

УДК: 591.111.1

Регенерация при экспериментальном инсульте. Влияние тромбоцитов

Пальцын А.А.

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, ул. Балтийская, 8² — Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Острота проблемы инсульта стимулирует её интенсивную разработку на экспериментальных моделях. Внимание исследователей, занятых этой работой, привлекают быстро накапливающиеся данные последних лет о регулирующей роли тромбоцитов в процессах воспаления, ангиогенеза, регенерации и нейропротекции. Предпринимаются попытки использовать тромбоциты или их микрочастицы в качестве лечебного средства при инсульте. Эти попытки рассматриваются в обзоре. В поиске и изложении литературы автор руководствовался идеей, что функциональное проявление регенерации мозга обеспечивается восстановлением и перестроением нарушенных нервных сетей. Оно может происходить с восполнением числа погибших нейронов или без него за счет восполнения волокнистых структур, развития нейропиля, нейроглии и циркуляции.

Ключевые слова: инсульт, лечение инсульта, репаративная регенерация мозга, тромбоцит, микрочастицы тромбоцитов

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, Irrp@mail.ru

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Поступила 27.01.2016

Regeneration in experimental stroke. Effect of platelets

Paltsyn A.A.^{1,2}¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

The severity of the problem of stroke stimulates its intensive development on experimental models. The attention of researchers engaged in this work is attracted by rapidly accumulating evidence of recent years on the regulatory role of platelets in inflammatory processes, angiogenesis, regeneration and neuroprotection. Attempts are undertaken to use platelets or its microparticles as a therapeutic agent for stroke. These attempts are examined in the review. In search and presentation of the literature, the author was guided by the idea that functional expression of brain regeneration is provided by restoration and rearrange of damaged neural networks. It can happen to renovation of the new neurons instead of dead or without it by means of development of fibrous structures, neuroglia and circulation.

Keywords: stroke, treatment of stroke, reparative regeneration of the brain, platelet, platelet microparticles

For correspondence: Aleksandr Paltsyn, Irrp@mail.ru

Received 27.01.16

Введение

Успех лечения при любой болезни зависит от знания врачом механизмов регенерации и степени согласованности его действий с этими механизмами. Если в альтернативной составляющей инсульта определять роль отдельных видов клеток, то, скорее всего, на первое место следует поставить тромбоцит — без него тромбоз сосуда не произойдет. Один из эффективных методов терапии при инсульте (тромболизис) направлен на подавление гемостатического действия тромбоцитов. Тот факт, что метод не полностью удовлетворяет желаниям врачей, не может быть причиной отказа от него на современном уровне наших знаний. В то же время современный уровень знаний дает повод обратиться к возможности использования тромбоцитов уже в качестве регенеративного средства при инсульте. При лечении второй [1] по уровню смертности болезни современного человечества — инсульта ве-

сьма популярным лечебным приемом является тромболизис блокированием агрегации тромбоцитов. Имеется обширный литературный материал по изучению действия рекомбинантного тканевого активатора плазминогена. На большом клиническом материале — 10 187 пациентов — было показано, что применение этого способа в первые три часа после инсульта существенно улучшало их состояние [2]. Актуальность проблемы инсульта обусловила проведение многих аналогичных исследований, убеждающих в полезности раннего интравенозного тромболизиса [3]. По результатам многих подобных исследований в США приняты рекомендации проводить тромболизис в течение первых 3 часов после появления симптомов инсульта, в Европе — в течение 4,5 часов [4].

Узкие временные рамки для использования обсуждаемого способа терапии обусловили то обстоятельство, что частота применения его не превышает 3–10% от числа

случаев инсульта [5], есть и более грустные данные: 3—5% [6]. Кроме того, способ опасен возможностью вызвать внутримозговое кровоизлияние [7], т.е. превратить ишемический инсульт в геморрагический.

Тромболизис нацелен на скорейшее восстановление циркуляции в очаге или, по крайней мере, на его границе. При достаточно раннем применении, эта мера позволяет уменьшить степень и объем повреждения. Иными словами, тромболизис *защищает нервную ткань* от разрушения. Повышенная чувствительность мозга к недостатку кислорода ограничивает, как было отмечено, срок осуществления такой возможности. После этого срока, когда разрушение уже произошло, дальнейшая судьба больного в значительной мере определяется эффективностью *восстановления разрушенной нервной ткани*, т.е. регенераторного процесса. В данном обзоре представлен материал, посвященный изучению закономерностей развития этой более поздней регенераторной реакции и возможностей её стимулирования.

Следует определить более точно смысл слов «регенераторный процесс», «восстановление разрушенной нервной ткани». Наиболее просто и логично было бы подразумевать под этими словами восстановление числа, обеспечивающих функцию клеток, т.е. нейронов, бывших в зоне инсульта до инсульта. Такое понимание было бы точным, если бы дело касалось не нервной ткани. В том же случае, когда речь идет о мозге, восстановление исходного числа нейронов оказывается очень сомнительным, а, скорее всего, невозможным событием. Подробнее об этом сказано ниже, здесь же отмечу, что открытие Reynolds и Weiss [8] нейральной стволовой клетки (NSC) и, конечно, огромное желание исцелять неврологических больных, индуцируют появление большого числа попыток восстановить число разрушенных болезнью нейронов. Делается это методом клеточной терапии — введением в мозг экзогенных стволовых или дифференцированных до различного уровня клеток. Пока результаты лечения нельзя признать перспективными для клинического применения. Авторы объясняют это плохим приживлением клеток их неконтролируемой *in vivo* дифференцировкой. Другие причины: неэффективная интеграция с тканями хозяина (а, скорее, отсутствие её) и краткий срок пребывания вносимых с клетками ростовых факторов [9]. Высказываются надежды на улучшение ситуации применением биоинженерных технологий [10], но нацеленные в будущее надежды не снижают сегодняшней остроты проблемы лечения инсульта.

