

УДК 616.831-005.4:612.084.6:546.172.6

С.Г. Калинин¹, С.П. Шава², Н.Ю. Матвеева³

¹ Владивостокский государственный университет экономики и сервиса (690990 г. Владивосток, ул. Гоголя, 41), ² Краевая клиническая больница № 1 (690950 г. Владивосток, ул. Алеутская, 57), ³ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, ул. Острякова, 2).

АНГИОГЕННОЕ И ЦИТОПРОТЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ОСНОВНОГО ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ В ФОКУСЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Ключевые слова: головной мозг, постишемический ангиогенез, факторы роста сосудов, оксид азота.

В эксперименте на крысах-самцах путем перевязки правой общей сонной артерии моделировали ишемию головного мозга, а затем внутриартериально вводили bFGF – basic Fibroblast Growth Factor (в контроле – физраствор). Показано, что bFGF усиливает активность NADPH-диафоразы и пролиферацию эндотелия сосудов и перицитов в теменной коре головного мозга. Эти процессы коррелировали с увеличением плотности микрососудов и достигали максимума на 12-й день после ишемии. Обсуждается взаимодействие bFGF-зависимого и нитроксидергического механизмов пост-ишемической реорганизации сосудов мозга. По мнению авторов, стимуляция ангиогенеза и сохранение жизнеспособности нейронов на фоне введения bFGF указывают на снижение токсического влияния оксида азота в фокусе ишемии.

Реорганизация сосудистого русла в зоне ишемического инсульта реализуется в результате взаимодействия различных регуляторных факторов, среди которых эндотелиозависимый и нейровазальный признаны преобладающими [1, 2, 7]. Развитие этой концепции получило всестороннюю поддержку после открытия вазоактивных молекул – оксида азота и факторов роста сосудов, адаптирующих подвижность сосудистой стенки к уровню локальной гемодинамики и метаболической потребности нейронов [2, 4, 6]. Основные эффекты факторов роста сосудов в период пост-ишемической реабилитации связаны с их участием в компенсаторном ангиогенезе и становлении коллатеральной сосудистой сети [2, 6, 7].

Ключевую позицию в процессах ангиогенеза занимает основной фактор роста фибробластов (basic Fibroblast Growth Factor – bFGF). В ткани мозга он экспрессируется в цитоплазме нейронов и эндотелиоцитов [4]. Экзогенное поступление фактора стимулирует локальную перфузию, защищает клетки от токсического влияния окислительного стресса и ограничивает зону распространения ишемического некроза [4, 5, 12]. Как неотъемлемая часть сложной системы пост-ишемической реорганизации сосудов bFGF взаимодействует с нитроксидергическим механизмом, регулируя баланс цитотоксического и нейротективного эффектов оксида азота [6, 10, 14]. Вместе с тем влияние фактора на состояние нитроксидсинтазы сосудов при ишемическом повреждении остается невыясненным, что затрудняет интерпретацию данных о действии bFGF на пролиферацию компонентов сосудистой стенки.

Цель настоящей работы состояла в анализе динамики bFGF-стимулированного ангиогенеза и активности NADPH-диафоразы в очагах неполной хронической ишемии теменной коры большого мозга крыс.

Материалы и методы. Работа выполнена на 12 самцах массой 200–250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все эксперименты проведены в соответствии с правилами этического комитета ВГМУ по бережному обращению с лабораторными животными. В зависимости от сроков и условий проведения эксперимента животных разделили на две группы: опытную (6 крыс) и контрольную (6 крыс). Животных анестезировали ингаляцией паров эфира. Ишемия головного мозга моделировалась путем перевязки правой общей сонной артерии под фторотановым наркозом. У крыс опытной группы через 30 мин после перевязки в сонную артерию вводили 1 мкг bFGF (human recombinant, Sigma Aldrich), разведенного в 0,2 мл физиологического раствора. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Забор материала осуществлялся через 48 часов, 12 и 24 суток от начала ишемии в одно и то же время. Крыс анестезировали внутривенной инъекцией пентобарбитала натрия (60 мг/кг), затем перфузировали через аорту холодным раствором 4% параформальдегида на 0,1М натрийфосфатном буфере (pH 7,4). Мозг извлекали на стекло, теменную область коры разрезали на ломтики толщиной 0,2 см и постфиксировали в течение 2 ч в том же самом растворе. Для гистохимической идентификации активности NADPH-диафоразы (NADPH-d) образцы промывали в 15% растворе сахарозы в течение суток. Криостатные срезы толщиной 25 мкм термостатировали в течение 1 ч при 37°C и pH 8,0 в среде следующего состава: 50 мМ Трис-буфер, 0,2% Тритон X-100, 0,8 мг/мл β-NADPH (Sigma Aldrich), 0,4 мг/мл нитросинего тетразолия (Sigma Aldrich) [11]. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля.

