

УДК 616.1-018.74-007+616.13-007.64]-037

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ РОСТА В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ И АРТЕРИАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ПРОГНОЗ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.Д. Урыков, В.Д. Трошин, А.А. Артифексова,
ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»,
ГВЗ «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»

Урыков Алексей Дмитриевич – e-mail: Alexey351@yandex.ru

Среди причин смерти сосудистые заболевания головного мозга занимают третье место после ишемической болезни сердца и онкопатологии. В работе приведены данные о экспрессии факторов роста в эндотелиоцитах артериальных аневризм и артериовенозных мальформаций, а также их пролиферативной активности. В исследовании определена связь выраженности клинической симптоматики и неблагоприятного исхода лечения с особенностями иммуногистохимического профиля.

Ключевые слова: аневризмы, мальформации, эндотелиоциты, иммуногистохимия.

Among causes of death brain vascular diseases take the third place after an ischemic heart trouble and cancer disease. In work the data about an expression of factors of growth in endotheliocytes arterial aneurysm and arteriovenous malformations, and also their proliferative activity is cited. In research communication of expression of clinical semiology and a failure of treatment with features of an immunohistochemical profile is defined.

Key words: aneurysms, malformation, endotheliocytes, an immunohistochemistry.

Введение

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 артерио-венозные 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 р38 митоген-активированной протеинкиназы, регулирующей процессы ангиогенеза, в результате аутоматной мутации в генах CCM1, CCM2 и CCM3. Гены, имеющие отношение к ангиогенезу, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста, ангиопоэтин и другие компоненты семейства эфрин, не дифференцируются в эфферентных сосудах и ядре АВМ, что указывает на возможную роль эфрина А1 в формировании мозговых сосудистых мальформаций. Однако, несмотря на подавляющее значение 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 энцефаломиелита, у пациентов с болезнью мойя-мойя и серповидноклеточной анемией) [1].

Происхождение внутричерепных артериальных аневризм (АА), по-видимому, многофакторное. Развитие аневризм происходит при сочетании нескольких причин: наличия дегенеративных изменений сосудистой стенки и факторов, их вызывающих. В пользу врожденного происхождения аневризм 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 артериальными аневризмами, имеющими стигмы эмбриогенеза, показано проведение магнитно-резонансной внутричерепной ангиографии [2, 3]. Часто встречается врожденная предрасположенность в сочетании с гемодинамическими нарушениями (так называемые бифуркационно-гемодинамические), 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 (артериовенозные мальформации, 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, током крови поврежденная интима может отслаиваться на этом участке и постепенно формируется локальное выпячивание – аневризма. Из литературных сведений становится понятно лишь то, что в патогенезе сосудистых аномалий большую роль играет нарушение взаимоотношений между основными медиаторами ангиогенеза, изучение которых не только расширяет наши знания о врожденных аномалиях, но и позволит разработать новые эффективные методы их лечения.

Целью работы являлось выяснение особенностей экспрессии ангиогенных медиаторов в эндотелиоцитах, а также их пролиферативной активности в артериовенозных мальформациях и артериальных аневризмах. Возможность назначения патогенетически обоснованного лечения и риска развития осложнений в зависимости от уровня экспрессии ангиогенных медиаторов. Оценка риска развития осложнений и определение прогноза заболевания на основе особенностей иммуногистохимического профиля.

