

## ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИШЕМИИ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС

Ангелина Андреевна Титова<sup>1\*</sup>, Михаил Олегович Мавликеев<sup>1</sup>,  
Георгий Олегович Певнев<sup>1,2</sup>, Айрат Ильдарович Билялов<sup>1</sup>, Мария Сергеевна Абызова<sup>1,2</sup>,  
Аскар Айратович Латышев<sup>1,2</sup>, Дамир Ильгизович Сахапов<sup>1</sup>,  
Айгуль Касыймовна Шафигуллина<sup>1</sup>, Роман Вадимович Деев<sup>1,3,4</sup>, Анорей Павлович Киясов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

<sup>3</sup>Институт стволовых клеток человека, г. Москва, Россия;

<sup>4</sup>Рязанский государственный медицинский университет, г. Рязань, Россия

Поступила 18.11.2016; принята в печать 20.12.2016.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-73

**Цель.** Разработка модели ишемии задних конечностей у крыс для оценки эффективности генной и клеточной терапии.

**Методы.** На первом этапе производили лигирование наружной подвздошной артерии сразу после бифуркации общей подвздошной артерии. Затем бедренную артерию лигировали до её разветвления на нисходящую колленную, подколенную и подкожную артерии, после этого следовало рассечение артерии между лигатурами. Второй этап выполняли через 7 дней после первого: ветви подколенной артерии к икроножной мышце и сформировавшиеся коллатерали лигировали и иссекали. Кровоток в конечности оценивали при помощи лазерной доплеровской флоуметрии. Животных выводили из эксперимента на 14-е, 17-е, 21-е, 28-е, 35-е и 42-е сутки после первого этапа. Парафиновые срезы икроножной мышцы окрашивали по Маллори и с антителами к CD34.

**Результаты.** Патогистологический анализ показал продолжительную ишемию оперированной конечности без восстановления нативной структуры скелетных мышц и значительный интерстициальный фиброз (11,89±5,53% против 2,55±2,13% в интактной конечности к 42-му дню,  $p < 0,05$ ). При этом в оперированной конечности наблюдались полиморфные мышечные волокна значительно меньшего диаметра, а также снижение капиллярной плотности (0,82±0,03 против 1,91±0,06 в интактной конечности на 42-й день,  $p < 0,05$ ). По данным лазерной доплеровской флоуметрии выявлено снижение кровотока в оперированной конечности (0,67±0,22 от уровня кровотока интактной конечности на 42-й день).

**Вывод.** Разработанная нами двухэтапная модель ишемии задних конечностей у крыс приводит к гистологическим изменениям в скелетных мышцах, типичным для такой патологии у человека.

**Ключевые слова:** терапевтический ангиогенез, ишемия задних конечностей, хирургическая модель, фиброз.

## HISTOLOGIC EVALUATION OF PATHOLOGIC CHANGES IN GASTROCNEMIUS MUSCLE IN THE MODEL OF RODENT HINDLIMB ISCHEMIA

A.A. Titova<sup>1</sup>, M.O. Mavlikeev<sup>1</sup>, G.O. Pevnev<sup>1,2</sup>, A.I. Bilyalov<sup>1</sup>, M.S. Abyzova<sup>1,2</sup>, A.A. Latyshev<sup>1,2</sup>, D.I. Sakhapov<sup>1</sup>, A.K. Shafigullina<sup>1</sup>, R.V. Deev<sup>1,3,4</sup>, A.P. Kiyasov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>3</sup>Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia;

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

**Aim.** Development of a model of hindlimb ischemia in rats to assess the effectiveness of gene and cell therapy.

**Methods.** In the first stage of this approach the external iliac artery was ligated immediately after bifurcation of the common iliac artery. Then the femoral artery was ligated before its branching into the descending genicular, popliteal and saphenous arteries with following dissection of arteries between ligatures. The second stage of this approach was performed seven days after the completion of the first stage: branches of popliteal artery to gastrocnemius muscle and formed collaterals were ligated and dissected. Hindlimb blood flow was assessed by laser Doppler flowmetry. Animals were euthanized 14, 17, 21, 28, 35, 42 days after the first stage. The paraffin sections of gastrocnemius muscles were stained with Mallory trichrome and with antibodies to CD34.

