

УДК 616.13-004.6-08

М.В. ПЛОТНИКОВ^{1,2}, М.О. МАВЛИКЕЕВ³, И.И. ШАМСУТДИНОВА¹¹Республиканская клиническая больница МЗ РТ, 420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д. 138²Казанская государственная медицинская академия, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 36³Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Клинические и морфологические аспекты влияния прямой генной терапии Неоваскулгеном у пациентов с облитерирующим заболеванием периферических артерий

Плотников Михаил Викторович — хирург отделения сосудистой хирургии № 1, ассистент кафедры кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии, тел. +7-917-265-19-03, e-mail: plotnikov_mv@bk.ru

Мавликеев Михаил Олегович — младший научный сотрудник, тел. +7-917-265-19-03, e-mail: MOMavlikeev@kpfu.ru

Шамсутдинова Ильдрия Ильдусовна — врач функциональной диагностики, тел. +7-927-670-04-55, e-mail: ilsgum@rambler.ru

В статье представлены клинические и морфологические данные влияния терапии препаратом «Неоваскулген» у пациентов с облитерирующими заболеваниями периферических артерий. Десяти пациентам (степень ишемии IIb-III по Покровскому — Фонтейну) произведены две внутримышечные инъекции препарата согласно инструкции производителя. Проводили стандартный тредмил-тест, измеряли лодыжечно-плечевой индекс. Гистологическое исследование биоптатов мышц пораженной конечности выполнено до и через 3 месяца после выполнения генной терапии. Выявлено увеличение дистанции безболезненной ходьбы к трем месяцам в среднем на 31,74% и отсутствие ограничения ходьбы к шести месяцам. Установлено увеличение лодыжечно-плечевого индекса к шести месяцам на 64,7%. При сохранном состоянии мышечной ткани терапия Неоваскулгеном стимулирует увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон без значительного ангиогенного эффекта. В случае сниженной капиллярной плотности терапия Неоваскулгеном приводит к улучшению кровоснабжения, что способствует регенерации мышц путем пролиферации миосателлитоцитов и увеличения площади поперечного сечения мышечных волокон, а также дегенерации соединительной ткани.

Ключевые слова: заболевания периферических артерий, генная терапия, Неоваскулген, регенерация, иммуногистохимия.

M.V. PLOTNIKOV^{1,2}, M.O. MAVLIKEEV³, I.I. SHAMSUTDINOVA¹¹Republican Clinical Hospital of the MH of RT, 138 Orenburgskiy Tract, Kazan, Russian Federation, 420064²Kazan State Medical Academy, 36 Butlerov St., Kazan, Russian Federation, 420012³Kazan (Volga region) Federal University, 18 Kremlevskaya St., Kazan, Russian Federation, 420008

Clinical and morphological aspects of the direct gene therapy impact by Neovaskulgen in patients with peripheral arterial occlusive disease

Plotnikov M.V. — Surgery of the Department of Vascular Surgery № 1, Assistant of the Department of cardiology, endovascular and cardiovascular surgery, tel. +7-917-265-19-03, e-mail: plotnikov_mv@bk.ru

Mavlikeev M.O. — Junior Researcher, tel. +7-917-265-19-03, e-mail: MOMavlikeev@kpfu.ru

Shamsutdinova I.I. — doctor of functional diagnostics, tel. +7-927-670-04-55, e-mail: ilsgum@rambler.ru

Clinical and morphological data of «Neovaskulgen» therapy in patients with peripheral arterial disease were presented. Twice repeated intramuscular injections of Neovaskulgen (according to the manufacturer's instructions) were performed to 10 patients with ischemia IIb-III grade by Pokrovsky-Fontaine. Standart treadmill test, ankle-brachial index estimation were performed. Injured muscle biopsies taken before and 3 months after injection was histologically studied. Pain-free walking distance increase to 31.74% at 3 months and no limits to walk at six months were detected. There were ankle-brachial index increase to 64.7% at 6 months. In intact muscles therapy with Neovaskulgen 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.

Key words: peripheral arterial disease, gene therapy, Neovaskulgen, regeneration, muscle biopsy, immunohistochemistry.

Облитерирующие заболевания периферических артерий являются одной из ведущих причин снижения качества жизни и инвалидизации. По данным различных авторов, заболеванием периферических артерий страдает от 3 до 10% популяции [1, 2].

Заболевания периферических артерий (ЗПА) носят прогрессирующий характер, что заставляет проводить мероприятия для предупреждения развития критической ишемии — шунтирующие и рентгенэндоваскулярные операции [3]. Однако примерно у трети пациентов выполнение прямой реваскуляризации невозможно, что может привести к ампутации [4].

Проблема хирургического лечения поражения дистального русла у пациентов с ишемией напряжения (IIA-III стадии по А.В. Покровскому) по-прежнему актуальна. Развитие генно-клеточных технологий позволило взглянуть на эту проблему с точки зрения концепции коррекции артериальной недостаточности при помощи стимуляции ангиогенеза. Наиболее перспективным направлением является разработка генных препаратов для терапевтического ангиогенеза [5-7]. В России зарегистрирован первый генный препарат, содержащий в качестве действующего вещества плазмиду, обеспечивающую экспрессию гена сосудистого эндотелиального фактора роста — «Неоваскулген» (РУ ЛП-000671 от 28.09.2011 г.). Его безопасность и клиническая эффективность при ишемии напряжения доказана в ряде исследований [8, 9]. При этом морфологические основы эффективности терапии данным препаратом в клинике остаются неизученными.

Цель работы — оценить клиническую эффективность прямой генной терапии препаратом «Неоваскулген» и установить морфологические аспекты его воздействия.

Материал и методы

Эффективность препарата «Неоваскулген» изучена у 10 пациентов. Средний возраст пациентов составил 56,3±1,7 года. У всех пациентов была диагностирована IIB или III степень (без трофических

изменений) хронической артериальной недостаточности по А.В. Покровскому-Фонтейну. У всех пациентов этиологией ЗПА являлся облитерирующий атеросклероз, а у одного пациента — сахарный диабет как сопутствующая патология. Один пациент ранее перенес аорто-бедренную реконструкцию (шунт проходим, но перемежающаяся хромота сохранялась), 3 пациента — инфраингвинальные реконструкции (все шунты окклюзированы).

Клиническая оценка функционального состояния кровоснабжения конечности проведена до введения препарата, через 3 и 6 месяцев путем измерения лодыжечно-плечевого индекса и стандартного тредмил-теста. Исходная дистанция безболевой ходьбы составила 94,96±49,79 м, лодыжечно-плечевой индекс — 0,43±0,13.

Под инфильтрационной анестезией раствором лидокаина 1% на уровне середины голени выполняли кожный разрез до 1 см, через который выполняли забор биоптата икроножной мышцы. После ушивания раны выполняли инфильтрацию мышц голени препаратом «Неоваскулген» в дозе 1,2 мг. Повторная инъекция, согласно рекомендациям производителя, выполнялась через 14 суток. Повторная биопсия указанной области была произведена через 3 месяца после первичной инъекции. 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 иммуногистохимическое окрашивание с коммерческими моноклональными антителами к CD34 для визуализации капилляров (клон QBEnd/10, Novocastra (UK), 1:75), к ядерному антигену пролиферирующих клеток для выявления пролиферативной активности клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA, клон PC10, Dako (Denmark), 1:200), к миогенину для визуализации активированных миосателлитов (клон F5D, Dako (Denmark), 1:50). На срезах, окрашенных по Массону, в трех случай-

