

РОЛЬ АНГИОГЕНЕЗА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ

Рожченко Л.В., Дрягина Н.В., Размологова О.Ю., Иванов А.Ю.

Российский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: rozhch@mail.ru

Проведено изучение роли ангиогенеза в процессе роста и рецидивирования церебральных артериовенозных мальформаций (АВМ). Определен уровень трех факторов ангиогенеза: сосудистого эндотелиального фактора роста factor (VEGF), ангиопоэтина-22 (ANG-2) и матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в сыворотке крови у 264 пациентов с церебральными АВМ до и через 24 часа после эндоваскулярной эмболизации с использованием иммунофлюоресцентного анализа (IMMULITE 1000, Personal Lab, «Adaltis», Italy). У 39,7% пациентов АВМ продемонстрировали склонность к росту, один или несколько факторов ангиогенеза были повышены: VEGF - у 19,62% пациентов, MMP-9 - у 31,14%, ANG-2 повышен у 6,33%. Через 24 часа после проведения тотальной эндоваскулярной эмболизации АВМ отмечено достоверное снижение VEGF ($p < 0,005$) и MMP-9 ($p < 0,001$) ANG-2 ($p < 0,04$). Кроме того, больных с повышенными показателями ангиогенных факторов после тотальной эмболизации не отмечено. После частичной и субтотальной эмболизации, напротив, отмечается достоверное повышение VEGF ($p < 0,005$) и MMP-9 ($p < 0,001$).

Ключевые слова: факторы ангиогенеза (VEGF), (ANG-2), (MMP-9), церебральные АВМ, эндоваскулярная эмболизация, планирование хирургического лечения.

THE ROLE OF ANGIOGENESIS IN THE PROGRESSION CEREBRAL AVMs

Rozhchenko L.V.¹, Dryagina N.V.¹, Razmologova O. Yu.¹, Ivanov A.Y.¹

¹Russian Polenov Neurosurgical Institute – branch of Federal Almasov North-West Research Centre, St. Petersburg, e-mail: rozhch@mail.ru

The study of the role of angiogenesis in the growth and recurrence of cerebral AVM. We determined the level of three factors of angiogenesis: vascular endothelial growth factor factor (VEGF), angiopoietin-22 (ANG-2) and matrix metalloproteinase-9 (9 (MMP-9) in the blood serum from 264 patients with cerebral AVM before and after 24 hours after endovascular embolization using immunofluorescence analyses (IMMULITE 1000, Personal Lab, "Adaltis", Italy) in 39.7% of patients AVM demonstrated a tendency to increase one or more angiogenesis factors were raised: VEGF - in 19.62% of patients, MMP-9 - at 31.14%, ANG-2 increased from 6.33% after 24 hours of total endovascular embolization of AVM was a significant reduction in VEGF ($p < 0,005$) and MMP-9 ($p < 0,001$) ANG-2. ($p < 0,04$). In addition, patients with enhanced angiogenic factors after total embolization was not observed. After partial or subtotal embolization, on the contrary, there is a significant increase in VEGF ($p < 0,005$) and MMP-9 ($p < 0,001$).

Keywords: factors of angiogenesis (VEGF), (ANG-2), (MMP-9), cerebral arteriovenous malformation (AVM), embolization, planning of surgical treatment.

Церебральные артериовенозные мальформации (АВМ), являющиеся пороками развития сосудов центральной нервной системы, могут пройти ряд изменений, таких как регресс, рост, повторное появление. Изучение механизмов, регулирующих формирование, рост и рецидивирование АВМ, в настоящее время является актуальной проблемой в нейрохирургии. Каждому, кто занимается хирургией АВМ, знакома ситуация, когда между этапами эмболизации происходит ремоделирование сети приводящих сосудов у части АВМ, увеличение размеров ее тела, «подключение» новых источников питания из других сосудистых бассейнов (в том числе из наружной сонной артерии). Артериовенозные мальформации до недавнего времени традиционно считались врожденными пороками

сосудов мозга, в основе развития которых лежит диспластический метаморфоз первичных капилляров эмбриональной сосудистой сети, приводящий к нарушению процессов формирования сосудистой стенки [1; 3]. Однако нельзя пройти мимо того обстоятельства, что АВМ клинически проявляются преимущественно в возрасте 25-35 лет, а дородовая диагностика церебральных АВМ явление редкое. Растущее количество сообщений о появлении АВМ de novo [10; 14], об их росте [8] и рецидивировании после радикального оперативного вмешательства [5; 14] позволяет предположить, что часть АВМ может иметь приобретенный характер, обусловленный продолжающимся неоангиогенезом благодаря наличию в межучасточных участках АВМ скопления эндотелиальных клеток с выраженной пролиферативной активностью.

С 1966 по 2009 г. в литературе описан 61 случай рецидива интракраниальных АВМ после тотального, подтвержденного ангиографически их выключения оперативным путем (открытая хирургия как в комбинации с эндоваскулярным лечением или радиохирургией, так и без них) [4; 10]. Другими исследователями у половины из 106 больных с церебральными АВМ отмечено увеличение размеров мальформации за 8-летний период, доказывающий предположение о возможном росте АВМ со временем [9]. Эти данные указывают на существование процессов роста и рецидивирования АВМ и актуальность этого процесса.

Цель исследования

Изучение влияния ангиогенеза на рост и прогрессирование церебральных АВМ.

Материалы и методы

За 5 лет (2011-2015) в отделении хирургии сосудов мозга РНХИ им. профессора Поленова А.Л. произведено исследование уровня факторов ангиогенеза (сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиопоэтин (Ang 2), металлопротеиназа (ММП-9)) 264 пациентам (147 мужчин и 117 женщин, средний возраст 39 лет) с церебральными АВМ. Контрольная группа - 34 здоровых добровольца (28 мужчин и 6 женщин). Средний возраст контрольной группы сопоставим с исследуемой группой – 33 года. Определены нормальные значения уровней факторов ангиогенеза в сыворотке крови: VEGF $271,16 \pm 41,14$ pg/ml, Ang 2 $2797,65 \pm 273,93$ pg/ml, ММП-9 $472,52 \pm 48,42$ ng/ml. Обследовано 247 пациентов с полушарной локализацией АВМ и 17 больных с АВМ задней черепной ямки. У 110 пациентов заболевание проявлялось эпилептическим синдромом, у 99 пациентов - развитием внутричерепных кровоизлияний, 55 пациентов имели смешанный тип течения (кровоизлияние и припадки).

Оценка первичного ангиогенного статуса (уровней Ang -2, VEGF и ММП-9) проводилась перед оперативным лечением (за 2-3 дня) и в динамике через 1 сутки после

проведения эндоваскулярного вмешательства. Для исследований биомаркеров ангиогенеза у пациентов кровь забиралась из периферической вены натошак в вакуумную пробирку с активатором свертывания. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 20 минут получали сыворотку, которая после аликвотирования отправлялась на хранение при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до исследования. Исследование крови из периферической вены проводилось на иммуноферментном анализаторе планшетного типа Personal Lab, Adaltis, Италия. Для определения VEGF использовались тест-системы фирмы Invitrogen, США, а для MMP-9 и Ang-2 применялись тест-системы фирмы R&D Systems, США. Существующие аппаратные нормальные значения уровней факторов ангиогенеза в сыворотке крови (VEGF 136-510 пг/мл. Ang 2 1807-3997 пг/мл, MMP-9 199-700 пг/мл) полностью коррелировали с полученными значениями в контрольной группе (для 34 здоровых добровольцев определены уровни VEGF $271,2 \pm 41,1$ пг / мл, MMP-9 $472,5 \pm 48,4$ нг / мл и Ang 2 $2797,7 \pm 273,9$ пг/мл).

Результаты

264 пациентам выполнялась эндоваскулярная суперселективная эмболизация АВМ. За период исследования были эмболизированы 78 первичных пациентов (у 35 использован оникс, у 43 - гистоакрил), дважды оперированы 130 больных (с использованием гистоакрила - 69 больных, оникса – 61), от 3 до 6 этапов было предпринято 56 пациентам (28 из них эмболизированы ониксом и 28 - гистоакрилом). В зависимости от радикальности эндоваскулярного вмешательства, пациенты разделены на 2 подгруппы: 56 больным выполнена тотальная эмболизация АВМ, 208 пациентам - частичная эмболизация. У 78 (39,7%) первичных (не оперированных до начала исследования) больных с АВМ выявлено повышение одного и более факторов ангиогенеза (VEGF повышен у 19,62% (31 больной), MMP-9 повышено у 31,4% (36 больных), ANG-2 повышен у 6,33% (11 больных)). Средний уровень VEGF в сыворотке крови больных с церебральными АВМ до проведения оперативного вмешательства составил $370,3 \pm 22,9$ пг / мл; MMP-9 - $473,2 \pm 30,4$ нг / мл и ANG-2 - $2536,5 \pm 80,0$ пг / мл. Статистически достоверным оказалось более высокое базовое повышение VEGF у больных с АВМ, чем в контрольной группе ($p=0,004$). Проведен анализ зависимости базового уровня факторов ангиогенеза (у не оперированных до начала исследования пациентов) в зависимости от структурно-функциональных особенностей и типа клинического проявления церебральных АВМ. При этом выявлена достоверная связь между наибольшим уровнем MMP-9 и геморрагическим типом течения ($p=0,006$), повышение MMP-9 ($p<0,001$) и VEGF ($p<0,001$) отмечено при АВМ с глубоким характером дренирования АВМ и с участием в кровоснабжении АВМ афферентов наружной сонной артерии (MMP-9 $p<0,001$ и VEGF $p<0,001$). Оценена динамика факторов ангиогенеза в

зависимости от размера АВМ до и после частичной эмболизации. Выявлено, что уровень всех факторов достоверно снижается после операции только при АВМ малого размера (Spetzler-Martin I), в то время как при АВМ больших размеров все факторы повышаются после эмболизации, и наиболее значимо растет MMP-9 после эмболизации больших и гигантских АВМ (Spetzler-Martin III-Y).

После проведения тотальной эндоваскулярной эмболизации АВМ отмечено достоверное снижение VEGF ($p < 0,005$) и MMP-9 ($p < 0,001$) ANG-2 ($p < 0,04$). Кроме того, больных с повышенными показателями ангиогенных факторов после тотальной эмболизации не отмечено. После частичной и субтотальной эмболизации, напротив, отмечается достоверное повышение VEGF ($p < 0,005$) и MMP-9 ($p < 0,001$). Обращает на себя особое внимание резкий рост уровня MMP-9 после субтотальной эмболизации (достоверно выше, чем при частичной).

Обсуждение результатов

Ангиогенез — процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани, обеспечивающий не только первичное формирование сосудистой сети, но и техническое обслуживание ее на протяжении всей жизни. Процесс ремоделирования сосудистой сети определяет рост и клиническое поведение АВМ, продолжающийся после рождения. Процесс формирования нового капилляра начинается с секретирования эндотелием в теле мальформаций сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, который связывается со своим рецептором VEGF-R1, затем Ang-1 связывается с эндотелий-специфическим рецептором TIE2. VEGF-A индуцирует секрецию фибробластами, макрофагами и гладкомышечными клетками сосудистой стенки MMP-9 - матрикс-разрушающего фермента, обладающего деградирующей способностью в отношении всех компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны сосуда, что приводит к ослаблению, растяжению и разрыву сосудистой стенки, а это, в свою очередь, является первым шагом для ремоделирования сосудистой сети. MMP стимулирует транспорт глюкозы через мембрану эндотелиальной клетки, помогая обеспечить повышенные энергетические требования эндотелиальных клеток в процессе роста и пролиферации. Деструкция базальной мембраны, затем миграция эндотелиальных клеток (Ang2 с VEGF) и их последующая пролиферация в зоне миграции приводит к формированию новых сосудистых структур и их анастомозов. Затем наступает фаза созревания и стабилизации, обеспечивающая целостность и стабильность сосуда (Ang1+TIE2 с VEGF), отмечается реконструкция базальной мембраны вокруг незрелого капилляра, с окружением ее перицитами. Будучи сформированной, зрелая сосудистая сеть является стабильной, а эндотелиальные клетки способны к очень низкой регенерации. В стабильном состоянии эндотелиоциты не пролиферируют и лишь изредка (1 раз в 7-10 лет)

делятся. Рост новых сосудов детерминирован балансом между его стимуляторами и ингибиторами. При низком значении соотношения стимуляторов к ингибиторам образования сосудов неоангиогенез блокируется или малоинтенсивен, напротив, при высоких значениях соотношения происходит активный запуск неоангиогенеза.

Наблюдаемая нами аномальная экспрессия ангиогенных факторов у пациентов с церебральными АВМ делает очевидным их участие в формировании и прогрессии мальформаций. Выявленное нами после частичной и субтотальной эмболизации достоверное повышение VEGF ($p < 0,005$) и MMP-9 ($p < 0,001$) объясняется тем, что при неполной эмболизации АВМ происходит перестройка кровотока и формирование местной региональной гипоксии внутри тела АВМ. В ответ на гипоксию в эндотелии начинается экспрессия про-ангиогенных факторов, в частности внутриклеточного фактора (HIF-1 α), гипоксией индуцируемого транскрипционного фактора, который стимулирует выработку SDF-1 (stromal-derived factor-1) и VEGF [4; 6; 11]. Гипоксия является основным стимулом для синтеза VEGF. Сосудистая ткань имеет способность приспосабливаться к изменениям метаболических потребностей в окружающей ее среде: скорость транскрипции генов мРНК VEGF увеличивается в течение первого часа после гипоксического стресса, наблюдается повышение стабильности VEGF, в результате чего в 4 раза увеличивается его период полураспада. VEGF обеспечивает неоангиогенез, пока метаболические потребности тканей не будут удовлетворены [11]. Кроме того, развитие асептического воспаления в стенке сосудов АВМ после эмболизации [4] увеличивает выработку интранидального интерлейкина-6 (ИЛ-6), активируют экспрессию MMP-9, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток, миграцию лейкоцитов, запускает процесс ангиогенеза через стимуляцию выработки мРНК VEGF. Увеличение высвобождения MMP-9 повреждает эндотелий сосудов АВМ и может привести к ее разрыву [12].

Исходя из концепции, что АВМ являются динамическими объектами с постоянным ремоделированием сосудов, обусловленным ангиогенезом, регулируемым хронической гемодинамической перестройкой, гипоксией и воспалением после вмешательства во врожденную аномалию церебральных сосудов (АВМ), изучение механизмов сосудистой биологии этих пороков может дать перспективы для разработки инновационных методов лечения. Поскольку каждое вмешательство в АВМ может привести к повышению экспрессии VEGF, следует задуматься о применении анти-VEGF терапии при эндоваскулярной эмболизации АВМ. В исследованиях на мышах Walker et al. (2013) [13], применяя анти-VEGF моноклональное антитело бевацизумаб (Avastin®), продемонстрировали перспективу дополнения эндоваскулярной эмболизации АВМ анти-VEGF лечением. Не исключается, что новая концепции антиангиогенной терапии позволит

повлиять на ту часть АВМ, которая отличается наличием продолжающегося неоангиогенеза.

Заключение

Рецидивы АВМ являются редким, но потенциально опасным продолжением полной хирургической их облитерации. Фактическая частота рецидивов остается неясной из-за отсутствия протокола обязательного ангиографического контроля у больных с радикально выключенными АВМ. Необходимо признать обязательным контроль излеченных АВМ через год и три года после тотального выключения.

Наличие феномена увеличения послеоперационного объема АВМ после частичной эмболизации объясняется наличием ангиографически негативного, скрытого компартмента АВМ и существованием генетически предрасположенных механизмов роста АВМ, приводящих к образованию новых сосудов, активно принимающих участие в возобновлении кровоснабжения мальформации [2; 7; 11]. Частичная эндоваскулярная эмболизация АВМ приводит к повышению активности MMP-9, Ang -2 и VEGF у больных с АВМ после проведения оперативного лечения. Выявление факторов, предрасполагающих АВМ к дальнейшему росту, должно служить сигналом к максимально возможному радикальному удалению АВМ, в том числе с использованием комбинированной методики (тотального удаления АВМ после предварительной эмболизации).

Список литературы

1. Мацко Д.Е. Перспективы изучения морфогенеза пороков развития сосудов головного и спинного мозга / Медведев Ю.А., Мацко Д.Е. // Патологическая анатомия хирургических заболеваний нервной системы. – СПб., 1991. – С. 121-136.
2. Рожченко Л.В. Исследование факторов ангиогенеза при церебральных артериовенозных мальформациях с различным клиническим течением / Дрягина Н.В., Панунцев В.С., Кондратьев А.Н., Размологова О.Ю. // Российский нейрохирургический журнал им проф. А.Л. Поленова. - 2014. – Т. 1У, № 1. – С. 35-41.
3. Achrol A.S. Pathogenesis and radiobiology of brain arteriovenous malformations: implications for risk stratification in natural history and posttreatment course / Guzman R., Varga M., Adler J.R., Steinberg G.K. // Neurosurg Focus. – 2009. Vol. 3. - P. 26:5-9.
4. Buell Th. J. Embolization-induced angiogenesis in cerebral arteriovenous malformations / Ding D., Starke R., Crowley W. // Review Journal of Clinical Neuroscience. - 2014. - Vol. 21. - 11.- P. 1866–1871; Stevens J. De novo cerebral arteriovenous malformation: case report and

literature review / Leach J.L., Abruzzo T., Jones B.V. // *AJNR Am J Neuroradiol.* - 2009. - Vol. 30. - P. 111–112.

5. Freudenstein D. Recurrence of a cerebral arteriovenous malformation after surgical excision / Duffner F., Ernemann U., Rachinger J., Grote E. // *Cerebrovasc. Dis.* - 2001. - Vol. 11. - P. 59-64.

6. Hashimoto T. Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations / Wu Y., Lawton M.T. // *Neurosurgery.* - 2005. - Vol. 56. - P. 1058–65 [discussion P. 1058–65].

7. Kim H. Brain Arteriovenous Malformation Biology Relevant to Hemorrhage and Implication for Therapeutic Development / Pawlikowska L., Chen Y., Young W.L. // *Stroke.* - 2009. - Vol. 40 [suppl. 1]. - P. 95-97.

8. Klimo P. Jr. Pediatric arteriovenous malformations: a 15-year experience with an emphasis on residual and recurrent lesions / Rao G., Brockmeyer D. // *Childs Nerv.* - 2007. - Vol. 23. - P. 31–37.

9. Novakovic R.L. The diagnosis and management of brain arteriovenous malformations / Lazzaro M.A., Castonguay A.C. // *Neurol. Clin.* - 2013. - Vol. 31. - P. 749–63.

10. Rodriguez-Arias C. Recurrence in a different location of a cerebral arteriovenous malformation in a child after radiosurgery / Martinez R., Rey G., Bravo G. // *Childs. Nerv. Syst.* - 2000. - Vol. 16. - P. 363–365.

11. Sure U. Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor are expressed more frequently in embolized than in nonembolized cerebral arteriovenous malformations / Battenberg E., Dempfle A. // *Neurosurgery.* - 2004. - Vol. 55. - P. 663–9 [discussion P. 669–70].

12. Starke R.M. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations / Komotar R.J., Hwang B.Y. // *Neurosurgery.* - 2010. - Vol. 66. - P. 343–348.

13. Walker E.J. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain / Su H., Shen F. // *Stroke.* - 2012. - Vol. 43. - P. 1925–1930.

14. Yong-Sook Park. Recurrent Cerebral Arteriovenous Malformation in a Child : Case Report and Review of the Literature / Jeong-Taik Kwon // *J. Korean Neurosurg Soc.* - 2009. - Vol. 45. - P. 401-404.