**Results.** Histopathological analysis showed a continuous hindlimb ischemia of operated limb without any native skeletal muscle structure restoration and with significant interstitial fibrosis (11.89±5.53% vs 2.55±2.13% in intact limb by day 42,  $p < 0.05$ ). Polymorphic muscle fibers in operated limb with significantly smaller diameter and reduced capillary density (0.82±0.03 vs 1.91±0.06 in intact limb by day 42,  $p < 0.05$ ) were revealed. Laser Doppler flowmetry revealed reduction of blood flow in the operated limb (0.67±0.22 of intact limb blood flow by day 42).

**Conclusion.** Our developed two-stage model of hindlimb ischemia in rats leads to histologic changes characteristic for the same pathology in human.

**Keywords:** therapeutic angiogenesis, hindlimb ischemia, surgical model, fibrosis.

Высокая распространённость заболеваний периферических артерий вызывает повышенный интерес к терапевтическому

ангиогенезу. Клеточная и генная терапия, основанная на стимуляции формирования новых артерий и капилляров в поражённых скелетных мышцах, показывает высокий уровень эффективности в доклинических

моделях [1], но противоречивые результаты в клинических исследованиях [3].

Существующие доклинические исследования используют модели ишемии задних конечностей животных, которые не отображают истинные патоморфологические изменения при заболеваниях периферических артерий (продолжающуюся дегенерацию и регенерацию мышечных волокон с их фиброзированием [2]), а демонстрируют острую ишемию с признаками некроза мышечных волокон и постнекротического воспаления в большинстве случаев [4]. В нашем исследовании мы представляем новую двухступенчатую модель, пригодную для изучения генных и клеточных подходов к восстановлению кровотока в ишемизированной мышечной ткани задних конечностей.

Исследование проведено в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (1986), протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Казанского федерального университета. Наша хирургическая модель была выполнена на крысах мужского пола линии Вистар (масса тела 200–250 г) под внутривенным наркозом (0,5 мг хлоралгидрата на 1 кг массы тела в 0,9% растворе натрия хлорида) на обоих этапах.

На первом этапе после бритья и дезинфекции производили кожный разрез длиной 1 см в области паховой связки. Тупым способом отодвигали мышцы, идентифицировали основные сосуды и нервные стволы. Затем производили лигирование наружной подвздошной артерии непосредственно после её отхождения от общей подвздошной артерии шелковой нитью. Бедренную артерию лигировали шелком 6/0 перед её разветвлением на нисходящую артерию колена, подколенную и кожную артерии с перерезкой артерий между двумя лигатурами. Манипуляции на венах выполняли аналогичным образом. Хирургическую рану ушивали шовным материалом из полигликолевой кислоты 4/0, кожу вокруг швов ежедневно обрабатывали спреем, содержащим 32,1 мг/мл окситетрациклина гидрохлорида (Baumicin Aerosol, Norbrook Laboratories Limited, Северная Ирландия).

Второй этап моделирования выполняли через 7 дней после первого. Он включал удаление швов и проведение вертикального разреза в подколенной области длиной 1 см. Ветви подколенной артерии к головкам икроножной мышцы, а также обнаруженные коллатерали лигировали и

иссекали. Хирургическую рану ушивали, послеоперационный уход осуществляли как и после первого этапа.

Животных выводили из эксперимента на 14-е, 17-е, 21-е, 28-е, 35-е и 42-е сутки после первого этапа (по 5 животных на контрольную точку).

Парафиновые срезы икроножной мышцы ишемизированной и контрлатеральной конечностей окрашивали по Маллори и иммунофлуоресцентно с антителами к CD34 (клон C-18, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), в качестве вторичных были использованы антитела, меченые Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), ядра докрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (4',6-diamidino-2-phenylindole — DAPI). Производили морфометрический анализ изображений окрашенных срезов, результаты представляли в виде «среднее ± стандартное отклонение»

Кровоток в оперированной и интактной конечностях анализировали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (Easy LDI, Aimago, Великобритания) до и после операций, а также перед выведением животных из эксперимента. Результаты выражали в виде отношения «кровоток в оперированной конечности/кровоток в интактной конечности». Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с  $p < 0,05$  в качестве уровня достоверности.

Патогистологический анализ икроножной мышцы оперированной конечности показали ишемически повреждённые мышечные волокна с эозинофильной и дезинтегрированной цитоплазмой на 14-е и 17-е сутки эксперимента. Также была продемонстрирована потеря поперечной исчерченности и лимфогистоцитарная инфильтрация, что сопровождалось присутствием многочисленных мышечных трубочек с базофильной цитоплазмой и гиперхромными центральными ядрами. Было выявлено значительное увеличение содержания соединительной ткани ( $9,73 \pm 6,32\%$  против  $2,55 \pm 2,13\%$  в интактной конечности на 17-е сутки,  $p < 0,05$ ).

К 21-м суткам нашего эксперимента почти вся икроножная мышца прооперированной конечности была представлена мышечными трубочками малого диаметра, площадь фиброза составляла  $12,39 \pm 5,33\%$  ( $p < 0,05$ ).

К 28-м суткам наблюдались многочисленные мышечные трубочки и полиморфные мышечные волокна. Область фиброза увеличилась до  $14,77 \pm 8,33\%$  ( $p < 0,05$ ).

К 35-м и 42-м суткам икроножная мыш-

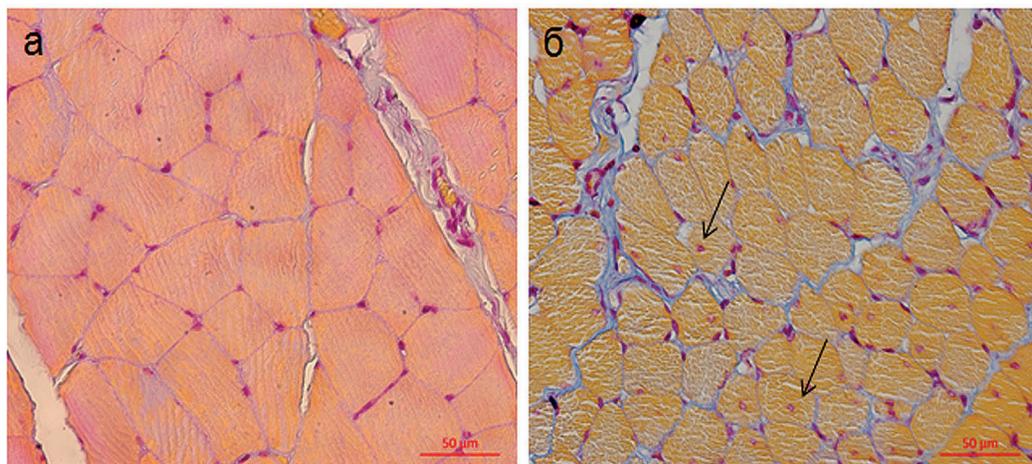


Рис. 1. Срезы икроножной мышцы, окрашенные по Маллори, на 42-й день эксперимента (а — интактная конечность, б — ишемизированная конечность), коллаген голубого цвета, мышечные волокна жёлтые, ядра красные. В ишемизированной мышце (б) отмечаются мышечные волокна малого диаметра с центральными ядрами (отмечены стрелками); площадь фиброза на 42-й день составляет  $11,89 \pm 5,53\%$  ( $p < 0,05$ )

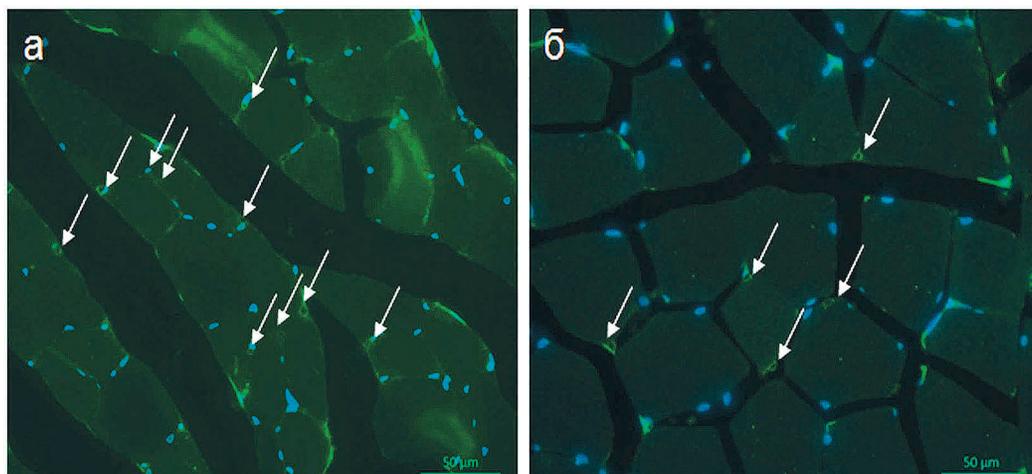


Рис. 2. Репрезентативные срезы икроножной мышцы, окрашенные антителами против CD34 (а — интактная конечность, б — ишемизированная конечность), 42-й день эксперимента, капилляры зелёные (отмечены стрелками), капиллярная плотность в ишемизированной мышце достоверно ниже ( $0,82 \pm 0,03$  капилляра/мышечное волокно в ишемизированной конечности против  $1,91 \pm 0,06$  в интактной,  $p < 0,05$ )

ца состояла из полиморфных мышечных волокон со значительно меньшим диаметром по сравнению с интактной мышцей, наблюдались единичные мышечные трубочки (рис. 1). Площадь фиброза на 42-й день составляла  $11,89 \pm 5,53\%$  ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты отражают продолжительную ишемию оперированной конечности без восстановления нативной структуры скелетных мышц и нарастание интерстициального фиброза.

