

УДК 611.13/.16–018:616–018.2–005.4–085.849.19+612.015.13

## МЕХАНИЗМЫ ЛАЗЕРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НЕОАНГИОГЕНЕЗА

Е.С. Головнева, Г.К. Попов, А.И. Козель

e-mail: main@cgilh.chel.su

Челябинский государственный институт лазерной хирургии ЮУНЦ РАМН, г. Челябинск, Россия

Статья поступила 15 октября 2004 г.

### Введение

Начиная с последнего десятилетия двадцатого века в сердечно–сосудистой хирургии получило развитие новое направление — реваскуляризация ишемизированных тканей воздействием высокоинтенсивных лазеров. Одной из первых операций, выполненных с помощью высокоинтенсивного лазерного излучения, явилась трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация. Предполагалось, что ишемизированные ткани будут перфузироваться за счет выбрасываемого под давлением объема крови из левого желудочка. Однако накапливающийся клинический опыт показал, что создаваемые лазером каналы со временем закрываются. Вместе с тем, данная операция сопровождается достаточно выраженным клиническим эффектом: снижается гипоксия миокарда, улучшаются показатели перфузии. Чем же объяснить позитивный эффект ТМЛР при ишемическом синдроме? В дальнейших исследованиях было показано, что на месте облитерированных лазерных каналов в соединительно–тканых структурах образуется новая сеть кровеносных сосудов, обеспечивающая улучшение кровоснабжения в оперируемом миокарде [1].

Мы полагаем, что лазерное воздействие является универсальным пусковым моментом неоангиогенеза не только в миокарде, но и в других ишемизированных тканях, благодаря развитию местного воспалительного процесса и реакции на лазерное повреждение ряда клеточных элементов. Высокоинтенсивное лазерное воздействие реализует выход факторов роста из клеток и из депо во внеклеточном матриксе, а также усиливает локальную ферментную активность в ходе заживления лазерной раны.

Согласно современным представлениям о формировании новых сосудов, первым необходимым условием неоангиогенеза является наличие в тканях достаточного уровня ангиогенных факторов роста. Эти факторы стимулируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных и гладкомышечных сосудистых клеток. Факторами роста также осуществляется регуляция клеточной протеолитической активности, благодаря этому становится возможным лизис внеклеточного матрикса и ремоделирование тканевых структур [5, 7, 8]. Наше исследование было направлено на выяснение механизмов неоангиогенеза, наблюдаемого при лазерном воздействии в нормальном и ишемизированном миокарде, ишемизированных мышцах бедра и печени с циррозоподобными изменениями.

### 1. Методика исследования

Эксперимент проводился на 590 беспородных крысах, с применением YAG:Nd и диодного лазера (длина волны 805 нм). В сердце формировался один лазерный канал. В ишемизированных мышцах бедра и в печени с циррозоподобными постишемическими изменениями создавалось 2 лазерных канала глубиной 3–5 мм. Морфология лазерных каналов изучалась на парафиновых срезах с применением стандартных окрасок, тучные клетки выявлялись толудиновым синим (рН 2.0), экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия и основного фактора роста фибробластов оценивалась иммуногистохимически с использованием специфических моноклональных антител, функциональная активность фибробластов и тромбоцитов изучалась с применением

сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, активность протеолитических ферментов оценивалась методом прямой зимографии после предварительного электрофореза белков тканей. Лазерная доплеровская флуометрия показателей микроциркуляции в тканях мышц и печени проводилась прибором ЛАКК-01 (Россия).

## 2. Результаты и обсуждение

В связи с особенностями гистоструктуры органов-мишеней лазерного воздействия нами были выявлены некоторые отличия в морфологии лазерных каналов на ранних сроках после операции. Так, каналы в миокарде заполнялись кровью из полости левого желудочка и в течение нескольких минут тромбировались. Лазерные каналы в мышцах заполнялись экссудатом, практически не содержащим эритроцитов, позднее отмечалось выпадение нитей фибрина. В печени отмечались как каналы содержащие форменные элементы крови, так и прозрачный экссудат.

В дальнейшем морфологические изменения в различных органах были достаточно сходными. В конце первых суток в зонах воздействия наблюдалась слабая нейтрофильная инфильтрация, а позднее отмечалась выраженная пролиферация макрофагов и фибробластов.

Начиная с 5-х суток, в грануляционной ткани мы регистрировали появление многочисленных капилляров, строение стенок которых дифференцировалось с течением времени. В печени также отмечалась пролиферация холангиол. К 20-м суткам эксперимента зоны лазерного воздействия полностью замещались нежнотоволокнистой соединительной тканью с сосудами. В миокарде и мышцах исчезали проявления ишемии, в печени исчезали явления дистрофии гепатоцитов.

Через три месяца после лазерного воздействия участки лазерного повреждения представляли собой соединительно-тканые тяжи, имеющие на поперечном срезе звездчатую форму. В соединительной ткани имелось множество сосудов, как крупных капилляров, так и артериол, венул, анастомозирующих с густой сетью кровеносных сосудов, расположенной в тканях, окружающих очаги лазерного воздействия.

Оценка площади образованного в области лазерного очага сосудистого русла показала, что в миокарде (как нормальном так и ишемизированном) этот показатель был максимален на 10 сутки эксперимента, в момент расцвета грануляционной ткани. Затем площадь сосудистого русла несколько уменьшалась, но все же через три месяца после лазерного воздействия в два раза превышала начальный уровень. В мышцах наблюдалась несколько иная динамика сосудистого роста, отмечалось неуклонное нарастание площади сосудистой сети вплоть до 90 суток эксперимента. При этом индекс соотношения капилляров и мышечных волокон в ткани вокруг лазерного очага увеличивался лишь до 10 суток и позднее практически не изменялся, что свидетельствовало об ограниченном характере процесса неоангиогенеза в области лазерного повреждения. В области лазерного воздействия на паренхиму печени нарастание площади сосудов констатировалось до 30-х суток эксперимента и в дальнейшем оставалось на достигнутом уровне. В портальных трактах печени, лежащих поблизости от лазерного очага прироста площади сосудистой сети не отмечалось.

Изучение реакции тучных клеток в зоне лазерного повреждения выявило резкое усиление их дегрануляции (с максимумом на сроке 1—2 минуты), и увеличение количества тучных клеток (наибольшее на 5—10-е сутки). Эти явления отмечались нами до 20-го дня эксперимента.

Такая массивная дегрануляция тучных клеток очевидно была обусловлена термическим эффектом лазерного воздействия, а позднее могла поддерживаться факторами, выделяющимися в ходе местного воспалительного процесса. Интерлейкины 1 $\beta$ , 6, 8, компоненты комплекса С3а, С5а, ряд цитокинов, выделяемых нейтрофилами и макрофагами, факторы роста являются хемоаттрактантами для тучных клеток и стимулируют их дегрануляцию.

С первых минут и до 5-х суток эксперимента наблюдалась активация тромбоцитов на стенках лазерного канала и в сосудах перифокальной зоны. Тромбоциты меняли форму, отмечались псевдоподии, дегрануляция с освобождением  $\alpha$  гранул и образование агрегатов. Максимальный уровень дегрануляции кровяных пластинок отмечался сразу же после лазерного воздействия, то есть главную роль в активации тромбоцитов несомненно играли высокие температуры и факторы системы свертывания, стимулированной продуктами разрушенных тканей.

Реакция фибробластов в зоне лазерного воздействия характеризовалась ранним началом (уже с первых суток), активной пролиферацией с образованием клеточных тяжей и усилением

функциональной активности клеток. Нами была отмечена резкая гиперплазия гранулярного эндоплазматического ретикулума фибробластов.

Проведенные иммуногистохимические исследования с использованием специфических антител показали повышение уровня факторов роста в тканях в ответ на лазерное воздействие. Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) повышалась с первых суток опыта и достигала максимума к 10–м суткам.

Известно, что фактор роста сосудистого эндотелия играет ведущую роль в регуляции неоангиогенеза, за счет своей способности повышать сосудистую проницаемость и активировать протеолитические процессы в окружающих тканях [4, 6, 7]. Источниками ФРСЭ первоначально служили тромбоциты и нейтрофилы, а позже пролиферирующий эндотелий и макрофаги.

Уровень основного фактора роста фибробластов (оФРФ) был максимальным на 5–10 сутки после лазерного воздействия и постепенно снижался к 90 суткам. оФРФ действует как синергистом ФРСЭ и повышает его синтез клетками и чувствительность к его воздействию. Еще одной особенностью оФРФ является способность повышать устойчивость клеток к гипоксии [2, 9]. Основными производителями оФРФ по нашим наблюдениям являлись тучные клетки и эндотелий.

В зоне лазерного повреждения также отмечалось повышение активности протеолитических ферментов. Так, активность матриксной металлопротеиназы–2 усиливалась с 5–х суток, а на 10–е сутки опыта появлялась активность матриксной металлопротеиназы–9. На 20–30–е сутки эксперимента активность этих ферментов была максимальной, а к 90–м суткам почти возвращалась к норме. Суммарная активность активаторов плазминогена увеличивалась с первых суток после лазерного воздействия, была максимальной на 5–10–е сутки и постепенно снижалась к 3–м месяцам. Источниками протеолитических ферментов являются все мигрирующие клетки. Последовательно сменяя друг друга, нейтрофилы, макрофаги, эндотелий, гладкомышечные клетки и фибробласты создавали в области лазерного повреждения тканей уровень ферментной активности, необходимый для преобразования внеклеточного матрикса и роста новых сосудистых петель. Показано, что факторы роста усиливают синтез протеаз клетками, поддерживая процессы миграции [2, 5, 8].

Анализируя полученные результаты, мы пришли к выводу о том, что основным в механизме действия высокоинтенсивного лазера является дозированное повреждение ткани миокарда, мышц, печени которое и приводит к активации разнообразных неспецифических клеточных элементов — тучных клеток, тромбоцитов, фибробластов, а также участвующих в развитии воспаления нейтрофилов и макрофагов. Эти клетки являются источниками целого комплекса факторов роста, в частности фактора роста сосудистого эндотелия и фактора роста фибробластов, играющих ключевую роль в стимуляции процесса неоангиогенеза, пролиферации и миграции эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Достаточная активность протеолитических ферментов, отмечаемая нами в зоне лазерного воздействия, создает возможности для лизиса экстрацеллюлярного матрикса и существовавших ранее сосудистых структур с последующим формированием новой капиллярной сети.

## Заключение

Неоангиогенез в случае лазерного воздействия является естественным, стереотипным ответом ткани на повреждение, будь то миокард, мышцы конечностей или печень. Образовавшиеся сосуды способны компенсировать дефицит кровоснабжения тканей, либо выступать в роли внутрипеченочных portoкавальных анастомозов, устраняя явления портальной гипертензии при циррозах печени.

Разработанные нами новые методики лечения успешно применяются в клинике нашего института. Операция трансмиокардиальной реваскуляризации проведена 280 пациентам, реваскуляризация мышц нижних конечностей 260, реваскуляризация печени по поводу циррозом печени, осложненным явлениями портальной гипертензией, — проведена у 12 пациентов. Во всех случаях отмечался хороший клинический эффект, подтвержденный методами функциональной диагностики.

## Список литературы

1. Козель А.И., Гиниатуллин Р.У., Евдокимов С.В., Головнева Е.С. Экспериментально–морфологические аспекты трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации // Хирургия, 2000. № 11. С. 8–10.

2. Fujisawa T., Hattori T., Tokashi K. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1 // *J. Biochem.*, 1999. Vol. 245. P. 966—975.
3. Moscatelli D., Flaumenhaft D., Sascela O. Interaction of basic fibroblast growth factor with extracellular matrix and receptors // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998. Vol. 650. P. 177—181.
4. Pepper M.S., Mandriota S., Jeltsch M. et al. Vascular endothelial growth factor C synergizes with basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro and alter endothelial cell extracellular proteolytic activity // *J. Cell. Physiol.*, 1998. Vol. 177. P. 439—452.
5. Qu Z., Liebler J.M., Rowers M.R. et al. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma // *Am. J. Pathol.*, 1995. Vol. 147. P. 564—573.
6. Sellke F.W., Laham R.J., Edelman E.R. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results // *Ann. Thorac Surg.*, 1998. Vol. 65. P. 1540—1544.
7. Senger D. R. Molecular framework for angiogenesis // *Am. J. Pathol.*, 1996, Vol. 149. P. 1—7.
8. Tyagi S., Kumar S., Cassatt S. Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion // *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1996. Vol. 4. P. 983—995.
9. Yanagisawa-Miva A., Uchida Y., Nacamura F. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor // *Science*, 1992. Vol. 257. P. 1401—1405.