

УДК 616.831-005.4-06+616.13-005.4

АНАЦКАЯ Л.Н., ГОНЧАРОВА Н.В.

Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, г. Минск, Беларусь
Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск, Беларусь

ЭНДОГЕННЫЙ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗ В ПОСТИНСУЛЬТНОЙ РЕПАРАЦИИ МОЗГА

Резюме. Залогом адекватной постинсультной церебральной реперфузии в первую очередь является формирование новых сосудов (ангиогенез и васкулогенез), нейрососудистых единиц и нейрососудистых связей. Мобилизованные из костного мозга в периферическую кровь с помощью проангиогенных факторов роста эндотелиальные клетки-предшественники играют основную роль в постинсультной сосудистой репарации мозга и remodelировании сосудистого русла. В связи с этим эндотелиальные клетки-предшественники представляют собой, с одной стороны, клеточные маркеры риска цереброваскулярных заболеваний и выраженности постинсультной регенерации мозга, а с другой — являются терапевтической мишенью и источником будущего перспективного метода клеточной терапии инфаркта мозга и церебральной микроангиопатии.

Ключевые слова: инфаркт мозга, нейрососудистая единица, ангиогенез, эндотелиальные клетки-предшественники, факторы роста.

Введение

Современная стратегия лечения инфаркта мозга (ИМ) направлена в первую очередь на уменьшение очага ишемии и снижение риска гибели нейронов в первые 6–12 часов заболевания (в период терапевтического окна). За исключением тромболизиса, который проводится в целом только 3 % пациентов в первые часы заболевания, на сегодняшний день отсутствуют какие-либо другие лекарственные средства и методы лечения ИМ с доказанной клинической эффективностью. Однако церебральный ангиогенез, remodelирование сосудистого русла, нейро- и олигодендрогенез, от которых зависит степень функционального восстановления пациента, продолжают в течение четырех недель после ИМ, что может явиться предпосылкой для второго терапевтического окна в лечении ишемического инсульта. Поэтому одними из перспективных целей нейропротекции при инфаркте мозга являются реперфузия зоны острой ишемии мозга за счет стимуляции ангиогенеза и эндотелиорепарации микроциркуляторного русла и восстановление целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

Нейрососудистая единица и нейрососудистые сети

Основной терапевтической мишенью нейрорепарации и нейропротекции, согласно современной

патофизиологической модели инсульта, считается нейрососудистая единица (НСЕ). Нейрососудистая единица — морфофункциональный микроанатомический многоклеточный комплекс, состоящий из эндотелиоцитов, глиальных клеток, перицитов, нейронов, а также факторов роста и белков внеклеточного матрикса, которые находятся в физической близости к эндотелию [41]. Согласно этой модели, патология в нейрососудистой единице может возникать непосредственно до или во время развития инфаркта мозга, прогрессировать в период острой ишемии головного мозга и реперфузии [39].

Впервые концепция НСЕ была предложена в 1996 году в виде триады клеток — гладкомышечной, астроцита и нейрона, т.к. эти клетки находятся в постоянном взаимодействии друг с другом и каждая из них оказывает определенное воздействие на НСЕ [14]. Однако в 2002 г. эта модель была пересмотрена,

Адрес для переписки с авторами:

Анацкая Людмила Николаевна
Республика Беларусь, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 24
Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
ninh@mail.ru

© Анацкая Л.Н., Гончарова Н.В., 2013

© «Международный неврологический журнал», 2013

© Заславский А.Ю., 2013

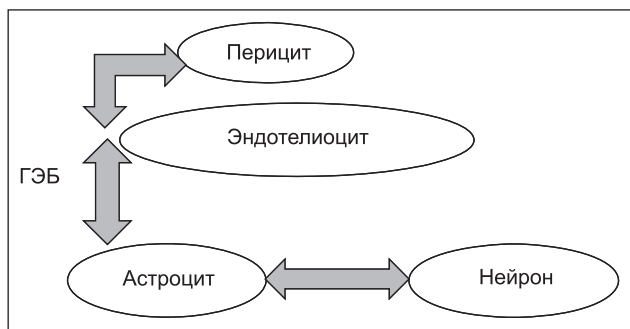


Рисунок 1. Нейрососудистая единица

и место миоцитов заняли эндотелиоциты в силу их функциональной роли, особенно базальной мембраны как структурной единицы, обеспечивающей целостность ГЭБ. В состав НСЕ были также включены пероциты, ножки олигодендроцитов и иммунные клетки (макрофаги и лейкоциты). Эта модель стала основной структурной и функциональной единицей мозга и ГЭБ [9, 41] (рис. 1).

Важно также отметить, что факторы риска инсульта относительно НСЕ в первую очередь специфически воздействуют на эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудистой стенки, периваскулярные нервные волокна церебральных артерий. Деструкция эндотелия мелких артерий в период острой церебральной ишемии способствует агрегации тромбоцитов и локальному тромбообразованию, что усугубляет имеющиеся сосудистые нарушения за счет высвобождения серотонина, который может, в свою очередь, оказывать митогенный и геномный эффекты на гладкомышечные клетки сосудистой стенки, изменяя их фенотип, сократительную способность и структуру артериальной стенки [8, 14].

Стратегические терапевтические мишени острой фокальной ишемии мозга также разрабатывались в соответствии с морфофункциональными особенностями НСЕ. Современная стратегия нейропротекторной терапии острой ишемии мозга направлена в основном на уменьшение размера очага инфаркта мозга, регенерацию нервных клеток и реорганизацию клеточного окружения капилляров, а церебральные микроциркуляторные нарушения при этом не учитываются. Однако максимальная эффективность постинсультной нейрорепарации не может быть достигнута без адекватной реперфузии зоны ишемии мозга. Залогом адекватной постинсультной реперфузии является в первую очередь формирование новых сосудов (ангиогенез) и нейрососудистых связей мелких артерий и артериол, которые разветвляются до паренхимальных капилляров, формируя капиллярную сеть церебрального микроциркуляторного русла [25]. Интрапаренхимальные артериолы отходят от пиальных, пенетрирующих и нутриентных артерий, спускающихся от передне-, средне-, заднемозговой и базилярной артерий. Все вышеперечисленные перфорирующие

артерии и артериолы имеют гладкомышечный сосудистый слой. Гладкомышечный слой клеток выполняет высокоспециализированную функцию, включая сокращение, пролиферацию миоцитов, секрецию протеина экстрацеллюлярного матрикса. Изначально сосудистые гладкомышечные клетки, исходя из их морфологической структуры, рассматривались только как контрактильные или синаптические, однако было установлено, что они обладают полифункциональным действием и могут иметь различные фенотипические характеристики [3]. Миоциты очень динамичны, а их фенотип зависит от комбинированного взаимодействия различных факторов периваскулярной среды. После острой ишемии эти клетки могут утратить контрактильные свойства и не влиять на сосудистый тонус и ауторегуляцию, что в значительной степени позволяет артериальному сосудистому руслу не реагировать на метаболические сдвиги, возникающие при церебральной ишемии, способствуя увеличению церебрального кровотока для сохранения локального гомеостаза [3].

Эндотелий высвобождает многочисленные факторы, которые могут влиять на пролиферацию и дифференциацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Кроме того, было показано, что высвобождаемые вазомоторные эндотелиальные факторы, такие как оксид азота и эндотелин, могут влиять на фенотип гладкомышечных клеток. При ишемическом поражении крупных церебральных артерий снижается непрерывная экспрессия эндотелиальных вазомоторных факторов, что, в свою очередь, приводит к изменению фенотипа гладкомышечных клеток и их сократительной способности. Кроме того, снижение уровня эндотелиальных вазомоторных факторов на фоне церебральной макроангиопатии может привести к увеличению сосудистой проницаемости и эндотелиальной дисфункции артерий второго и третьего уровней [8].

Периваскулярные нервные волокна были обнаружены с помощью электронной микроскопии между соединением медиального и адвентициального слоев сосудистой стенки. Эти волокна обеспечивают аминергическую, холинергическую, пептидергическую, пуринергическую и нитритергическую трансмиссию, способствуя вазоконстрикции или вазодилатации, пролиферации, росту и дифференциации гладкомышечных клеток. Вазомоторная функция периваскулярных нервных волокон критична при регуляции церебральной перфузии, т.к. повреждение этих волокон может привести к нарушению кровотока в определенных зонах мозга и дисрегуляции взаимосвязанных локальных метаболических процессов с уровнем перфузии тканей как во время, так и после острой ишемии [17]. В эксперименте было показано, что периваскулярные нервные волокна выполняют защитную функцию, способствуя уменьшению раз-

меров очага инфаркта за счет влияния на процессы ангиогенеза и, в меньшей степени, кратковременного вазомоторного эффекта [3].

С целью углубления представлений о патогенезе инсульта John H. Zhang и соавт. (2012) предложили дополнить понятие НСЕ патофизиологической парадигмой нейронально-сосудистых сетей мозга (НСС), которая включает в себя новые мировоззрения на ключевую роль эндотелия, периваскулярного гладкомышечного слоя и периваскулярных нервов церебральных артерий [39]. Нейронально-сосудистые сети включают артерии малого диаметра, отходящие от основных сосудистых стволов, артериолы, мелкие вены и венулы. При этом НСЕ являются составной частью нейрососудистой сети.

Концепция НСЕ включает в себя только три из пяти ключевых аспектов патофизиологии инфаркта мозга, имеющие целевой терапевтический потенциал: уменьшение зоны некроза за счет нормализации проницаемости капилляров; регенерация новых клеток, реорганизация нейрососудистой микросреды, способствующей функциональному восстановлению. Две другие базовые задачи лечения и предупреждения инсульта — своевременная реперфузия зоны ишемической полутени, профилактика развития и прогрессирования церебральной макро- и микроангиопатии — могут рассматриваться только в рамках концепции сосудисто-нейрональных сетей, которая является единственной моделью для интеграции всех пяти терапевтических мишеней цереброваскулярных заболеваний.

Предлагаемая парадигма патофизиологии цереброваскулярных заболеваний отражает неполноценность существующей нейропротекторной стратегии, направленной только на восстановление нервных клеток и не учитывающей сосудистое поражение головного мозга, которое является основным компонентом отсроченных ишемических микрососудистых поражений мозга. Однако модель НСЕ сосредоточена в основном на капиллярах, с эндотелиальными клетками которых взаимодействуют астроциты и нейроны. А венозный отток по венулам и артериальный приток крови по артериолам и мелким пенетрирующим артериям мозга, гладкая мускулатура сосудистой стенки и периваскулярные нервные волокна, играющие определенную роль в патофизиологии острой ишемии мозга, не учитываются. В связи с этим нейропротекция и нейрорепарация должны быть направлены не только на нейроглию и нейроны, но и на эндотелий, миоциты и периваскулярные нервные волокна артериол и венул [39].

Ангиогенез и васкулогенез, потенциальная роль эндотелиальных клеток-предшественников

Ангиогенез и васкулогенез являются основными процессами, позволяющими восстановить целост-

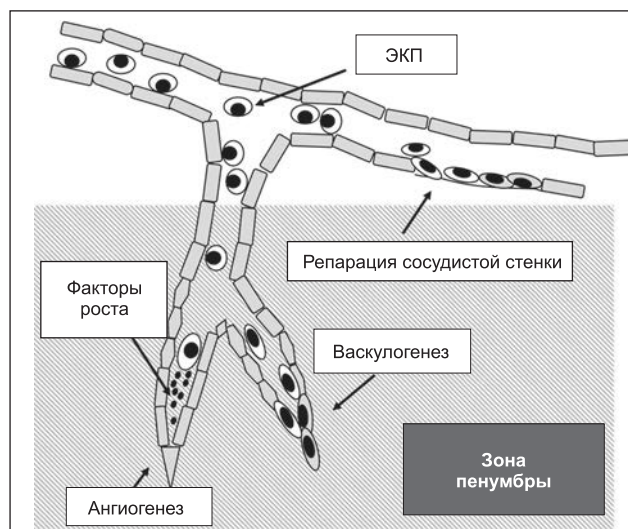


Рисунок 2. Функция ЭКП в эндотелиорепарации, васкулогенезе и ангиогенезе [26]

ность НСЕ и НСС или сформировать новые НСЕ за счет ремоделирования и образования новых сосудов после ишемического повреждения артерий в зоне инфаркта мозга [31]. **Ангиогенез** определяется как образование новых сосудов из уже существующих. Проллиферация эндотелиальных клеток в пограничной зоне ишемии начинается в первые 12–24 ч после инсульта, достигая своего пика через 48 ч и возвращаясь к исходному состоянию через 168 ч [4]. **Васкулогенез** — это развитие *de novo* сосудистого русла из эндотелиальных клеток-предшественников, мобилизованных из костного мозга под действием факторов роста, с последующей дифференцировкой в зрелые эндотелиальные клетки [5].

Эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП) представляют собой циркулирующий в периферической крови пул ангиобластов, которые противодействуют факторам риска деструкции эндотелия и эндотелиальной дисфункции [13, 20]. Основными факторами риска деструкции эндотелия являются курение, артериальная гипертензия, сахарный диабет, гиперхолестеринемия и их синергия, особенно в условиях гипоксии. Asahara et al., открывшие в 1997 г. в периферической крови ЭКП, установили, что они обладают функционально-структурными характеристиками как стволовых клеток, так и зрелых эндотелиальных клеток, играя основную роль в эндогенной сосудистой репарации, эндотелиальной интеграции и гомеостазе (рис. 2) [6].

Острая церебральная ишемия является индуктором выброса проангиогенных факторов роста (индуцируемый гипоксией фактор 1 α , эстроген, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и эритропоэтин), под действием которых мобилизованные из костного мозга в периферическую кровь ЭКП направляются к месту деструкции церебраль-

ного сосудистого эндотелия, где дифференцируются в эндотелиоциты [12, 30, 31]. Стромальный клеточный производный фактор α (SDF- α) на периферии опосредует миграцию, хоуминг ЭКП и созревание эндотелиоцитов [30, 31]. Мобилизация ЭКП из костного мозга также зависит от уровня выработки оксида азота (NO) и активности матриксных металлопротеиназ, в особенности матриксной металлопротеиназы 9. Полагают, что за счет градиента цитокинов ЭКП мигрируют в зону ишемической полутени, где действуют как паракрины, способствуя пролиферации и стабилизации эндотелия, или дифференцируются в зрелые эндотелиоциты [31].

Артериогенез представляет собой формирование коллатералей от уже существующих артериол после окклюзии ствола основной артерии, образование анастомозов или ремоделирование пострадавших артерий, после чего вновь сформированные сосуды переходят в стабильное состояние [31]. В отличие от ангиогенеза артериогенез активируется при повышении компрессионного давления на стенку артерии за счет полной или частичной окклюзии ее просвета, а не гипоксии. Ангиопоэтины 1 и 2 и их рецепторы Tie-2 участвуют в созревании, стабилизации и ремоделировании церебральных артерий [4, 26].

Детекции и характеристики ЭКП

В настоящее время для детекции и характеристики ЭКП применяются иммунофлуоресцентные и морфологические тесты. Для определения выраженности маркеров, подтверждающих принадлежность ангиобластов к эндотелиальной линии, широко используются иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Коммерчески доступные антитела к эндотелиальным маркерам включают CD34, рецепторы VEGF-1 и -2 (FLT-1 и KDR), фактор фон Виллебранда, CD31 (PECAM-1), VE-кадерин, а также Tie, Tek, Flk1, CD36, CD49b, AC133, HLA class I, HLA class II, β 2-микроглобулин, cKit, VCAM, ICAM-1, CD62E, CD62L, CD62P, MUC18, H1P12. Выраженность маркеров важна, поскольку они специфичны не только для эндотелиальных клеток, а популяция ЭКП гетерогенна по экспрессии ранних и поздних маркеров. Для визуализации иммунофлуоресцентно окрашенных клеток преимущественно используются флуоресцеиновый (fluorescein isothiocyanate, Alexa 488) или родаминовый (phycoerythrin [PE], Alexa 594, тexasский красный) стандартные фильтры возбуждения/эмиссии. Для детекции в периферической крови ЭКП принято определять стволовые клетки с коэкспрессией на их поверхности маркеров CD34+, CD133+ и второго рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF-R2), иначе называемого вставкой рецептора домена киназы (KDR) [28]. Коэкспрессия вышеперечисленных специфических поверхностных маркеров (CD34+,

CD133+ и VEGF-R2) позволяет фенотипировать эндотелиальные клетки-предшественники в ранней стадии созревания. К другим ранним поверхностным маркерам субпопуляции ЭКП относятся vWF+ (фактор фон Виллебранда), CD31+ (молекулы клеточной адгезии эндотелия), CD62E (E-селектин), CD144+ (VE-кадерин) и CXCR-4 (CXC-хемокин 4-го типа) [26, 28, 30].