Плотность капилляров на 14-е сутки в мышечной ткани прооперированной конечности уменьшилась ( $0,75 \pm 0,11$  капилляра/мышечное волокно в ишемизированной конечности против  $2,03 \pm 0,21$  в интактной

конечности,  $p < 0,05$ ) и осталась сниженной до конца эксперимента ( $0,82 \pm 0,03$  капилляра/мышечное волокно в ишемизированной конечности против  $1,91 \pm 0,06$  в интактной конечности, 42-е сутки,  $p < 0,05$ ; рис. 2).

Кровоток в прооперированной конечности уменьшился сразу после первой операции до  $0,72 \pm 0,15$ . За ним следовало уменьшение до  $0,62 \pm 0,19$  после второй операции, и затем кровоток держался в пределах  $0,67 \pm 0,22$  до конца эксперимента (42-е сутки; рис. 3).

Таким образом, нами разработана новая модель для изучения хронической ишемии нижних конечностей по гистологическим признакам, эквивалентным реальной нозологии, позволяющая использовать её для

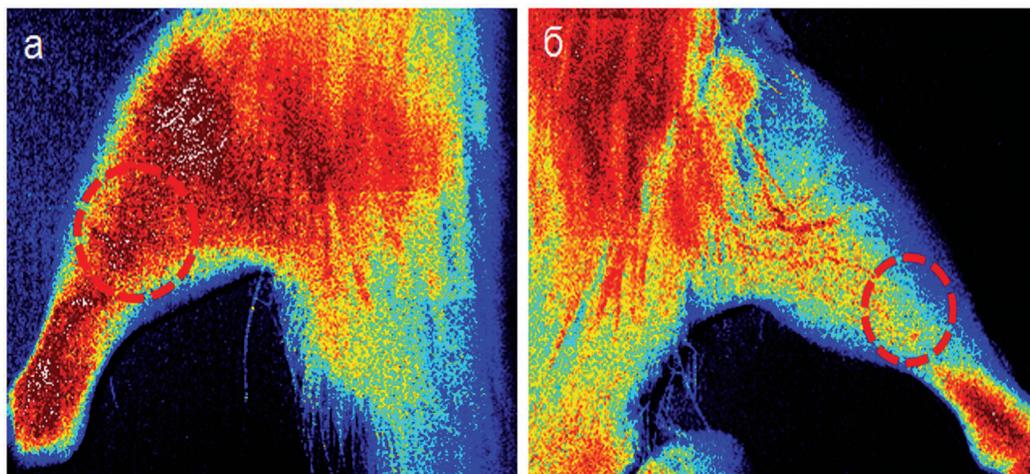


Рис. 3. Репрезентативные изображения, полученные при лазерной доплеровской флоуметрии, отображающие уровень перфузии в ишемизированной (а) и интактной (б) конечностях на 42-й день эксперимента, среднее соотношение «кровоток в оперированной конечности/кровоток в интактной конечности» составляет  $0,67 \pm 0,22$

разработки и тестирования генных и клеточных ангиогенных препаратов.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Благодарности: работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (14-15-00916) и при поддержке программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидий, выделенных Казанским федеральным университетом по государственному заданию в сфере научной деятельности.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bobek V., Taltynov O., Pinterova D., Kolostova K. Gene therapy of the ischemic lower limb — Therapeutic angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 2006; 44 (6): 395–405.
2. Cluff K., Miserlis D., Naganathan G.K. et al. Morphometric analysis of gastrocnemius muscle biopsies from patients with peripheral arterial disease: objective grading of muscle degeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013; 305 (3): 291–299.
3. Kalka C., Baumgartner I. Gene and stem cell therapy in peripheral arterial occlusive disease. *Vasc. Med.* 2008; 13 (2): 157–172.
4. Shin C.I., Kim H.C., Song Y.S. et al. Rat model of hindlimb ischemia induced via embolization with polyvinyl alcohol and N-butyl cyanoacrylate. *Korean J. Radiol.* 2013; 14 (6): 923–930.