Идейной платформой этого обзора является широко известный факт — случаи частичного, а нередко и полного восстановления нарушенных инсультом функций. Не стану пока рассуждать, происходит ли при таком восстановлении новообразование нейронов — нейрогенез. Скорее всего, не происходит, но в нашей постановке вопроса это не имеет решающего значения. Попробуем руководствоваться мыслью, что восстановление функции нервной системы — это регенерация связей. Она может осуществляться не только пополнением числа нейронов, но и путем перестроения нервных сетей, образования новых нейритов, новых синапсов, новых сосудов, т.е. развитием нейропиля и достаточного уровня циркуляции в очаге инсульта. Важной составляющей этого процесса становится пролиферация сосудов в окружающей зону инсульта пенумбре.

В последние 20—25 лет появилось большое количество данных, указывающих на содержание в тромбоцитах многих ростовых факторов и за счет этого участие этих клеток во множестве биологических процессов помимо гемостаза. К таким процессам относятся: воспаление, регенерация, развитие сосудистой и лимфатической системы, канцерогенез. Поэтому представляются резонными попытки использовать тромбоциты или их компоненты для терапии инсульта.

Протеомным анализом в гранулах тромбоцитов (α гранулы, плотные гранулы, лизосомы) обнаружено 827 белков [11]. Наиболее крупные α гранулы (200—500 нм), они же и наиболее многочисленные (50—80 в одном тромбоците), отличаются наибольшим набором разнообразных по функциям белков. Для нашей темы наиболее интересны белки и пептиды, посредством которых осуществляется взаимодействие тромбоцитов с клетками сосудистой стенки, клетками воспаления и иммунного ответа. На первом месте по объему известных о них сведений и по роли в регенераторных процессах следует указать факторы роста. Из них наиболее известны: тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF). Кроме перечисленных факторов в гранулах есть и другие активаторы и медиаторы провоспалительных и прорегенераторных клеточных реакций: тромбоцитарный фактор 4 (PF4), P-selectin, CD40L, CD63, тромбоспондин, металлопротеиназы (MMP-2, MMP-9), циклофилин А [12].

Заканчивая этот неполный перечень содержащихся в тромбоцитах биологически активных веществ, следует сказать о давнем и чрезвычайно важном для нашей темы открытии. В 1990 году Yamamoto и Gurney [13] нашли в тромбоцитах человека нейротрофический фактор мозга (BDNF). Недавно Chacon-Fernandez с соавторами [14] сообщили, о синтезе BDNF в мегакариоцитах, хранении его в α гранулах и о том, что в тромбоцитах человека содержание BDNF в 100—1000 раз превышает таковое в тканях мозга. Неизменные участники травмы и воспаления: тромбин, коллаген, вызывают быстрое выделение BDNF из тромбоцитов.

В последние годы в биологию пришло осознание замечательного факта — широкого распространения в нормальных и патологических процессах жизнедеятельности везикулярного способа передачи сигнала. Выяснилось, что очень многие, а может быть, и все клетки отделяют везикулы со сложным набором биологически активных веществ, содержащихся, как в полости везикул, так и на их мембране. Экстрацеллюлярные везикулы разделяют по механизму образования и по размеру на два типа: экзосомы (30—100 нм) и микрочастицы (МЧ) — окруженные клеточной мембраной экстрацеллюлярные везикулы размером от 100 до 1000 нм. Процесс образования МЧ тромбоцитами выражен значительно, чем это бывает в других клетках. МЧ тромбоцитов раньше других МЧ были идентифицированы и описаны [15]. Они наиболее многочисленны — около 80% присутствующих в крови МЧ — это тромбоцитарные МЧ (ТМЧ). [16]. Их концентрация в крови 100—1000/мкл [17]. ТМЧ содержат мембранные белки и пептиды (рецепторы, цитокины), белки цитоскелета, в том числе актин, фосфатидилсерин, гликопротеи-

ны, протеолитические ферменты [18], металлопротеиназы, факторы роста [19], мРНК, мкРНК и ДНК [20]. Обширный комплект веществ, полученных от родительских клеток, обеспечивает ТМЧ возможность осуществлять межклеточные взаимодействия и таким образом участвовать во многих физиологических и патологических процессах. Описано, например, что в мозге они могут положительно влиять на синаптическую активность, регенерацию нервов, нейропротекцию [21]. Есть данные, что взаимодействие ТМЧ с клетками-мишенями осуществляется не только механизмом лиганд — рецептор, но и путем слияния ТМЧ с клеткой. Возможно, что в тех случаях, когда ТМЧ осуществляют мкРНК зависимый контроль функции клеток-мишеней, эффект достигается именно через механизм слияния МЧ. Этот механизм избавляет мкРНК от деградации РНКазой крови [22]. Ещё один способ переноса содержимого МЧ в клетку-мишень — фагоцитоз [23]. Разнообразие способов взаимодействия ТМЧ с клетками мишенями наделяет ТМЧ способностью влиять на мишени не так, как тромбоциты. Своеобразие действия ТМЧ определяется не только сказанным выше, но и тем фактом, что активность молекулы в растворе и фиксированной на мембране различна [24].