Для морфологической и функциональной оценки клеточных культур изолированные периферические мононуклеарные клетки культивируют в течение нескольких дней, и с момента образования кластеров производится их количественный учет. Наиболее эффективным средством характеристики эндотелиальной культуры большинство авторов считает в первую очередь определение характерных эндотелиальных маркеров (VEGF, VE-кадерин, VCAM-1, vWF+, CDGATA-2 (ранний гемангиобласт), SHH (сосудистый эндотелий), eNOS, CD31+ (PECAM-1), CD34+, рецепторы VEGF-R1 и -R2), морфологии и функциональных особенностей (ангиогенез, поглощение AcLDL, окрашивание с Ulex europaeus lectin 1-го типа). Культивированные ЭКП можно морфологически и функционально разделить на две подгруппы: ранние проросшие ЭКП, определяемые как колониеобразующие единицы, и поздние проросшие ЭКП с высокой пролиферативной активностью, или истинно ЭКП [24, 26, 27]. Ранние проросшие ЭКП имеют ангиогенно-моноцитарные характеристики, низкий потенциал пролиферации, но экспрессируют проангиогенные цитокины и факторы роста, содействуя мобилизации и дифференцировке ЭКП, и сами не созревают в эндотелиоциты. Только поздние проросшие ЭКП обладают характеристиками ЭКП и в конечном итоге дифференцируются в зрелые эндотелиоциты. По мере созревания эндотелиальных клеток уменьшается экспрессия ранних маркеров ЭКП. Однако до настоящего времени отсутствует стандартизация количественного определения ЭКП как у здоровых лиц, так и у пациентов с инфарктами мозга.

Важно отметить, что наше понимание физиологии ЭКП и их вклада в процесс регенерации после повреждения сосудов по-прежнему ограничено. Без всестороннего осмысления биологии эндотелиальных клеток дальнейшее развитие клеточных технологий в медицине невозможно.

Эндотелиальные клетки-предшественники — клеточный маркер риска развития сердечно-сосудистых заболеваний

Уровень ЭКП является новым биомаркером эндотелиальной дисфункции артерий, играющим ключевую роль в поддержании функции эндотелия и предупреждении прогрессирования сердечно-сосуди-

стных заболеваний. Так, низкий уровень циркулирующих ЭКП является самостоятельным предиктором будущих сердечно-сосудистых событий и смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с ишемической болезнью сердца [18, 19, 28].

Снижение количества ЭКП в периферической крови и их функциональной активности в экспериментальных работах ассоциируется с ослаблением компенсаторного ангиогенеза (коллатерального ангиогенеза) и процессов ремоделирования артерий в ответ на ишемию, что может иметь определенное клиническое значение. С другой стороны, снижение числа ЭКП отражает более высокий уровень их потребления для восстановления эндотелия при эндотелиодеструкции у пациентов пожилого возраста, при метаболическом синдроме [19, 25]. Действительно, у пациентов с распространенным повреждением церебрального сосудистого эндотелия определяется очень низкое число ЭКП. Поврежденный эндотелий играет важную роль в формировании атеросклеротических поражений и их прогрессировании, стимулирует проатерогенные воспалительные реакции, опосредованные моноцитами, макрофагами и Т-клетками [19]. Низкий уровень циркулирующих ЭКП является независимым фактором риска сердечно-сосудистых осложнений, что может отражать недостаточность уровня репарации эндотелия [18]. Было показано, что снижение функциональной активности и жизнеспособности ЭКП приводит к нарушению эндотелиального гомеостаза и системы ангиогенеза, прогрессированию церебральной микроангиопатии. При прогрессировании церебральной микроангиопатии ангиогенные Т-лимфоциты могут стимулировать функциональные возможности ЭКП, содействуя формированию новых кровеносных сосудов, эндотелиальной репарации ГЭБ и микроартерий [20].

Уровень эндотелиальных клеток-предшественников CD34+KDR+ был изучен у 519 пациентов с ангиографически верифицированными изменениями коронарных артерий при ишемической болезни сердца с помощью проточной цитометрии в зависимости от исходов заболевания. Многофакторный анализ позволил определить ЭКП как независимый предиктор сердечно-сосудистой смертности, первых сердечно-сосудистых проявлений заболевания, реваскуляризации и частоты госпитализаций [20]. Однако при цереброваскулярных заболеваниях аналогичные исследования проводились очень ограниченно.

Низкая функциональная активность ЭКП (недостаточное вовлечение в процессы реэндотелизации после ишемического сосудистого поражения) у пациентов с сердечно-сосудистыми факторами риска может быть обусловлена снижением эндотелиальной биодоступности оксида азота, которая

приводит к прогрессированию эндотелиодеструкции и замедлению процессов сосудистой репарации. Другими факторами, снижающими уровень ЭКП и их функциональную активность, оказались ожирение, гиперлипидемия, курение и стресс [19, 35]. Прекращение курения в течение четырех недель приводило к быстрому восстановлению не только уровня циркулирующих ЭКП, но и эндотелиальной функции церебральных артерий [20]. Физические нагрузки способствуют повышению уровня циркулирующих в периферической крови ЭКП за счет NO-зависимого механизма [23]. У пациентов с коронарным атеросклерозом после четырех недель выполнения тренирующей программы увеличивалось количество циркулирующих CD34+KDR+-клеток [23].

Ангиогенез и инфаркт мозга

Область пенумбры является наиболее интенсивной зоной церебральной репарации и активного ангиогенеза. Многие факторы роста, такие как VEGF, индуцированный гипоксией фактор 1, SDF- α , eNOS и др., способствуют ангиогенезу и пролиферации эндотелиальных клеток. Ангиогенез запускается в первые 12–24 ч инфаркта мозга и продолжается около 4 недель. Кроме того, нервные клетки-предшественники (НКП) и ангиобласты вместе пролиферируют в кластерах, взаимосвязанных с микрососудами в сосудистых нишах. Подтверждением гипотезы сосудистой ниши является нейрогенез взрослых, который возникает также в микроангиогенной среде [4, 5]. **Ангиогенные ниши** являются микроанатомическими единицами, в которых НКП интимно взаимодействуют с эндотелиальными клетками желудочков мозга и эндотелиоцитами капилляров ГЭБ [4, 41]. Необходимо отметить, что в ангиогенных нишах к эндотелию капилляров не примыкают ножки астроцитов и отсутствует их перицитарное покрытие, что позволяет НКП получать клеточные сигналы напрямую от эндотелиоцитов, эндотелиальных клеток и цереброспинальной жидкости. Большинство НКП субгранулярной зоны мозга пролиферируют также в ангиогенной микросреде, где нейрональные и эндотелиальные прогениторные клетки разделяются на четкие кластеры. В области микрососудистых ниш нейральные стволовые клетки (НСК) секретируют множество факторов роста — VEGF, нейротрофический мозговой (BDNF), фактор пигментного эпителия и др., являющихся сигналами как для обновления НСК, так и для их гибели. Активированный острой ишемией эндотелий церебральных сосудов высвобождает стромальный клеточный фактор SDF-1 α , который способствует экспрессии рецепторов нейробластов для SDF-1 α и CXС-хемокиновых рецепторов 4 (CXCR-4) [26]. Эти факторы способствуют постинсультной ми-

грации нейробластов из субвентрикулярной зоны в пограничную зону ишемии, в которой запускается нейрогенез. Блокирование CXCR-4 останавливает миграцию нейробластов в краевую зону ишемии [4, 12]. Во время миграции нейробласты тесно связаны с церебральным сосудистым руслом и активно взаимодействуют с микросредой. В краевой зоне ишемии они дифференцируются в зрелые нейроны [12].

Ангиогенез в постинсультном периоде играет двойную роль. Более высокая микрососудистая плотность в зоне пенумбры, с одной стороны, способствует увеличению перфузии, стимуляции нейрогенеза и улучшению функционального исхода ИМ, с другой — более быстрой элиминации некротических масс [13, 15, 28, 30]. При этом продуцируемый ЭКП эндотелиальный сосудистый фактор роста выполняет нейропротекторную роль [27].

Taguchi et al. при исследовании 40 пациентов, перенесших инсульт, показали, что снижение уровня CD34+-клеток было взаимосвязано с более выраженными функциональными неврологическими нарушениями в течение первого года после инфаркта мозга по оценке вероятности развития повторного инсульта, шкале Бартель и шкале когнитивных нарушений. Авторы пришли к выводу, что уровень циркулирующих CD34+-клеток имеет прогностическое значение для восстановления неврологических функций в соответствии с их потенциальной ролью в поддержании адекватной церебральной микроциркуляции [34]. Yip et al. определяли количество CD31+CD34+, CD62E+CD34+ и CD34+KDR+ у 138 пациентов в остром периоде инсульта (основная группа), у 40 пациентов с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и у 20 здоровых лиц (контрольные группы) [36]. Было установлено увеличение количества ЭКП всех изучаемых клеточных популяций в основной группе по сравнению с контрольными. Более низкий уровень ЭКП явился независимым предиктором числа баллов по NIHSS в первые 12–48 часов после инфаркта мозга, и только уровень CD34+KDR+-клеток строго коррелировал с неврологическим улучшением по NIHSS на 21-е сутки после инсульта.

T. Bogoslovsky et al. показали, что уровень ЭКП коррелирует с объемом инфарктного очага и его увеличением в острейшем периоде инсульта [10]. Магнитно-резонансная томография головного мозга, магнитное поле которой соответствовало 3 Tesla, было выполнено 18 пациентам в 1-е и на 5-е сутки после инфаркта мозга, уровень CD34+CD133+KDR+-клеток определяли в 1-е и на 3-и сутки острой церебральной ишемии. Большой диаметр очага инфаркта был взаимосвязан с меньшим количеством ЭКП, в то время как менее выраженное прогрессирование размеров очага инфаркта было установлено у пациентов с более высоким уровнем ЭКП в периферической крови.

Объем инфарктного очага в остром периоде инсульта коррелировал с уровнем стромального клеточного производного фактора SDF- α [11].

Проведенное исследование уровня циркулирующих ЭКП, VEGF и эндотелина-1 в остром периоде лакунарных инфарктов мозга (ЛИМ) при церебральной микроангиопатии на фоне хронической ишемии мозга в зависимости от церебральной гемодинамики позволило установить снижение в первые сутки ЛИМ уровня циркулирующих в периферической крови ЭКП и увеличение их количества к 7-м суткам [1]. Снижение количества ЭКП в периферической крови и их функциональной активности ассоциировано с ослаблением компенсаторного ангиоартериогенеза в ответ на острую ишемию в связи с развитием ЛИМ на фоне церебральной микроангиопатии. Установлена неоднородность субпопуляционного состава ЭКП в остром периоде ЛИМ, находящихся на различных стадиях созревания, что обусловлено хронической эндотелиальной дисфункцией микроциркуляторного русла, приводящей к перманентной эндотелиодеструкции. У большинства пациентов с ЛИМ (83,3 %) в первые сутки заболевания наблюдался невысокий уровень eNOS в сыворотке крови на фоне достоверно высоких уровней эндотелина-1. Через 7 дней на фоне стандартной терапии определялась стимуляция его синтеза с одновременной растущей экспрессией VEGF, что, с одной стороны, отражает выраженность эндотелиальной дисфункции, а с другой — указывает на ангиогенную роль eNOS в стимуляции процессов ангиогенеза.

Тем не менее для формирования новых кровеносных сосудов и их индукции после инфаркта мозга требуются различные сложные механизмы образования зрелых сосудов. Кроме того, для морфогенеза и стабилизации кровеносных сосудов могут быть вовлечены стволовые клетки, позволяющие стабилизировать ГЭБ.

Модуляция эндогенного ангиогенеза

Одной из перспективных целей нейропротекции является неоваскуляризация зоны пенумбры после острой ишемии мозга, позволяющая достигнуть более эффективного восстановления пациента. Патофизиологические механизмы ишемического поражения мозга достаточно сложные, процессы эндогенной репарации и регенерации, включая ангиогенез, зависят от времени, которое прошло с момента острой ишемии. При этом у определенных проангиогенных молекул имеется конкретная механистическая функция в определенном и часто ограниченном промежутке времени после инсульта. Поэтому понимание основных механизмов постинсультной репарации мозга на клеточно-молекулярном уровне, включая факторы роста, молекулы адгезии, ангиогенные и нейрональные

клетки-предшественники, имеет основополагающее значение для развития ангиогенных методов лечения. Так, в эксперименте было показано, что внутрижелудочковое введение рекомбинантного человеческого VEGF в первые 48 ч индуцированной ишемии мозга стимулировало ангиогенез церебральных артерий, что приводило к уменьшению размеров очага инфаркта мозга и увеличивало вероятность благоприятного исхода [38]. Но, к сожалению, VEGF одновременно увеличивает проницаемость ГЭБ, что усиливает воспалительные процессы и приводит к отеку мозга. Разрабатываемые современные неоваскуляризационные биотехнологии в недалеком будущем можно будет внедрить для лечения пациентов с инфарктом мозга.

Как уже упоминалось ранее, одним из самых мощных ангиогенных цитокинов в острейшем периоде инфаркта мозга является SDF-1 α . В последнее время был разработан синтетический аналог этого фактора — SDF-полипептид, который оказался эффективнее эндогенного цитокина в отношении стимуляции миграции ЭКП, в том числе включая их повышенную устойчивость и стабильность при экзогенном введении SDF-полипептида [29].

В эксперименте на мышах было показано, что раннее начало выполнения тренирующей терапии после окклюзии среднемозговой артерии способствует увеличению церебрального кровотока в зоне ишемии, в значительной степени уменьшению объема очага ишемии, лучшему функциональному исходу в сравнении с животными, у которых не использовались физические упражнения [40]. Полученные данные коррелировали с уровнем ангиогенеза в ишемизированном участке коры мозга.

Фармакологические стратегии, индуцирующие эндогенный ангиогенез

Фармакологические препараты, мобилизующие и функционально модифицирующие ЭКП, могут в будущем играть основную роль в предупреждении и лечении цереброваскулярных заболеваний. На сегодняшний день доказан положительный эффект статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающих ферментов, ингибиторов рецепторов ангиотензина II и β -блокаторов на мобилизацию и функцию ЭКП [22, 26]. Однако требуется более глубокое и полное понимание факторов, регулирующих ЭКП.

Применение силденафила (виагра) на экспериментальной модели ишемии мозга у крыс увеличивало уровень VEGF и ускоряло процессы ангиогенеза [7]. В экспериментальных исследованиях на мышах был установлен также эндотелиопротекторный эффект цитиколина на уровне церебрального микро-

циркуляторного русла. Цитиколин препятствовал апоптозу эндотелиоцитов и их эксайтотоксическому повреждению, в значительной степени индуцировал ангиогенез и способствовал васкуляризации зоны ишемии мозга [24]. В клинических исследованиях было установлено, что цитиколин не только обладает нейрогенным эффектом, но также способствует мобилизации ЭКП из костного мозга при острой церебральной ишемии. Применение цитиколина, особенно в сочетании с системным тромболизом рекомбинантным тканевым активатором плазминогена (rt-PA), способствовало увеличению уровня колониеобразующих ЭКП [24].

Применение статинов в первые четыре дня инфаркта мозга также имело ангиогенное действие в отношении ЭКП. Назначение статинов, особенно в сочетании с системным тромболизом рекомбинантным тканевым активатором плазминогена, способствовало увеличению уровня колониеобразующих ЭКП и более благоприятному исходу заболевания [33].

Нами изучен уровень ЭКП и оксида азота в первые трое суток ЛИМ при церебральной микроангиопатии и через 7 дней после лечения стандартной терапией и 20 мг аторвастатина на фоне стандартной терапии. Установлено достоверное увеличение циркулирующих ЭКП с фенотипом наиболее ранних клеток CD34+CD133+, CD34+KDR+ в группе пациентов, пролеченных аторвастатином. Имеющаяся тенденция снижения уровня оксида азота на фоне приема статинов свидетельствует об увеличении его биодоступности [2].

Применение колониестимулирующего фактора гранулоцитов (Granulocyte colony-stimulating factor — G-CSF) в первые 12 часов инфаркта мозга способствовало мобилизации ЭКП. Применение рекомбинантного эритропоэтина в первые 48 и 72 ч инфаркта мозга приводило к увеличению уровня циркулирующих ЭКП и значительному улучшению исходов заболевания через 90 дней [21, 32, 37].

Заключение

Улучшение постинсультной церебральной неоваскуляризации является одним из самых перспективных терапевтических подходов в ангионеврологии. Мобилизованные из костного мозга в периферическую кровь с помощью проангиогенных факторов роста ЭКП играют основную роль в постинсультной сосудистой репарации, являясь, с одной стороны, васкулогенными маркерами выраженности постинсультной регенерации мозга, а с другой — мишенью для терапевтических стратегий лечения и источником будущего перспективного метода клеточной терапии инфаркта мозга и репарации церебрального микроциркуляторного русла.

Список литературы

1. Анацкая Л.Н. Роль циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и эндотелиального фактора роста в остром периоде лакунарных инфарктов мозга при церебральной микроангиопатии / Л.Н. Анацкая, Н.В. Гончарова, М.П. Потаннев, Н.И. Щербина, Л.И. Матусевич // *Весті НАН Беларусі*. — 2012. — 3. — С. 15-21.
2. Анацкая Л.Н. Уровень циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и оксида азота в остром периоде лакунарных инфарктов мозга у пациентов, получавших аторвастатин / Л.Н. Анацкая, Н.В. Гончарова, М.П. Потаннев, Н.И. Щербина, Л.И. Матусевич // *Материалы международной научной конференции «Фундаментальные науки и современная медицина», 25–26 октября 2012 г., Минск, Беларусь*. — С. 76-80.
3. Alexander M.R., Owens G.K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease // *Annu. Rev. Physiol.* — 2012. — 74. — 13-40.
4. Arai K., Lok J., Guo S. et al. Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke // *Child Neurol.* — 2011. — 9. — 1193-1198.
5. Arai K., Jin G., Navaratna D. et al. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke // *FEBS J.* — 2009. — 276(17). — 4644-4652.
6. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science*. — 1997. — 275. — 964-967.
7. Bednar M.M. The role of sildenafil in the treatment of stroke // *Current Opinion in Investigational Drugs*. — 2008. — 9(7). — 754-759.
8. Behrouz R., Malek A.R., Torbey M.T. Small vessel cerebrovascular disease: the past, present, and future // *Stroke Res. Treat.* — 2012. — 839151. — 8 p.
9. Berezowski V. et al. Endothelial Cells and Astrocytes: A Concerto en Duo in Ischemic Pathophysiology // *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Cell Biology*. — 2012. — Article ID 176287. — 16 p.
10. Bogoslovsky T., Chaudhry A., Latour L. et al. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke // *Neurology*. — 2010. — 75. — 2059-2062.
11. Bogoslovsky T., Spatz M., Chaudhry A. et al. Stromal-derived factor-1 α correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients // *Stroke*. — 2011. — 42. — 618-625.
12. Borlongan C.V., Glover L.E., Tajiri N. et al. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: Therapeutic implications for stroke and other neurological disorders // *Prog. Neurobiology*. — 2011. — 95(2). — 213-28.
13. Chopp M., Li Y. Stimulation of Plasticity and functional recovery after stroke — cell-based and pharmacological therapy // *European Neurological Review*. — 2011. — 6(2). — 97-100.
14. Cohen Z., Bonvento G., Lacombe P. & Hamel E. Serotonin in the regulation of brain microcirculation // *Prog. Neurobiol.* — 1996. — 50. — 335-362.
15. Deb A., Patterson C. Hard luck stories: the reality of endothelial progenitor cells continues to fall short of the promise // *Circulation*. — 2010. — 121. — 850-852.
16. Du F., Zhou J., Gong R. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis // *Front Biosci.* — 2012. — 17. — 2327-2349.
17. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone // *J. Appl. Physiol.* — 2006. — 100. — 1059-1064.
18. Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — 348. — 593-600.
19. Jialal I., Devaraj S., Singh U. et al. Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: Implications for increased cardiovascular risk // *Atherosclerosis*. — 2010. — 211. — 297-302.
20. Jung K.H., Roh J.K. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease // *J. Clin. Neurol.* — 2008. — 4(4). — 139-147.
21. Gonzalez F.F., Larphaveesarp A., McQuillen P. Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke // *Stroke*. — 2013. — 44(3). — 753-758.
22. Kaneko Y., Tajiri N., Shinozuka K. et al. Cell therapy for stroke: emphasis on optimizing safety and efficacy profile of endothelial progenitor cells // *Curr. Pharm.* — 2012. — 18(25). — 3731-3734.
23. Koutroumpi M., Dimopoulos S., Psarra K. et al. Circulating endothelial and progenitor cells: Evidence from acute and long-term exercise effects // *World J. Cardiol.* — 2012. — 4(12). — 312-326.
24. Krupinski J. et al. Citicoline induces angiogenesis improving survival of vascular/human brain microvessel endothelial cells through pathways involving ERK1/2 and insulin receptor substrate-1 // *Vascular Cell*. — 2012. — 4(20). — 3-11.
25. Kushner E.J., MacEaney O.J., Weil B.R. et al. Aging is associated with a proapoptotic endothelial progenitor cell phenotype // *J. Vasc. Res.* — 2011. — 48. — 408-414.
26. Liman T.G., Endres M. New Vessels after Stroke: Postischemic Neovascularization and Regeneration // *Cerebrovasc. Dis.* — 2012. — 33. — 492-499.
27. Medina R.J., O'Neil C.L., Sweeney M. et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities // *BMC Medical Genomics*. — 2010. — 3. — 18.
28. Medina R.J., O'Neill C.L., O'Doherty T.M. et al. Endothelial Progenitors as Tools to Study Vascular Disease // *Stem Cells International*. — 2012. — Article ID 346735. — 5 p.
29. Moskowitz M.A., Lo E.H., Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments // *Neuron*. — 2010. — 67(2). — 181-198.
30. Navarro-Sobrinho M., Rosel A., Hernandez-Guillamon M. et al. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke // *Microvasc. Res.* — 2010. — 80(3). — 317-23.
31. Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis // *Cell*. — 2011. — 146. — 873-887.
32. Reichmann H. et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke // *Stroke*. — 2009. — 40. — e647-656.
33. Sobrinho T., Blanco M., Pérez-Mato M. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with ischemic stroke treated with statins during acute phase // *Eur. J. Neurol.* — 2012. — 19(12). — 1539-1546.

34. Taguchi A., Nakagomi N., Matsuyama T. et al. Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2009. — 29. — 34-38.

35. Tobler K., Freudenthaler A., Baumgartner-Parzer S.M. et al. Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity // *Int. J. Obes.* — 2010. — 34. — 687-700.

36. Yip H., Chang L., Chang W. et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke // *Stroke.* — 2007. — 39. — 69-74.

37. Yip H. et al. Effect of erythropoietin on level of circulating endothelial progenitor cells and outcome in patients after acute ischemic stroke // *Critical Care.* — 2011. — 15. — R40.

38. Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q. et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain // *J. Clin. Invest.* — 2000. — 106. — 829-838.

39. Zhang J.H., Badaut J., Tang J. et al. The vascular neural network — a new paradigm in stroke pathophysiology // *Nat. Rev. Neurol.* — 2012. — 8(12). — 711-716.

40. Zhang J.H., Yu H., Zhou N. et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model // *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation.* — 2013. — 10. — 43.

41. Del Zoppo G.J. The neurovascular unit in the setting of stroke // *J. Intern. Med.* — 2010. — 267. — 156-171.

Получено 15.05.13 □

Анацька Л.М., Гончарова Н.В.

Республіканський науково-практичний центр неврології й нейрохірургії, м. Мінськ, Білорусь

Республіканський науково-практичний центр гематології й трансфузіології, м. Мінськ, Білорусь

ЕНДОГЕННИЙ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗ У ПОСТІНСУЛЬТНІЙ РЕПАРАЦІЇ МОЗКУ

Резюме. Запорукою адекватної постінсультної церебральної реперфузії в першу чергу є формування нових судин (ангіогенез і васкулогенез), нейросудинних одиниць і нейросудинних зв'язків. Мобілізовані з кісткового мозку в периферичну кров за допомогою проангіогенних факторів росту ендотеліальні клітини-попередники відіграють основну роль у постінсультній судинній репарації мозку й ремоделюванні судинного русла. У зв'язку із цим ендотеліальні клітини-попередники являють собою, з одного боку, клітинні маркери ризику цереброваскулярних захворювань і вираженості постінсультної регенерації мозку, а з іншого — є терапевтичною мішенню й джерелом майбутнього перспективного методу клітинної терапії інфаркту мозку й церебральної мікроангіопатії.

Ключові слова: інфаркт мозку, нейросудинна одиниця, ангіогенез, ендотеліальні клітини-попередники, фактори росту.

Anatskaya L.N., Goncharova N.V.

Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery

Republican Scientific and Practical Center of Hematology and Transfusiology, Minsk, Belarus

ENDOGENOUS NEOVASCULOGENESIS IN POSTSTROKE CEREBRAL REPARATION

Summary. The key to adequate post-stroke cerebral reperfusion in the first place is the formation of new blood vessels (angiogenesis and vasculogenesis), neurovascular units and neurovascular relationships. Mobilized from bone marrow into the peripheral blood using proangiogenic growth factors, endothelial progenitor cells play a major role in the post-stroke cerebral vascular reparation and vascular bed remodeling. In this regard, endothelial progenitor cells are, on the one hand, cellular risk factors for cerebrovascular disease risk and severity of post-stroke recovery of the brain, and the other hand, — therapeutic target and a source for future promising method of cell therapy in cerebral infarction and cerebral microangiopathy.

Key words: cerebral infarction, neurovascular unit, angiogenesis, endothelial progenitor cells, growth factors.