Рисунок 1. Дистанция безболевой ходьбы по результатам тредмил-теста

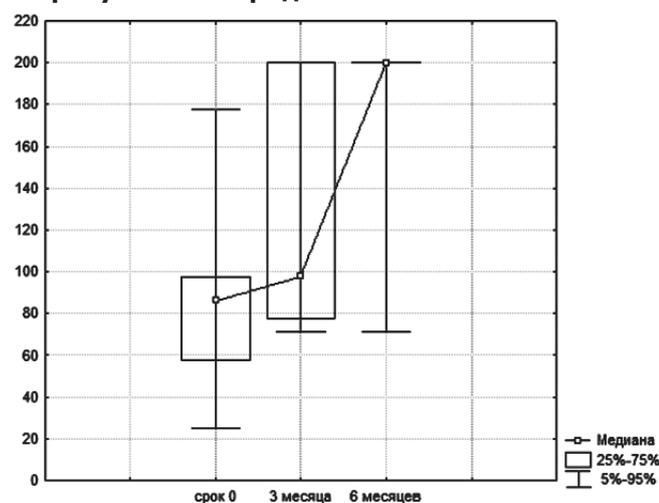


Рисунок 2. Динамика лодыжечно-плечевого индекса

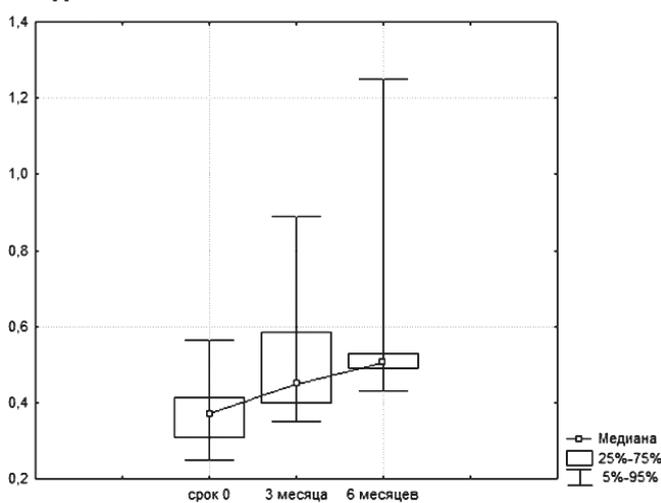
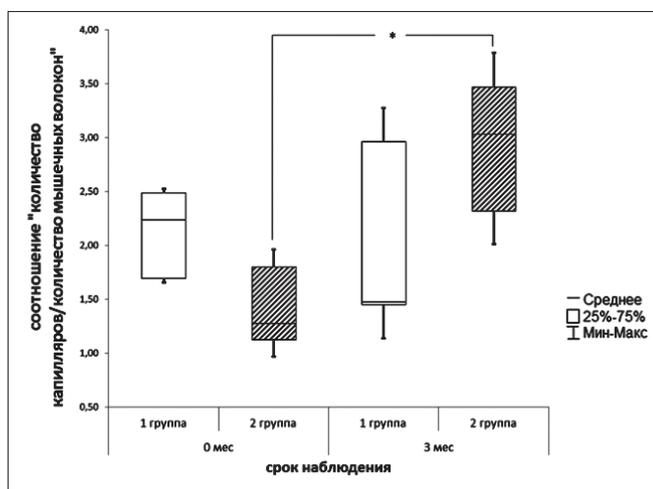


Рисунок 3. Соотношение числа капилляров и числа мышечных волокон в биоптатах пациентов до терапии и через три месяца после терапии Неоваскулгеном. Наблюдается достоверное увеличение капиллярной плотности во 2-й группе ($p < 0,05$)



ных 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).

Статистическая обработка количественных показателей выполнена с помощью программного пакета STATISTICA, оценка достоверности различий проведена с помощью Т-критерия Вилкоксона.

Результаты

В ходе исследования у одного пациента на сроке 2 месяца произошло усугубление ишемии, что потребовало выполнения малой ампутации. Один пациент самовольно прекратил участие в исследовании. Таким образом, отдаленные результаты исследованы у восьми пациентов.

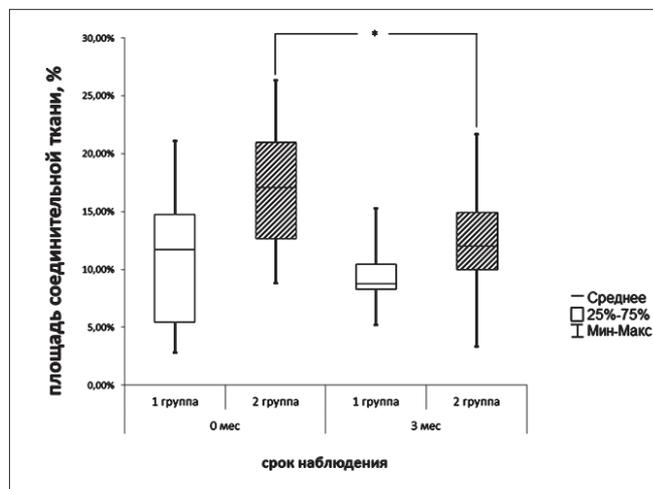
Все оставшиеся пациенты отметили улучшение, выражающееся в увеличении дистанции ходьбы, потеплении конечности и нормализации сна (купирования болей у пациентов с хронической ишемией III ст.) уже через 2 недели после введения препарата.

Дистанция безболевого ходьбы по результатам тредмил-теста увеличилась у всех пациентов. Прирост дистанции к 3-му месяцу наблюдения составил в среднем 31,74% (с $94,96 \pm 49,79$ до $139,11 \pm 60,78$ м; $p < 0,05$). На сроке 6 месяцев все пациенты, кроме одного, выполняли тредмил-тест полностью (рис. 1).

По данным измерения лодыжечно-плечевого индекса до введения Неоваскулгена и на сроках 3 и 6 месяцев установлено достоверное увеличение данного показателя на 64,7%. Лодыжечно-плечевой индекс к 3-му месяцу наблюдения увеличился с $0,37 \pm 0,04$ до $0,42 \pm 0,08$ ($p < 0,05$). На сроке 6 месяцев лодыжечно-плечевой индекс составил $0,52 \pm 0,07$; $p < 0,05$ (рис. 2).

При изучении морфологической картины первичных биоптатов в некоторых образцах было отмечено большее содержание соединительной ткани и больший разброс в диаметре и форме мышечных

Рисунок 4. Соотношение площади соединительной ткани и общей площади срезов биоптатов (в %) до терапии и через три месяца после терапии Неоваскулгеном. Наблюдается достоверное снижение площади соединительной ткани во 2-й группе ($p < 0,05$).



волокон, что позволило разделить пациентов на 2 группы.

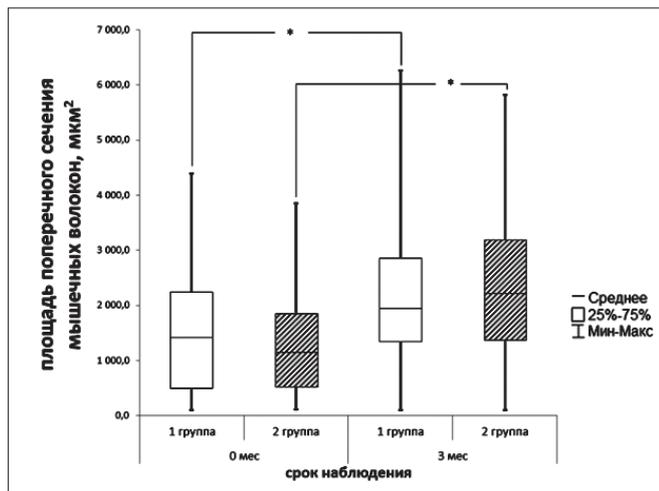
У 3 пациентов первой группы в первичных биоптатах наблюдается достаточно высокая плотность капилляров ($2,17 \pm 0,46$), относительно невысокий уровень фиброза ($11,85 \pm 6,83\%$) и пролиферации (не более 25% позитивных ядер, локализованных в основном в стенке сосудов). При исследовании повторных биоптатов в данной группе пациентов после применения Неоваскулгена плотность капилляров изменилась незначительно (с $2,17 \pm 0,46$ до $1,98 \pm 0,79$; $p = 0,68$) (рис. 3), площадь соединительной ткани также осталась неизменной ($11,85 \pm 6,83\%$ против $9,51 \pm 3,37$; $p = 0,75$) (рис. 4). Однако при этом отмечено увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с $1459,7 \pm 1034,5$ до $2259,5 \pm 1331,75$ $\mu\text{м}^2$; $p < 0,05$ (рис. 4, 5). Необходимо отметить, что у данных пациентов на фоне увеличения дистанции ходьбы прироста лодыжечно-плечевого индекса не зафиксировано.

Во второй группе (5 пациентов) в первичных биоптатах наблюдается сниженная по сравнению с первой группой капиллярная плотность ($1,40 \pm 0,36$), более высокая площадь соединительной ткани ($17,18 \pm 5,87\%$). 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. 3), снижение площади соединительной ткани с $17,18 \pm 5,87$ до $12,62 \pm 5,2\%$; $p < 0,05$ (рис. 4), увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с $1282,42 \pm 857,37$ до $2323,46 \pm 1237,58$ $\mu\text{м}^2$; $p < 0,05$ (рис. 5). Мышечные волокна в повторных биоптатах были более однородны по форме и размерам. У данных пациентов на сроке 3 месяца наблюдалось достоверное увеличение лодыжечно-плечевого индекса более чем на 0,1 (с $0,37 \pm 0,04$ до $0,49 \pm 0,07$; $p < 0,05$).

Обсуждение

В проведенном исследовании подтверждена клиническая эффективность препарата «Неоваскулген». Кроме того, нам удалось выявить некоторые морфологические аспекты, предопределяющие

Рисунок 5. Площадь поперечного сечения мышечных волокон (в мкм²) в биоптатах пациентов до терапии и на сроке 3 месяца после терапии Неоваскулгеном. Наблюдается достоверное увеличение площади поперечного сечения в 1-й и 2-й группах (p<0,05)



механизм клинического эффекта. Так, выявлено, что степень и характер изменений гистологической картины мышечной ткани после данной терапии зависят от исходного состояния мышечной ткани. В 1-й группе на фоне исходно высокого уровня плотности капилляров и незначительного уровня фиброза, терапия Неоваскулгеном не привела к росту плотности капиллярной сети. Однако, в данной группе наблюдается увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон, что может свидетельствовать о регенерации мышечной ткани путем пролиферации миосателлитов и гипертрофии мышечных волокон [10]. Установленное отсутствие роста плотности капиллярной сети и улучшения функциональных параметров кровоснабжения конечности может свидетельствовать об ином, не связанном с ангиогенезом механизме клинического эффекта. Ранее было показано, что VEGF стимулирует дифференцировку мышечных предшественников в культуре и способствует их гипертрофии [11], а также индуцирует компенсаторную гипертрофию сердечной мышцы после инфаркта миокарда [12], однако конкретные молекулярные механизмы данных эффектов остаются неизученными. Показано антиапоптотическое действие VEGF на мышечные клетки [13].