В месте травматического или ишемического повреждения тканей скапливаются находящиеся в циркуляторном русле тромбоциты, они активируются местными гомеостатическими нарушениями, контактом с поврежденной сосудистой стенкой и межклеточным веществом. Активированные тромбоциты выделяют в микроокружение биоактивные молекулы. Эти молекулы привлекают в очаг иммунные клетки: нейтрофилы, моноциты, включают активацию, пролиферацию, и дифференцировку клеток, обеспечивающих регенерацию: фибробластов, гладкомышечных, а также специфических для участка повреждения прогениторных клеток [25].

Пусковым моментом альтеративных изменений при инсульте становится, вызываемое гипоперфузией снижение содержания кислорода и глюкозы. В результате повышается выброс в межклеточное пространство глутамата, активируются глутаматные рецепторы, перевозбуждаются постсинаптические нейроны, включается каскад проапоптотических и пронекротических изменений [1].

Эксайтотоксичность глутамата выражается и усугубляется нарушением гомеостаза кальция, оксидативным стрессом за счет (reactive oxygen species, ROS) и оксида азота, нарушением мембранного потенциала митохондрий, снижением уровня АТФ, нарушением фолдинга белка — стрессом эндоплазматического ретикула [26—28]. Важная особенность очага поражения при инсульте — градиент концентрации альтеративных факторов с максимумом в центре и уменьшением на периферии. Эта особенность определяет и соответствующий градиент выраженности деструктивных изменений, и противоположный градиент возможностей регенерации. Так, клетки в центре инсульта подвергаются некрозу, а в пенумбре более выражен апоптоз. Индуцированная глутаматом дендритотоксичность выражается разрывами микротрубочек, кальций-зависимой потерей MAP2 (microtubule-associated protein 2), нарушением функции дендритов [29]. Результатом перечисленных событий становится появление в мозге провоспалительных молекул и мертвых клеток. В англоязычной литературе для этого часто используется аббревиатура DAMPs (danger-associated molecular patterns).

В качестве русского варианта можно встретить выражение — «сигналы опасности». Погибшие клетки, конечно, оказываются поставщиком в межклеточное пространство фрагментов ДНК. В том числе митохондриальной ДНК. Эволюционное родство митохондрий с бактериями наделяет фрагменты митохондриальной ДНК способностью стимулировать врожденный иммунитет, формировать воспалительный инфильтрат [30]. Распад фосфолипидов способствует активации инфламмосом и включает продукцию провоспалительных цитокинов IL-1В и IL-18. Не упоминая в этом тексте много других стимуляторов воспаления, хочу подчеркнуть тот факт, что воспаление всегда сопутствует инсульту.

Уровень развития воспаления и особенности проявления его бывают различными, и это имеет существенное значение для исхода процесса. Воспаление неизбежно связано с некоторой степенью повреждения, т.е. всегда участвует в альтеративном процессе при инсульте. В то же время и регенерация не может осуществиться без воспаления. Так стимуляция классической воспалительной реакции — фагоцитарной активности микроглии, улучшала восстановление после инсульта [31]. Важнейшим регенеративным моментом воспаления является удаление фагоцитами мертвых клеток, тканевого детрита. Воспаление, разрешение воспаления и восстановление нейральных повреждений при инсульте связаны последовательной временной и причинно-следственной преемственностью. Она — преемственность — предопределяет и отсутствие четких временных и структурно-функциональных границ между обсуждаемыми фазами болезни. Поэтому результаты регенераторного процесса начинают формироваться уже на стадии воспаления. Имеется в виду следующее. Регенерация оказывается тем полнее, чем меньше разрушения произошло при образовании инсульта. Клетки воспалительного инфильтрата макрофаги/микроглиоциты производят факторы роста IGF-1 и FGF-2, которые способствуют сохранению жизнеспособных нейронов и глиальных клеток в пенумбре.

В литературе, описывающей регенеративные изменения при инсульте, есть пропагандируемое многими авторами мнение, не согласующееся с фактическим материалом современной нейробиологии. Такое обстоятельство затрудняет и без того нелегкий путь к знанию и его клиническому применению. Попытаюсь сложившуюся ситуацию четко обозначить.

Нейральная стволовая клетка (NSC) — прародительница как нейронов, так и глиоцитов. Многие исследователи, объясняя положительный эффект факторов индуцирующих пролиферацию NSC, связывают его с нейрогенезом. Например, Ruan с сотр. [32] пишут: «The capacity to produce new neurons in the adult brain and the ability of the ischemia-injured adult brain to partially recover suggest a possible relationship between adult neurogenesis and stroke recovery». Таких работ, авторы которых не представляют иного способа восстановления поврежденного ишемией мозга, кроме пополнения числа нейронов, много [33—35].

Отождествление регенерации мозга только с нейрогенезом ведет к неверному пониманию сути процесса регенерации и, соответственно, к ошибкам медицинской практики. Возможность регенерации за счет именно нейрогенной дифференцировки NSC у взрослых млекопитающих исследовалась огромным количеством работ. Результаты получены скромные. Суть их при объективной оценке сво-

