

## ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ПОСЛЕ ПРЯМОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ VEGF165 ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ОБЛИТЕРИРУЮЩИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

М.О. Мавликеев<sup>1</sup>, М.В. Плотников<sup>2,3</sup>, А.В. Максимов<sup>2,3</sup>, Г.Р. Гафиятуллина<sup>1</sup>, А.И. Муртазин<sup>4</sup>, Ю.Э. Терегулов<sup>2</sup>, И.И. Шамсутдинова<sup>2</sup>, А.А. Гумерова<sup>1</sup>, А.А. Ризванов<sup>1</sup>, А.П. Киясов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, Россия

<sup>3</sup> Казанская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Казань, Россия

<sup>4</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

### Pathohistological assessment of skeletal muscle after direct gene therapy with vegf165 of patients with peripheral arterial diseases

M.O. Mavlikeev<sup>1</sup>, M.V. Plotnikov<sup>2,3</sup>, A.V. Maksimov<sup>2,3</sup>, G.R. Gafiyatullina<sup>1</sup>, A.I. Murtazin<sup>4</sup>, U.E. Teregulov<sup>2</sup>, I.I. Shamsutdinova<sup>2</sup>, A.A. Gumerova<sup>1</sup>, A.A. Rizvanov<sup>1</sup>, A.P. Kiassov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Republic Clinical Hospital of Republic of Tatarstan, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

<sup>4</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Цель исследования – оценка влияния генной терапии плазмидой, несущей ген *vegf165*, на структуру скелетной мышечной ткани пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

Шести пациентам (степень ишемии IIб–III по А.В. Покровскому – Фонтейну) произведены согласно инструкции по применению две внутримышечные инъекции плазмиды (препарат «Неоваскулген», РУ ЛП-000671 от 28.09.2011). Проводили стандартный тредмил-тест, измеряли лодыжечно-плечевой индекс. Гистологическое исследование биоптатов мышц пораженной конечности выполнено до и через 3 мес. после выполнения генной терапии.

При сохранном состоянии мышечной ткани терапия *vegf165* стимулирует увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон без значительного ангиогенного эффекта. В случае сниженной капиллярной плотности терапия *vegf165* приводит к улучшению кровоснабжения, что способствует регенерации мышц путем пролиферации миосателлитов и увеличения площади поперечного сечения мышечных волокон, а также дегенерации избытка соединительной ткани. Показано увеличение дистанции безболезненной ходьбы в среднем на 31,74% (с  $94,96 \pm 49,79$  м до  $139,11 \pm 60,78$  м,  $p < 0,05$ ) у всех пациентов. Отмечена корреляция данных патогистологического анализа с клиническими результатами.

**Ключевые слова:** заболевания периферических артерий, генная терапия, сосудистый эндотелиальный фактор роста, регенерация, иммуногистохимия.

Хроническим облитерирующим заболеваниям артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) уделяется незаслуженно малое внимание по сравнению, например, с атеросклерозом коронарных артерий. Согласно эпидемиологическим данным, распространенность ХОЗАНК достигает 10% в популяции [1]. Течение ХОЗАНК характеризуется прогрессирующим течением и зачастую приводит к развитию критической ишемии нижних конечностей (КИНК), которая, в свою очередь, является предиктором инвалидизации и смерти [2]. При возникновении КИНК к концу первого года смертность составляет до 25%, а трети пациентов выполняется ампутация на уровне бедра

The aim was to elucidate impact of gene therapy with plasmid encoding *vegf165* on the muscle tissue pathohistology of patients with peripheral arterial diseases.

Twice repeated intramuscular injections of plasmid («Neovaskulgen», RN LP-000671 from 28.09.2011) were performed to 6 patients (ischemia grade IIb–III by Pokrovsky-Fontaine) according to specification. Standard treadmill test, ankle-brachial index estimation were performed. Histological study of injured muscle biopsies taken before and 3 months after injection was performed.

In intact muscles therapy with *vegf165* leads to increase of mean cross-sectional muscle fiber area without significant angiogenic effect. In muscles with decreased capillary density this therapy leads to blood supply improvement promoting regeneration of muscles by myosatellites proliferation and increase of mean cross-sectional muscle fiber area and connective tissue degradation. Treadmill test showed painless walking distance increased by 31,74% on average (from  $94,96 \pm 49,79$  m to  $139,11 \pm 60,78$  m,  $p < 0,05$ ) in all patients. There was correlation of pathohistological analysis with clinical data.