Материалы и методы

В основу работы положен результат анализа операционного и секционного материала 35 больных (17 женщин и 18 мужчин) в возрасте от 18 до 71 года с артериовенозными мальформациями и артериальными аневризмами сосудов головного мозга, проходивших лечение в ГУЗ НОКБ им. Н.А. Семашко с 2002 по 2009 год. В 17 случаях диагностированы артериовенозные мальформации (10 женщин и 7 мужчин), возраст от 18 до 39 лет, в 18 – артериальные аневризмы (7 женщин и 11 мужчин), в возрасте от 42 до 71 года, причем 27 из них были старше 55 лет. Исследование также проводилось на базе Областной клинической больницы им. Н.А. Семашко. Под наблюдением находились 35 больных, проходивших лечение в нейрохирургическом отделении с 2001 по 2007 годы. 16 пациентов с артериовенозными мальформациями поступили в клинику в плановом порядке с диагнозом объемного образования головного мозга. Один больной был доставлен экстренно с картиной геморрагического инфаркта головного мозга без сознания. Семь пациентов не имели никаких жалоб и выявленная патология явилась случайной находкой при инструментальном обследовании. Остальные 9 пациентов имели сходные жалобы на головную боль разной степени выраженности и длительности, в том числе постоянные изнуряющие боли, у двоих, кроме того, имели место переходящие нарушения зрения, у одного – в сочетании с синкопальными состояниями потери ориентации и сознания. После проведенного обследования все пациенты данной группы были прооперированы с клипированием сосудов и удалением мальформации. В настоящее время 13 пациентов живы, из них 8 продолжают работать на прежних должностях, 3 человека социально адаптированы со сменой профессии на упрощенную, 2 пациента проходят реабилитацию. Из 3 умерших в 3 случаях причиной смерти был отек мозга в раннем послеоперационном периоде.

В группе больных с аневризмами сосудов головного мозга женщин было 7, все они относились к старшей возрастной группе и имели много сопутствующих патологий, включая сахарный диабет, ожирение 3–4-й степени, тяжелые формы ишемической болезни сердца и гипертонической болезни.

Возрастной разброс мужчин был более выраженным, как и спектр заболеваний, которыми они страдали. 13 пациентов поступили в больницу в экстренном порядке с картиной геморрагического инсульта, из них 10 пациентов умерли в больнице, еще 2 умерли в течение первого года после разрыва аневризмы, оставшийся пациент жив, имеет инвалидность первой группы, с трудом адаптируется к быту без мыслей о возвращении к профессиональной деятельности. Четверо пациентов с аневризмой без разрыва не имели жалоб, однако, при более тщательном выяснении, двое отметили преходящие умеренные головные боли. Остальные пациенты отмечали выраженные головные боли, эпизоды потери ориентации, преходящие кратковременные нарушения сознания и другие симптомы неврологического плана. В этой подгруппе результаты операции были более благоприятными – трое человек живы, в разной степени адаптированы к быту и труду, 1 пациент умер в раннем послеоперационном периоде от отека мозга.

Полученные кусочки ткани фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Гистологическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (ЭФР; «DBC», 1:50), трансформирующего фактора роста $\beta 3$ (ТФР- $\beta 3$; «DBC», 1:100), основного фактора роста фибробластов (β -ФРФ; «BioGenex», 1:30) и маркера пролиферации Ki-67 («BioGenex», 1:30) проводили иммунопероксидазным методом с докраской ядер гематоксилином. Результаты реакции с антителами к факторам роста оценивали полуколичественным 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 исследования

При гистологическом исследовании АВМ были выявлены хаотично расположенные сосуды артериального и венозного типа диаметром 4–15 мкм. В артериях и венах АВМ найдено утолщение базальной мембраны эндотелия, дегенерация внутренней эластической мембраны с ее фрагментацией и расщеплением. В просвете как артерий, так и вен определялись множественные как пристеночные, так и обтурирующие тромбы, часть из которых имели признаки реканализации. В части случаев из-за выраженных вторичных изменений определение типа сосуда оказалось невозможным. В веществе головного мозга, заключенном между сосудами, выявлялся глиоз, фокусы петрификации и последствия старых кровоизлияний в виде кистозных полостей, скопления гемосидерофагов, отложения гемосидерина. Подобные изменения обнаруживались и в участках мозга, расположенных на некотором отдалении от АВМ, что было обнаружено и другими исследователями.