Во 2-й группе пациентов исходно наблюдается интенсивная дегенерация мышечной ткани и ее замещение соединительной тканью на фоне сниженной плотности капилляров. В этом случае терапия Неоваскулгеном привела к достоверному увеличению плотности капилляров, снижению площади соединительной ткани и увеличению средней площади поперечного сечения мышечных волокон. Можно предположить, что повышенная экспрессия VEGF способствует пролиферации эндотелия, а улучшение кровоснабжения, также подтверждаемое положительной динамикой ЛПИ, стимулирует регенерацию мышечных волокон путем пролиферации миосателлитов и гипертрофии зрелых мышечных волокон, исходно находившихся в состоянии атрофии. Ранее возможна восстановления мышцы после атрофии показана в экспериментальных работах по иммобилизации конечностей [14], но по-

добные данные при заболевании периферических артерий отсутствуют.

Заключение

Прямая генная терапия препаратом «Неоваскулген» эффективна для лечения пациентов с заболеванием периферических артерий IIБ-III степени (по классификации А.В. Покровского). Выявлено улучшение значений основных функциональных параметров периферического кровотока: достоверное увеличение лодыжечно-плечевого индекса на 65% и отсутствие ограничения дистанции безболезной ходьбы на сроке 6 месяцев. Гистологические изменения скелетной мышцы под воздействием прямой генной терапии свидетельствуют о наличии механизма клинического улучшения, не связанного с ангиогенезом. В этой связи мы считаем, что более широкое использование в клинической диагностике морфологического и иммуногистохимического анализа биоптатов мышечной ткани, сопоставление гистологической картины и клинических показателей пациентов с ЗПА позволят понять и объяснить противоречивые результаты клинических исследований эффективности генных и клеточных технологий для стимуляции неоангиогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Selvin E., Erlinger T.P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000 // *Circulation*. — 2004. — Vol. 10. — P. 738-43.
- Fowkes G.R., Rudan D., Rudan I., Aboyans V. et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis // *The Lancet*. — 2013. — Vol. 382. — P. 1329-1340.
- Aquino R., Johnnides Ch., Makaroun M. et al. Natural history of claudication: Long-term serial follow-up study of 1244 claudicants // *J Vasc Surg*. — 2001. — Vol. 34. — P. 962-70.
- Norgren L. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*. — 2007. — Vol. 45. — P. 5-67.
- Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В. и др. Мировой опыт генотерапии ишемических заболеваний // *Ангиология и сосудистая хирургия*. — 2011. — №17(2). — С. 145-54.
- Швальб П.Г., Калинин Р.Е., Грязнов С.В. и др. Безопасность и краткосрочная эффективность генотерапевтического препарата у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. — 2011. — №4. — С. 61-66.
- Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy // *Circ. Res*. — 2009. — Vol. 105. — P. 724-36.
- Швальб П.Г., Гавриленко А.В., Калинин Р.Е. с соавт. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIБ-III фаза клинических испытаний) // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. — 2011. — №VI(3). — С. 76-83.
- Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсисян Е.Г. с соавт. Терапевтический ангиогенез в лечении больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. Ближайшие и отдаленные результаты // *Ангиология и сосудистая хирургия*. — 2012. — №3. — С. 19-27.
- Ishido M., Kami K., Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles // *Acta Physiol Scand*. — 2004. — Vol. 180(3). — P. 281-9.
- Bryan B.A., Walshe T.E., Mitchell D.C. et al. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation // *Mol Biol Cell*. — 2008. — Vol. 19(3). — P. 994-1006.
- Zentilin L., Puligadda U., Lionetti V. et al. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction // *FASEB J*. — 2010. — Vol. 24(5). — P. 1467-78.
- Arsic N., Zacchigna S., Zentilin L. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo // *Mol Ther*. — 2004. — Vol. 10(5). — P. 844-54.
- Brooks N.E., Myburgh K.H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways // *Front Physiol*. — 2014. — Vol. 17(5). — P. 99.