**Key words:** peripheral arterial diseases, gene therapy, vascular endothelial growth factor, regeneration, muscle biopsies, immunohistochemistry.

или голени [3]. В большинстве случаев открытые и рентгенэндоваскулярные реваскуляризирующие вмешательства позволяют сохранить конечность. Пациентам, которым выполнение прямой реваскуляризации невозможно, применяются различные методы стимуляции коллатерального кровообращения, зачастую с недоказанной эффективностью.

Применение генно-терапевтических препаратов, стимулирующих неоангиогенез в ишемизированных тканях, в настоящее время относят к IIб классу доказательности [4]. В России зарегистрирован генный препарат «Неоваскулген», содержащий в качестве действующего вещества плазмиду, обеспечива-

ющую экспрессию гена сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF165). Безопасность и клиническая эффективность препарата доказана в ряде исследований [5, 6]. При этом морфологические основы эффективности терапии данным препаратом в клинике остаются неустановленными. В связи с этим нами впервые изучено влияние генной терапии в клинике на морфологические показатели состояния мышечной ткани у пациентов с ХОЗАНК.

**Цель работы:** оценить влияние прямой генной терапии *vegf165* на структуру пораженной мышцы у пациентов с ХОЗАНК.

### Материал и методы

В исследовании приняло участие 6 пациентов с ХОЗАНК. Средний возраст пациентов составил  $56,3 \pm 1,7$  года. У всех пациентов была диагностирована IIБ или III стадия (без трофических изменений) хронической артериальной недостаточности по А.В. Покровскому – Фонтейну, диапазон дистанции безболевой ходьбы –  $94,96 \pm 49,79$  м, лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) –  $0,43 \pm 0,13$ . У всех пациентов был обнаружен облитерирующий атеросклероз, у одного – сахарный диабет. Один пациент ранее перенес аорто-бедренную реконструкцию (шунт проходим, но перемежающаяся хромота сохранилась), 3 пациента – инфраингинальные реконструкции (все шунты окклюзированы).

Клиническая оценка функционального состояния кровоснабжения конечности проведена до введения препарата и через 3 мес. путём измерения ЛПИ и стандартного тредмил-теста.

В условиях операционной (отделение сосудистой хирургии ГАУЗ РКБ МЗ Республики Татарстан) под инфильтрационным обезболиванием через кожный разрез на уровне середины голени производили биопсию икроножной мышцы. После ушивания раны выполняли инфильтрацию мышц голени препаратом «Неоваскулген» (РУ ЛП-000671 от 28.09.2011 г.) в дозе 1,2 мг в равноудаленных точках равными дозами, повторная инъекция была произведена через 14 сут. тем же способом. Повторная биопсия указанной области была произведена через 12 нед. после повторной инъекции препарата. У всех пациентов получено информированное согласие на забор биоптатов мышцы.

Биоптаты заливали в парафин по стандартной методике и изготавливали срезы толщиной 4–6 мкм. Поперечные срезы мышечной ткани окрашивали по Массону для выявления соединительной ткани и проведения морфометрического анализа; выполняли иммуногистохимические исследования с использованием коммерческих моноклональных антител к CD34 для визуализации капилляров (клон QVEnd/10, Novocastra, Великобритания, 1:75), к ядерному антигену пролиферирующих клеток для выявления пролиферативной активности клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA, клон PC10, Dako, Дания, 1:200), к миогенину для визуализации активированных миосателлитоцитов (клон F5D, Dako, Дания, 1:50). На срезах, окрашенных по Массону, в трех случайных полях зрения определяли площадь соединительной ткани и ее отношение к общей площади среза в процентах с помощью графического пакета ImageJ (NIH, открытая лицензия). По результатам окрашивания с антителами к CD34 определяли

количество капилляров, соотношение числа капилляров и мышечных волокон (плотность капилляров). Экспрессию PCNA оценивали полуколичественно с учётом локализации PCNA-позитивных ядер. Экспрессию миогенина также оценивали полуколичественно, обращая внимание на локализацию и характер экспрессии (цитоплазматическая, ядерная). Статистическая обработка количественных показателей выполнена с помощью программного пакета STATISTICA, оценка достоверности различий проведена с помощью критерия Вилкоксона.

### Результаты

Все пациенты отметили улучшение, выражающееся в увеличении дистанции безболевой ходьбы, потеплении конечности и нормализации сна (купирования болей у пациентов с ХОЗАНК III стадии) уже через 2 нед. после введения препарата. Дистанция безболевой ходьбы по результатам тредмил-теста увеличилась у всех пациентов. Прирост дистанции к 3-му месяцу наблюдения составил в среднем 31,74% (с  $94,96 \pm 49,79$  м до  $139,11 \pm 60,78$  м,  $p < 0,05$ ).

При изучении обзорных препаратов первичных биоптатов в некоторых образцах было отмечено большее содержание соединительной ткани и больший разброс в диаметре и форме мышечных волокон, что позволило разделить пациентов на 2 группы. В первой группе (2 пациента) в первичных биоптатах наблюдается достаточно высокая плотность капилляров ( $2,17 \pm 0,46$ ), относительно невысокий уровень фиброза ( $11,85 \pm 6,83\%$ ) и пролиферации (не более 25% позитивных ядер, локализованных в основном в стенке сосудов). У данных пациентов в повторных биоптатах плотность капилляров изменилась незначительно (с  $2,17 \pm 0,46$  до  $1,98 \pm 0,79$ ,  $p = 0,68$ ) (рис. 1, 2), площадь соединительной ткани также осталась неизменной ( $11,85 \pm 6,83\%$  против  $9,51 \pm 3,37\%$ ,  $p = 0,75$ ) (рис. 3, 4). При этом отмечено увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с  $1459,7 \pm 1034,5$  мкм<sup>2</sup> до  $2259,5 \pm 1331,75$  мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,05$  (рис. 4, 5) и количества PCNA-позитивных ядер в мышечных волокнах (до 75% от общего числа ядер), что может являться признаком гипертрофии мышечных волокон (рис. 6). Это предположение также подтверждается появлением в повторных биоптатах молодых мышечных волокон с миогенин-позитивными ядрами, тогда как в первичных биоптатах обнаруживаются лишь единичные клетки с цитоплазматическим паттерном окрашивания на миогенин между мышечными волокнами (рис. 7). Также у данных пациентов на фоне увеличения дистанции ходьбы не отмечалось прироста ЛПИ (0,69 у первого пациента и 0,41 у второго до введения препарата, 0,69 и 0,4 соответственно через 3 мес.).

Во второй группе (4 пациента) в первичных биоптатах наблюдается сниженная по сравнению с первой группой капиллярная плотность ( $1,40 \pm 0,36$ ), более высокая площадь соединительной ткани ( $17,18 \pm 5,87\%$ ), которая была представлена прослойками между отдельными мышечными волокнами, а в отдельных случаях выявлено замещение целых мышечных волокон соединительной тканью. При этом обращает на себя внимание значительная вариабельность формы и размеров мышечных волокон, пустоты, соответствующие по форме и размерам

мышечным волокнам. В повторных биоптатах установлено значительное увеличение плотности капиллярной сети с  $1,40 \pm 0,36$  до  $3,03 \pm 0,82$ ,  $p < 0,05$  (рис. 1, 2), снижение площади соединительной ткани с  $17,18 \pm 5,87\%$  до  $12,62 \pm 5,2\%$ ,  $p < 0,05$  (рис. 3, 4), увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с  $1282,42 \pm 857,37 \text{ мкм}^2$  до  $2323,46 \pm 1237,58 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,05$  (рис. 4, 5). Мышечные волокна в повторных биоптатах были более мономорфны по форме и размерам. Уровень пролиферации в каждом случае был различен (от единичных PCNA-положительных ядер до 25–50% положительных ядер), но не отличался существенно в биоптатах до и после терапии (рис. 6). Окрашивание с антителами к миогенину не выявило значительных различий в биоптатах до и после терапии, в обоих случаях выявлялись единичные миогенин-положительные интерстициальные клетки (рис. 7). У данных пациентов наблюдалось достоверное увеличение ЛПИ более чем на 0,1 (с  $0,37 \pm 0,04$  до  $0,49 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ).

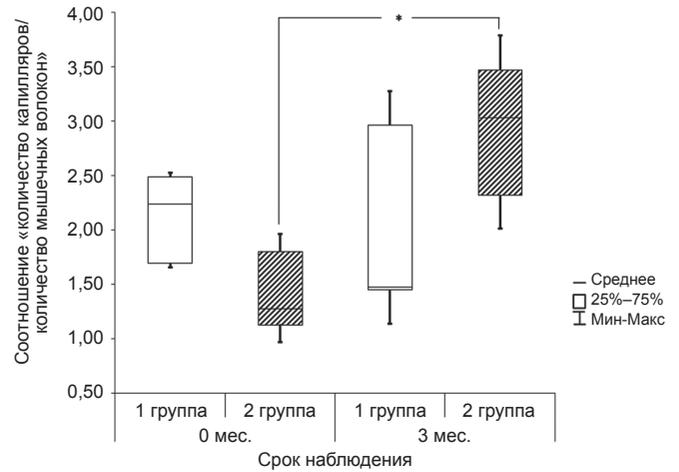


Рис. 1. Соотношение числа капилляров и числа мышечных волокон в биоптатах пациентов до терапии и через 3 мес. после терапии. Достоверное увеличение капиллярной плотности во 2 группе ( $p < 0,05$ )

