

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, постиншемический 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 нитроксидазного механизмов постиншемической 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 постиншемической 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 постиншемической реорганизации сосудов bFGF взаимодействует с нитроксидазным механизмом, регулируя баланс цитотоксического и нейротропного эффектов оксида азота [6, 10, 14]. Вместе с тем влияние фактора на состояние нитроксидазы 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 толудиновым 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 каодилатном буфере (pH 7,3). Затем образцы обрабатывали в 1% растворе четырехоксида осмия, обезжировали 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 темной коры крысы при перевязке общей сонной артерии, $M \pm t$

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:

$$S = \pi d L,$$

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 темной 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 разрывлением 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 перичитами (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 спраутинга 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 темной коры крысы при экспериментальной ишемии на фоне введения bFGF, $M \pm t$

Постигишемический 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

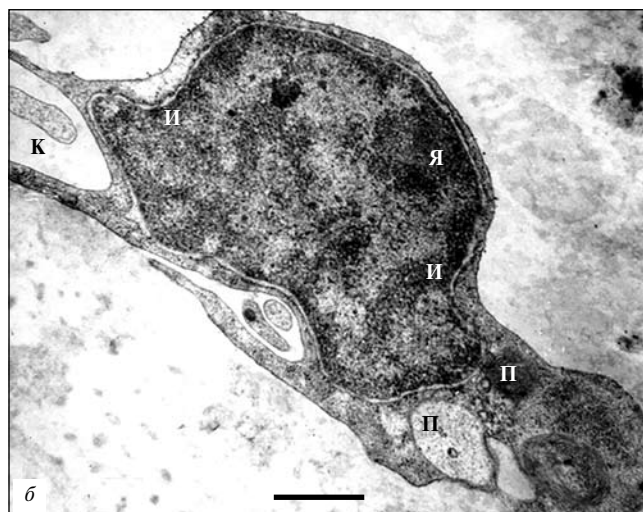
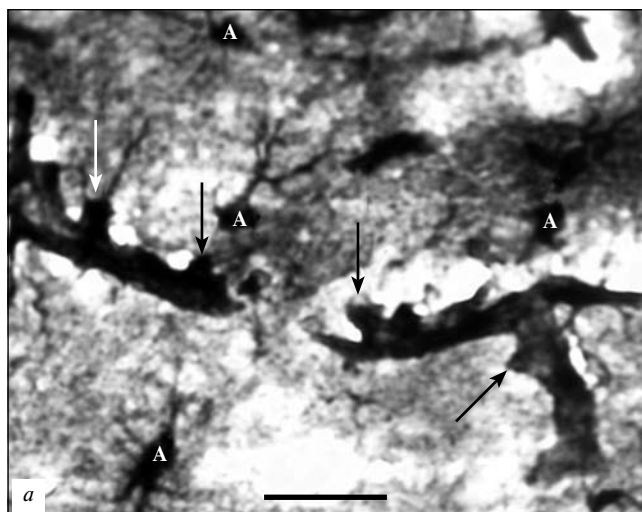


Рис. Ангиогенез в очаге ишемической деструкции теменной коры крысы при внутриаартериальном введении bFGF.

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 карิโอлеммы (И), в цитоплазме многочисленные пузырьки (П). Поверхность клетки дает микровыросты в периваскулярную ткань (стрелки). Отмечается незаключенность 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. exper. 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., Kiveli 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., Nonoguchi N. et al. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume

- after transient focal cerebral ischemia in rats // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004. Vol. 24, No. 11. P. 1205–1213.
15. Yamamoto S., Golanov E.V., Berger S.B. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992. Vol. 12, No. 5. P. 717–726.

Поступила в редакцию 05.02.2009.

ANGIOGENIC AND CYTOPROTECTING EFFECTS OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN FOCUS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

S.G. Kalinichenko¹, S.P. Schava², N.Yu. Matveeva³

¹ Vladivostok State University of Economics and Service (41 Gogolya St. Vladivostok 690990 Russia), ² Primorsky Regional Clinical Hospital No.1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690950 Russia), ³ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary — Male-rat experiments using right general carotid ligation included simulation of cerebral ischemia and intra-arterial introduction of basic Fibroblast Growth Factor (control — physiological solution) and showed that bFGF has enhanced NADPH-diaphorase activity and endothelial proliferation in vessels and pericytes of parietal cerebral cortex. These processes corresponded to thickening of microvessels and reached their maximum after 12 days from ischemia. The paper discusses interaction between bFGF-dependent and nitroxidergic mechanisms of post-ischemic cerebrovascular re-organization. The authors believe stimulation of angiogenesis and maintenance of neuron viability against the bFGF introduction were indicative of decreasing toxic effects of nitric oxide in the focus of ischemia.

Key words: brain, post-ischemic angiogenesis, vessel growth factors, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 2, p. 66–69.

УДК 611.8:612.824:577.152:546.172.6

А.Е. Коцюба, В.М. Черток

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

НИТРОКСИДСОДЕРЖАЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИННЕРВАЦИИ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Ключевые слова: сосуды головного мозга, афферентная иннервация, нитроксидазгические рецепторы, нитроксидазгические нейроны.

С помощью гистохимической реакции на NADPH-диафору в эксперименте на белых крысах изучены структурные элементы афферентной иннервации артерий мягкой мозговой оболочки, а также нейроны нижнего яремного узла и ядра одиночного пути. В сосудах установлено наличие трех типов рецепторов и афферентных волокон — с высокой, умеренной и низкой активностью нитроксидазгической, а в нижнем яремном узле и ядре одиночного пути выделены нейроны (17,4 и 24,5% соответственно) с положительной реакцией на NADPH-диафору.

В нервной регуляции церебральной гемодинамики важное место отводится афферентной иннервации артерий головного мозга [2, 8]. Долгое время считалось, что рецепцию и проведение возбуждения к нервным центрам обеспечивает ацетилхолин, а холинергический механизм является едва ли не единственным участником этих процессов [3]. Затем список веществ, включенных в механизмы восприятия и проведения нервного импульса, значительно расширился. В него попали некоторые кинины, аминокислоты, другие биологически активные вещества (брадикинин, адениновые нуклеотиды, аспартат, глутамат), а не так давно — оксид азота [4, 13, 14].

Известно, что в большинстве случаев оксид азота выступает в качестве нейротрансмиттера, опосредуя активность нитроксидазгических нейронов. Центральные отростки этих нейронов участвуют в образовании эфферентных сплетений, иннервирующих сосудистую и внесосудистую гладкую мускулатуру сердца, пищеварительной системы, дыхательных путей [4,

5]. В отношении афферентной функции оксида азота сведения ограничиваются сообщениями о наличии этого вещества в инкапсулированных рецепторах сердца [5], нейронах некоторых чувствительных нервных узлов и ядер головного мозга [1, 7].

Целью работы явился анализ распределения нитроксидазгической (NOS) в рецепторах и чувствительных нервных волокнах артерий головного мозга, а также в нейронах нижнего яремного узла и одиночного ядра.

Материал и методы. Работа выполнена на 26 белых беспородных крысах массой 180–200 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Животные выводились из опыта путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Для выявления нитроксидадениндинуклеотидфосфат-диафазы (NADPH-диафазы) образцы тканей обрабатывали по методу V. Hope и S. Vinsent [10].

С целью детекции афферентной иннервации сосудов использовали фрагменты отпрепарированной и расплавленной на стекле мягкой оболочки теменной доли мозга, а для изучения чувствительных нейронов — нижний яремный узел и кусочки ткани, взятые из продолговатого мозга в проекции одиночного ядра. Из последних изготавливали криостатные срезы толщиной 30 мкм. Образцы инкубировали 1 час при 37°C в среде, содержащей 0,5 мМ β-НАДФН, 0,5 мМ нитросинего тетразолия и 0,3% тритона Ч-100 в 0,15 М трис-HCL-буфере (рН 8,0). После инкубации срезы промывали в дистиллированной воде, обезживали в спиртах и заключали в канадский балзам.