Для электронно-микроскопического исследования развивающихся капилляров участки коры размером 0,2×0,2 см фиксировали в смеси 4% параформальдегида и 2% глутаральдегида, приготовленных на 0,1М какодилатном буфере (pH 7,3). Затем образцы обрабатывали в 1% растворе четырехоксида осмия, обезвоживали в спирте, ацетоне и заливали в «Эпон-812» по обычным правилам. Ультратонкие срезы контрастировали в 2% растворе уранилацетата.

Таблица 1

Активность NADPH-d и морфометрические показатели сосудов теменной коры крысы при перевязке общей сонной артерии, $M \pm m$

Условия эксперимента	Активность NADPH-d, ЕОП		Диаметр капилляров, мкм	Суммарная длина капилляров, мм	Площадь обменной поверхности, мм ²
	сосуды	астроциты			
Интактная кора	18,40±0,20	не опред.	5,01±0,12	194,20±0,70	30,55±0,30
48 часов после ишемии	82,70±3,01	96,10±2,20	3,89±0,04	61,57±0,40	7,52±0,10
12 суток после ишемии	35,10±0,40	92,00±1,40	4,92±0,30	118,50±0,30	18,30±0,70
24 суток после ишемии	27,30±1,10	74,90±0,50	5,00±0,04	152,10±0,70	23,87±0,45

Препараты просматривали под электронным микроскопом JEM-100B при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Количественную оценку NADPH-d-реактивных микрососудов в очагах ишемии проводили с помощью окуляр-морфометрической сетки на участках коры площадью 200 мкм². Суммарную длину капилляров в 1 мм³ коры определяли по формуле:

$$L_o = N_o N_r / N_b [2 + 4(N_b - N_r) / 3N_r],$$

где L_o – суммарная длина капилляров, N_o – количество открытых концов капилляров на 1 мм², N_r – число пересечений горизонтальных и N_b – число пересечений вертикальных линий сетки окуляр-микрометра [2].

Площадь обменной поверхности капилляров вычисляли по формуле:

$$S = \pi dL,$$

где d – средний диаметр капилляров, L – длина капилляров в 1 мм³ коры [2]. Активность NADPH-d в эндотелии микрососудов измеряли с помощью микроденситометра M85A Vickers и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с определением t -критерия достоверности по Стьюденту.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. На срезах теменной коры участки ишемического повреждения определялись как очаги нейронального опустошения и скопления NADPH-d-позитивных астроцитов, охватывавших слои II–VI и подкорковое белое вещество ипсилатерального полушария. Сосудистая сеть в фокусе ишемии имела признаки вазоспазма, характеризовалась разрыхлением базальных мембран и отеком периваскулярного нейропиля. В сосудах выявлялись неизменно высокая активность NADPH-d, которая постепенно снижалась в отдаленный постишемический период. Наряду с этим отмечалось снижение суммарной длины микрососудов на 33% и площади их обменной поверхности на 39% по сравнению с показателями у интактных животных (табл. 1).

При внутриартериальном введении bFGF на всех стадиях постишемии в капиллярах и астроцитах отмечалось выраженное усиление активности NADPH-d. При этом площадь обменной поверхности и протяженность NADPH-d-позитивного микроциркуляторного русла в присутствии экзогенного bFGF увеличивалась на 50,6% от

контрольных значений (табл. 2). На стенках капилляров выявлялось массовое образование почек роста – грибовидных структур с высокой активностью энзима (рис., а). Почки роста, как известно, содержат мигрирующие в перпендикулярном направлении эндотелиоциты и являются начальной формой новообразующегося капилляра [2]. При электронно-микроскопическом исследовании в почках роста обнаруживались слабодифференцированные эндотелиоциты, не имевшие четко выраженной базальной мембраны и связи с перицитами (рис. б). Поверхность эндотелиоцитов имела сложный рельеф из-за многочисленных выростов цитоплазмы, отходящих в периваскулярную ткань. Контакты между соседними клетками были незамкнуты. Выявлялись гипертрофия аппарата Гольджи, увеличение числа митохондрий, расширение цистерн эндоплазматической сети. Эти структурные изменения свидетельствовали об усилении ангиогенных процессов в ишемизированной ткани.

Введение bFGF, очевидно, оказывало протективное действие на нейроны и стенки сосудов. Так, в присутствии этого фактора обнаружено существенное снижение количества некротических клеток на 12-е сутки постишемии. При окраске срезов по Нисслю наряду с гиперхромными несморщенными нейронами, располагавшимися преимущественно в III–IV слоях, начинали превалировать клетки с нормохромной реакцией. Нейропротективная роль bFGF в зоне ишемической «полутени» поддерживается через механизмы стимуляции аксонального спрутинга и синаптической пластичности, а гиперэкспрессия bFGF стабилизирует целостность структур гематоэнцефалического барьера [4].

Проведенные исследования показывают, что в средне- и долгосрочной перспективе в зоне bFGF-стимулированного ангиогенеза отмечается увеличение активно функционирующих микрососудов. Ангиогенное действие фактора стимулирует пролиферацию

Таблица 2

Активность NADPH-d и состояние микроциркуляторного русла теменной коры крысы при экспериментальной ишемии на фоне введения bFGF, $M \pm m$

Постигемический период	Активность NADPH-d, ЕОП	Диаметр капилляров, мкм	Суммарная длина капилляров, мм	Площадь обменной поверхности, мм ²
48 часов	69,2±0,9	4,40±0,05	110,3±1,1	15,20±0,10
12 суток	34,8±0,7	6,42±0,05	155,2±0,9	31,28±0,22
24 суток	20,9±0,8	5,38±0,06	161,4±0,2	27,26±0,15

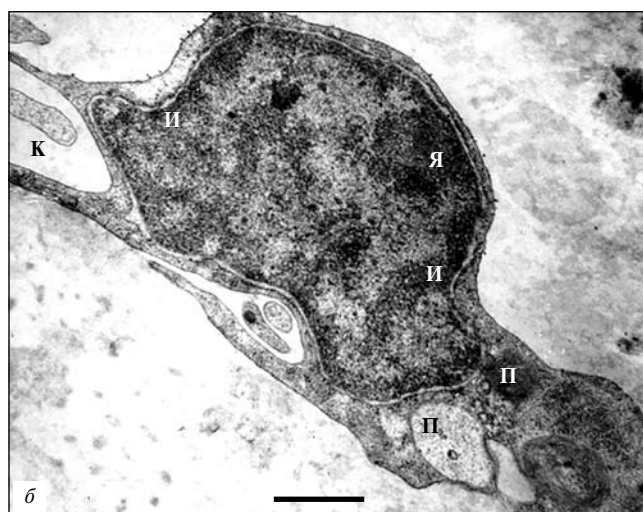
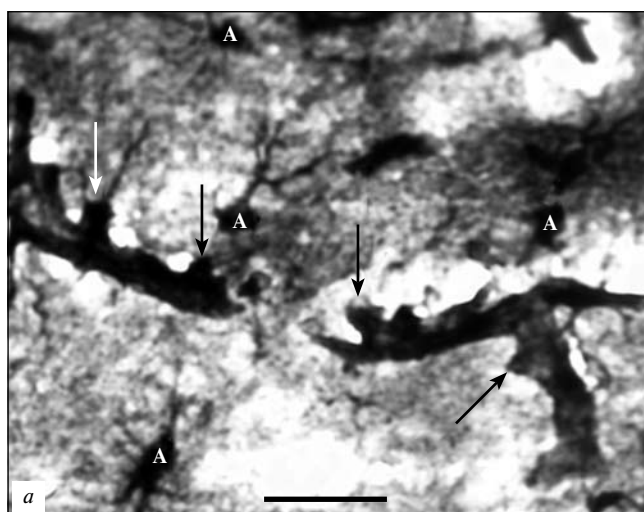


Рис. Ангиогенез в очаге ишемической деструкции теменной коры крысы при внутриаартериальном введении bFGF.