дится к тому, что такая регенерация представляется крайне ограниченной территориально. Дело в том, что сложный процесс пролиферации, дифференцировки предшественников в нейроны и интеграции вновь образованных нейронов в нейронные сети происходит только в двух небольших зонах мозга: зубчатой извилине гиппокампа [36] и субвентрикулярной зоне боковых желудочков [37]. Образовавшиеся в этих зонах нейробласты мигрируют. В гиппокампе из субгранулярного в гранулярный слой. Из субвентрикулярного слоя боковых желудочков мозга в обонятельные луковицы. По прибытии в участки постоянной локализации нейробласты дифференцируются в нейроны, встраиваются в местные нейронные сети. Таким образом, представлялось, что регенерация с восстановлением (хотя бы частичным) численности нейронов возможна только тогда, когда в зону инсульта входят зубчатая извилина или обонятельные луковицы. Их называют зонами канонического нейрогенеза. Однако в последнее десятилетие появилось много сообщений, что ниши пролиферации NSC не ограничиваются боковыми желудочками мозга, но распространяются на всю желудочковую систему. Пишут, что при повреждении мозга такая пролиферация воплощается в нейрогенез и глиогенез в стенках 3-го и 4-го желудочков [38]. Подобные сообщения, конечно, очень актуальны и перспективны, но не как доказательства нейрогенеза при инсульте, а как предварительные данные об его возможности. В статье того же коллектива [39] как доказательство нейрогенеза описывают появление «Dcx+ neurons». Такой же конечный результат представлен в статье Heinrich с соавторами [40] описывающей превращение прогениторной клетки олигодендрокита — NG2 в Dcx+ клетку. Но Dcx+ клетка — это не нейрон, маркер Dcx экспрессируют предшественники и незрелые нейроны. Чтобы такой клетке стать нейроном, способным заменить погибший нейрон, ей надо пройти стадии терминальной дифференцировки (т.е. превратиться из клетки Dcx+ в клетку NeuN+), миграции в соответствующий участок мозга и интеграции в местную нейронную сеть. Осуществление этих стадий ещё не доказано, следовательно, и связывать выздоровление с нейрогенезом пока можно лишь предположительно. В недавней статье одного из авторитетных специалистов по обсуждаемой проблеме Bonfanti [41] нейрогенез за пределами канонических зон, как спонтанный, так и реактивный, развивающийся в ответ на повреждение, назван неполным — «incomplete». Имеется в виду, что полный нейрогенез — это процесс от активации NSC до интеграции нейронов в местную сеть. Автор подчеркивает, что судьба нейронов, образовавшихся в неполном нейрогенезе остается неясной.

Кроме того, в принципе, с позиций здравого смысла и диалектики ошибочно сводить сложный процесс регенерации мозга к пополнению числа одного вида клеток, даже такого премьерного для мозга вида как нейроны. Нормальная функция мозга осуществляется взаимодействием всех клеток, всех структурных элементов мозга. Следовательно, и восстановление этой функции после её нарушения происходит тем же комплексом взаимодействий. Тем больше оснований рассмотреть в обзоре другие (помимо нейрогенеза) механизмы регенерации. Их немало.

Начнем разбор с событий, совершающихся в нейронах. Кахаль говорил: «интеллигентность, талант, гений — это не количество нейронов, а объём белого вещества» [42]. Будничный смысл этого блестящего афоризма тот,

что, в конечном счете, нервная деятельность определяется числом связей нейронов, а не числом клеточных тел. Сейчас представление о том, что память и вообще мыслительная деятельность осуществляется перестройками синаптических связей, является общепринятым. Связи нейронов динамичны, они постоянно образуются и исчезают. Литература на эту тему, называемую нередко пластичностью мозга, сейчас неисчерпаема. Упомяну только одну работу. В эксперименте, длящемся месяцы Lee с сотрудниками [43] с помощью двухфотонного микроскопа хронически *in vivo* регистрировали изображения дендритных шипиков и аксональных бутонов и показали рост и перестройку дендритного дерева взрослых нейронов в поверхностных слоях коры у мышей. Это первая (по моим поискам) работа, где умозрительные представления Кахалья были подтверждены непосредственным видением роста и перестройки взрослых нейритов. Они вытягивали и сокращали ветви, а в некоторых случаях образовывали новые ответвления. Пластичность взрослого мозга можно было воспринимать и оценивать *наблюдением*.

Динамичность нервных связей — серьезный признак того, что хорошо известные и даже не редкие случаи восстановления нарушенной инсультом функции могут осуществляться не пополнением числа нейронов, а пополнением числа контактов между сохранившимися после инсульта нейронами.

К вопросу межнейрональных контактов имеет непосредственное отношение судьба глиальных и васкулярных клеток при инсульте. Она отличается от судьбы нейронов. Во-первых, астроциты, олигодендрокиты и клетки сосудистой стенки менее чувствительны к гипоксии. Следовательно, они в большей доле и более продолжительно сохраняются после инсульта и терапевтические меры по восстановлению их функции более обширны и практически выполнимы сравнительно с нейронами. Во-вторых, эти клетки у взрослых млекопитающих способны к регенерации, путем клеточного деления и дифференцировки. В отличие от территориально ограниченной дифференцировки NSC в нейроны, их дифференцировка в глиоциты широко распространена по территории ЦНС. Этим обеспечивается возможность повсеместного развития NSC в прогениторные клетки астроцитов и олигодендрокитов и, наконец, дифференцировки в соответствующие зрелые клетки.

Исследования последних 20 лет заставляют пересмотреть сложившееся в предыдущие годы представление об астроцитах, как только структурном, поддерживающем элементе нервной системы. Стало известно много фактов, указывающих, что они, по существу, в равной степени с нейронами участвуют в проведении импульса. Из множества свидетельств этому приведем только одно. Боковой амиотрофический склероз (БАС) связывают с поражением нейронов, этому представлению соответствует синоним — болезнь мотонейронов. Однако оказалось, что дегенеративные изменения, агрегаты в цитоплазме развиваются при БАС в астроцитах, составляющих микроокружение спинальных мотонейронов, раньше появления каких либо изменений и, тем более, гибели самих нейронов [44]. Развитие глиальных клеток в зоне инсульта необходимый фактор регенерации вообще и восстановления пластичности мозга, в частности. Так, нейромедиаторы пресинаптических нейронов повышают концентрацию ионов кальция в прилежащей глии. Активированная глиа

(астроциты), в свою очередь, выделяет медиаторы, в том числе, глутамат и АТФ. Такие глиомедиаторы могут как усиливать, так и угнетать дальнейшее выделение нейромедиаторов. Кроме того, глиомедиаторы способны непосредственно стимулировать постсинаптические нейроны, обеспечивая возбуждательный или тормозной ответ. Для рассматриваемой нами темы регенерации важно, что глутамат, АТФ и цитокины астроцитов увеличивают жизнеспособность и функциональную активность новообразованных связей. Расположение астроцитов в сосудистой стенке нейроваскулярных комплексов обеспечивает согласованность нервной и циркуляторной работы. Проведение импульса, синаптическая передача энергозависимое событие. Необходимая для него подача энергии осуществляется расширением артериол и капилляров. Этот эффект обеспечивают астроциты. Распространяющаяся по ним во время нейрональной активности волна повышенной концентрации кальция вызывает секрецию астроцитами вазоактивных веществ: оксида азота, простагландина E₂, АТФ. Результатом таких волн является череда вазодилатаций — вазоконстрикций. Таким образом, астроциты, будучи компонентом трехсторонних синапсов и нейроваскулярных комплексов способствуют восстановлению пластичности мозга непосредственно как участники передачи импульса и как инструменты энергетического обеспечения передачи. Кроме того они обеспечивают восстановление пластичности через нормализацию циркуляции и выброс нейротрофинов, ангиопоэтина, ангиотензина [45].

Выше было сказано, что уменьшение степени и распространенности повреждений способствует выздоровлению. В этой связи сохранение и регенерация астроцитов представляется ответственным моментом. Они обладают способностью снижать интенсивность действия важнейших патогенных факторов инсульта — эксайтотоксичности, свободных радикалов, оксида азота. Астроциты способны абсорбировать глутамат, удалять свободные радикалы, снижать продукцию NO, поддерживать гомеостаз медиаторов [46]. Участие астроцитов в регенераторном процессе нейронов выражается в восстановлении пластичности (долговременной потенциации), экспрессии на поверхности трофических и ростовых факторов, стимуляции дифференцировки нейронов и синаптогенеза [47]. С накоплением знаний о биологии астроцитов появились сообщения ещё об одной форме их участия в регенерации мозга. О принципиальной возможности развития астроцитов по нейрогенной программе. Блокированием Notch1 рецептора у мышей удавалось наблюдать дифференцировку астроцитов в нейроны в стриатуме и медиальной коре в норме и при инсульте [48].

Не менее значительна в восстановлении нервной функции и роль олигодендроцитов, сохранившихся после инсульта или появившихся вновь путем дифференцировки NSC в прогениторные клетки олигодендроцитов (OPCs) и, наконец, в зрелые олигодендроциты. При распаде миелиновых оболочек в очаге инсульта образуются остатки миелина, ингибирующие OPCs, и, в то же время, цитокины, ростовые и трофические факторы самих тромбоцитов и привлеченных ими в очаг микроглиоцитов/макрофагов способны стимулировать дифференцировку OPCs и функцию новообразованных олигодендроцитов. Было показано, что содержащиеся в α гранулах PDGF и FGF содействуют выживанию, мобилизации и пролиферации OPCs [49].

Мозг отличается наибольшим объемом кровотока, уникальным строением сосудистой сети, наиболее чувстрой зависимостью функции от состояния кровообращения. Эти особенности определяют большое значение циркуляторных событий в регенерации при инсульте. Эндотелий мозга представляет собой не имеющую аналогов структуру — гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В нем своеобразно устроены уже сами эндотелиоциты. Они, в отличие от эндотелиоцитов из других участков тела, соединены плотными контактами. В них снижен транцитоз (пиноцитоз), повышено содержание митохондрий, существенно отличается набор мембранных рецепторов. Своеобразными эндотелиоцитами, а также участвующими в организации и функции ГЭБ перицитами, астроцитами и микроглиоцитами барьер отделяет нейроны от компонентов циркулирующей крови. Размах гематоэнцефалических взаимодействий можно представить по таким грубо-физическим характеристикам мозга человека как длина сосудистой сети — 600—700 км и поверхность молекулярного транспорта — около 20 м² [50]. Понятно, что наряду с прочим, регенерация при инсульте определяется уровнем нормализации и этих характеристик.

Многие структурно-функциональные характеристики ГЭБ зависят от перицитов. Особое положение и значение перицитов, входящих в ГЭБ, иллюстрируется уже их повышенным содержанием. В ЦНС отношение перициты/эндотелиоциты бывает 1/1—1/3, тогда как в других участках тела, например в мышце: 1/10—1/100. Роль перицитов в ангиогенезе динамична и разнонаправлена на разных стадиях процесса. На ранних стадиях они секретируют ангиогенные факторы, например VEGF-A, стимулирующий образование ответвлений и пролиферацию эндотелиоцитов. Позже могут экспрессировать матриксные металлопротеиназы, урокиназу, разрушающие базальную мембрану и способствующие миграции эндотелиоцитов [51]. В настоящее время неизвестно происходит ли смена клеточных поколений перицитов в нормальном онтогенезе. Неизвестны и клетки-предшественники. Однако при заболеваниях ЦНС (в том числе при экспериментальном инсульте) восстановление популяции перицитов происходит. Ангиогенез, развитие сети коллатералей стимулируют ряд цитокинов и ростовых факторов, содержащихся в тромбоцитах FGF, TGF- β , VEGF, PDGF- β .

Сегодня есть много наблюдений, свидетельствующих, что узловым фактором восстановления пластичности нервной системы является протеолиз. В частности, функция содержащейся в тромбоцитах металлопротеиназы 9 (MMP9): расщепление и восстановление экстрацеллюлярного матрикса — необходимое условие динамичности нервных связей [52].

Результаты терапевтического применения тромбоцитов при экспериментальном инсульте

Группа исследователей из Израиля изучала возможность терапевтического применения ТМЧ человека в экспериментах с ишемизирующим тромбозом в сердце и мозге [53]. В модели инфаркта у крыс, сразу после перевязки левой коронарной артерии вводили в миокард по периферии ишемизированного участка ТМЧ. Через 3 недели наблюдали достоверное увеличение числа сосудов в поврежденной области сравнительно с контролем (введение раствора без ТМЧ).

В том же учреждении и по той же схеме эксперимента выполнены несколько работ по исследованию действия ТМЧ на течение инсульта [54]. У спонтанно гипертензивных крыс в возрасте 13 недель вызывали окклюзию средней мозговой артерии, что создавало инсульт фронтальной коры, занимающий 19–24% полушария. Поврежденный участок закрывали пленкой (5x5 мм) биоразлагаемого полимера с фосфатным буферным раствором (ФБР) или с ФБР, содержащем взвесь 10 мкг/мл или 100 мкг/мл ТМЧ. В течение 90 дней после инсульта многократно исследовали степень восстановления нарушенной инсультом двигательной активности. В полученных через 90 дней морфологических препаратах иммуноцитохимически определяли число сосудов и меченых предшественником ДНК (BrdU) клеток. ТМЧ увеличивали дозозависимо плотность расположения сосудов на границе зоны инсульта. Частота коаголяции метки эндотелиоцитов и BrdU указывала на то, что многие из этих сосудов были вновь образованные. На границе зоны повреждения в группе животных с ТМЧ увеличивалось число клеток совмещавших метку BrdU с меткой астроцитов, олигодендроцитов и нейронов (в последнем случае демонстрация авторов не убедительна). Это доказывает, что ТМЧ стимулируют дифференцировку нейральных стволовых клеток. Недифференцированных предшественников в группе ТМЧ было больше. Первые признаки восстановления нарушенной инсультом двигательной активности отмечали после 20 дней. В группе ТМЧ восстановление происходило быстрее и с дозозависимым эффектом. Размер очагов инсульта был меньше в группе ТМЧ, однако разница с контролем не достигала статистически достоверной величины. В другом, сходном по схеме, эксперименте того же коллектива, где испытывали не ТМЧ, а лизат тромбоцитов (введение в боковой желудочек) авторы наблюдали через 90 дней достоверное уменьшение величины очага и увеличение скорости восстановления функции [55].

Один из содержащихся в тромбоцитах ростовых факторов — VEGF, будучи специфическим митогеном для эндотелиальных клеток, привлек особое внимание исследователей инсульта. На ранних сроках после инсульта эндогенная экспрессия этого вещества ишемизированными нейронами, астроцитами и микроглиоцитами/макрофагами увеличивает межклеточные промежутки в эндотелии, нарушает ГЭБ, и тем способствует отеку и распространению деструкции местных тканей [56].

Понятно, что отек в мозге, расположенном в неподдающемся растяжению черепе, не только усугубляет деструкцию, но и представляет смертельную опасность. В связи с этим важно, чтобы в ранней фазе развития инсульта нейтрализующие антитела к VEGF уменьшали отек и деструкцию тканей [57]. На основании анализа литературы Suzuki с сотрудниками [58] пришли к заключению, что случающиеся осложнения при лечении rt-PA на ранних стадиях инсульта реализуются через VEGF.

Однако, если учитывать другие имеющиеся сегодня данные о роли VEGF в развитии инсульта, то следует подчеркнуть важность параметра времени в суждении о роли этого вещества. Есть немало сообщений о его терапевтическом действии. Двойственная роль VEGF при инсульте в зависимости от временного графика его применения была показана Zhang с сотрудниками [59]. Они исследовали (по их мнению, впервые) результаты раннего и позд-

него введения VEGF при инсульте у крыс. Через 1 или 48 часов после эмболизации средней мозговой артерии вводили в/в человеческий рекомбинантный VEGF 165 (rhVEGF165) в дозе 1 мг/кг. Применение специального насоса позволяло вводить дозу в течение 4 часов со скоростью 5 мкл/мин. В контроле вводили физраствор по той же схеме. Позднее (48 часов) введение обеспечивало появление в пенумбре большого числа вновь образованных сосудов, достоверное увеличение кровотока в пенумбре и улучшало функциональные неврологические показатели. Раннее введение повышало проницаемость ГЭБ, увеличивало отек, кровоизлияния и ишемические повреждения клеток мозга.

Описан опыт лечения экспериментального инсульта VEGF [60]. Эта работа интересна не только выбором лекарства, но и особенностью его введения в организм. VEGF был растворен в гидрогеле. При системном введении раствора VEGF он быстро исчезает из кровотока. Поэтому авторы использовали гидрогель, увеличивающий срок выделения VEGF, а инъекцию производили в стриатум за 15 минут до перевязки на 1 час средней мозговой артерии у крыс. Уже через 2 дня после инсульта наблюдали значительное улучшение двигательной функции и поведенческих реакций в сравнении с контролем: введение гидрогеля без VEGF или VEGF без гидрогеля.

Dzietko с сотрудниками [61] исследовали действие VEGF на заживление инсульта у 10 — дневных крысят. Инсульт вызывали окклюзией на 1,5 часа правой средней мозговой артерии. МРТ подтвердила ишемию и последующую реперфузию изучаемого участка мозга. На 18-й день в правый боковой желудочек мозга вводили рекомбинантный VEGF человека (Sigma, USA) в дозе 1,5 мкг/кг, растворенный в фосфатном буфере/0,4% бычьего сывороточного альбумина. Мозг фиксировали на 25-й день. В цитохимическом анализе на содержание NeuN⁺ клеток в коре введение VEGF улучшало скорость регенерации поврежденного мозга. Проведенное Dzietko с сотрудниками изучение ангиогенного эффекта VEGF (по совмещению метки platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) и BrdU) не обнаружило существенного влияния препарата. Авторы объясняют этот факт сравнительно поздним введением препарата (через 8 дней после инсульта) и поздним (через 5 дней после введения VEGF) началом инъекций BrdU. Однако объем сосудистой сети (по распространенности метки PECAM) в перинфарктной зоне при введении VEGF был достоверно больше. Подчеркиваем, что в обсуждаемой работе положительный эффект VEGF на заживление инсульта проявился даже при его позднем введении, причем в водном растворе, не обеспечивающем длительное действие препарата. Интраназальное введение препарата [62] способствовало сохранению когнитивной функции и уменьшало повреждаемость нейронов гиппокампа при общей церебральной ишемии. В обзоре Greenberg и Jin [63] приводится много сведений, полученных в исследованиях *in vitro* и указывающих на благоприятное действие VEGF непосредственно на нервную ткань при гипоксии. Авторы называют этот эффект нейропротективным. Имеется в виду стимуляция роста и созревания аксонов, пролиферация Швановских клеток, повышение устойчивости культивируемых нейронов к стрессовым изменениям среды, в том числе гипоксии.

Присутствие BDNF в тромбоцитах может обуславливать их лечебное действие при инсульте. Kim и Kim [64] изучали влияние физических нагрузок на развитие инсульта, вызванного окклюзией средней мозговой артерии у крыс. Бег перед и после операции достоверно улучшал показатели двигательной активности и содержание BDNF в гиппокампе сравнительно с животными, не упражнявшимися или бегавшими только после инсульта. Улучшение когнитивных показателей после аэробных упражнений было отмечено у людей с ишемическим инсультом. При этом наблюдали положительную корреляцию с содержанием BDNF в сыворотке [65]. Последние две работы демонстрируют связь благоприятного течения инсульта с содержанием эндогенного BDNF. Применение экзогенного препарата тормозится трудностями производства медицинского препарата BDNF [56]. Но, конечно, это обстоятельство не отменяет возможность лечебного действия BDNF, содержащегося в тромбоцитах.

References

1. Moskowitz M.A., Lo E.H., Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010; 67(2): 181-98.
2. Wardlaw J.M., Murray V., Berge E., del Zoppo G.J. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 7: 213.
3. *Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for health care professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review*. 2013; 64 p.
4. Cohen D., Macdonald H. UK drug agency announces review of use of alteplase after stroke. *BMJ*. 2014; 349: 5355.
5. Killer M., Ladurner G., Kunz A.B., Kraus J. Current endovascular treatment of acute stroke and future aspects. *Drug Discov Today*. 2010; 15(15-16): 640-7.
6. Ruan L., Wang B., Zhu Ge Q., Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res*. 2015; 1623: 166-73.
7. Green A.R., Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today*. 2006; 11(15-16): 681-93.
8. Reynolds B., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255(5052): 1707-10.
9. Wang J., Yang W., Xie H., Song Y., Li Y., Wang L. Ischemic stroke and repair: current trends in research and tissue engineering treatments. *Regen Med Res*. 2014; 2(3): 1186-2050.
10. Bhatia S.K. Tissue engineering for clinical applications. *Biotechnol J*. 2010; 5: 1309-23.
11. Lam F.W., Vijayan K.V., Rumbaut R.E. Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells. *Compr Physiol*. 2015; 5(3): 1265-80.
12. Morrell C.N., Aggrey A.A., Chapman L.M., Modjeski K.L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014; 123(18): 2759-67.
13. Yamamoto H., Gurney M. E. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci*. 1990; 10: 3469-78.
14. Chacon-Fernandez P., Sauberli K., Colzani M., Moreau T., Ghevaert C., Barde Y.A. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2016; 291(19): 9872-81.
15. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*. 1967; 13(3): 269-88.
16. Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 392-401.
17. Simak J., Gelderman M.P. Cell membranemicroparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*. 2006; 20: 1-260.
18. Antwi-Baffour S., Adjei J., Aryeh C., Kyeremeh R., Kyei F., Seidu M.A. Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *ImmunInflamm Dis*. 2015; 3(3): 133-40.
19. Burnouf T., Goubran H.A., Chou M.L., Devos D., Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev*. 2014; 28(4): 155-66.
20. Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern J.N., Ponomarev E.D., Duckett L. et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol*. 2013; 14: 23.
21. Lai C.P., Breakefield X.O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3: 228.
22. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res*. 2012; 93: 633-44.
23. Christianson H.C., Svensson K.J., van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 17380-5.
24. Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. Down regulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*. 1998; 4: 31-6.
25. Mazzucco L., Borzini P., Gope R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function. *Transfus. Med. Rev*. 2010; 24: 218-34.
26. Hara M.R., Snyder S.H. Cell signaling and neuronal death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007; 47(1): 117-41.
27. Luk'janova L.D. Mitochondrial dysfunction — the molecular mechanisms of hypoxia. *Patogenez*. 2003; 1: 52-67. (in Russian)
28. Luk'janova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signal pathways and their role in the system regulation. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'najaterapija*. 2011; 1: 3-19. (in Russian)
29. Posada-Duque R.A., Barreto G.E., Cardona-Gomez G.P. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8: 231.
30. Shichita T., Ito M., Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8: 319.
31. Ortega F.J., Jolkkonen J., Mahy N., Rodriguez M.J. Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013; 33(3): 356-64.
32. Ruan L., Wang B., Zhu Ge Q., Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res*. 2015; 1623: 166-73.
33. Thored P., Arvidsson A., Cacci E., Ahlenius H., Kallur T., Darsalia V., et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006; 24: 739-47.
34. Jin K., Wang X., Xie L., Mao X O., Zhu W., Wang Y., et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2006; 103: 13198-202.
35. Marlier Q., Verteneuil S., Vandenbosch R., Malgrange B. Mechanisms and functional significance of Stroke-Induced neurogenesis. *Front Neurosci*. 2015; 9: 458.
36. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. Genetic influence in the dentate gyrus of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 10409-14.
37. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96: 25-34.
38. Lin R., Iacovitti L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res*. 2015; 1628(Pt B): 327-42.
39. Lin R., Cai J., Nathan C., Wei X., Schleidt S., Rosenwasser R. et al. Neurogenesis is enhanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. *Neurobiol Dis*. 2015; 74: 229-39.
40. Heinrich C., Bergami M., Gascon S., Lepier A., Vigano F., Dimou L. Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Reports*. 2014; 3: 1000-14.
41. Bonfanti L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. *Front Neurosci*. 2016; 10: 44.
42. Cajal S.R. *The croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. Proceedings of the Royal Society of London*. London: Harrison and Sons; 1894; 444-68.
43. Lee W.C., Huang H., Feng G., Sanes J.R., Brown E.N., So P.T. et al. Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex. *PLoS Biol*. 2006; 4(2): e29.
44. Capani F., Quarracino C., Caccuri R., Sica R.E. Astrocytes As the Main Players in Primary Degenerative Disorders of the Human Central Nervous System. *Fron. Aging Neurosci*. 2016; 8: 45.
45. Liu Z., Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2015; 15(3): 301-82.

46. Swanson R. A., Ying W., Kauppinen T. M. Astrocyte influence on ischemic neuronal death. *Curr. Mol. Med.* 2004; 4: 193-205.
47. Allen N.J. Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2013; 23: 1027-33.
48. Magnusson J.P., Goritz C., Tatarishvili J., Dias D.O., Smith E.M., Lindvall O. A. Latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science.* 2014; 346(6206): 237-41.
49. Miron V.E., Franklin R.J. Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem.* 2014; 130(2): 165-71.
50. Zlokovic B.V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in neurosciences.* 2005; 28(4): 202-8.
51. Trost A., Lange S., Schroedl F., Bruckner D., Motloch K.A., Bogner B. et al. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10: 20.
52. Mozrzymas J.W., Kaczmarek L. Editorial: Neuroplasticity and Extracellular Proteolysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 10: 59.
53. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005; 67: 30-8.
54. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Brill A., Varon D., Leker R.R. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Curr. Neurovasc. Res.* 2012; 9: 185-92.
55. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Varon D., Leker R. R. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. *Thromb. Haemost.* 2013; 110: 323-30.
56. Larphavesarp A., Ferriero D.M., Gonzalez F.F. Growth factors for the treatment of ischemic brain injury (growth factor treatment). *Brain Sci.* 2015; 5(2): 165-77.
57. Kimura R., Nakase H., Tamaki R., Sakaki T. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction. *Stroke.* 2005; 36: 1259-63.
58. Suzuki Y., Nagai N., Umemura K.A. Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10: 2.
59. Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C. et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest.* 2000; 106: 829-38.
60. Emerich D.F., Silva E., Ali O., Mooney D., Bell W., Yu S.J. et al. Injectable VEGF hydrogels produce near complete neurological and anatomical protection following cerebral ischemia in rats. *Cell Transplant.* 2010; 19(9): 1063-71.
61. Dziejko M., Derugin N., Wendland M.F., Vexler Z.S., Ferriero D.M. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl Stroke Res.* 2013; 4(2): 189-200.
62. Yang J., Yao Y., Chen T., Zhang T. VEGF ameliorates cognitive impairment in vivo and in vitro ischemia via improving neuronal viability and function. *Neuromol. Med.* 2014; 16: 376-88.
63. Greenberg D.A., Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70: 1753-61.
64. Kim G., Kim E. The effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats. *J Phys Ther Sci.* 2013; 25(5): 553-6.
65. El-Tamawy M.S., Abd-Allah F., Ahmed S.M., Darwish M.H., Khalifa H.A. Aerobic exercises enhance cognitive functions and brain derived neurotrophic factor in ischemic stroke patients. *NeuroRehabilitation.* 2014; 34(1): 209-13.

Сведения об авторе: Пальцын Александр Александрович, д.м.н., профессор, зав. лабораторией регуляции репаративных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва