окклюзия - у 8 (23%), мультифокальное поражение – 6 (17%) (рис. 26). При этом 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. 25). Однако, к моменту включения в исследование характер поражения магистральных артерий был таков, что не обеспечивал техническую возможность выполнения открытого и/или эндоваскулярного оперативного вмешательства (рис. 26). 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.

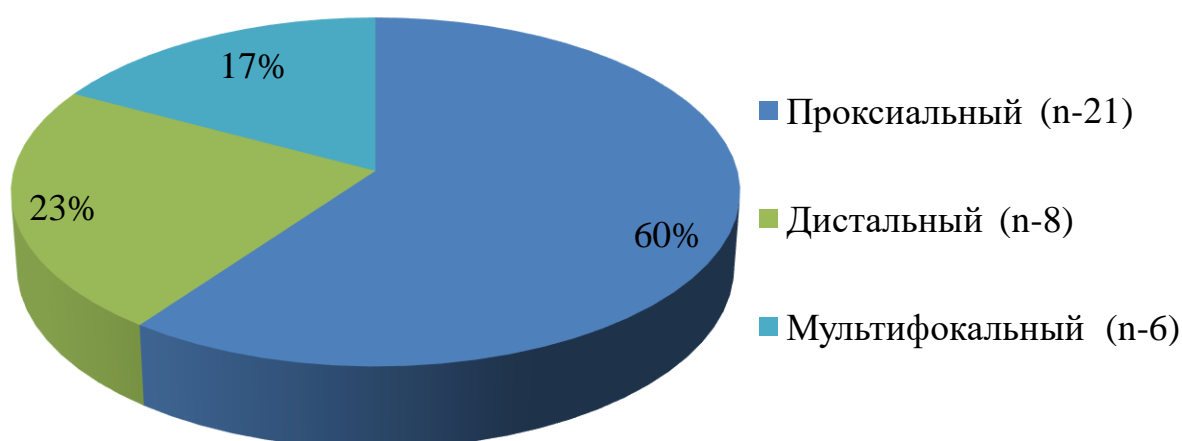


Рис. 25. Распределение пациентов по уровню окклюзии

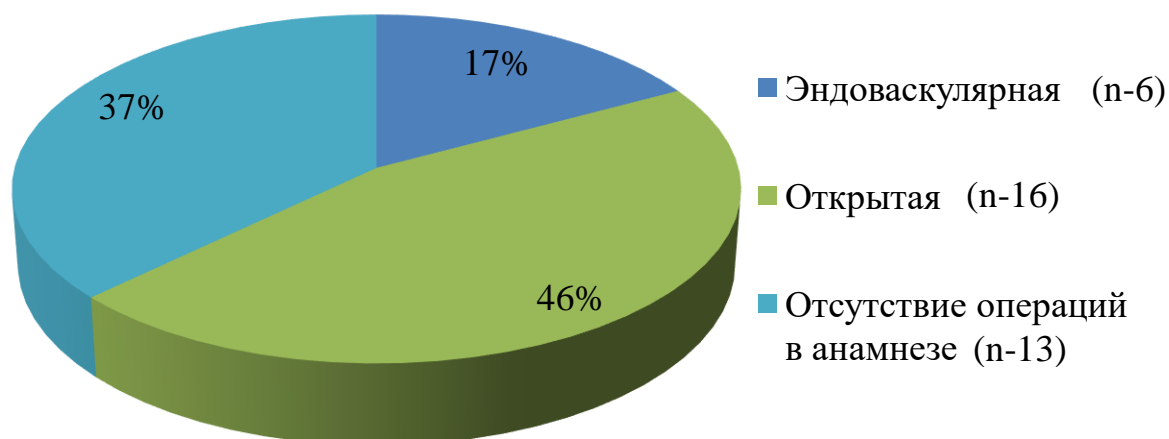


Рис. 26. Распределение пациентов по наличию оперативных вмешательств на сосудистом русле в анамнезе

У всех пациентов при включении в исследование 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 нейропатического дисфункционального счёта (НДС) (рис. 27).



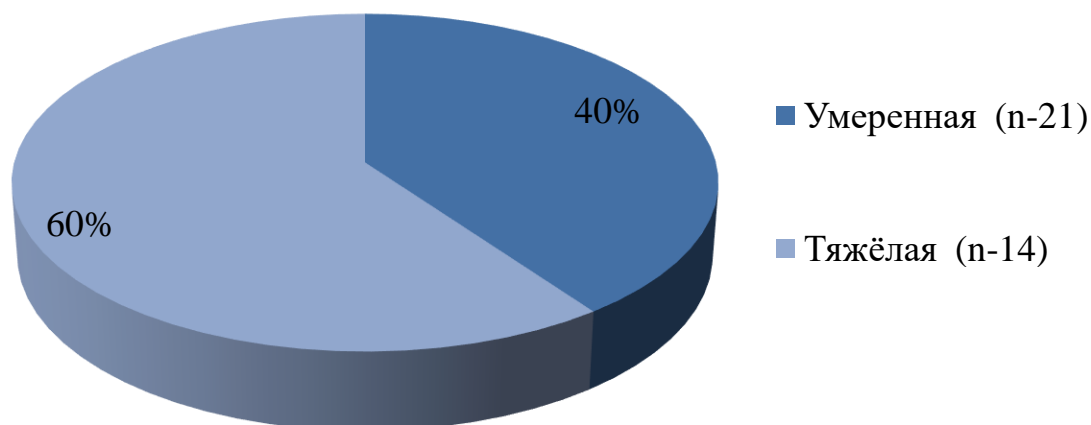


Рис. 27. Общее распределение пациентов по степени тяжести нейропатического компонента согласно показателям нейропатического дисфункционального счёта (НДС)

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. Показатель ТКНК является одним из наиболее распространённых способов оценки перфузии мягких тканей, который может применяться для оценки степени выраженности ишемии, уровня ампутации, а также как прогностический фактор вероятности заживления язвенного дефекта у больных СДС. В отдельных работах показано, что при показателе ТКНК более 40 мм рт ст прогноз благоприятный и сопровождается высокой частотой заживления, в то время как при значении ниже 10 мм рт ст вероятность заживления язвенного дефекта крайне низка [48]. Отдельные авторы считают, что значение ТКНК в 25 мм рт ст может являться границей между пациентами с высокой вероятностью заживления язвенного дефекта и низкой вероятностью [72]. Таким образом, с позиции современных представлений о прогностической значимости показателя ТКНК большая часть пациентов

настоящего исследования попадала в ту категорию, у которых достаточно высокая вероятность заживления язвенного дефекта. Однако резистентный характер течения отражает то, что у больных был также достаточно выраженный нейропатический компонент. В совокупности эти факторы обусловили выраженное изменение условий репаративного гистогенеза.

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. Данная форма поражения средней оболочки артерий на фоне ее утолщения и склероза возрастает с возрастом от 5% у молодых до 37% у пожилых. По данным отдельных работ у больных СД склероз Менкеберга выявляется, в среднем, в 3 раза чаще, чем у лиц без нарушений углеводного обмена [260]. Таким образом, измерение ЛПИ у пациентов с СД может иметь ограниченный характер в связи с низкой чувствительностью метода.

Исходные показатели пациентов с синдромом диабетической стопы,  
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 <sup>2</sup>	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%)
Предшествующее хирургическое лечение	
Да	21 (60%)
Нет	14 (40%)
ЛПИ, Ед	0,96±0,09
ТКНК, мм рт ст	35,3±1,36

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

### **5.1. Оценка безопасности геннопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы**

Двукратное внутримышечных введение раствора r1-*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. Следовательно, клинически значимого влияния генной конструкции при ее местном внутримышечном введении на основные метаболические системы поддержания гомеостаза не выявлено. Нежелательных явлений, связанных с индукцией ангиогенеза r1-*VEGFA* у пациентов с СДС также не было зафиксировано. Развития опухолей, нарушения зрения и иные патологические состояния, которые могли бы косвенно свидетельствовать об осложнениях геннопосредованной индукции ангиогенеза зарегистрировано не были выявлены на всех сроках обследования.

*Ампутации.* Трём пациентам была выполнена ампутация нижней конечности на уровне бедра (большая ампутация) и двум – в пределах стопы (малая ампутация) (табл. 11). Две из трёх больших ампутации были выполнены вследствие прогрессирования ишемии. В одном случае к концу 3 месяца было зафиксировано развитие острого тромбоза артерий бедренно-подколенного сегмента целевой конечности. Выполнение операции оказалась неэффективной. Во втором случае несмотря на проводимое лечение наблюдалось прогрессирование заболевания, выражающееся в увеличение площади язвенного дефекта и усиление болевого синдрома, однако

выполнение реваскуляризирующей операции было невозможно вследствие выраженного и дистального характера поражения артерии стопы. Ещё один случай большой ампутации был обусловлен развитием тяжёлых инфекционных осложнений раневого процесса, которые были индуцированы ожогом 2 степени вследствие длительного контакта с обогревающими предметами (грелка) на фоне глубокой утраты чувствительности.

Двум пациентам была выполнена малая ампутация в пределах стопы. В одном из случаев это было обусловлено тем, что язвенный дефект располагался на втором пальце и несмотря на проводимое комплексное лечение площадь язвенного дефекта продолжала увеличиваться, с постепенным развитием признаков воспаления, распространяющихся на стопу. Ввиду невозможности выполнения реваскуляризирующей операции и окклюзии дистальных отделов артерий стопы пациенту была выполнена ампутация пальца. Во втором случае язвенный дефект располагался на плантарной поверхности стопы. Как и в первом случае, несмотря на применение комплексного подхода с применением разгрузки, размер язвенного дефекта продолжал увеличиваться. Ввиду невозможности выполнения реваскуляризирующей операции вследствие протяжённой окклюзии дистальных отделов и выраженного кальциноза артерий больному была выполнена малая ампутация в пределах стопы с целью предупреждения развития гнойно-некротических осложнений. Таким образом, сохранность целевой конечности к концу 6 месяца наблюдения составила 84%. У 3 из 5 пациентов выполнение ампутации было обусловлено прогрессированием ишемии на фоне выраженным структурных изменениях сосудистой стенки дистального артериального русла и невозможностью выполнения реваскуляризирующей операции. Эти осложнения являлись естественным исходом длительно текущего заболевания и не связана с применением генноопосредованной индукции ангиогенеза. В двух остальных случаях – развитие острого артериального тромбоза и инфекционных осложнений

раневого процесса вследствие ожога связи с применением р1-*VEGFA* также достоверно не прослеживается. В совокупности это позволяет сделать вывод о том, что ни одно из нежелательных явлений не имеет достоверной связи с применением геннопосредованной индукции ангиогенеза.

Таблица 11

Распределение серьёзных нежелательных явлений в клинической группе пилотного исследования

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

## **5.2. Эффективность геннопосредованной индукции ангиогенеза у больных синдромом диабетической стопы**

### **5.2.1. Влияние геннопосредованной индукции ангиогенеза на нейропатический компонент синдрома диабетической стопы**

У всех пациентов клинического исследования была успешно достигнута коррекция уровня глюкозы в крови на протяжении всех 6 месяцев, что отражают средние показатели гликированного гемоглобина на при включении, а также на сроках 3 и 6 месяцев. Таким образом, благодаря нивелированию влияния данного компонента патогенеза на репаративную регенерацию тканей, удалось максимально объективизировать

терапевтический эффект геннопосредованной индукции ангиогенеза на нейропатический компонент и заживление язвенного дефекта (рис. 28).

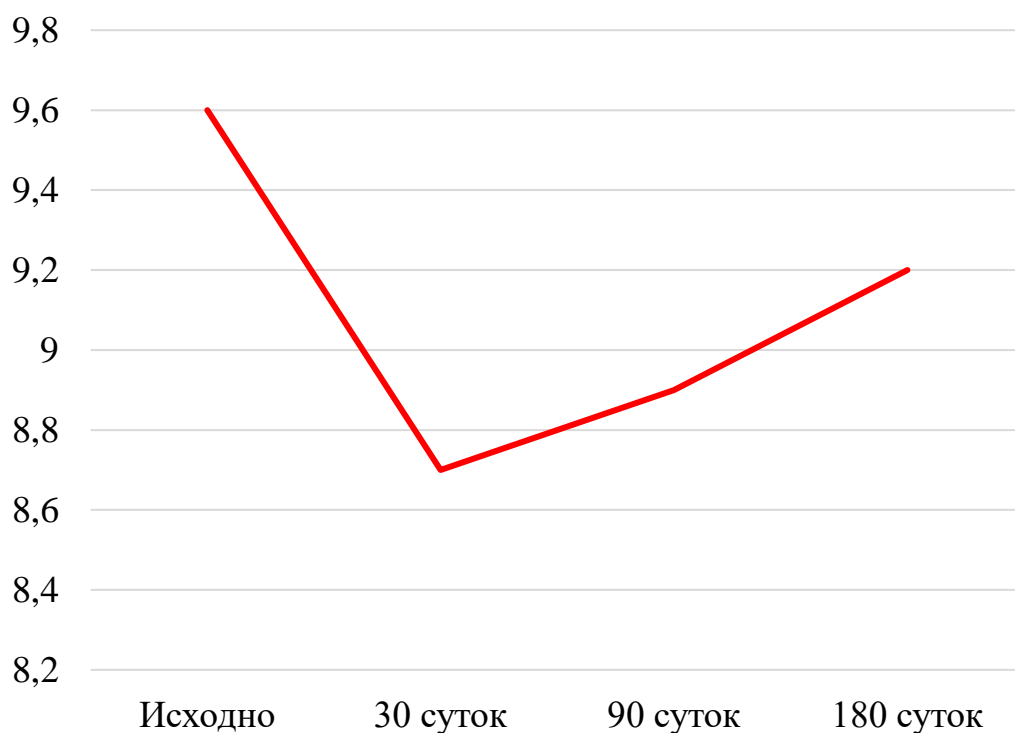


Рис. 28. Динамика изменения среднего показателя гликированного гемоглобина в течение 6 месяцев наблюдения

Исходную степень выраженности нейропатического компонента у пациентов с СДС, включённых в исследование отражают показатели НСС, НДС и Мичиганского опросника нейропатии. Исходное значение НСС отражает наличие выраженного нейропатического компонента. При этом у 80% больных из них в структуре жалоб преобладали жжение, онемение и покалывание, которые распространялись на стопу, что согласно шкале является суррогатными маркерами выраженного поражения периферических нервных волокон (табл. 12).

У 14 из 35 пациентов (40%), включённых в исследование, появление вышеописанных жалоб определялось преимущественно в течение ночи, что отражает глубокие структурные изменения тканей нерва и ассоциировано с

низким качеством жизни (табл. 12). Одновременно с этим в структуре больных СДС преобладали те, которые для снижения выраженности симптомов прибегали к ходьбе, что в части случаев приносило облегчение. Таким образом, по совокупности показателей у большей части пациентов с СДС нейропатический компонент мог быть расценен умеренной и/или выраженной степени силы.

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. У 8 за время исследования удалось добиться полного купирования проявлений диабетической нейропатии, что выражалось отсутствием жалоб к 6 месяцу.

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.



Динамика показателей шкалы нейропатического счёта (НСС)

Критерий		Исходно	30 сут	90 сут	180 сут
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%)

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. 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 (рис. 29).

Двукратное введение *pl-VEGFA* обеспечило снижение проявлений ДН, что выразилось 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 (рис. 30).

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. Это может быть обусловлено тем, что эффект генноопосредованной индукции ангиогенеза может быть выражен в различной степени в зависимости от гистологической структуры волокон периферической нервной системы, обеспечивающих разные виды чувствительности.

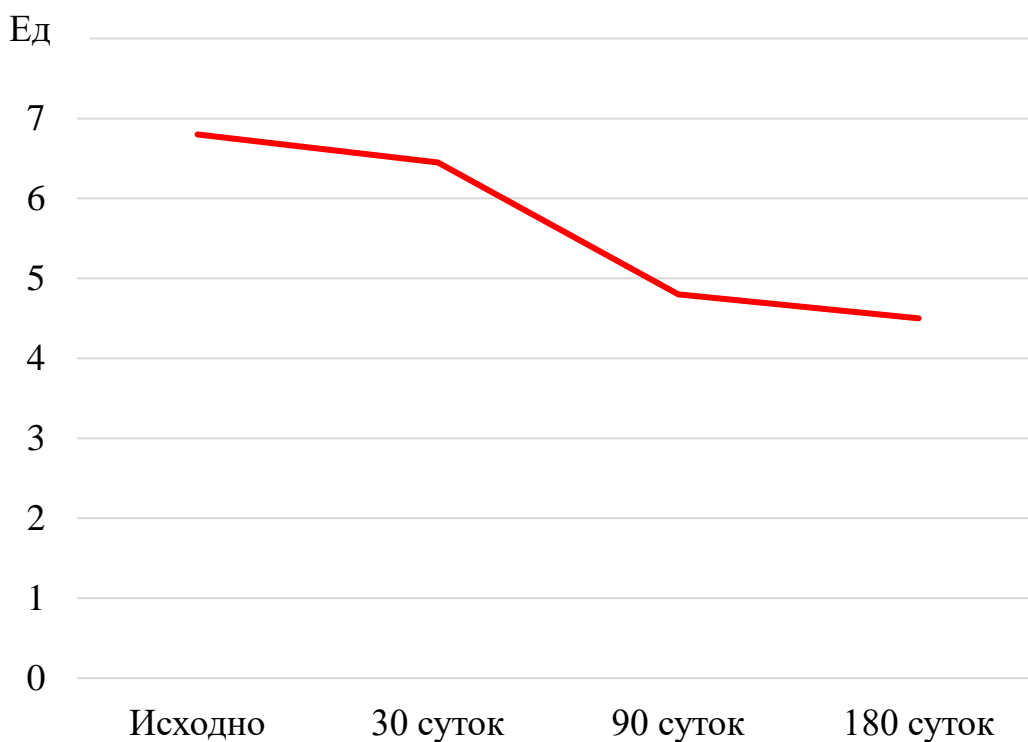


Рис. 29. Динамика изменения показателя индекса нейропатического симптоматического счёта в течение 6 месяцев наблюдения

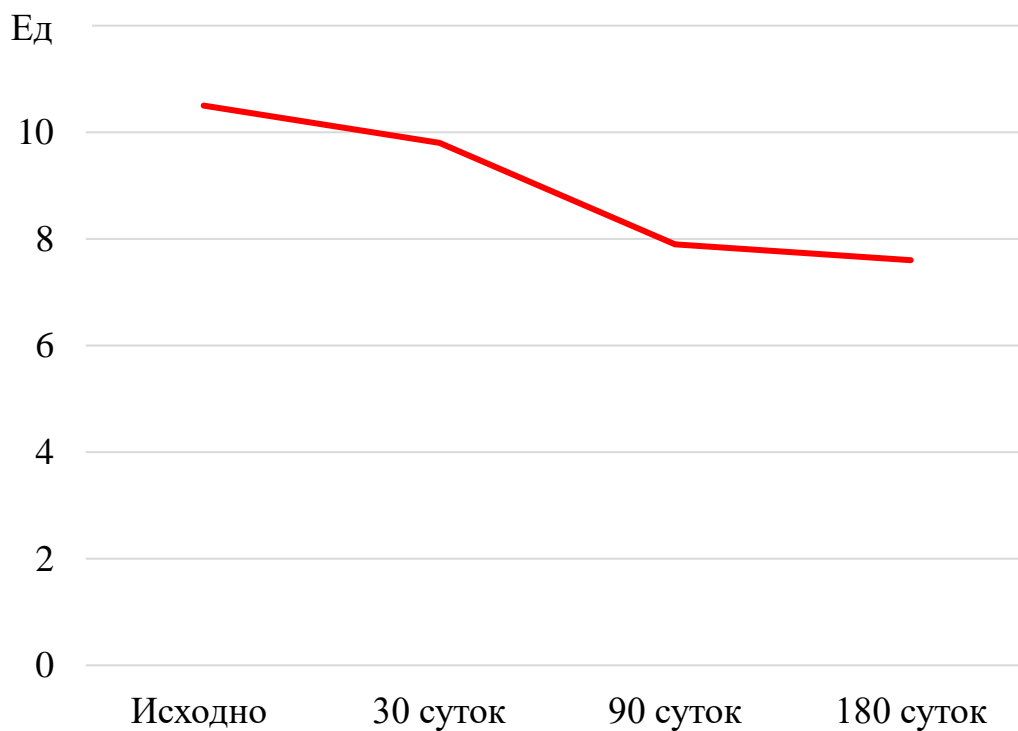


Рис. 30. Динамика изменения показателей индекса нейропатического дисфункционального счёта в течение 6 месяцев наблюдения

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. 13). Напротив, показатель вибрационной чувствительности практически не изменился за весь период наблюдения. Положительная динамика показателя болевой чувствительности выражалась в уменьшении показателя с 2,5 до 2,2, однако разница показателей не достигла статистической достоверности.

Применение *pl-VEGFA* также обеспечило частичное восстановление рефлексов (табл. 13). 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 (табл. 14). 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. Вероятно вследствие этого терапевтический эффект *pl-VEGFA* может быть менее выражен по отношению к ахиллову рефлексу. Необходимо отметить, что положительная динамика была отмечена в равной степени как на стороне поражения (язвенного дефекта), так и на противоположной конечности. Таким образом, положительное влияние от введения *pl-VEGFA* выразилось 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 [265].

Таблица 13

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

Таблица 14

Динамика показателей коленного и ахиллова рефлексов. \* – внутригрупповые различия с исходным показателем статистически значимы,  $p < 0,05$

Название рефлекса		Исходно	30 суток	90 суток	180 суток
Коленный рефлекс	слева	1,68	1,56	1,12*	0,86*
	справа	1,72	1,62	1,14*	0,78*
Ахиллов рефлекс	слева	1,56	1,44	1,32	1,31
	справа	1,52	1,148	1,22	1,28

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 ( $p=0,012$ ) (рис. 31).

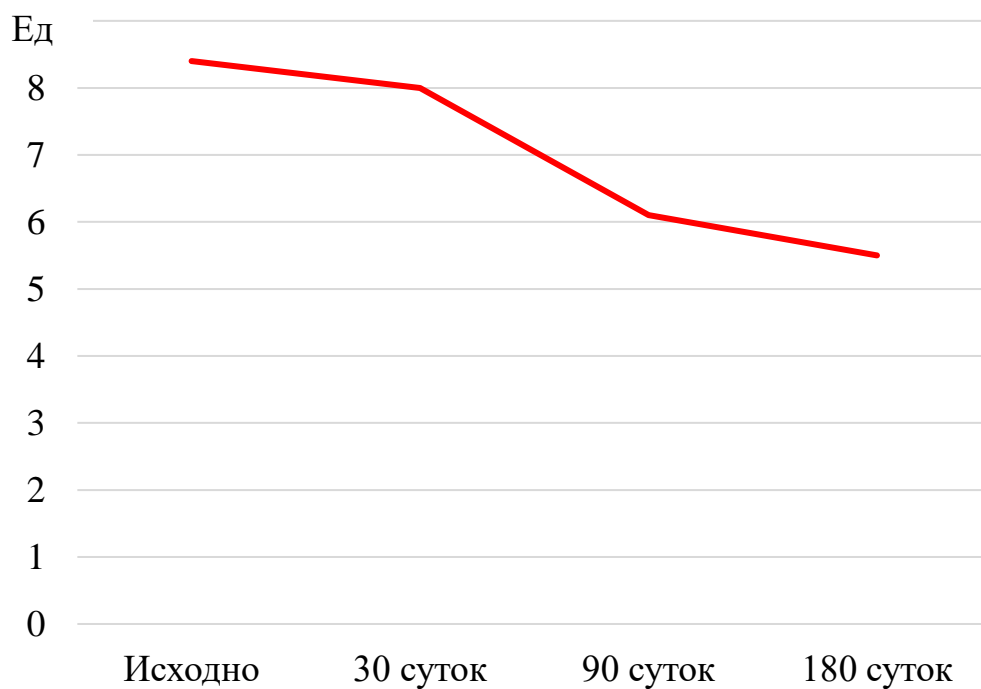


Рис. 31. Динамика изменения среднего показателя индекса Мичиганского опросника в течение 6 месяцев наблюдения

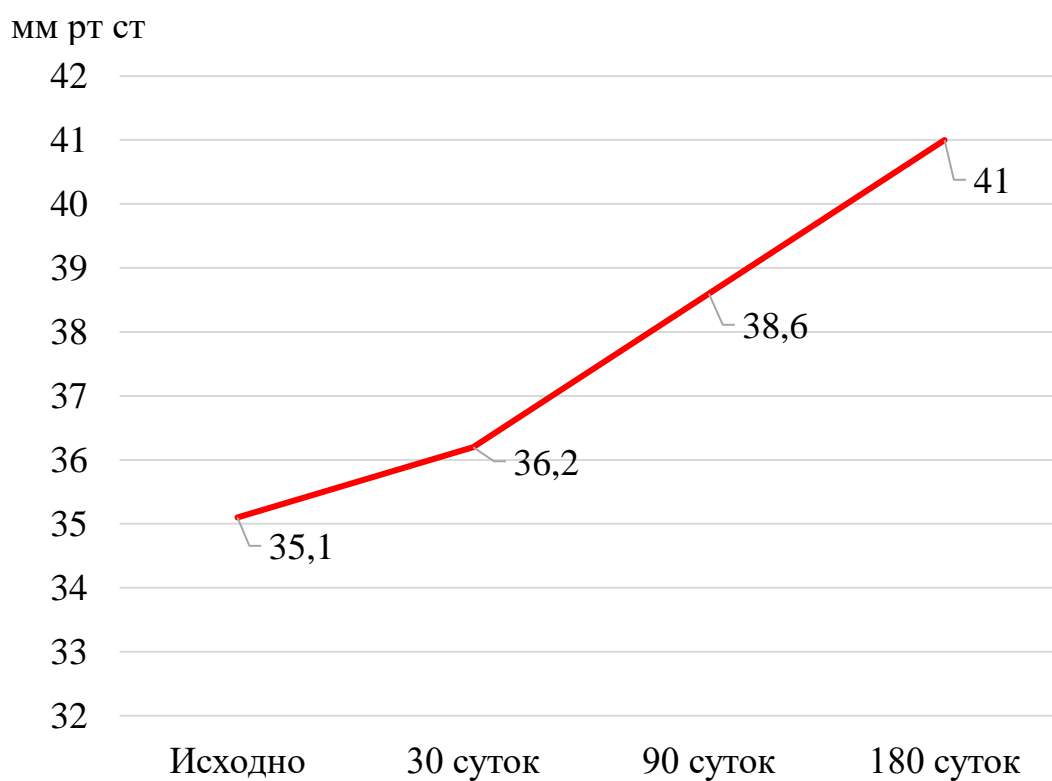


Рис. 32. Динамика среднего показателя ТКНК у участников исследования в течение 6 месяцев наблюдения

Таким образом, генноопосредованная индукция ангиогенеза у пациентов с СДС позволяет снизить выраженность нейропатического компонента. При этом первые детектируемые явления определяются уже через 3 месяца после введения *pl-VEGFA*, что выражается как в снижении субъективных проявлений заболевания, так и инструментально определяемых.

### 5.2.2. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на гемодинамику.

Применение терапевтического ангиогенеза обеспечило улучшение перфузии тканей стопы, что выразалось 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 (рис. 30). 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 (рис. 33).

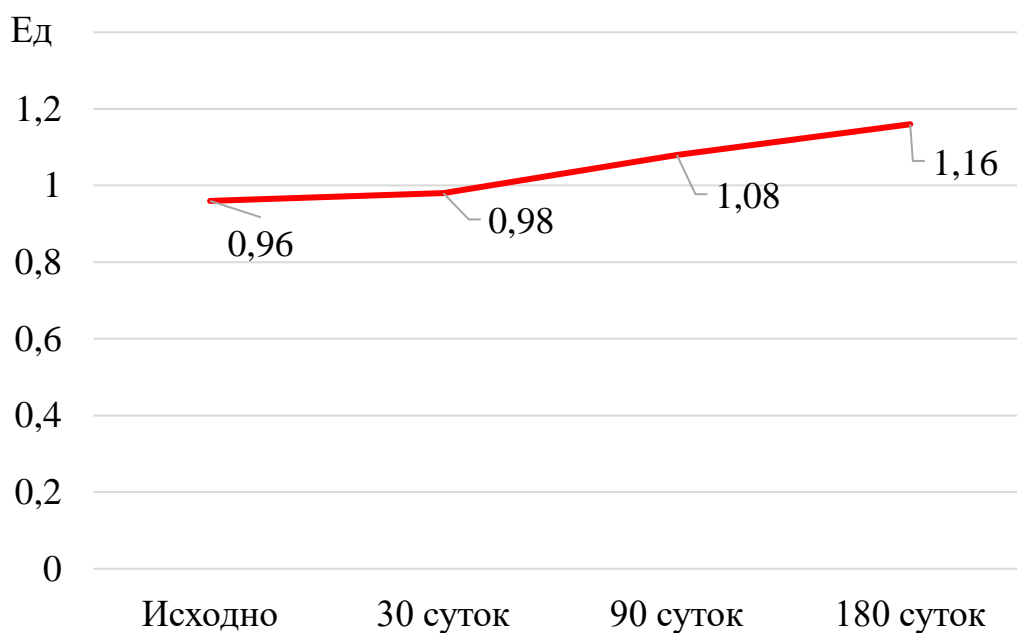


Рис. 33. Динамика среднего показателя ЛПИ у участников исследования в течение 6 месяцев наблюдения

### 5.2.3. Влияние генноопосредованной индукции ангиогенеза на раневой процесс.

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 (табл. 15). Это коррелировало с показателями ТКНК, что отражает улучшение условий репаративной регенерации на фоне индукции ангиогенеза.

К концу первого месяца после введения первой дозы *pl-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 и эпителизации свидетельствует об изменении условий репаративной регенерации тканей (рис. 34).



Динамика заживления язвенного дефекта

Исход лечения	Через 1 месяц n (%)	Через 3 месяца n (%)	Через 6 месяцев n (%)
Полное заживление	1 (2,8%)	15 (42%)	23 (65,7%)
Уменьшение площади язвенного дефекта на 70%	4 (11,4%)	4 (11,4%)	3 (8,5%)
Уменьшение площади язвенного дефекта на 50%	2 (5,8%)	5 (14,2%)	0 (0%)
Уменьшение площади язвенного дефекта менее 50%, но более 30%	2 (5,7%)	3 (8,5%)	1 (2,9%)
Уменьшение площади язвенного дефекта менее 30%	24 (68,5%)	6 (17%)	3 (8,5%)
Увеличение площади язвенного дефекта	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%)	3 (5,8%)

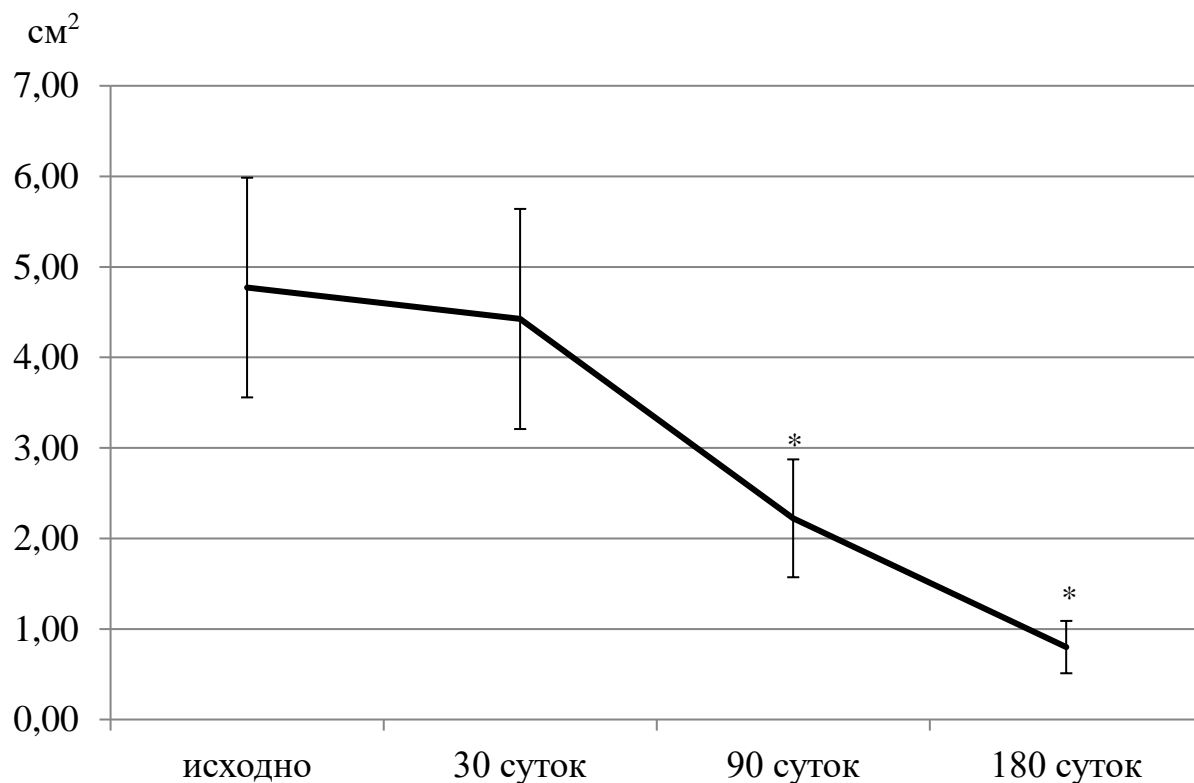


Рисунок 34. Динамика показателя средней площади язвенного дефекта; \* — внутригрупповые различия статистически значимы ( $p < 0,01$ )

### 5.3. Обсуждение результатов клинического исследования

Результаты настоящего исследования показали, что терапевтический ангиогенез может быть применён в составе комплексного лечения пациентов с СДС, в том числе при невозможности выполнения реваскуляризации и закрытия раневого дефекта при помощи стандартной терапии. Введение препарата *pl-VEGFA* было безопасно и не сопровождалось развитием нежелательных явлений. Препарат *pl-VEGFA* за счёт индукции ангиогенеза воздействует как на ишемический, так и нейропатический компонент заболевания. Это позволяет рассматривать его как средство патогенетической терапии, которое обладает многокомпонентным эффектом в отношении данной нозологии. Применение *pl-VEGFA* не сопровождается увеличением частоты развития сердечно-сосудистых осложнений, онкологических заболеваний и нарушений зрения. Это указывает на то, что

данный препарат является локальным индуктором ангиогенеза, не обладающим системным действием.

Мировой опыт применения ангиогенных препаратов у больных СДС насчитывает лишь несколько исследований, поэтому основной задачей настоящей работы была оценка безопасности генноопосредованной индукции ангиогенеза у пациентов с СД. Впервые этот подход был реализован в ходе 1-2 фазы КИ Ad-5*PDGF-B* (GAM501) у 15 больных с хроническими язвами при нейропатической форме СДС, которым геннотерапевтическая конструкция на основе вируса наносилась на язвенный дефект в составе коллагенового геля. Это не сопровождалось развитием нежелательных реакций, но при этом полного закрытия на фоне комбинированного лечения удалось добиться у 12 из 15 [148]. В другом исследовании применение плазмиды с геном *HGF* (VM202) у пациентов с КИНК обеспечило достоверное увеличение частоты заживления дефектов кожных покровов стопы и не сопровождалось развитием осложнений. При этом исследование показало, что применение индукции ангиогенеза было наиболее эффективно у пациентов с СД, которые составили 60% участников. Отечественные исследования с участием больных хронической ишемией нижних конечностей показали, что при фоновом СД локальная индукция ангиогенеза в нижних конечностях не сопровождается развитием нежелательных явлений [63]. Таким образом, результаты настоящего пилотного исследования подтверждают ранее накопленные доказательства безопасности ангиогенной терапии у пациентов с СД.

Площадь язвенного дефекта была выбрана как основной критерий эффективности потому, что в обычной клинической практике уменьшение размера язвы и/или её полное закрытие часто определяет достигнут ли успех лечения СДС или нет [39]. Однако использование этого показателя ассоциировано с применением жёстких критериев включения, определяющих пациенты с какими именно язвенными дефектами могут быть включены в

исследование, так как скорость и исход репаративной регенерации зависит от большого количества факторов. Например, результаты исследования с участием 261 больных СДС показал, что среднее время заживления язвенного дефекта составляет 49 дней, однако наличие раневой инфекции или остеомиелита сопровождается увеличением сроков заживления в среднем до 83 и 115 дней. В то же время у пациентов с преобладанием ишемического компонента среднее время заживление составило 58 дней, а при его отсутствии - 46 [141]. Ввиду этого, включение в настоящее пилотное исследование больных с неглубокими язвенными дефектами 1-2 стадии по Вагнеру было обусловлено стремлением нивелировать многочисленные факторы, которые влияют на процесс репаративной регенерации и достичь, таким образом, максимальной объективности при оценке влияния генноопосредованной индукции ангиогенеза на сроки заживления язвенного дефекта.

Результаты настоящего исследования показали, что наибольшая скорость сокращения язвенного дефекта наблюдалась в интервале между 30 и 90 сутками – то есть через месяц после введения *pl-VEGFA*, что может быть обусловлено отсроченным действием генной индукции ангиогенеза. Напротив, снижение средней скорости заживления в интервале времени между 90 и 180 сутками, а также отсутствие заживления к концу 3-го месяца лечения может являться проявлением ограниченного срока действия препарата вследствие разрушения плазмидной конструкции и, как следствие, ограниченного периода экспрессии целевого белка – VEGF. В то же время отдельные исследования выделяют прогностические факторы заживления язвенного дефекта, которые могут быть ассоциированы с исходными условиями репаративной регенерации. Например, уменьшение площади язвенного дефекта на 50% к концу 4 недели является прогностическим критерием заживления раны через 12 недель. Напротив, отсутствие заживления к этому срок сопровождается достоверным увеличением частоты

ампутации [187]. Таким образом, уже к концу 3 месяца после введения r1-*VEGFA* можно выделить категорию пациентов, у которых применение ангиогенной индукции может оказаться неэффективно ввиду не только ограниченного периода экспрессии целевого белка, но и исходных изменений сосудистой стенки, нарушений репаративной регенерации, которые настолько выражены, что не могут быть скорректированы при помощи генной индукции ангиогенеза. Однако эта гипотеза безусловно требует подтверждения на более крупных группах пациентов.

Клиническое исследование было направлено на оценку возможности применения генной терапии при СДС, поэтому сохранность конечности не применялась в качестве показателя эффективности. Однако 6-месячное наблюдение показало, что количество ампутаций в исследуемой группе составило 14%, что оказалось ниже по сравнению с другими клиническими исследованиями с аналогичной выборкой пациентов. Полученные данные безусловно не могут быть экстраполированы на общую популяцию больных СДС из-за небольшого размера выборки, но подтверждают рабочую гипотезу о том, что применение генной терапии позволяет оптимизировать условия репаративной регенерации тканей благодаря патогенетическому воздействию на сосудистой компонент нейропатии.

Показатель ЛПИ широко применяется в повседневной практике как экспресс метод диагностики заболеваний периферических артерий у пациентов с облитерирующим атеросклерозом. В отдельных работах показано, что этот показатель может быть также использован как прогностический фактор заживления язвенного дефекта у больных СДС. Так, мета-анализ 11 клинических исследований показал, что ЛПИ менее 0.5 достоверно чаще ассоциировано с вероятностью резистентного течения раневого процесса и ампутации нижней конечности. По-видимому, в рамках данной работы применение ЛПИ как критерия эффективности оказалось

малоинформативным ввиду исходно высокого значения показателя ЛПИ из-за выраженного кальциноза артерий. Вследствие этого интерпретация увеличения среднего показателя ЛПИ затруднена – ответ на вопросы является ли это следствием применения ангиогенной терапии или нет требует проведения более крупных исследований.

В отдельных работах было показано, что применение генной терапии способно обеспечить снижение выраженности проявлений ДН. В первом плацебо-контролируемом исследовании с участием больных СД было показано, что введение плазмиды с геном *VEGF* в проекции седалищного, малоберцового и большеберцового нервов обеспечивает достоверное улучшение показателя шкалы SS и не приводит к развитию нежелательных явлений. Активным компонентом препарата VM202 является плазида с генами двух изоформ HGF. В ходе 1 фазы клинического исследования с участием 12 пациентов с болевой формой ДН, была доказана безопасность и хорошая переносимость ангиогенной терапии с использованием дозировок 4 мг, 8 мг и 16 мг [25]. Во II фазе двойного слепого, плацебо-контролируемого клинического исследования с участием 100 больных болевой формой ДН, использовались дозировки 16 мг и 32 мг. Препарат вводился двукратно с интервалом в 2 недели в процессе 16 и 32 инъекций соответственно. В качестве первичного критерия эффективности использовался среднесуточный показатель шкалы боли относительно базального уровня, вторичных – показатель VAS, качества жизни, а также интраэпидермальная плотность нервных волокон по данным щипковой биопсии на уровне бедра и голени с интервалом в 6 месяцев. Применение генного препарата не сопровождалось увеличением частоты развития нежелательных явлений, при этом по первичному критерию было достигнуто статистически значимое различие [117]. Результаты настоящего исследования также показали, что генноопосредованная индукция ангиогенеза обеспечила снижение

выраженности проявлений ДН, что выражалось в улучшении показателей шкал НСС и НДС.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что генная индукция ангиогенеза *pl-VEGFA* может быть использована в составе комплексного лечения пациентов с СДС, в том числе при невозможности выполнения реваскуляризации и нарушении репаративной регенерации язвенного дефекта - введение препарата было безопасно и не сопровождалось развитием нежелательных явлений. Результаты показали, что препарат Неоваскулген воздействует как на ишемический, так и нейропатический компонент заболевания. Это позволяет рассматривать его как средство патогенетической терапии, которое обладает многокомпонентным эффектом в отношении данной нозологии. Однако для трансляции полученных на данных на общую популяцию пациентов с СДС, необходимо проведение крупных рандомизированных исследований.

Результаты настоящей работы подтверждают данные предыдущих авторов о том, что применение генноопосредованной индукции ангиогенеза является эффективным инструментом коррекции репаративной регенерации тканей у больных хирургического профиля. Так в работе Н.Д. Мжаванадзе и др. было показано, что *pl-VEGFA* обладает ангиогенными и гистопротекторными свойствами в отношении поперечнополосатой мышечной ткани в условиях ишемии. Трансляция данного подхода в клиническую практику позволила улучшить результаты лечения больных ХИНК, что выражалось в увеличении дистанции безболевого ходьбы. Улучшение функционального состояния пациентов при этом коррелировало с показателями ТКНК и ЛПИ, что отражает улучшение васкуляризации мышц нижних конечностей. В исследовании А.А. Крылова было показано, что применение генноопосредованной индукции ангиогенеза обеспечивает увеличение частоты заживления язвенных дефектов у пациентов с КИНК, что обусловлено оптимизацией условий репаративной регенерации благодаря

увеличению в зоне дефекта количества сосудов, как это было показано в экспериментальном исследовании.



Рис. 35. Алгоритм принятия решения о наличии показаний к проведению генно-опосредованной индукции ангиогенеза



Ограничением данного исследования является открытый дизайн, что увеличивает вероятности появления систематической ошибки в интерпретации симптомов и признаков, в ведении пациентов, возникающей, когда лечение пациента заранее известно. Выбор подобного дизайна обусловлен тем, что генноиндуцированный ангиогенез ранее никогда не применялся у данной категории больных, ввиду чего основной целью работы была предварительная оценка безопасности на небольшом количестве пациентов.

Вместе с тем, на основании полученных в ходе проведенного клинического исследования данных представляется целесообразным предложить алгоритм принятия решения врачом-хирургом при проведении обследования и лечения профильных пациентов относительно целесообразности включения в комплексного лечения с использованием мультидисциплинарного подхода геннотерапевтической индукции ангиогенеза (рис. 35).

Следует подчеркнуть, что дискуссионным остается индукция ангиогенеза в случае невыраженного атеросклероза при нейропатической форме диабетической стопы, однако данное положение нуждается в проверке в ходе отдельного клинического исследования.

Техническая и клиническая возможность выполнения реваскуляризирующей или эндоваскулярной операции не может быть противопоказанием к терапевтическому ангиогенезу. Более того, ряд исследователей считает, что включение в программу комплексного лечения индукторов ангиогенеза может повлиять на стойкость результата хирургического лечения, а именно, оказать синергичный потенцирующий эффект, что приведет к улучшению как краткосрочных, так и отдаленных результатов оперативного лечения. Однако, проверка этого тезиса так же требует отдельного оригинального сравнительного исследования.

Настоящее исследование отвечает на вопрос о безопасности и краткосрочной эффективности у включенных в него пациентов. Вместе с тем, проведенное нами исследование открывает дополнительные направления и перспективы улучшения результатов лечения при выраженной макроангиопатией и микроангиопатией в т.ч. на фоне атеросклероза сосудов нижних конечностей и синдромом диабетической стопы.

#### Клинический пример №1

Пациент Н., 58 лет, поступил 02.07.2015 года. При поступлении: жалобы на жжение, онемение и покалывание в области стоп преимущественно в ночное время, а также на наличие язвенного дефекта на большом пальце левой стопы, который сформировался за 6 месяца до поступления вследствие случайного травмирования кожных покровов маникюрными ножницами. Из анамнеза известно, что первые признаки диабетической нейропатии (утомляемость, судороги, снижение тактильной и болевой чувствительности) стал отмечать около 4 лет назад, заболевание постепенно прогрессировало, нарастала утрата всех видов чувствительности, давность появления первичных трофических изменений на большом пальце левой стопы – 6 месяцев. Страдает сахарным диабетом II типа на протяжении 9 лет (рис. 36).



Рис. 36. Внешний вид стопы и язвенного дефекта при поступлении

На момент обращения показатели шкал нейропатии были значительно выше нормы: НСС - 7,2, НДС – 15,3, мичиганский опросник – 8,1. Вместе с этим у пациента отмечалось нарушение магистрального кровотока: ЛПИ справа и слева составлял соответственно 1,1 и 0,96, что обусловлено выраженным кальцинозом стенок сосудов и их ригидностью;  $TcPO_2$  слева и справа составлял 44 и 51 мм рт ст соответственно. Справа подвздошный сегмент, ОБА, ГБА, ПБА, ПКА с ровными контурами. ПББА окклюзирована в средней трети, ЗББА окклюзирована в средней трети. Слева: ОПА, НПА, ОБА, СБА с неровностью контуров, ЗББА диффузно изменена, окклюзирована в нижней трети (рис. 37). Таким образом, на основании совокупности данных у больного была диагностирована нейроишемическая форма СДС.



Рис. 37. Ангиография артерий нижних конечностей

На контрольном визите через 3 месяца после начала лечения пациент отмечает снижение выраженности проявлений диабетической нейропатии – судороги и жжение беспокоят лишь периодически в дневное время. Объективно отмечается достоверное снижение показателей шкал нейропатии: НСС - 5,1, НДС – 12,4, мичиганский опросник – 6,8. В то же время отмечается небольшое, но достоверное увеличение показателя  $TcPO_2$  с – 44 до 48 мм рт ст, что свидетельствует об индукции ангиогенеза и коррелирует с уменьшением площади язвенного дефекта с  $1,52\text{ см}^2$  до  $1,21\text{ см}^2$ .

На контрольном визите через 6 месяца после начала лечения пациент практически не предъявлял жалоб на проявления диабетической нейропатии, что коррелировало со значительным снижением показателей шкал нейропатии по сравнению с исходными значениями: НСС - 3,2, НДС – 6,4, мичиганский опросник – 3,2. При инструментальном исследовании отмечается сохранение показателей примерно на том же уровне, что отражает отсутствие влияние геннопосредованного ангиогенеза на сосуды с выраженными структурными изменениями сосудистой стенки - ЛПИ справа и слева составлял соответственно 1,1 и 0,96; в то же время отмечается небольшое, но достоверное увеличение показателя  $TcPO_2$  с – 44 до 48 мм рт ст, что свидетельствует об индукции ангиогенеза и коррелирует с уменьшением площади язвенного дефекта с 1,21 см<sup>2</sup> до 0,63 см<sup>2</sup> (рис. 38).



Рис. 38. Через 6 месяца после первого введения *pl-VEGFA*

## Клинический пример №2

Пациент С., 60 лет, поступил 28.09.2015 года в клинику сосудистой хирургии РязГМУ с жалобами на онемение и покалывание в области стоп преимущественно в ночное время, а также на наличие язвенного дефекта в области ахиллова сухожилия, который сформировался за 8 месяцев до поступления вследствие систематического травмирования кожи жёсткой обувью на фоне глубокой утраты всех видов чувствительности. Из анамнеза известно, что первые признаки диабетической нейропатии стал отмечать около 5 лет назад, которые выражались в появлении жжения преимущественно в области голени. Страдает сахарным диабетом II типа на протяжении 12 лет (рис. 39).



Рис. 39. Внешний вид стопы и язвенного дефекта при поступлении

При обследовании были выявлены выраженные проявления диабетической нейропатии. На момент обращения показатели шкал нейропатии были значительно выше нормы: НСС - 6,8, НДС – 14,6, мичиганский опросник – 7,8. У пациента отмечалось нарушение магистрального кровотока: ЛПИ справа и слева составлял соответственно 0,56 и 0,47; ТсР<sub>О</sub><sub>2</sub> слева и справа составлял 59 и 42 мм рт ст соответственно. Справа подвздошный сегмент, ОБА, ГБА, ПБА, ПКА с ровными контурами. ПББА окклюзирована в нижней трети, ЗББА окклюзирована в нижней трети. Слева: ОПА, НПА, ОБА, ГБА, СБА с неровностью контуров, ЗББА окклюзирована в нижней трети (рис. 40).



Рис. 40. Ангиография артерий нижних конечностей

На контрольном визите через 3 месяца после начала лечения пациент отмечает снижение выраженности проявлений диабетической нейропатии – судороги и жжение беспокоят лишь периодически в дневное время. Объективно отмечается достоверное снижение показателей шкал нейропатии: НСС - 5,0, НДС – 12,2, мичиганский опросник – 6,6. В то же время отмечается небольшое, но достоверное увеличение показателя  $TcPO_2$  с – 42 до 47 мм рт ст, что свидетельствует об индукции ангиогенеза и коррелирует с уменьшением площади язвенного дефекта с 5,62  $cm^2$  до 5,11  $cm^2$  (рис. 41).



Рис. 41. Через 3 месяца после первого введения *pl-VEGFA*



На контрольном визите через 6 месяца после начала лечения пациент практически не предъявлял жалоб на проявления диабетической нейропатии, что коррелировало со значительным снижением показателей шкал нейропатии по сравнению с исходными значениями: НСС - 4,8, НДС – 6,4, мичиганский опросник – 5,3. Отмечалось незначительное улучшение показателей ЛПИ - на стороне поражения показатель увеличился с 0,47 до 0,52, что коррелировало с небольшим, но устойчивым увеличением показателя ТсРО<sub>2</sub>. Таким образом, улучшение иннервации и васкуляризации обеспечило оптимизацию условий репаративной регенерации, что сопровождалось началом заживления длительно существующего язвенного дефекта (рис. 41).



Рис. 41. Через 6 месяцев после первого введения р1-VEGFA

## 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.
2. Патоморфологические изменения в периферическом нерве у пациентов с синдромом диабетической стопы включают массивную мозаичную демиелинизацию, диффузное снижение количества осевых цилиндров, а также дистрофические изменения и гибель леммоцитов, что обусловлено выраженными структурными изменениями сосудистой стенки капилляров нерва – утолщением базальной мембраны, окклюзией просвета сосудов, пролиферацией эндотелиоцитов.
3. Применение генной индукции ангиогенеза периферического нерва при диабетической нейропатии у больных синдромом 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 НСС, НДС и мичиганского опросника ( $p < 0,05$ ).
5. Алгоритм лечебно-диагностической помощи этой категории хирургических больных должен включать коррекцию нейропатического компонента за счёт индукции ангиогенеза в нерве и периневральных тканях.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Генноопосредованная индукция ангиогенеза *pl-VEGFA* обеспечивает оптимизацию условий репаративной регенерации периферических нервов, что может быть использовано для улучшения результатов лечения пациентов хирургического профиля.
2. Одним из компонентов комплексного лечения больных синдромом диабетической стопы должно быть восстановление кровообращения в периферических нервах посредством генноопосредованной индукции ангиогенеза *pl-VEGFA*.
3. Генноопосредованная индукция ангиогенеза должна выполняться у больных синдромом диабетической стопы посредством двукратного введения по 1,2 мг с интервалом в 14 суток внутримышечно.
4. Генноопосредованная индукция ангиогенеза должна выполняться у пациентов с синдромом диабетической стопы в том числе при отсутствии возможности выполнения реваскуляризирующей операции.

## ПРИЛОЖЕНИЕ №1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2558294

**КОДОН-ОПТИМИЗИРОВАННАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ  
ПЛАЗМИДА, СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ  
ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА ЧЕЛОВЕКА**

Патентообладатель(ли): *Общество с ограниченной  
ответственностью "НекстГен" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014137218

Приоритет изобретения **16 сентября 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации **01 июля 2015 г.**

Срок действия патента истекает **16 сентября 2034 г.**

*Врио руководителя Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Л.Л. Кирий*



## ПРИЛОЖЕНИЕ №2



## ПРИЛОЖЕНИЕ №3

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2639175

**Способ индукции регенерации периферического нерва**

Патентообладатель: *Общество с ограниченной ответственностью "НекстГен" (RU)*

Авторы: *Исаев Артур Александрович (RU), Деев Роман Вадимович (RU), Плакса Игорь Леонидович (RU), Ризванов Альберт Анатольевич (RU), Богов Андрей Алексеевич (RU), Масгутов Руслан Фаридович (RU), Богов Алексей Андреевич (RU), Салафутдинов Ильнур Ильдусович (RU), Бозо Илья Ядигерович (RU)*

Заявка № 2016144482

Приоритет изобретения 14 ноября 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 20 декабря 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 14 ноября 2036 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Исиев* Г.П. Исиев

**ПРИЛОЖЕНИЕ 4**

Шкала нейропатического симптоматического счёта [283].

<b>Признак</b>	<b>Балл</b>
1. Жжение, онемение, покалывание	2
2. Утомляемость, судороги, боль	1
Локализация:	
1. Стопа	2
2. Икры	1
3. Другая	0
Время появления симптомов	
1. Ночью	2
2. Днём и ночью	1
3. Днём	0
4. Сразу после пробуждения	1
Уменьшение выраженности симптомов	
1. При ходьбе	2
2. Сидя	1
3. Стоя	0

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Шкала нейропатического дисфункционального счёта [284].

ФИО: Диагноз:			ДАТА
Исследование рефлексов			Сумма баллов по всем четырём рефлексам
Рефлекс	Правая конечность	Левая конечность	
Коленный			
Ахиллов			
Критерии оценки рефлексов: норма – 0 баллов; ослаблены – 1 балл; отсутствуют – 2 балла			
Исследование чувствительности			Средний балл по обеим конечностям
Чувствительность	Правая конечность, баллы	Левая конечность, баллы	
Температурная			
Болевая			
Тактильная			
Критерии оценки – уровень распространения поражения: Норма – 0 баллов; до основания I пальца – 1 балл; до середины стопы – 2 балла; до середины лодыжек – 3 балла; до середины голени – 4 балла; до колена – 5 баллов			
Чувствительность	Правая конечность, баллы	Левая конечность, баллы	Средний балл по обеим конечностям
Вибрационная			
Индекс NDS (сумма показателей в последней колонке)			
В норме индекс NDS составляет 0-4 балла. При умеренно выраженной			



сенсомоторной нейропатии – 5 – 13 баллов. При выраженной сенсомоторной нейропатии индекс составляет – 14-28 баллов		
Перевод условных единиц порога вибрационной чувствительности в баллы индекса NDS		
Баллы	При вибрационной чувствительности, условные единицы	
	У основания I пальца	У медиальной лодыжки
0	>6 или равно 6	>6 или равно 6
1	5	>6 или равно 6
2	1-4	5
3	1-4	1-4
4	0	1-4
5	0	0

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галстян Г.Р., Дедов И.И. Организация помощи больным с синдромом диабетической стопы в Российской Федерации / Г.Р. Галстян // Синдром диабетической стопы. — 2009. — №1. — С. 4 — 7.
2. Галстян Г.Р., Страхова Г.Ю. Современные технологии разгрузки нижней конечности в комплексном лечении нейропатической формы синдрома диабетической стопы / Г.Р. Галстян // Эндокринная хирургия. — 2007. — №1. — С. 29 — 32.
3. Галстян Г.Р., Анциферов М.Б. Лечение дистальной диабетической полинейропатии // Рус. мед. журнал. — 2000. — №2. — С. 59 — 60.
4. Галстян Г.Р. Диабетическая нейропатия: этиология, патогенез, особенности клинического течения и лечение: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2006. — 31 с.
5. Гехт Б.М, Никитина С.С. Механизмы компенсаторной реиннервации при повреждениях аксонов периферических нервов (обзор) / Б.М. Гехт // Журн. невропат. и псих. им. С.С.Корсакова. — 1986. — Т. 86(2) — С. 294 — 300.
6. Гурьева И.В. Профилактика, лечение, медико-социальная реабилитация и организация междисциплинарной помощи больным с синдромом диабетической стопы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук М., 2001. — 25 с.
7. 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.
8. Живолупов С.А., Рашидов Н.А., Самарцев И.Н., Яковлев Е.В. Современные представления о регенерации нервных волокон при травмах периферической нервной системы / С.А. Живолупов // Вестник российской военно-медицинской академии. — 2013. — Т. 3(43). — С. 190 — 198.

9. Иванов А.Н., Коршунова Г.А., Матвеева О.В., Нинель В.Г., Шутров И.Е., Щаницын И.Н., Андропова Т.А., Норкин И.А. Комплексная стимуляция регенерации периферического нерва после отсроченной нейрорафии / А.Н. Иванов // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2017. — Т. 13 (3). — С. 732 — 737.
10. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д. и др. / Р.Е. Калинин // Регенеративные технологии в лечении синдрома диабетической стопы. // Гены и Клетки. — 2017. — Т.13. — С. 15 — 26.
11. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д., Крылов А.А. Генная индукция ангиогенеза у неоперабельных пациентов с атеросклерозом и сахарным диабетом / Р.Е. Калинин // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2018. — №2. — С. 33 — 41.
12. Карагяур М.Н., Макаревич П.И., Шевченко Е.К., Стамбольский Д.В., Н.И. Калинина, Е.В. Парфёнова. Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии / М.Н. Карагяур // Гены и клетки. — 2017. — Т. 12(1). — С. 1 — 9.
13. Киселев С.Л., Деев Р.В. Генная терапия онкологических и сосудистых заболеваний. Раздел 4. Трансляционная медицина: генная терапия и клеточные технологии в медицине. Издательство Казан. ун-та. — 2014. — С. 592.
14. Комелягина Е.Ю. Система профилактики ампутации нижних конечностей у больных сахарным диабетом и перспективы её внедрения в Москве / Е.Ю. Комелягина А.К. // Проблемы эндокринологии. — 2007. — Т.53. — С. 8 — 12.
15. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Салафутдинов И.И., Шульман А.А., Журавлева М.Н., Галлямов А.Р., Богов А.А. (млад.), Богов А.А., Ризванов А.А. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы при ксенотрансплантации мультипотентных мезенхимальных

стромальных клеток жировой ткани / Р.Ф. Масгутов // Гены и клетки. — 2011. — Т.10(1). — С. 98-102.

16. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Рогожин А.А., Журавлева М.Н., Закирова Е.Ю., Нигметзянова М.В., Мухаметова Л.Р., Шульман А.А., Мухамедшина Я.О., Яфарова Г.Г., Ризванов А.А. Стимуляция регенерации седалищного нерва крысы с использованием тубуляции в сочетании с аллотрансплантацией мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани / Р.Ф. Масгутов // Гены и клетки. — 2015. — Т.10(3). — С. 98 — 102.

17. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А., Трофимова А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Исламов Р.Р., Челышев Ю.А., Богов А.А., Ризванов А.А. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов / Р.Ф. Масгутов // Гены и Клетки. — 2011. — Т.4(3). — С. 67 — 70.

18. Мжаванадзе Н.Д. Геннотерапевтическая индукция неоангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротической этиологии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.26 — М., 2013. — 171 с.

19. 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.

20. Николаев С.И., Галлямов А.Р., Челышев Ю.А. Локальная доставка генов VEGF и FGF2, стимулирующая регенерацию нерва / С.И. Николаев // Астраханский медицинский журнал. — 2013. — С. 170 — 174.

21. Стамбольский Д.В., Плеханова О.С, Юдина И.Ю. Калинина Н.И., Карагяур М.Н. Дубров В.Э. Кочиш А.Ю. Семина Е.В. Акопян Ж.А. Голубев И.О. Антонов А.В. Сафин Ш.М. Ткачук В.А. Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию / Д.В. Стамбольский //

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2017. — Т.62(4). — С. 142—152.

22. Удовиченко О.В., Галстян Г.Р. Имобилизирующая разгрузочная повязка (total contact cast) в лечении трофических язв у больных сахарным диабетом // О. В. Удовиченко / Сахарный диабет. — 2003. — № 3. — С. 29 —34.

23. Швальб П.Г., Гавриленко А.В., Калинин Р.Е. и др. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb–III фаза клинических испытаний) / П.Г. Швальб // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т.4(3). — С. 76 — 83.

24. Юдин М.А., Плакса И.Л., Мжаванадзе Н.Д., Краковский М.А., Быков В.Н., Мавликеев М.О., Исаев А.А., Калинин Р.Е., Деев Р.В. Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта pl-VEGF165 в модели ишемии конечностей / М.А. Юдин // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2015. — Т.19(4). — С. 33 — 42.

25. Ajroud-Driss S., Christiansen M., Allen J.A. Phase 1/2 open-label dose-escalation study of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with painful diabetic peripheral neuropathy / S. Ajroud-Driss // Mol Ther. — 2013. — Vol. 21(6). — P. 1279 — 86.

26. Allan H.R., Kenneth C.G., Gooch C.L., Weinberg D.H., Losordo D. VEGF gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized double blinded trial / H.R. Allan // Ann Neurol. — 2009. — 65(4). — P. 386–393.

27. Alitalo K., Adams R. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / K. Alitalo // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2007. — Vol. 8. — P. 464 — 478.

28. Ahrendt G., Chickering D. E., Ranieri John P. Angiogenic Growth Factors: A Review for Tissue Engineering / G. Ahrendt // Tissue Engineering. — 2011. — Vol. 4 (2).

29. Amro M., Stino and Albert G., Smith. Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome / M. Amro // *J Diabetes Investig.* — 2017. — Vol. 8(5). — P. 646 — 655.
30. Andrews K. L., Houdek M. T., Kiemele, L. J. Wound management of chronic diabetic foot ulcers: From the basics to regenerative medicine / K. L. Andrews // *Prosthetics and Orthotics International.* — 2015. — Vol. 39(1). — P. 29 — 39.
31. Anisimov A., Alitalo A., Korpisalo P., Soronen J., Kajjalainen S., Leppänen V-M. Activated forms of VEGF-C and VEGF-D provide improved vascular function in skeletal muscle / A. Anisimov // *Circulation Res.* — 2009. — Vol. 104. — P. 1302 — 1312.
32. Aranyi Z., Csillik A., Devay K., Rosero M. Ultrasonographic demonstration of intraneural neovascularization after penetrating nerve injury / Z. Aranyi // *Muscle Nerve.* — 2018. — Vol. 57(6). — P. 994 — 999.
33. Ashrafi M., Baguneid M., Bayat A. The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing / M. Ashrafi // *Acta Dermato-Venereologica.* — 2015. — Vol. 96. — №5. — P. 587 — 94.
34. Aston N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies / N. Aston // *Br J Ophdtalmol.* — 1963. — Vol. 47. — P. 521 — 38.
35. Bao X.H., Wong V., Wang Q., Low L.C. Prevalence of peripheral neuropathy with insulin-dependent diabetes mellitus / X.H. Bao // *Pediatr Neurol.* — 1999. — Vol.20 — P. 204 — 209.
36. Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney M., Walsh, K., Isner, J.M. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia / I. Baumgartner // *Circulation.* — 1998. — Vol. 97. — P. 1114 — 1123.
37. Binder D.K., Scharfman H.E. Mini review / D.K. Binder // *Growth factors.* — 2004. — Vol. 22. — P. 123 — 131.
38. Boldyreva M.A., Bondar I.V., Stafeev I.S., Makarevich P.I., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Shevchenko E.K., Molokotina Y.D., Karagyaur M.N., Ratner E.I.,

- Parfyonova Ye V. Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury / M.A. Boldyreva // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. — Vol.101(5). — P. 682 — 690.
39. Bolton L. Quality randomized clinical trials of topical diabetic foot ulcer healing agents / L. Bolton // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. — 2016 — Vol. 5(3). — P. 137–147.
40. Bonatti J., Haeusler C., Klaus A., Fink M., HammererLercher A., Laufer G. Acceptance of gene therapy by the heart surgery patient / J. Bonatti // *Eur J Cardiothorac Surg*. — 2002. — Vol. 21. — P. 981 — 986.
41. Boulton A.J. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview / A.J. Boulton // *Diabet Med*. — 1996. — Vol. 13. — P. 12 — 16.
42. Boulton A.J.M., Kirsner R.S., Vileikyte L. / *Neuropathic Diabetic Foot Ulcers* / A.J. M. Boulton // *The New England Journal of Medicine*. — 2004. — Vol. 351. — P. 48—55.
43. Boulton A.J. The diabetic foot: Grand overview, epidemiology and pathogenesis / A.J. Boulton // *Diabet. Metab. Res. Rev*. — 2008. — Vol. 24. — P. 3 — 6.
44. Boulton A.J. Diabetic neuropathy and foot complications / A.J. Boulton // *Handbook Clin. Neurol*. — 2014. — Vol. 126. — P. 97 — 107.
45. Bradley J.L., King R.H., Muddle J.R., Thomas P.K. The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy / J.L. Bradley // *Acta Neuropathol*. — 2000. — Vol. 99(5). — P. 539 — 46.
46. Bridge P.M., Ball D.J., Mackinnon S.E., Nakao Y., Brandt K., Hunter D.A., Hertl C. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis experimental neurology / P.M. Bridge // *Exp Neurol*. — 1994. — Vol. 127(2). — P. 284 — 90.
47. Britland S.T., Young R.J., Sharma A.K., Clarke B.F. Relationship of endoneurial capillary abnormalities to type and severity of diabetic polyneuropathy / S.T. Britland // *Diabetes*. — 1990. — Vol. 39(8). — P. 909 — 913.

48. Brownrigg J.R., Hinchliffe R.J., Apelqvist J., Boyko E.J., FitrIDGE R. Performance of prognostic markers in the prediction of wound healing or amputation among patients with foot ulcers in diabetes: a systematic review / J.R. Brownrigg // *Diabetes Metab Res Rev.* — 2016. — Vol. 32. — P. 128 — 35.
49. Caldwell R.B., Bartoli M., Behzadian M.A., El-Remessy A.E., Al-Shabrawey M. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress / R.B. Caldwell // *Curr Drug Targets.* — 2005. — Vol. 6(4). — P. 511 — 24.
50. Campbell W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury / W.W. Campbell // *Clin Neurophysiol.* — 2008. — Vol. 119. — P. 1951 — 1965.
51. Campbell W.W. The value of inching techniques in the diagnosis of focal nerve lesions. Inching is a useful technique / W.W. Campbell // *Muscle Nerve.* — 1998. — Vol. 21(11). — P. 1554 — 1556.
52. Caravaggi C., Ferraresi R., Bassetti M., Sganzaroli A.B., Galenda P., Fattori S., De Prisco R., Simonetti D., Bona F. Management of ischemic diabetic foot / C. Caravaggi // *J Cardiovasc Surg (Torino).* — 2013. — Vol. 54(6). — P. 737 — 754.
53. Carlson E.C., Audette J.L., Veitenheimer N.J., Risan J.A., Laturus D.I., Epstein P.N. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice / E.C. Carlson // *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* — 2003. — Vol. 271. — P. 332–341.
54. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis / P. Carmeliet // *Nat. Med.* — 2000. — № 6(4). — P. 389 — 395.
55. Carmeliet P., Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: Implications in neurodevelopment and neurodegeneration / P. Carmeliet // *Cell Mol Life Sci.* — 2013. — Vol. 70(10). — P. 1763 — 1778.
56. Cheret J., Lebonvallet N., Buhe V., Carre J.L., Misery L., Le Gall-Ianotto C. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process / J.Cheret // *J Dermatol Sci.* — 2014. — Vol. 74. — P. 193 — 203.



57. Cinnamon L.H., Arévalo-Soliz L.M., Hornstein B.D. Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy / L.H. Cinnamon // *Genes (Basel)*. — 2017. — Vol. 8(2). — P. 65 — 72.
58. Colen K. L., Choi M., Chiu D. T. W. Nerve grafts and conduits / K. L. Colen // *Plastic and Reconstructive Surgery*. — 2009. — Vol. 124(6). — P. 386 — 394.
59. Cruise B.A., Xu P., Hall A.K. Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia / B.A. Cruise // *Developmental Biology*. — 2004. — Vol. 271. — P. 1—10.
60. Cruwys S.C., Kidd B.L., Mapp P.I. et al. The effects of calcitonin gene-related peptide on formation of intra-articular oedema by inflammatory mediators / S.C. Cruwys // *British Journal of Pharmacology*. — 1992. — Vol. 107. — P. 116 — 119.
61. David I.R., Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease / I.R. David // *Genome Biol*. — 2005. — Vol. 6(2). — P. 209-216.
62. Deev R.V., Bozo I.Y., Mzhavanadze N.D., Voronov D.A., Gavrilenko A.V., Chervyakov Y.V., Staroverov I.N., Kalinin R.E., Shvalb P.G., Isaev A.A. pCMV-vegfl65 intramuscular gene transfer is an effective method of treatment for patients with chronic lower limb ischemia / R.V. Deev // *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. — 2015. — Vol. 20(5). — P. 473 — 82.
63. 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.
64. Deitch E.A. Experience with 112 shotgun wounds of the extremities/ E.A. Deitch, W.R. Grimes // *J Trauma*. — 1984. — Vol. 24. — P. 600 — 603.
65. Dishart K. L., Work L.M., Denby L., Baker A.H. Gene Therapy for Cardiovascular Disease / Kate L. Dishart // *J Biomed Biotechnol*. — 2003. — Vol. 21, (20). — P. 138 — 148.

66. Dumpich M., Theiss C. VEGF in the nervous system: an important target for research in neurodevelopmental and regenerative medicine / M. Dumpich // *Neural Regen Res.* — 2015. — Vol. 10(11). — P. 1725–1726.
67. Dunbar C. E, Katherine A. High, J. Keith Joung, Donald B. Kohn, K. Ozawa, Michel Sadelain. Gene therapy comes of age / Cynthia E. Dunbar // *Science.* — 2018. — Vol. 359. — P. 6372.
68. Dvali L., Mckinnon S. The role of microsurgery in nerve repair and nerve grafting / L. Dvali // *Hand Clin.* — 2007. — Vol. 21. — P. 73 — 81.
69. Dyck P. J., Hansen S., Karnes J., O'Brien P., Yasuda H., Windebank A. and Zimmerman B. Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve / P. J. Dyck // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1985. — Vol. 82(8). — P. 2513 — 2517.
70. Dyck P. J., James W., Andersen A. H. et al. Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity / P. J. Dyck // *Diabetes / Diabetes Metab Res Rev.* — 2011. — № 27. — P. 620 — 628.
71. Dzau G.H. Molecular therapies for vascular diseases / G.H. Dzau // *Science.* — 1996. — Vol. 272. — P. 689 — 693.
72. Fagher K., Katzman P., Löndahl M. Transcutaneous oxygen pressure as a predictor for short-term survival in patients with type 2 diabetes and foot ulcers: a comparison with ankle-brachial index and toe blood pressure / K. Fagher // *Acta Diabetol.* — 2018. — Vol. 55(8). — P. 781 — 788.
73. Ferrara N. From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti / N. Ferrara // *Int J Dev Biol.* — 2011. — Vol. 55(4–5). — P. 383 — 8.
74. Figueroa-Romero C., Sadidi M., Feldman E.L. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy / C. Figueroa-Romero // *Rev Endocr Metab Disord.* — 2008. — Vol.9. — P. 301 — 314.

75. Florian, P.T. The spectrum of diabetic neuropathy / P.T. Florian // Saint Louis University, School of Medicine Saint Louis. — 2005. — P. 15 — 21.
76. Frykberg, R.G. Diabetes foot disorders. A clinical practice guideline / R.G. Frykberg // J. Foot and Ankle Surgery. — 2006. — Suppl. — P. 62 — 66.
77. Frykberg R.G., Belczyk R. Epidemiology of the Charcot foot / R.G. Frykberg // Clin Podiatr Med Surg. — 2008. — Vol. 359. — P. 17 — 28.
78. Fujiwara T., Kubo T., Kanazawa S., Shingaki K., Taniguchi M., Matsuzaki S., et al. Direct contact of fibroblasts with neuronal processes promotes differentiation to myofibroblasts and induces contraction of collagen matrix in vitro/ T. Fujiwara // Wound Repair Regen. — 2013. — Vol. 2. — P. 588 — 594.
79. Gagliardo A., Toia F., Maggi F., Vincenzo Mariolo A., Cillino M., Moschella F. Clinical neurophysiology and imaging of nerve injuries: preoperative diagnostic work-up and postoperative monitoring / A. Gagliardo // Plast Aesthet Res. — 2015. — Vol. 2(4). — P. 149 — 155.
80. Gamse R., Saria A. Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide / R. Gamse // European Journal of Pharmacology. — 1985. — Vol. 114. — P. 61 — 66.
81. George E. B., Glass J. D. & Griffin, J. W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels / E. B. George // J. Neurosci. — 1995. — Vol. 15. — P. 6445 — 6452.
82. Giannini C., Dyck P.J. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity / C. Giannini // Annals of Neurology. — Vol. 37(4). — P. 498 — 504.
83. Gibran N.S., Jang Y.C., Isik F.F., Greenhalgh D.G., Muffley L.A., Underwood R.A., et al. Diminished neuropeptide levels contribute to impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus / N.S. Gibran // J Surg Res. — 2002. — Vol. 108. — P. 122 — 128.
84. Green, M.F. Diabetic foot: Evaluation and management / M.F. Green //

- Southern Medical Journal. — 2002. — Vol. 95(1). — P. 95 — 101.
85. Grothe C., Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration / C. Grothe // *Anat Embryol (Berl)*. — 2001. — Vol. 204. — P. 171 — 177.
86. Gupta K., Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? / J. Zhang // *Postgrad Med J*. — 2005. — Vol. 81(954). — P. 236 — 242.
87. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy / R. Gupta // *Circ Res*. — 2009. — Vol. 105. — P. 724 — 736.
88. Gwathmey J.K., Copelas L., MacKinnon R., Schoen F.J., Feldman M.D., Grossman W., Morgan J.P. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure / J.K. Gwathmey // *Circulation Research*. — 1987. — Vol. 61. — P. 70 — 76.
89. Henry T.D., Rocha-Singh K., Isner J.M., Kereiakes D.J., Giordano F.J., Simons M., Losordo D.W., Hendel R.C., Bonow R.O., Eppler S.M., Zioncheck T.F., Holmgren E.B., McCluskey E.R. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease / T.D. Henry // *Am Heart J*. — 2001. — Vol. 142(5). — P. 872 — 880.
90. Herrera J.J., Nestic O., Narayana P.A. Reduced vascular endothelial growth factor expression in contusive spinal cord injury / Juan J. Herrera // *J Neurotrauma*. — 2009. — Vol. 26(7). — P. 995 — 1003.
91. Hill R.E., Williams P.E. Perineurial cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve/ R.E. Hill // *J Neurol Sci*. — 2004. — Vol. 15. — P. 157 — 163.
92. Hill R.E., Williams P.E. Quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve. / R.E. Hill // *J Anat*. — 2002. — Vol. 201(2). — P. 185 — 192.
93. Hirasawa Y. Peripheral nerve suture / Y. Hirasawa // *Journal of Orthopaedic Science*. — 1996. — Vol. 1(3). — P. 214 — 229.

94. Hobson M.I., Green C.J., Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy / M.I. Hobson // *J. Anat.* — 2000. — Vol. 197(4). — P. 591 — 605.
95. Hudso A.R. Timing of peripheral nerve repair: important local and neuropathological factors / A.R. Hudson // *Clinical Neurosurgery.* — 1977. — Vol. 24. — P. 391 — 405.
96. Hongkui W., Hui Z., Qi G. Overlapping mechanisms of peripheral nerve regeneration and angiogenesis following sciatic nerve transection / W. Hongkui // *Front Cell Neurosci.* — 2017. — Vol. 11. — P. 323.
97. Hong-kui Wang, Wang Y., Xue C. Angiogenesis in tissue-engineered nerves evaluated objectively using MICROFIL perfusion and micro-CT scanning / Hong-kui Wang // *Neural Regen Res.* — 2016. — Vol. 11(1). — P. 168 — 173.
98. Hoyng S.A., Winter F., Martijn R.T. Gene therapy and peripheral nerve repair: a perspective / Hoyng S.A. // *Front Mol Neurosci.* — 2015. — Vol. 8. — P. 32.
99. Hudso A.R. Timing of peripheral nerve repair: important local and neuropathological factors / A.R. Hudson // *Clinical Neurosurgery.* — 1977. — Vol. 24. — P. 391 — 405.
100. Huebner E. A. & Strittmatter S. M. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems / E. A. Huebner // *Results Probl. Cell Differ.* — 2009. — Vol. 48. — P. 339 — 351.
101. Hulse R.P., Beazley-Long N., Ved N., Bestall S.M., Riaz H., Singhal P., Ballmer Hofer K., Harper S.J., Bates D.O., Donaldson L. Vascular endothelial growth factor-A165b prevents diabetic neuropathic pain and sensory neuronal degeneration. / Hulse R..P// *Clin Sci (Lond).* — 2015. — Vol.1;129(8). — P. 741 — 756.
102. Isaacs J. Treatment of acute peripheral nerve injuries: current concepts / J. Isaacs // *J Hand Surg (Am).* — 2010. — Vol. 35. — P. 491 — 497.
103. Ishikawa S., Takeda A., Akimoto M., Kounoike N., Uchinuma E., Uezono Y. Effects of neuropeptides and their local administration to cutaneous wounds in

sensory-impaired areas / S. Ishikawa // *J Plast Surg Hand Surg.* — 2014. — Vol. 48. — P. 143 — 147.

104. Iversen M.M., Tell G.S., Riise T. History of foot ulcer increases mortality among individuals with diabetes: ten-year follow-up of the Nord-Trøndelag Health Study, Norway / M.M. Iversen // *Diabetes Care.* — 2009. — Vol. 32. — P. 2193 — 9.

105. Jeffcoate W.J., Harding K.G. Diabetic foot ulcers / W.J. Jeffcoate // *Lancet.* — 2003. — Vol. 36. — P. 1545 — 1551.

106. Jin K., Mao X.O., Batteur S.P., McEachron E., Leahy A., Greenberg D.A. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor / K. Jin // *Neuroscience.* — 2001. Vol.108(2). — P. 351 — 358.

107. Jörneskog G. Why critical limb ischemia criteria are not applicable to diabetic foot and what the consequences are / G. Jörneskog // *Scand J Surg.* — 2012. — Vol. 101(2). — P. 114 — 118.

108. Juan J. H., Olivera N., Ponnada A. Narayana Reduced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Contusive Spinal Cord Injury. / H.Juan // *J Neurotrauma.* — 2009. — Vol. 26(7) — P. 995 — 1003.

109. Julia K.T., Vasileios K.K. Vascularized nerve grafts and vascularized fascia for upper extremity nerve reconstruction / K.T. Julia // *Hand (N Y).* — 2010. — Vol. 5(1). — P. 19–30.

110. Kahler C.M., Reinisch N., Wiederman C.J. Interaction of SP with epidermal growth factor and fibroblast growth factor in cyclooxygenase-dependent proliferation of human skin fibroblasts / C.M. Kahler // *Journal of Cellular Physiology.* — 1996. — Vol. 166. — P.601 — 608.

111. Karagoz H., Ulkur E., Kerimoglu O., Alarcin E., Sahin C., Akakin D., Dortunc B. Vascular endothelial growth factor-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres-induced lateral axonal sprouting into the vein graft bridging two healthy nerves: nerve graft prefabrication using controlled release system / H. Karagoz // *Microsurgery.* — 2012. — Vol.32(8). — P. 635 — 641.

112. Karagyaur M., Dyikanov D., Makarevich P., Semina E., Stambolsky D., Plekhanova O., Kalinina N., Tkachuk V. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration / M. Karagyaur // *Biomed Pharmacother.* — 2015. — Vol. 34. — P. 63 — 74.
113. Keeler A.M., Mallah M.K., Flotte T.R. Gene therapy 2017: progress and future directions / A.M. Keeler // *Clin Transl Sci.* — 2017. — Vol. 10(4). — P. 242 — 248.
114. Kemp S.W., Webb A.A., Dhaliwal S., Syed S., Walsh S.K., Midha R. Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat / S.W. Kemp // *Exp Neurol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 460 — 470.
115. Kennedy J.M., Zochodne D.W. Influence of experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve. / Kennedy J.M. // *Functional and morphological aspects. Diabetes.* — 2002. — Vol.51. — P. 2233 — 2240.
116. Kenneth L. Viral vectors in gene therapy diseases. / L. Kenneth // *Diseases* — 2018. Vol. 6(2). — P.42.
117. Kessler J.A., Smith A.G., Cha B.S. Double-blind, placebo-controlled study of HGF gene therapy in diabetic neuropathy / J.A. Kessler // *Ann Clin Transl Neurol.* — 2015. — Vol. 2(5). — P. 465 — 478.
118. King R. H. M. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy / R. H. M. King // *J Clin Pathol: Mol Pathol.* — 2001. — Vol. 54. — P. 400 — 408.
119. Korpisalo P., Hytönen J.P., Laitinen J.T., Laidinen S., Parviainen H. Karvinen H., Siponen J., Marjomäki V., Vajanto I., Rissanen T.T., Ylä-Herttuala S. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy / P. Korpisalo // *Eur Heart J.* — 2011. — Vol. 32(13). — P. 1664 — 1672.

120. Kut C., Gabhann F.M., Popel A.S. et al. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer / C. Kut // *Br J Cancer*. — 2007. — Vol. 97(7). — P. 978 — 985.
121. Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., Thal L.J., Gage F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain / H.G. Kuhn // *J Neurosci*. — 1997. — Vol. 17. — P. 5820 — 5829.
122. Lee K., Silva E. A., Mooney David J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments / K. Lee // *J R Soc Interface*. — 2011. — Vol. 6; 8(55). — P. 153 — 170.
123. Lee S.R. VEGF-Targeted therapy: therapeutic potential and recent advances / S.R. Lee // *The Oncologist*. — 2005. — Vol. 10. — P. 382 — 391.
124. Li Y., et al. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats / Y. Li // *J Clin Invest*. — 2008. — Vol. 118(3). — P. 913 — 923.
125. Li J.D., Li X.P. The effect of surgical trauma on blood flow of the facial nerve in rabbits / J.D. Li // *Wei Xunhuan Xue Zazhi*. — 2003. — Vol. 13(4). — P. 13 — 5.
126. Lim T.K., Shi X.Q., Johnson J.M., Rone M.B., Antel J.P., David S., Zhang J. Peripheral nerve injury induces persistent vascular dysfunction and endoneurial hypoxia, contributing to the genesis of neuropathic pain / T.K. Lim // *J Neurosci*. — 2015. — Vol. 25;35(8). — P. 3346 — 3359.
127. Lopes F.R., Lisboa B.C., Frattini F., Almeida F.M., Tomaz M.A., Matsumoto P.K., Langone F., Lora S., Melo P.A., Borojevic R., Han S.W., Martinez A.M. Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy / F.R. Lopes // *Neuropathol Appl Neurobiol*. — 2011. — Vol. 37(6). — P. 600 — 612.



128. Luwang L.A., O'Brien F.J., Keogh M.B. Innovations in gene and growth factor delivery systems for diabetic wound healing / L.A. Luwang // *J Tissue Eng Regen Med.* — 2018. — Vol. 12(1). — P. 296 — 312.
129. Mackenzie F., Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system / F.Mackenzie // *Development.* — 2012. — Vol. 139(8). — P. 1371 — 1380.
130. Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Shevelyov A.Ya., Rybalkin I.N., Shevchenko E.K., Beloglazova I.B., Vlasik T.N., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Combined transfer of human VEGF 165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle / P.I. Makarevich // *PloS One.* — 2012. — Vol. 7(6). — P.387 — 376.
131. Malik R.A., Tesfaye S., Thompson S.D., Veves A., Hunter A., Sharma A.K., Ward J.D., Boulton A.J. Transperineurial capillary abnormalities in the sural nerve of patients with diabetic neuropathy / Malik R.A. // *Microvasc Res.* — 1994. — Vol. 48(2). — P. 236 — 245.
132. Malik R. A., Veves A., Masson E. A., Sharma A. K., Ah-See A. K., Schady W., Lye R. H., and Boulton A. J. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy / R. A. Malik // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 1992. — Vol. 55(7). — P. 557 — 561.
133. Malik R.A. The Pathology of Human Diabetic Neuropathy Diabetes / R.A. Malik // — 1997. — Vol.46(2). — P. 50 — 53.
134. Malik R.A., Tesfaye S., Newrick P.G., Walker D., Rajbhandari S.M., Siddique I., et al. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy / R.A. Malik // *Diabetologia.* — 2005. — Vol. 48(3). — P. 578 — 585.
135. Mason M.R., Tannemaat M.R., Malessy M.J. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? / M.R. Mason // *Curr. Gene Ther.* — 2011. — Vol. 11(2). — P. 75 — 89.
136. Mennen U. End-to-side nerve suture a technique to repair peripheral nerve injury / U. Mennen // *S Afr Med J.* — 1999. — Vol. 89(11). — P. 1188 — 1194.

137. Menorca R.M.G., Theron S., Fussell T.S., Elfar J.C. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery / R.M.G. Menorca // *Hand Clin.* — 2013. — Vol. 29(3). — P. 317 — 330.
138. Mehraj M. A review of Wagner classification and current concepts in management of diabetic foot / M. Mehraj // *International Journal of Orthopaedics Sciences.* — 2018. — Vol. 4(1). — P. 933 — 935.
139. Miller J.W., Le Couter J., Strauss E.C., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease / J.W. Miller // *Ophthalmology.* — 2013. — Vol. 120(1). — P. 106 — 114.
140. Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting / H. Millesi // *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* — 1982. — Vol. 19. — P. 25 — 37.
141. Milne T., Schoen D., Bower V. Times of diabetic foot ulcers: investigating the influence of infection and peripheral arterial disease / T. Milne // *The Journal of Diabetic Foot Complications.* — 2013. — Vol. 5(2). — P. 29 — 38.
142. 241. Mohammadi R., Ahsan S., Masoumi M., Amini K. Vascular endothelial growth factor promotes peripheral nerve regeneration after sciatic nerve transection in rat / R. Mohammadi // *Chin J Traumatol.* — 2013. — Vol. 16(6). — P. 323 — 329.
143. Moore A. M., W. Z. Ray, K. E. Chenard, T. Tung, and S. E. Mackinnon. Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation / A. M. Moore // *Hand.* — 2009. — Vol. 4(3). — P. 239 — 244.
144. Monteiro-Soares M., Boyko E.J., Ribeiro J., Dinis-Ribeiro L.M. Risk stratification systems for diabetic foot ulcers: A systematic review / M. Monteiro-Soares // *Diabetologia.* — 2011. — Vol. 54 — P. 1190 — 1199.
145. Moscu B., Pereanu M. Pathophysiological features in diabetic neuropathy / B. Moscu // *Acta Medica Transilvanica.* — 2011. — Vol. 16 — P. 23-45.
146. Muffley L.A., Anthony J.P., Spenny M.L., Underwood R.A., Olerud J.E., et al. Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice / M. Pornprom // *Wound Repair Regen.* — 2004. — Vol.12. — P. 44 — 52.

147. Muheremu A., Ao Q. Past, present, and future of nerve conduits in the treatment of peripheral nerve injury / A. Muheremu // *Biomed Res Int.* — 2015. — Vol. 2. — P.375 — 407.
148. Mulder G., Tallis A.J., Marshall V.T. Treatment of nonhealing diabetic foot ulcers with a platelet-derived growth factor gene-activated matrix (GAM501): results of a phase 1/2 trial / G. Mulder // *J. Wound Repair Regeneration.* — 2009. — Vol. 17. — P. 772 — 779.
149. Munro C.A. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries / C.A. Munro // *J Trauma.* — 1998. — Vol. 45. — P. 116 — 122.
150. Murray H.J., Young M.J., Boulton AJM. The relationship between callus formation, high pressures and neuropathy in diabetic foot ulceration / H.J. Murray // *Diabetic Medicine.* — 1996. — Vol. 13. — P. 979 — 982.
151. Ndip A., Jude E.B. Emerging evidence for neuroischemic diabetic foot ulcers: model of care and how to adapt practice / A. Ndip // *Int J Low Extrem Wounds.* — 2009. — Vol. 8(2). — P. 82 — 94.
152. Nordwall M., Hyllienmark L., Ludvigsson J. Early diabetic complications in a population of young patients with type 1 diabetes mellitus despite intensive treatment / M. Nordwall // *J Pediatr Endocrinol Metab.* — 2006. — Vol.19. — P. 45 — 54.
153. Nowak-Sliwinska P., Segura T., Luisa M. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering / P. Nowak-Sliwinska // *Angiogenesis.* — 2014. — Vol. 17(4). — P. 779 — 804.
154. Nukada H. Post-traumatic endoneurial neovascularisation and nerve regeneration: a morphometric study / H. Nukada // *Brain Res.* — 1988. — Vol. 449. — P. 89 — 96.
155. Onger M.E., Delibaş B., Türkmen A.P., Erener E., Altunkaynak B.Z., Kaplan S. The role of growth factors in nerve regeneration / M.E.Önger // *Drug Discov Ther.* — 2017. — Vol. 15;10(6). — P. 285 — 291.

156. Pan Z., Fukuoka S., Karagianni N., Guaiquil V.H., Rosenblatt M.I. Vascular endothelial growth factor promotes anatomical and functional recovery of injured peripheral nerves in the avascular cornea / Z. Pan // *FASEB J.* — 2013. — Vol. 27(7). — P. 2756 — 2767.
157. Paromita K., Ian Peacock and Richard Donnelly. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes / K. Paromita // *Br J Clin Pharmacol.* —1999. — Vol. 48(5). — P. 643 — 648.
158. Pereira F.R., Lisboa B.C., Frattini F., Almeida F.M., Tomaz M.A., Matsumoto P.K., Langone F., Lora S., Melo P.A., Borojevic R., Han S.W., Martinez A.M. Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy / F.R. Pereira // *Neuropathol Appl Neurobiol.* — 2011. — Vol. 37(6). — P. 600 — 612.
159. Ping Y., Xiao S., Zeng-Wei Kou, Kun W. W., Ya-Lin H., Feng-Yan S. VEGF Axonal Transport Dependent on Kinesin-1B and Microtubules Dynamics. / Ping Y. // *Front Mol Neurosci.* — 2017. — Vol.10. — P. 424.
160. Pleger S.T., Most P., Boucher M., Soltys S., Chuprun J.K., Pleger W., Gao E., Dasgupta A., Rengo G., Remppis A., Katus H.A., Eckhart A.D., Rabinowitz J.E., Koch W.J. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue / S.T. Pleger // *Circulation.* — 2007. — Vol. 115. — P. 2506 — 2515.
161. Pop-Busui Effect of prior intensive insulin treatment during the diabetes control and complications trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the epidemiology of diabetes interventions and complications (EDIC) study / Albers JW, Herman WH, R, et al. // *Diabetes Care.* – 2010. — № 33. – P. 1090 — 1096.
162. Price S.A., Dent C., Duran-Jimenez B., Liang Y., Zhang L., Rebar E.J., Case C.C., Gregory P.D., Martin T.J., Spratt S.K., Tomlinson D.R. Gene transfer of an engineered transcription factor promoting expression of VEGF-A protects against

experimental diabetic neuropathy / S.A. Price // *Diabetes*. — 2006. — Vol. 55(6). — P.1847 — 1854.

163. Ramsey, S.D. Incidence, outcomes, and costs of foot ulcers in patients with diabetes / S.D. Ramsey // *Diabetes Care*. — 1999. — Vol. 22. — P. 382 — 387.

164. Raskin P., Marks J.F., Burns H.J., Plumer M.E., Siperstein M.D. Capillary basement membrane width in diabetic children / P. Raskin // *Am J Med*. — 1975. — Vol. 58. — P. 365 — 372.

165. Robinson L.R. Traumatic injury to peripheral nerve. / L.R. Robinson// *Muscle Nerve*. — 2000. — Vol.23. — P.863 — 873.

166. Robinson C.J., Stringer S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors / C.J. Robinson // *J Cell Sci*. — 2001. — Vol. 114. — P. 853 — 865.

167. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury / S. Rotshenker // *J. Neuroinflammation*. — 2011. — Vol. 8. — P. 109.

168. Roy S., Sala R., Cagliero E., Lorenzi M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. / S. Roy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 1990. — Vol. 87(1). — P. 404 — 408.

169. Rinker B., Vyas K.S. Clinical applications of autografts, conduits, and allografts in repair of nerve defects in the hand: current guidelines / B. Rinker // *Clin Plast Surg*. — 2014. — Vol. 41. — P. 533 — 550.

170. Rissanen T.T., Ylä-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy / T.T. Rissanen // *Mol. Ther*. — 2007. — Vol. 15. — P. 1233 — 1247.

171. Sakata S., Lebeche D., Sakata N., Sakata Y., Chemaly E.R., Liang L.F., Tsuji T, Takewa Y., del Monte F., Peluso R., Zsebo K., Jeong D., Park W.J., Kawase Y., Hajjar RJ. Restoration of mechanical and energetic function in failing aortic-banded rat hearts by gene transfer of calcium cycling proteins / S. Sakata // *J Mol Cell Cardiol*. — 2007. — Vol. 42. — P. 852 — 861.

172. Schaper W., Scholz D. Factors regulating arteriogenesis / W. Schaper // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 2003. — Vol. 23. — P. 1143 — 1151.
173. Schaper N.C., Apelqvist J., Bakker K. The international consensus and practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot / N.C. Schaper // *Curr Diab Rep.* — 2003. — Vol. 359. — P. 475 — 479.
174. Schratzberger P., Walter D.H., Rittig K., Bahlmann F.H., Pola R., Curry C., Silver M., Isner J.M. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer / P. Schratzberger // *J Clin Invest.* — 2001. — Vol. 107(9). — P. 1083–1092.
175. Schratzberger P., Ropper A.H., Isner J.M. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer / P. Schratzberger // *J Clin Invest.* — 2001. — Vol. 107(9). — P. 1083 — 1092.
176. Schumacher B., Pecher P., von Specht B.U., Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease / B. Schumacher // *Circulation.* — 1998. — Vol. 97. — P. 645 — 650.
177. Selby J.V., Zhang D. Risk factors for lower extremity amputation in persons with diabetes / J.V. Selby // *Diabetes Care.* — 1995. — Vol. 18. — P. 509 — 516.
178. Sima A.A., Nathaniel V., Prashar A., Bril V., Greene D.A. Endoneurial microvessels in human diabetic neuropathy. Endothelial cell dysjunction and lack of treatment effect by aldose reductase inhibitor / A.A. Sima // *Diabetes.* — 1991. — Vol. 40(9). — P. 1090 — 1099.
179. Sima Anders A. F., Virgil N, Ashok P., Bril V. and Douglas A. Greene Endoneurial Microvessels in Human Diabetic Neuropathy: Endothelial Cell Dysjunction and Lack of Treatment Effect by Aldose Reductase Inhibitor / Anders A. F. Sima // *Diabetes* 1991. — Vol. 40(9). — P. 1090 — 1099.
180. Sillman J.S., Levine R.A., Kobler J.B. Laser Doppler measurements of intratemporal facial nerve blood flow / J.S. Sillman // *Am J Otol.* — 1994. — Vol. 15(3). — P. 327 — 334.

181. Singh R., Kishore L., Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions / R. Singh // *Pharmacol Res.* — 2014. — Vol. 80. — P. 21 — 35.
182. Singh N., Armstrong D.G., Lipsky B.A. Preventing foot ulcers in patients with diabetes / N. Singh // *JAMA.* — 2005. — Vol. 359. — P. 217 — 228.
183. Sima A.F., Thibert P. Proximal motor neuropathy in the BB wistar rat / A.F. Sima // *Diabetes.* — 1982. — Vol. 31. — P. 784-788.
184. Shimizu F., Sano Y., Haruki H., Kanda T. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- $\beta$  and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes / F. Shimizu // *Diabetologia.* — 2011. — Vol. 54(6). — P. 517 — 526.
185. Sharma P.R., Rosich-Medina A., Swan M.C., Gillespie P.H., Skepper J.N., Price R.D. A randomised comparison of neurotmesis using scissors or a razor blade for sural nerve graft harvest / P.R. Sharma // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* — 2016. — Vol. 69(12). — P. 1711 — 1713.
186. Shvartsman D., Storrie-White H., Lee K., Kearney C., Brudno Y., Mooney D.J. Sustained delivery of VEGF maintains innervation and promotes reperfusion in ischemic skeletal muscles via NGF/GDNF signaling / D. Shvartsman // *Mol Ther.* — 2014. — Vol. 22(7). — P. 1243 — 1253.
187. Sheehan P., Jones P., Caselli A. Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial / P. Sheehan // *Diabetes Care.* — 2003. — Vol. 26(6). — 1879 — 1882.
188. Smith C.D., Bilmen G.J., Iqbal S., Robey S., Pereira M. Medial artery calcification as an indicator of diabetic peripheral vascular disease / C.D. Smith // *Foot Ankle Int.* — 2008. — Vol. 29(2). — P. 185 — 190.
189. Sondell M., Lundborg G., Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and

Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system / M. Sondell // *J Neurosci.* — 1999. — Vol. 19(14). — P. 5731-5740.

190. Sondell M., Sundler F., Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor / M. Sondell // *Eur J Neurosci.* — 2000. — Vol.12(12). — P. 4243-4254.

191. Soroku Y., Shin-Ichiro Y., Ryuichi W. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. / Y. Soroku // *Diabetes Research and Clinical Practice.* — 2007. — Vol.77(3). — P.184 — 189.

192. Spinner R.J., Kline D.G. Surgery for peripheral nerve and brachial plexus injuries or other nerve lesions / R.J. Spinner // *Muscle Nerve.* — 2000. — Vol. 23. — P. 680 — 695.

193. Storkebaum E., Lambrechts D., Dewerchin M., Moreno-Murciano M.P., Appelmans S., Oh H., Van Damme P., Rutten B., Man W.Y., De Mol M., Wyns S., Manka D., Vermeulen K., Van Den Bosch L., Mertens N., Schmitz C., Robberecht W., Conway E.M., Collen D., Moons L., Carmeliet P. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS / E. Storkebaum // *Nat Neurosci.* — 2005. — Vol.8 — P. 85 — 92.

194. Stoll G. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustun Waller`s observations to neuroinflammation / G. Stoll, S. Jander, R.R. Myers // *JPNS.* — 2002. — № 7. — P. 13 — 18.

195. Sulaiman W.A.R., Kline D.G. Nerve surgery: a review and insights about its future / W.A.R. Sulaiman // *Clin Neurosurg.* — 2006. — Vol. 53. — P. 38 — 47.

196. Sun Y., et al. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration / Y. Sun // *Dev Biol.* 2008. — Vol. 289(2). — P. 329 — 335.

197. Suzuki D., Yagame M., Kim Y., Sakai H., Mauer M. Renal in situ hybridization studies of extracellular matrix related molecules in type 1 diabetes mellitus / D. Suzuki // *Nephron.* — 2002. — Vol. 92. — P. 564 — 572.



198. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // *Physiol Res.* — 2001. — Vol. 50(6). — P. 537 — 546.
199. Tanaka T., Danno K., Ikai K., Imamura S. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes / T. Tanaka // *J Invest Dermatol.* — 1988. — Vol. 90. — P. 399 — 401.
200. Taylor G.I., Ham F.J. The free vascularized nerve graft / G.I. Taylor // *Plast Reconstr Surg.* — 1976. — Vol. 57. — P. 413 — 426.
201. Tesfaye S., Selvarajah D. The Eurodiab study: what has this taught us about diabetic peripheral neuropathy? / S. Tesfaye // *Curr Diab Rep.* — 2009. — Vol. 9. — P. 432 — 434.
202. Thomas H.T. Clinical strategies to enhance nerve regeneration / H.T. Thomas // *Neural Regen Res.* — 2015. — №10. — P. 22 — 24.
203. Thebaud B., Ladha F., Michelakis E.D., Sawicka M., Thurston G., Eaton F., Hashimoto K., Harry G., Haromy A., Korbitt G., Archer SL. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization / B. Thébaud // *Circulation.* — 2005. — Vol. 112(16). — P. 2477 — 2486.
204. Thomas H.T. Clinical strategies to enhance nerve regeneration / H.T. Thomas // *Neural Regen Res.* — 2015. — №10. — P. 22 — 24.
205. Timperley W.R., Boulton A.J., Davies-Jones G.A., Jarratt J.A., Ward J.D. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control / W.R. Timperley // *J Clin Pathol.* — 1985. — Vol. 38(9). — P. 1030 — 1038.
206. Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D., Kearney M., Rossow S.T., Passeri J., Horowitz J.R., Symes J.F., Isner J.M. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral

- development and tissue perfusion / Y. Tsurumi // *Circulation*. — 1996. — Vol. 94. — P. 3281 — 3290.
207. Verheyen A., Peeraer E., Nuydens R., Dhondt J. Systemic anti-vascular endothelial growth factor therapies induce a painful sensory neuropathy / A. Verheyen // *Brain*. — 2012. — Vol. 135. — P. 2629 — 2641.
208. Verheyen A., Peeraer E., Lambrechts D., Poesen K., Carmeliet P., Shibuya M., Pintelon I., Timmermans J.P., Nuydens R., Meert T. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. // *Neuroscience*. — 2013. — Vol.6(244). — P.77 — 89.
209. Vinik A.I., Maser R.E., Mitchell B.D. et al. / Diabetic autonomic neuropathy / A.I. Vinik // *Diabetes Care*. — 2003. — Vol. 26: — P. 1553—1579.
210. Vincent A.M., Feldman E.L. New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy / A.M. Vincent // *Rev Endocr Metab Disord*. —2004. — Vol. 5. —P. 227–236.
211. Wagner F.W. The dysvascular foot: A system for diagnosis and treatment / F.W. Wagner // *Foot Ankle*. —1981. — Vol. 2. — P. 64 — 122.
212. Waller A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres / A. Waller // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. — 1985. — Vol. 140 (0). — P. 423 — 429.
213. P., Walter D.H., Rittig K., Isner J.M. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer / P. Schratzberger // *J Clin Invest*. — 2001. — Vol. 107(9). — P. 1083–1092.
214. Walker M.J., Xu X.M. Pleiotropic role of VEGF and its application for traumatic spinal cord injury / M.J. Walker // 2018. — Vol.1(1) — P.1001.
215. Wang H., Zhu H., Guo Q., Qian T., Zhang P., Li S., Xue C., Gu X. Overlapping Mechanisms of Peripheral Nerve Regeneration and Angiogenesis

- Following Sciatic Nerve Transection / Wang H. // *Front Cell Neurosci.* — 2017. — Vol. 11. — P. 323.
216. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner // *Physiol Rev.* — 2003 — Vol. 83. — P. 835 — 870.
217. Weerasuriya A., Mizisin A.P. The blood-nerve barrier: structure and functional significance / A. Weerasuriya // *Methods Mol Biol.* — 2011. — Vol. 686. — P. 149 — 173.
218. Witzendichler B., Asahara T., Murohara T., Silver M., Spyridopoulos I., Magner M., Principe N., Kearney M., Hu J.S., Isner J.M. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia / B. Witzendichler // *Am J Pathol.* — 1998. — Vol. 153(2). — P. 381 — 94.
219. Williams P.D. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease / P.D. Williams // *Cardiovascular Research.* — 2011. — Vol. 91(4). — P. 565–576.
220. Woitek F., Zentilin L., Hoffman N.E., Powers J.C., Ottiger I., Parikh S., Kulczycki A.M., Hurst M., Ring N., Wang T., Shaikh F., Gross P., Singh H., Kolpakov M.A., Linke A., Houser S.R., Sabri A., Madesh M., Giacca M., Recchia F.A. Intracoronary cytoprotective gene therapy: a study of VEGF-B167 in a pre-clinical animal model of dilated cardiomyopathy / F. Woitek // *J Am Coll Cardiol.* — 2015. — Vol. 66. — P. 139 — 153.
221. Wolfram J.A., Donahue J. K. Gene Therapy to Treat Cardiovascular Disease / J.A. Wolfram // *J Am Heart Assoc.* — 2013. — Vol. 2(4). — P. 1 — 119.
222. Wuestefeld R., Chen J., Meller K., Brand-Saberi B., Theiss C. Impact of vegf on astrocytes: analysis of gap junctional intercellular communication, proliferation, and motility / R. Wuestefeld // *Glia.* — 2012. — Vol. 60(6). — P. 936 — 947.
223. Xu Z., Han K., Chen J., Wang C., Dong Y., Yu M., Bai R., Huang C., Hou L. Vascular endothelial growth factor is neuroprotective against ischemic brain injury by inhibiting scavenger receptor A expression on microglia / Z. Xu // *J Neurochem.* — 2017. — Vol. 142(5). — P. 700 — 709.

224. Xu Q.G., Midha R., Martinez J.A., Guo G.F., Zochodne D.W. Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury / Q.G. Xu // *Neuroscience*. — 2008. — №9. — P. 877— 887.
225. Xu Q., Midha R., Zochodne D.W. The microvascular impact of focal nerve trunk injury / Xu Q. // *J Neurotrauma*. — 2010. — Vol. 27(3). — P. 639 — 646.
226. Yasuhara T., Shingo T., Kobayashi K., Takeuchi A., Yano A., Muraoka K., Matsui T., Miyoshi Y., Hamada H., Date I. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease / T. Yasuhara // *Eur J Neurosci*. — 2004. — Vol. 19(6). — P. 1494 — 1504.
227. Yagihashi S., Mizukami H., Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig*. 2011 Jan 24; 2(1): 18–32.
228. Yla-Herttuala S., Martin J. F. Cardiovascular gene therapy / S. Yla-Herttuala // *Lancet*. — 2000. — Vol. 355(9199). — P. 213 — 222.
229. Young M.J., Boulton A.J., MacLeod A.F., Williams D.R., Sonksen P.H. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population / M.J. Young // *Diabetologia*. — 1993. — 36(2). — P. 150 — 154.
230. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential / I. Zachary // *Neurosignals*. — 2005. — Vol. 14(5). — P. 207 — 221.
231. Zimmermann A., Reeps C., Hartl F., Ockert S., Eckstein H.H. The diabetic foot. *Der Chir. Z. Fuer Alle Geb* / A. Zimmermann // *Der Oper. Med*. — 2009. — Vol. 80. — P. 430 — 436.
232. Zhang Y., Huang J., Huang L., Liu Q. Silk fibroin-based scaffolds with controlled delivery order of VEGF and BDNF for cavernous nerve regeneration / Y. Zhang // *ACS Biomater. Sci. Eng*. — 2016. — Vol. 2(11). — P. 2018 — 2025.

233. Zor F., Deveci M., Kilic A. Effect of vegf gene therapy and hyaluronic acid film sheath on peripheral nerve regeneration / F. Zor // *Microsurgery*. — 2014. — Vol. 34. — P. 209 — 216.