а – NADPH-d в формирующихся сосудах на 12-й день после артериальной окклюзии: на стенке микрососудов многочисленные почки роста (стрелки), А – NADPH-d-позитивные астроциты; б – пролиферирующий эндотелиоцит капиллярной почки роста. Ядро (Я) неправильной формы с инвагинациями кариеолеммы (И), в цитоплазме многочисленные пузырьки (П). Поверхность клетки дает микроворсы в периваскулярную ткань (стрелки). Отмечается незажкнутость формирующихся межэндотелиальных контактов (К). Масштаб: а – 20 мкм; б – 0,5 мкм.

и направляет миграцию активированных эндотелиальных клеток и перицитов. Пролонгированное участие в этих процессах bFGF подтверждается данными по содержанию эндогенного сывороточного bFGF у пациентов, перенесших инсульт [9]. При этом синтез bFGF увеличивается на 3- и сутки от начала ишемии и остается значительно повышенным в течение 14 дней [9].

Согласно нашим наблюдениям, экзогенное поступление bFGF индуцирует активность NADPH-d в астроцитах и эндотелии микрососудов. Эта реакция поддерживается на протяжении всего постишемического периода, что указывает на существенное увеличение синтеза оксида азота. Известно, что в острый период церебральной ишемии оксид азота функционирует как нейропротектор, но уже спустя несколько часов этот эффект меняется на противоположный [3]. Аппликация небольших доз нитроаргинаина во время экспериментальной окклюзии средней мозговой артерии ограничивает зону ишемического инсульта у крыс, а высокие дозы ингибиторов нитроксидсинтазы, напротив, увеличивают очаг ишемии [8, 15]. Токсический и защитный эффекты, вызываемые монооксидом азота, взаимодополнительны и противостоят друг другу как элементы одного действия. Они представляют две стороны процесса, обусловленного активностью различных изоформ нитроксидсинтазы, уровнем продукции оксида азота и его окислительно-восстановительным статусом [13].

Исследование выполнено на средства гранта Фонда поддержки российской науки и гранта Президента РФ по финансовой поддержке молодых российских ученых (МД–83.2008.4).

Литература

1. Калиниченко С.Г., Мотавкин П.А. Кора мозжечка. М.: Наука, 2005. 320 с.
2. Куприянов В.В., Миронов В.А. Ангиогенез. Образование, рост и развитие кровеносных сосудов. М.: Медицина, 1993. 218 с.

3. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // Бюлл. экспер. биол. и мед. 1997. Т. 123, № 5. С. 484–490.
4. Bendfeldt K., Radojevic V., Kapfhammer J., Nitsch C. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: A new in vitro model of the blood–brain barrier // J. Neurosci. 2007. Vol. 27, No. 12. P. 3260–3267.
5. Bräsen J., Kiveliä A., Röser K. et al. Angiogenesis, VEGF and PDGF-BB expression, iron deposition, and oxidation-specific epitopes in stented human coronary arteries // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001. Vol. 21, No. 11. P. 1720–1726.
6. Cao R., Brakenhielm E., Wahlestedt C. et al. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98, No. 11. P. 6390–6395.
7. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // Nature Medicine // Nat. Medicine. 2000. Vol. 6, No. 3. P. 318–324.
8. Dawson D.A., Kusumoto K., Graham D.I. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia // Neurosci. Lett. 1992. Vol. 142, No. 2. P. 151–154.
9. Guoa H., Huang L., Cheng M. et al. Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction // Neurosci. Lett. 2006. Vol. 393, No. 1. P. 56–59.
10. Hampton T., Amende I., Fong J. et al. Basic FGF reduces stunning via a NOS2-dependent pathway in coronary-perfused mouse hearts // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2000. Vol. 279, No. 1. P. H260–H268.
11. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88, No. 7. P. 2811–2814.
12. Kawamata T., Dietrich W. D., Schallert T. et al. Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94, No. 15. P. 8179–8184.
13. Lipton S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection // Nat. Rev. Neurosci. 2007. Vol. 8, No. 10. P. 803–808.
14. Watanabe T., Okuda Y., Nonogushi N. et al. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume