

# ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ РОСТА В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ И АРТЕРИАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМ КАК МАРКЕРНЫЙ ПРИЗНАК ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

УДК 611—018.74:616.13—007.644—092

Поступила 13.10.2010 г.



**А.Д. Урыков**, ассистент кафедры патологической анатомии;  
**А.А. Артифехова**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии;  
**В.Д. Трошин**, д.м.н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

**Цель исследования** — изучение особенностей экспрессии ангиогенных медиаторов в эндотелиоцитах, а также их пролиферативной активности в артериовенозных мальформациях (АВМ) и артериальных аневризмах (АА), что позволит назначать патогенетически обоснованное лечение и выявлять риск развития осложнений в зависимости от уровня экспрессии.

**Материалы и методы.** Изучен операционный и секционный материал 35 больных (17 женщин и 18 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет с АВМ и АА сосудов головного мозга, проходивших лечение в НОКБ им. Н.А. Семашко с 2002 по 2009 г.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (ЭФР), трансформирующего фактора роста  $\beta 3$  (ТФР- $\beta 3$ ), основного фактора роста фибробластов  $\beta$ -ФРФ и маркера пролиферации Ki-67 проводили иммунопероксидазным методом с докраской ядер гематоксилином.

**Результаты.** Во всех наблюдениях АВМ в эндотелиоцитах выявлена значительно повышенная экспрессия ТФР- $\beta 3$ . В АА повышение уровня экспрессии ТФР- $\beta 3$  не выявлено.

В эндотелии АВМ умеренно повышена экспрессия сосудистого ЭФР, при этом она не повышена в эндотелии АА. Экспрессия  $\beta$ -ФРФ в обоих случаях была низкой или незначительно повышенной, при этом в эндотелии АВМ она была более высокой.

**Заключение.** Выявленные особенности экспрессии факторов роста в эндотелиоцитах АВМ отражают различия в морфогенезе и патогенезе данных образований. Повышенная пролиферативная активность эндотелия в АВМ может лежать в основе развития рецидивов заболевания. Поскольку уровень экспрессии рецепторов является специфическим маркерным признаком данной патологии, оценка рецепторного профиля является важной характеристикой, лежащей в основе определения прогноза и назначения патогенетически обоснованного лечения. В случаях высокой экспрессии ЭФР можно говорить о значительной вероятности прогрессирования АВМ, что приводит к появлению клинических симптомов, служит причиной развития осложнений и летального исхода.

**Ключевые слова:** факторы роста сосудов, сосудистые мальформации, артериальные аневризмы.

## English

### Expression of the growth factors in the endotheliocytes of arteriovenous malformations and arterial aneurisms as a marked sign of their differential diagnosis

**A.D. Urykov**, Tutor of the Pathological Anatomy Department;  
**A.A. Artifexova**, MD, Professor, Head of the Pathological Anatomy Department;  
**V.D. Troshin**, MD, Professor, Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics Department

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

**The aim** of the investigation is to study the peculiarities of angiogenic mediator expression in the endotheliocytes and their proliferative activity in the arteriovenous malformations (AVM) and arterial aneurisms (AA) as well. It gives an opportunity to prescribe a pathogenetically substantiated treatment and reveal the complication development risk according to the expression level.

Для контактов: Урыков Алексей Дмитриевич, тел. моб. +7 910-385-46-28; e-mail: Alexey351@yandex.ru.

**Materials and methods.** Under studies there has been surgical and sectional material of 35 patients (17 females and 18 males) at the age of 18—65 years with AVM and AA of the brain vessels. They have been treated at the hospital from 2002 to 2009.

The immunohistochemical investigation of the expression of the vascular endothelial growth factor (EFG), transforming growth factor  $\beta 3$  (TGF), basic factor of the fibroblast growth  $\beta$ -FGF and proliferation marker Ki-67 has been made with an immunoperoxidase method. The nuclei were stained with a hematoxylin.

**Results.** A significantly increased expression of a TGF- $\beta 3$  has been revealed in all the AVM observations in the endotheliocytes. An increase of a TGF- $\beta 3$  expression has not been revealed.

A vascular EFG expression is moderately increased in the AVM endothelium; but it is not increased in the AA endothelium. The  $\beta$ -FGF expression in both cases is low or insignificantly increased. However, it was higher in the AVM endothelium.

**Conclusion.** The revealed peculiarities of the growth factor expression in the AVM endotheliocytes appear to reflect the differences in the morphogenesis and pathogenesis of the given formations. An increased proliferative activity of the endothelium in the AVM is likely to be the basis of the disease recurrence. A receptor profile assessment is crucially important to prognose and to prescribe a pathogenetically substantiated treatment. The research proves that the receptors expression level is a specific marked sign of the given pathology. In cases of the EFG high expression it may be evidence of high probability of the AVM progression, which leads to the clinical symptoms. Moreover, it may be the reason for the complication development and a lethal outcome.

**Key words:** vessels growth factors, vascular malformations, arterial aneurisms.

Врожденные и приобретенные заболевания сосудов головного мозга не являются редкой патологией и вносят определенный вклад в летальность, в том числе и пациентов молодого возраста. Наиболее распространенной врожденной патологией сосудов являются артериовенозные мальформации (АВМ), эмбриогенез которых до конца не изучен. Известно только, что повреждающее действие на процессы ангиогенеза должно реализоваться до шестой недели эмбриогенеза — до начала формирования сосудистых ветвей головного мозга, пока не произошла дифференциация первичных капилляров на артерии и вены. Непосредственное формирование АВМ происходит между 7-й и 12-й неделями развития. Повреждающими факторами могут являться онкогены и тератогены, ишемия, аноксия, метаболические и генетические аномалии, травмы и ионизирующая радиация.

Наиболее вероятной причиной образования АВМ является нарушение интегрирования гена р38 митоген-активированной протеинкиназы, регулирующей процессы ангиогенеза, в результате аутомсомной мутации в генах ССМ1, ССМ2 и ССМ3. Гены, имеющие отношение к ангиогенезу, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста (ЭФР), ангиопоэтин и другие компоненты семейства эфринов, не дифференцируются в эфферентных сосудах и ядре АВМ, что указывает на возможную роль эфрина А1 в формировании мозговых сосудистых мальформаций. Однако, несмотря на подавляющую роль эмбриональных факторов, АВМ могут сформироваться в более позднем периоде в результате очагового неогиперангиогенеза в участках поврежденной нервной ткани (образование АВМ de novo после лучевой терапии по поводу опухолей головного мозга, после перенесенного энцефаломиелимита, у пациентов с болезнью мойя-мойя и серповидно-клеточной анемией) [1, 2].

Происхождение внутричерепных артериальных аневризм (АА), по-видимому, многофакторное. Развитие их происходит при сочетании нескольких причин: наличия дегенеративных изменений сосудистой стенки и факторов, их вызывающих. В пользу врожденного проис-

хождения АА свидетельствуют множественные стигмы: аномалии развития сосудов виллизиева круга, гипоплазия почечной артерии и др. Наследственная передача склонности к развитию аневризм сомнительна, однако ближайшим родственникам больных с АА, имеющих стигмы эмбриогенеза, показано проведение магнитно-резонансной внутричерепной ангиографии [3—5]. Часто встречается врожденная предрасположенность в сочетании с гемодинамическими нарушениями (так называемые бифуркационно-гемодинамические АА), когда АА появляются вследствие врожденных дефектов в мышечном слое церебральных артерий, чаще наблюдаемых в местах их бифуркации, во многом обусловленных дефицитом коллагена III типа. Формированию АА могут способствовать как регионарные (АВМ, фиброзно-мышечная дисплазия и др.), так и системные (гипертоническая болезнь, поликистоз почек, коарктация аорты) гемодинамические нарушения. Так, при гипертонической болезни сосудистая стенка мелких артерий мозга подвергается гиалинизации. «Атеросклеротические» аневризмы образуются из-за дегенеративных изменений сосудистой стенки, приводящих к ее ослаблению, что особенно ярко проявляется в крупных сосудах в местах изгибов, поворотов, где происходят гемодинамические удары. В ряде случаев эластический слой погибает, поврежденная током крови интима может отслаиваться на этом участке, и постепенно формируется локальное выпячивание — аневризма. Из литературных сведений понятно лишь то, что в патогенезе сосудистых аномалий большую роль играет нарушение взаимоотношений между основными медиаторами ангиогенеза. Изучение их не только расширяет наши знания о врожденных аномалиях, но и позволяет разработать новые эффективные методы лечения.

**Цель исследования** — изучение особенностей экспрессии ангиогенных медиаторов в эндотелиоцитах, а также их пролиферативной активности в артериовенозных мальформациях и артериальных аневризмах, что позволит назначать патогенетически обоснованное лечение и выявлять риск развития осложнений в зависимости от уровня экспрессии.

**Материалы и методы.** Исследован операционный и секционный материал 35 больных (17 женщин и 18 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет с АВМ и АА сосудов головного мозга, проходивших лечение в НОКБ им. Н.А. Семашко с 2002 по 2009 г. В 17 случаях диагностированы АВМ (10 женщин и 7 мужчин), в 18 — АА (7 женщин и 11 мужчин).

Полученные кусочки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Гистологическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование экспрессии сосудистого ЭФР (ф. DBC; 1:50), трансформирующего фактора роста  $\beta 3$  (ТФР- $\beta 3$ ) (ф. DBC; 1:100), основного фактора роста фибробластов ( $\beta$ -ФРФ) (ф. BioGenex; 1:30) и маркера пролиферации Ki-67 (ф. BioGenex; 1:30) проводили иммунопероксидазным методом с докраской ядер гематоксилином. Результаты реакции с антителами к факторам роста оценивали полуквантитативным методом с учетом интенсивности окрашивания цитоплазмы эндотелиоцитов и выражали в баллах: 0 — отрицательная реакция, 1 балл — слабая реакция, 2 балла — реакция средней интенсивности, 3 балла — интенсивная реакция. Оценку числа Ki-67 позитивных клеток выражали в процентах к общему количеству эндотелиоцитов.

**Результаты.** При гистологическом исследовании АВМ выявлены хаотично расположенные сосуды артериального и венозного типа диаметром 4—15 мкм. В артериях и венах АВМ найдены утолщение базальной мембраны эндотелия, дегенерация внутренней эластической мембраны с ее фрагментацией и расщеплением. В просвете как артерий, так и вен определяли множественные пристеночные и обтурирующие тромбы, некоторые из них имели признаки реканализации. В части случаев из-за выраженных вторичных изменений определение типа сосуда оказалось невозможным. В веществе головного мозга, заключенном между сосудами, выявляли глиоз, фокусы петрификации и последствия старых кровоизлияний в виде кистозных полостей, скопления гемосидерофагов, отложения гемосидерина. Подобные изменения обнаруживали и в участках мозга, расположенных на некотором расстоянии от АВМ, что было отмечено и другими исследователями [1, 2, 6—9].

Гистологическая картина АА представляла собой участок расширения сосуда различного размера с истончением стенки, наиболее выраженного в области дна, преимущественно за счет снижения числа мышечных клеток, а также фиброз стенки аневризмы. В части образцов в аневризме определяли пристеночные тромбы. По периферии АА в ряде случаев обнаруживали кровоизлияния различной давности.

Как следует из данных иммуногистохимического исследования сосудистых аневризм и

АВМ (см. таблицу), во всех наблюдениях АВМ в эндотелиоцитах выявлена значительно повышенная экспрессия ТФР- $\beta 3$ . В АА повышения уровня экспрессии этого фактора не отмечено.

Кроме того, в эндотелии АВМ установлена умеренно повышенная экспрессия сосудистого ЭФР. При этом она также не была повышена в эндотелии АА. Экспрессия  $\beta$ -ФРФ в эндотелиоцитах АА и АВМ была низкой или незначительно повышенной, при этом более высокая экспрессия наблюдалась в эндотелии АВМ.

Индекс пролиферации эндотелиоцитов сосудов крупного и среднего диаметра, АВМ и аневризм был низким (наблюдались лишь единичные экспрессирующие Ki-67-клетки — 0,1%), однако пролиферативная активность сосудов мелкого диаметра, расположенных в периферических отделах мальформаций, была умеренно повышена (3—4%).

**Обсуждение.** Система ТФР- $\beta 3$  и его рецепторов (ALK1, ALK5 и др.) играет важную роль на разных стадиях ангиогенеза, включая васкулогенез. В раннем эмбриогенезе экспрессия ТФР- $\beta 3$  характерна для многих тканей, в том числе для эндотелиальных и гемопоэтических клеток-предшественников. В опытах на животных показано, что инактивация ТФР- $\beta 3$  у зародышей мышей ведет к их гибели (в 50% случаев — у гетерозигот и в 25% — у гомозигот) на ранних сроках беременности [9]. Несмотря на то, что при отсутствии экспрессии ТФР- $\beta 3$  начальные этапы дифференцировки мезодермальных клеток-предшественников в эндотелиоциты протекают нормально, последующее их развитие с формированием капиллярноподобных трубочек ведет к образованию аномальных сосудов с дефектами стенок. Отсутствие у мышей рецептора ТФР- $\beta 3$  2-го типа ведет к развитию сходных аномалий, что также доказывает важную роль системы ТФР- $\beta 3$ —ТФР- $\beta 3$ -рецептор в формировании целостной сосудистой стенки [2, 9].

Кроме того, в литературе имеются сведения о роли системы ТФР- $\beta 3$  в развитии ангиодисплазий и их рецидивов после хирургических вмешательств. Установлено, что рост эндотелиоцитов АВМ не изменяется при введении в их культуру ТФР- $\beta 3$ , тогда как темпы роста эндотелиоцитов нормальных тканей замедляются и клетки подвергаются апоптозу [5].

На операционном материале нами отмечена умеренно повышенная экспрессия ТФР- $\beta 3$  в эндотелиоцитах АВМ, что, возможно, свидетельствует о незначительной его роли в патогенезе данного типа ангиодисплазий. Однако в трех случаях она была высокой, что подтверждает предположение о возможном влиянии

Результаты иммуногистохимического исследования аневризм и АВМ

Факторы риска	Уровень экспрессии							
	Отрицательная реакция		1 балл		2 балла		3 балла	
	АВМ	АА	АВМ	АА	АВМ	АА	АВМ	АА
ТФР- $\beta 3$	—	17	—	1	14	—	3	—
ЭФР	1	2	2	11	13	5	1	—
$\beta$ -ФРФ	—	1	2	14	15	2	—	—

ТФР- $\beta$ 3 на развитие сосудистой аномалии именно артериовенозного типа.

Семейство сосудистого ЭФР (VEGF) представлено несколькими секреторными гликопротеинами (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E). Все представители семейства могут связываться с VEGF тирозинкиназными рецепторами 1, 2 и 3-го типа (VEGFRs). Установлено, что VEGF-A является одним из наиболее важных регуляторов процесса ангиогенеза *in vivo*, особенно на ранних его этапах. Гиперэкспрессия VEGF-C и VEGF-D у трансгенных мышей приводит к формированию гиперпластических лимфатических сосудов, напротив, подавление этих медиаторов ведет к остановке роста лимфатических сосудов [7, 9].

В настоящее время роль нарушений в системе VEGF—VEGFRs наиболее полно изучена при сосудистых мальформациях ЦНС. Так, в эндотелии АВМ головного мозга и окружающих астроцитах отмечена повышенная в разной степени экспрессия представителей семейства VEGF (A, B, C, D) и их рецепторов (Flk-1, Flt-1 и Flt-4) [10].

В нашем исследовании в большинстве случаев выявлена умеренно повышенная экспрессия сосудистого ЭФР в эндотелии АВМ. Особенно высокой она была в эндотелиоцитах сосудов артериального типа.

Указанные особенности экспрессии ЭФР подтверждают его участие в патогенезе АВМ центральной нервной системы, однако для доказательства этого и выяснения роли ЭФР в развитии рецидивов ангиодисплазий такого типа необходимо проведение молекулярно-генетических исследований.

Роль системы  $\beta$ -ФРФ, включающей 22 полипептидных соединения, в патогенезе сосудистых мальформаций практически не изучена. Нами выявлена низкая или незначительно повышенная экспрессия  $\beta$ -ФРФ в эндотелиоцитах изученных мальформаций [11, 12].

Для оценки пролиферативной активности клеток в настоящее время используются два иммуногистохимических маркера — Ki-67 и PCNA, при этом Ki-67 выявляет пролиферирующие клетки, находящиеся на разных фазах цикла, и отражает весь пул делящихся клеток, являясь наиболее четким маркером пролиферации. Белок Ki-67 является короткоживущим протеином, который разрушается в течение 1—1,5 ч после начала синтеза, поэтому он не накапливается и не выявляется в покоящихся клетках [1, 8].

В результате проведенных иммуногистохимических исследований экспрессии Ki-67 установлена низкая пролиферативная активность эндотелиоцитов АВМ. Однако в отдельных наблюдениях выявлена умеренно повышенная пролиферативная активность эндотелия. У таких пациентов, на наш взгляд, значительно увеличен риск развития рецидивов заболевания после хирургического лечения.

**Заключение.** Выявленные особенности экспрессии факторов роста в эндотелиоцитах артериовенозных мальформаций отражают различия в морфогенезе и

патогенезе данных образований. Повышенная пролиферативная активность эндотелия в артериовенозных мальформациях может приводить к развитию рецидивов заболевания. Поскольку уровень экспрессии рецепторов является специфическим маркерным признаком данной патологии, оценка рецепторного профиля является важной характеристикой, лежащей в основе определения прогноза и назначения патогенетически обоснованного лечения. В случаях высокой экспрессии эндотелиального фактора роста можно говорить о значительной вероятности прогрессирования артериовенозной мальформации, что приводит к появлению клинических симптомов, служит причиной развития осложнений и летального исхода.

## Литература

1. *Sure U., Butz N., Schlegel J. et al.* Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. *J Neurosurg* 2001; 94(6): 972—977.
2. *Uranishi R., Baev N.I., Ng P.Y. et al.* Expression of endothelial cell angiogenesis receptors in human cerebrovascular malformations. *Neurosurgery* 2001; 48(2): 359—367.
3. *Милованов А.П.* Патоморфология ангиодисплазий конечностей. М; 1978.
4. *Мишнёв О.Д., Щёголев А.И.* Ангиодисплазии (врожденные пороки развития сосудов). М; 2008.
5. *Chen Y.G., Massague J.* Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth Factor- $\beta$  family receptors. *J Biol Chem* 1999; 274(6): 3672—3677.
6. *Hiratsuka S., Maru Y., Okada A. et al.* Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(3): 1207—1213.
7. *Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K. et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5(1): 74—80.
8. *Meijer-Jorna L.B., van der Loos C.M., de Boer O.J. et al.* Microvascular proliferation in congenital vascular malformations of skin and soft tissue. *J Clin Pathol* 2007; 60(7): 798—803.
9. *Tille J.S., Pepper M.S.* Hereditary vascular anomalies: new insights into their pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2004; 24(9): 1578—1590.
10. *Koizumi T., Shiraishi T., Hagihara N. et al.* Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in and around intracranial arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 2002; 50(1): 117—124.
11. *Murakami M., Nguyen L.T., Zhang Z.W. et al.* The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008; 118(10): 3355—3366.
12. *Nakamura T., Mochizuki Y., Kanetake H., Karda S.* Signals via FGF receptor 2 regulate migration of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(4): 801—806.