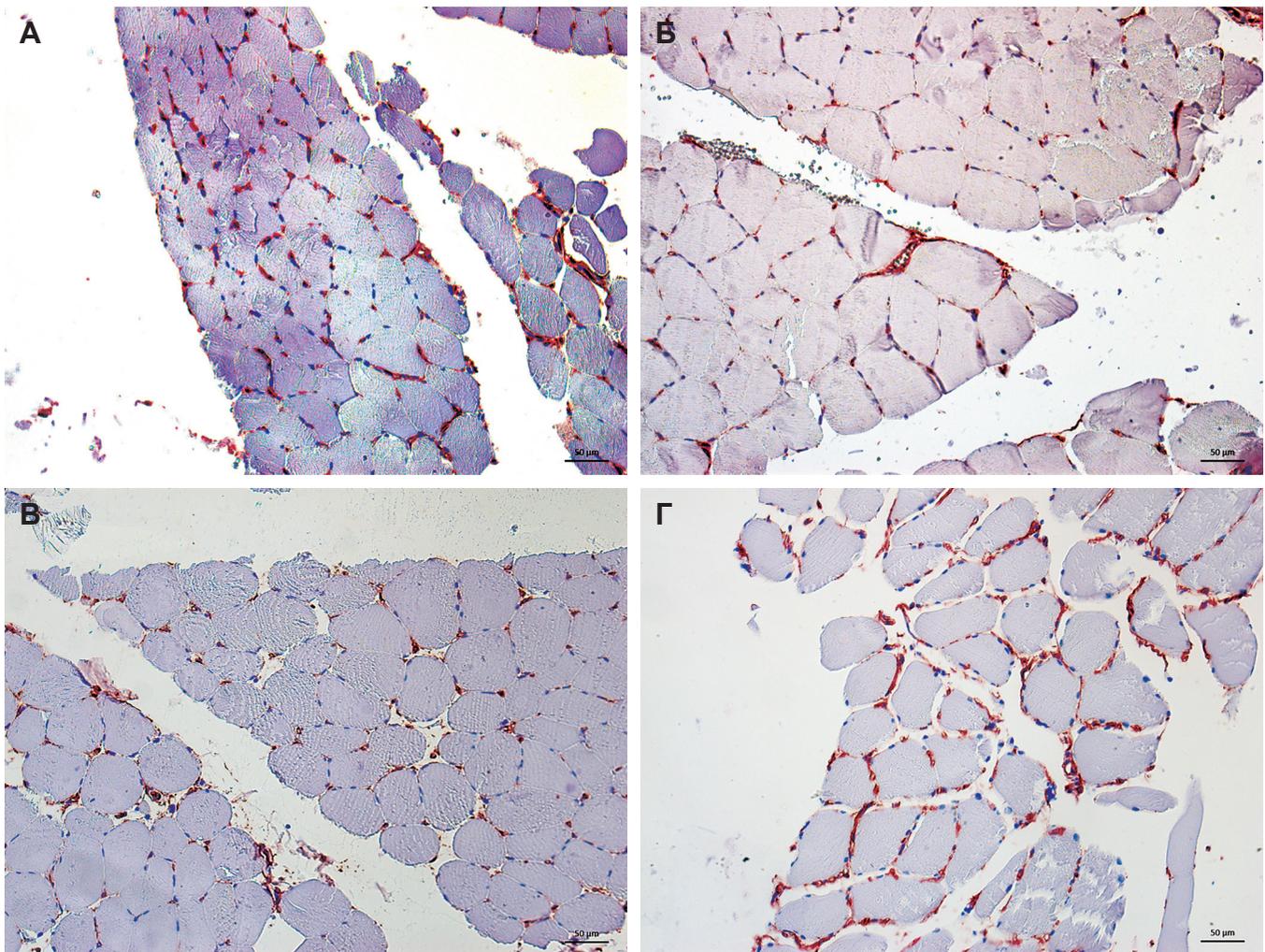
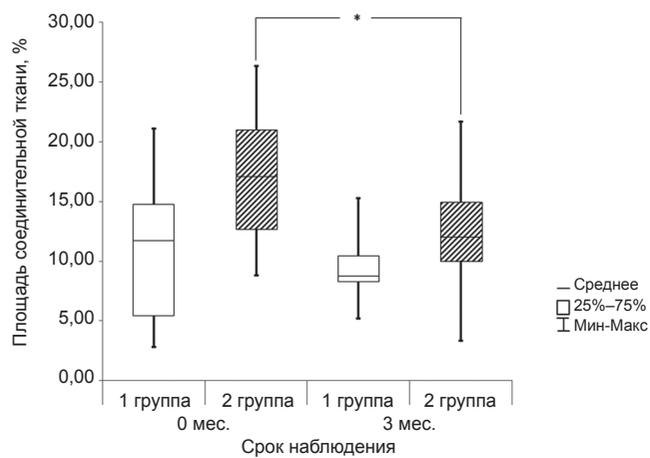
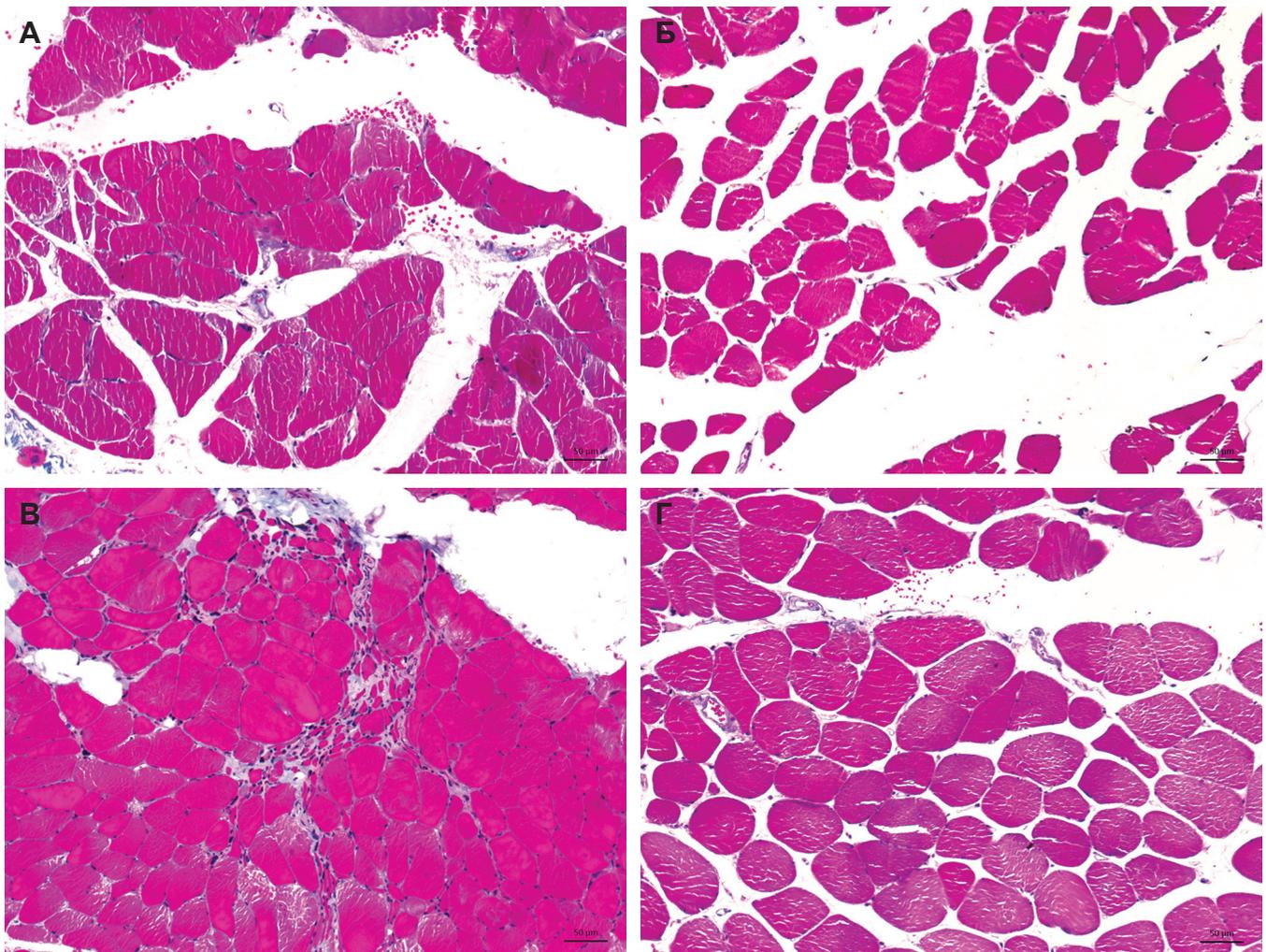


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34 (А, Б – 1 группа, В, Г – 2 группа): А, В – скелетная мышечная ткань до терапии; Б, Г – через 3 мес. после терапии. Докраска: гематоксилин. Ув.  $\times 200$



**Рис. 3.**  
Соотношение площади соединительной ткани и общей площади срезов биоптатов (в %) до терапии и через 3 мес. после терапии. Достоверное снижение площади соединительной ткани во 2 группе ( $p < 0,05$ )



**Рис. 4.** Скелетная мышечная ткань биоптатов от пациентов (А, Б – 1 группа, В, Г – 2 группа): А, В – до терапии; Б, Г – через 3 мес. после терапии. Уменьшение доли соединительной ткани во 2 группе, увеличение диаметра мышечных волокон в 1 и 2 группах. Окраска: по Массону. Ув.  $\times 200$

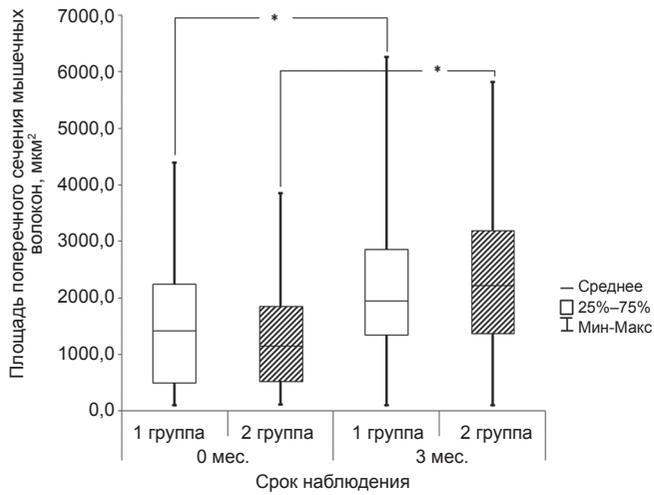


Рис. 5. Площадь поперечного сечения мышечных волокон (в  $\mu\text{m}^2$ ) в биоптатах пациентов до терапии и через 3 мес. Наблюдается достоверное увеличение площади поперечного сечения в 1 и 2 группах ( $p < 0,05$ )

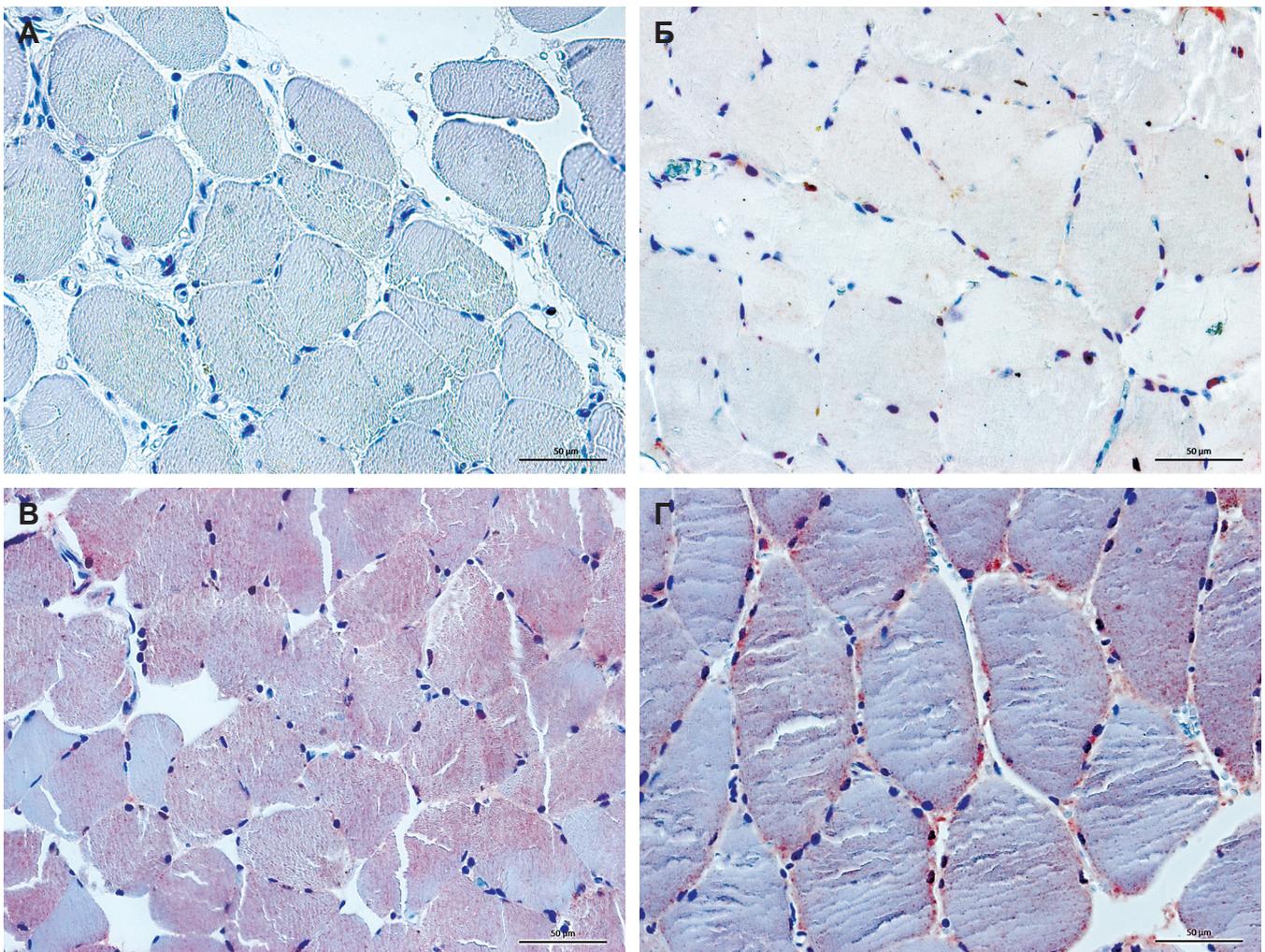


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция с антителами к PCNA (А, Б – 1 группа, В, Г – 2 группа): А, В – скелетная мышечная ткань до терапии; Б, Г – через 3 мес. после терапии. Увеличение числа PCNA-позитивных ядер в 1 группе. Докраска гематоксилин. Ув.  $\times 400$

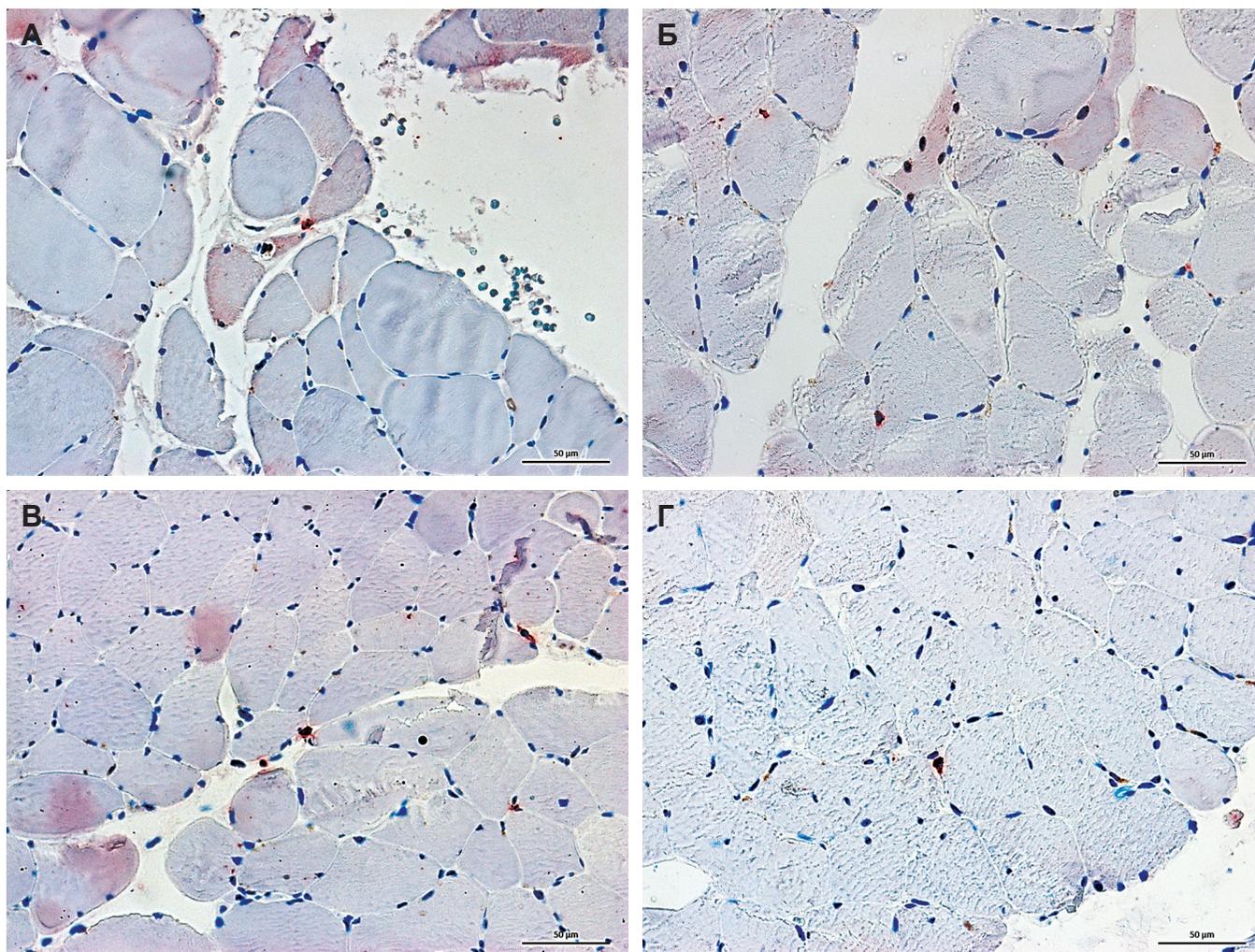


Рис. 7. Иммуногистохимическая реакция с антителами к миогенину (А, Б – 1 группа, В, Г – 2 группа): А, В – скелетная мышечная ткань до терапии; Б, Г – через 3 мес. после терапии. Докраска: гематоксилин. Ув.  $\times 400$

### Обсуждение

Проведенное исследование позволило получить новые сведения о морфологических изменениях, происходящих в пораженной хронической ишемией мышце в результате прямой генной терапии плазмидой, несущей ген *vegf165*.

Установлено, что степень и характер изменений структуры мышечной ткани под воздействием современного гентерапевтического лечения зависят от исходного состояния мышечной ткани. При сравнительно сохранном (1-я группа) исходном состоянии мышечной ткани (высокий уровень плотности капилляров, незначительный уровень фиброза) генная терапия не привела к значительным изменениям этих показателей. При этом отмечено увеличение уровня пролиферации и средней площади поперечного сечения мышечных волокон, что может свидетельствовать о регенерации мышечной ткани путём пролиферации миосателлитоцитов и гипертрофии мышечных волокон [7]. Это также подтверждается появлением молодых мышечных волокон с миогенин-позитивными ядрами, что было показано ранее [8]. Установленное отсутствие роста плотности капиллярной сети и улучшения функциональных параметров кровоснабжения может свидетельствовать об ином, не связанном с ангиогенезом, механизме

улучшения функции конечности. Ранее было показано, что VEGF стимулирует дифференцировку мышечных предшественников в культуре и способствует их гипертрофии [9], а также индуцирует компенсаторную гипертрофию сердечной мышцы после инфаркта миокарда [10], однако конкретные молекулярные механизмы данных эффектов остаются неизученными. Показано антиапоптотическое действие VEGF на мышечные клетки [11].

Значительные сдвиги морфологической картины наблюдаются в ситуации, когда исходно у пациентов наблюдается интенсивная дегенерация мышечной ткани и ее замещение соединительной тканью на фоне сниженной плотности капилляров (2-я группа). В этом случае генная терапия приводит к значительному увеличению плотности капилляров, снижению площади соединительной ткани и увеличению средней площади поперечного сечения мышечных волокон, а также к нормализации гистологической картины в целом. Можно предположить, что повышенная экспрессия VEGF способствует пролиферации эндотелия, а улучшение кровоснабжения, также подтверждаемое положительной динамикой ЛПИ, стимулирует регенерацию мышечных волокон путем пролиферации миосателлитоцитов и гипертрофии зрелых мышечных волокон, исходно находившихся