Гистологическая картина артериальных аневризм представляла собой участок расширения сосуда различного размера с истончением стенки, наиболее выраженное в области дна, преимущественно за счет снижения числа мышечных клеток, а также фиброз стенки аневризмы. В части образцов в аневризме определялись пристеночные тромбы. По периферии аневризм в ряде

случаев определялись кровоизлияния различной давности.

Данные иммуногистохимического исследования сосудистых аневризм и АВМ представлены в таблице. Как видно из представленной таблицы, во всех наблюдениях артериовенозных мальформаций в эндотелиоцитах выявлена значительно повышенная экспрессия ТФР- β . При исследовании артериальных аневризм не было выявлено повышения уровня экспрессии ТФР- β .

ТАБЛИЦА.

Данные иммуногистохимического исследования сосудистых аневризм и АВМ

		Уровень экспрессии							
		АВМ	А	АВМ	А	АВМ	А	АВМ	А
		0	0	+	+	++	++	+++	+++
1	ТФР- $\beta 3$	-	17	-	1	14	-	3	-
2	ЭФР	1	2	2	11	13	5	1	-
3	β -ФРФ	-	1	2	14	15	2	-	-

Кроме того, выявлена умеренно повышенная экспрессия сосудистого ЭФР в эндотелии артериовенозных мальформаций. При этом экспрессия ЭФР также не была повышена в эндотелии артериальных аневризм. Экспрессия β -ФРФ в эндотелиоцитах артериальных аневризм и артериовенозных мальформаций была низкой или незначительно повышенной, при этом она была более высокой в эндотелии артериовенозных мальформаций.

Индекс пролиферации эндотелиоцитов сосудов крупного и среднего диаметра, артериовенозных мальформаций 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- β и его рецепторов (ALK1, ALK5 и др.) играет важную роль на разных стадиях ангиогенеза, включая васкулогенез. В раннем эмбриогенезе экспрессия ТФР- β характерна для многих тканей, в том числе эндотелиальные и гемопоэтические клетки-предшественники. В опытах на животных показано, что инактивация ТФР- β у зародышей мышей ведет к их гибели (в 50% случаев – у гетерозигот и в 25% – у гомозигот) на ранних сроках беременности. Несмотря на то что при отсутствии экспрессии ТФР- β 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- β 2-го типа ведет к развитию сходных аномалий, что также доказывает важную роль системы ТФР- β –ТФР- β -рецептор в формировании целостной сосудистой стенки [4, 5, 6, 7].

Кроме того, в литературе имеются сведения о роли системы ТФР- β в развитии ангиодисплазий и их рецидивов после хирургических вмешательств. Установлено, что рост эндотелиоцитов артериовенозных мальформаций не изменяется при введении в их культуру ТФР- β , тогда как темпы роста эндотелиоцитов нормальных тканей замедляются и клетки подвергаются апоптозу [4].

На операционном материале нами отмечена умеренно повышенная экспрессия ТФР-β в эндотелиоцитах венозных мальформаций, что, возможно, свидетельствует о незначительной его роли в патогенезе данного типа ангиодисплазий.

В эндотелиоцитах артериовенозных мальформаций нами также отмечена умеренно повышенная экспрессия указанного фактора, однако в 3 случаях она была высокой, что подтверждает предположение о возможном влиянии ТФР-β 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 VEGF могут связываться с VEGF тирозинкиназными рецепторами 1-, 2- и 3-го типа (VEGFRs). Показано, что VEGF-A является одним из наиболее важных регуляторов процесса ангиогенеза *in vivo*, особенно на ранних его этапах. Так, 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 [8, 9].

В настоящее время роль нарушений в системе VEGF–VEGFR наиболее полно изучена при сосудистых мальформациях ЦНС. Так, в эндотелии артериовенозных мальформаций головного мозга и окружающих астроцитах отмечена повышенная в разной степени экспрессия представителей семейства VEGF (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 эндотелиального ЭФР в эндотелии как артериовенозных мальформаций, так и аневризм, однако в случае артериовенозных мальформаций она была несколько выше. При этом экспрессия ЭФР была особенно высокой в эндотелиоцитах сосудов артериального типа. Не было выявлено связи между особенностями экспрессии ангиогенных медиаторов и прогнозом заболевания.

Указанные особенности экспрессии ЭФР подтверждают его участие в патогенезе артериовенозных мальформаций сосудов головного мозга, однако для подтверждения этого и выяснения роли ЭФР в развитии рецидивов ангиодисплазий этого типа необходимо проведение молекулярно-генетических исследований.

Роль системы ФРФ, включающей 22 полипептидных соединения, в патогенезе сосудистых мальформаций практически не изучена. Нами выявлена низкая или незначительно повышенная экспрессия (β-ФРФ в эндотелиоцитах изученных мальформаций, при этом она была выше в эндотелии венозных мальформаций, что может отражать особенности патогенеза [7, 8, 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 [7, 12, 13].

Заключение

На основании проведенных нами иммуногистохимических исследований экспрессии Ki-67 установлена низкая пролиферативная активность эндотелиоцитов артериовенозных мальформаций и артериальных аневризм. Однако в отдельных наблюдениях выявлена умеренно повышенная пролиферативная активность эндотелия мальформаций. У таких пациентов в нашем исследовании имелись выраженные жалобы, а результаты хирургического лечения были хуже, и, на наш взгляд, значительно повышен риск развития рецидивов заболевания после хирургического лечения.

Таким образом, выявленные особенности экспрессии факторов роста в эндотелиоцитах венозных и артериовенозных мальформаций отражают различия в морфогенезе и патогенезе данных образований. Повышенная пролиферативная активность эндотелия в артериовенозных мальформациях может лежать в основе более выраженной клинической картины заболевания и развития осложнений после хирургического лечения, в том числе и 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 VEGF можно говорить о высокой вероятности прогрессирования АВМ, что приводит к появлению клинических симптомов, служит причиной развития осложнений и летального исхода.

МА

ЛИТЕРАТУРА

1. Милованов А.П. Патоморфология ангиодисплазий конечностей. М.: Медицина, 1978. 144 с.
2. Медведев Ю.А., Мацко Д.Е. и др. Патологическая анатомия аневризм артерий головного мозга в свете их хирургического лечения. Архив патологии. 1983. Т. 45. Вып. 1. С. 81–90.
3. Лебедев В.В. Неотложная нейрохирургия: руководство для врачей. /В.В. Лебедев, В.В. Крылов. М.: Медицина, 2000. 568 с.
4. Chen Y.G., Massague J. Smad1 Recognition and Activation by the ALK1 Group of Transforming Growth Factor- Family Receptors. //J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 6. P. 3672–7.
5. 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. Vol. 61. № 3. P. 1207–1213.
6. 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. Vol. 5. № 1. P. 74–80.
7. 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. Vol. 50. № 1. P. 117–124.
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. Vol. 60. № 7. P. 798–803.
9. 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. Vol. 118. № 10. P. 3355–3366.
10. Nakamura T., Mochizuki Y., Kanetake H., Karda S. Signals via FGF Receptor 2 Regulate Migration of Endothelial Cells. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 289. № 4. P. 801–806.
11. Лебедев В.В., Крылов В.В., Холодов С.А. Хирургия аневризм головного мозга в остром периоде кровоизлияния. М.: Медицина, 1996. 256 с.
12. Sure U., Butz N., Schlegel J. et al. Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. //J. Neurosurg. 2001. Vol. 94. № 6. P. 972–977.
13. Uranishi R., Baev N.I., Ng P.Y. et al. Expression of Endothelial Cell Angiogenesis Receptors in Human Cerebrovascular Malformations. //Neurosurgery. 2001. Vol. 48. № 2. P. 359–367.