

## Angiogeneza u centralnom nervnom sistemu: uloga faktora rasta vaskularnog endotela

Vesna Lačković\*, Vladimir Kostić†, Nadežda Šternić†, Vladimir Kanjuh‡,  
Irena Vuković§

Medicinski fakultet, \*Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“,  
Beograd, Klinički centar Srbije, †Institut za neurologiju, Beograd, ‡Srpska akademija  
nauka i umetnosti, Beograd, Medicinski fakultet, § Institut za histologiju i embriologiju,  
Kragujevac

**K l j u č n e r e č i :** neovaskularizacija, fiziološka; neovaskularizacija,  
patološka; nervni sistem, centralni; krvno-moždana  
barijera; endotel krvnih sudova; faktori rasta endotela  
krvnih sudova.

**K e y w o r d s :** neovascularization, physiologic; neovascularization,  
pathologic; central nervous system; blood-brain barrier;  
endothelium, vascular; vascular endothelial growth  
factors.

### Uvod

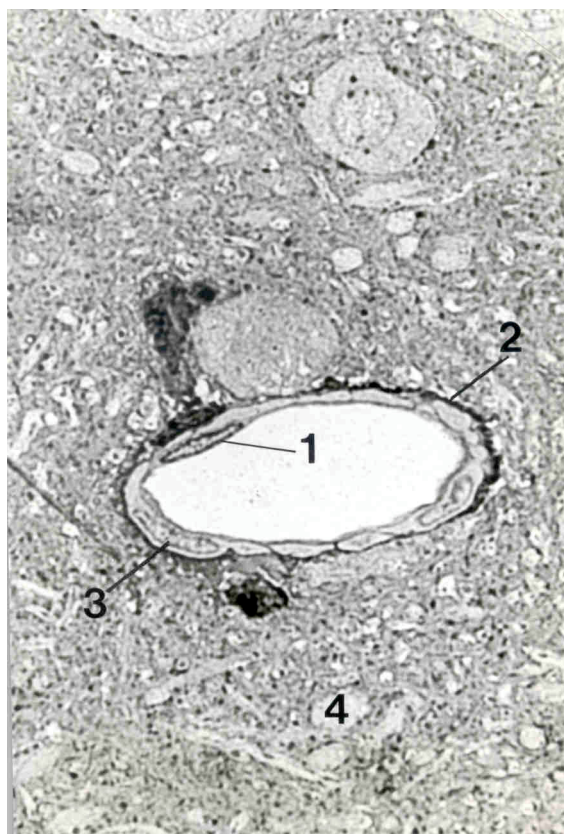
Normalni vaskularni rast i razvoj su rezultat niza kompleksnih celularnih i supcelularnih mehanizama i interakcije između mnogobrojnih stimulatornih i inhibitornih faktora koji regulišu ove procese (1). Lokalni balans između različitih pozitivnih ili negativnih faktora determiniše tendenciju ka angiogenezi ili angiostazi (2). Pokazano je da u procesima angiogeneze pored endotelnih ćelija učestvuju i druge ćelije vaskularnog zida, kao što su periciti i glatkomišićne ćelije (3). Međutim, u centralnom nervnom sistemu specifični ćelijski elementi konstituišu vaskularni zid, formirajući veoma važnu kompleksnu strukturu, hematoencefalnu barijeru, čiji razvoj i normalno funkcionisanje zavise od prisustva i interakcije svih njenih celularnih konstituenata (4, 5).

Poremećaj razvoja krvnih sudova može da izazove brojna ozbiljna patološka stanja (6). Poseban značaj ovi procesi imaju u tumorogenezi zbog toga što je za širenje tumora neophodno stvaranje novih krvnih sudova (7). Za utvrđivanje potencijalne terapijske strategije poznavanje regulisanja procesa angiogeneze je od najvećeg značaja.

*Histološka organizacija kapilara moždanog tkiva – hematoencefalna barijera.* Kapilari moždanog tkiva pripa-

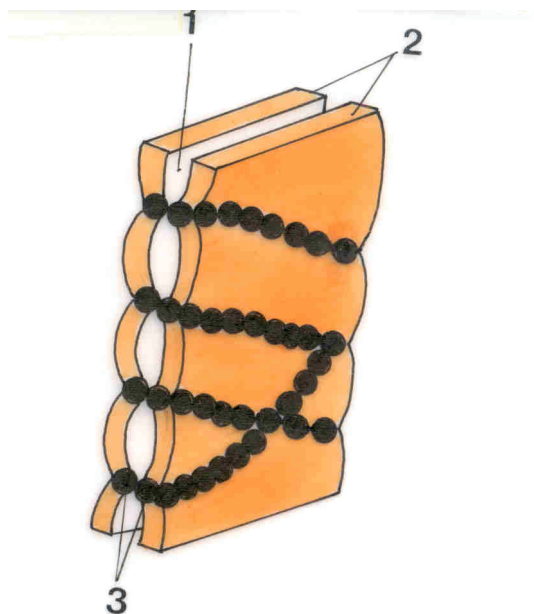
daju kategoriji kontinuiranih kapilara. Kapilari ove vrste nalaze se i u mišićnom tkivu, plućima, egzokrinim žlezdama, testisima, ovarijumima, koži, timusu, limfnim čvorovima, *vasa recta* bubrega i kostima (8–10). Zajednička karakteristika ovog tipa kapilara je da se oni sastoje od međusobno tesno povezanih endotelnih ćelija i kontinuirane bazalne lamine, koja se zbog svojih glikoproteinskih komponenti najbolje vizuelizuje impregnacijom srebrom (sl. 1) (11). Vaskularni zid kapilara moždanog tkiva poseduje određene specifičnosti histološke organizacije po kojima se razlikuju od ostalih kontinuiranih kapilara u organizmu (12). Strukture vaskularnog zida formiraju vrlo restriktivnu hematoencefalnu barijeru čija je glavna uloga u održavanju normalne ekstracelularne sredine neurona u CNS-u (sl. 1 i 2). Ovaj kompleksni celularni sistem sastoji se od endotelnih ćelija, pericita, perivaskularne mikroglije, astrocita i bazalne lamine (sl. 2) (13). Međutim, nepropustljivost hematoencefalne barijere najvećim delom se ostvaruje specifičnom strukturom endotela (14).

*Endotel* hematoencefalne barijere je kontinuiranog tipa. Endotelne ćelije su međusobno povezane okludentnim vezama. Susedne plazmaleme su sasvim tesno priljubljene, jer su spojene integralnim proteinima samih membrana, raspo-



Sl. 1 – Mozak – kapilar kontinuiranog tipa.

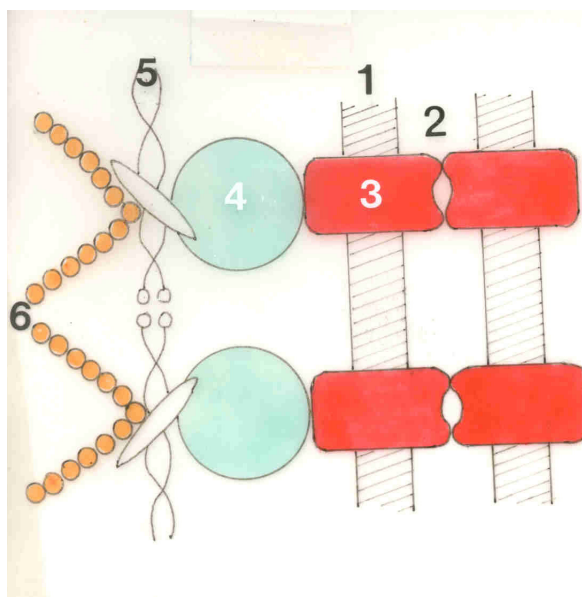
Endotelna ćelija (1), bazalna lamina (2), pericit (3), moždano tkivo (polutanki isečak; srebro;  $\times 256$ ) (4).



Sl. 2 – Okludentni spoj – shematski prikaz.

Intercelularni prostor (1), ćelijska membrana (2), intramembranski proteini (3).

ređenim u određenim razmacima duž plazmaleme (sl. 3) (15, 16). Glavni integralni, transmembranski protein je okludin (*occludin*). Direktno je uključen u formiranje paracelularne barijere, kao i u sve ostale funkcije okludentnog



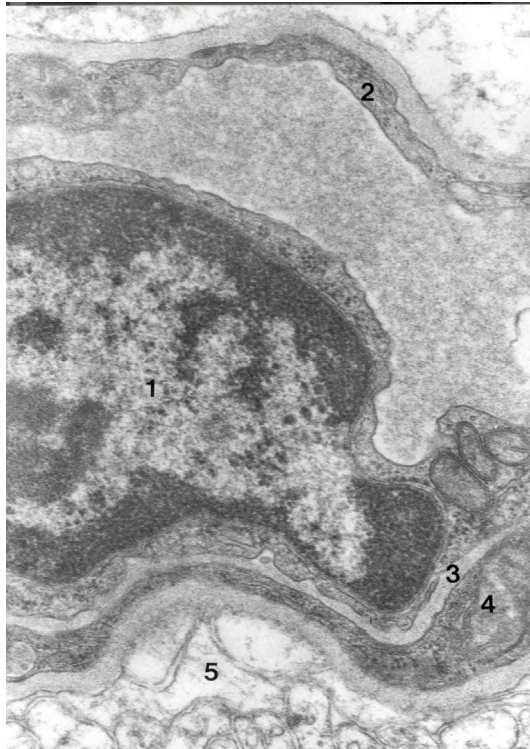
Sl. 3 – Okludentni spoj – shematski prikaz.

Ćelijska membrana (1), međucelijski prostor (2), okludin (3), ZO-1 (4), cingulin (5), aktinski filamenti (6).

spoja (sl. 4) (17). Sa unutrašnje strane ćelije povezan je sa apikalnom mrežom aktinskih filamenata, posredno preko asociiranog proteina ZO-1 koji sadrži mesta za vezivanje sa aktinom (18). ZO-1 zajedno sa drugim perifernim membranskim proteinima, kao što su ZO-2, ZO-3, cingulin, rab 13, simplektin, formira submembranski plak ovog spoja (19, 20). Ovako organizovan okludentni spoj formira selektivnu barijeru koja reguliše transport određenih metabolita, jona, makromolekula, toksičnih i drugih supstanci. Njegovu funkciju regulišu brojni faktori među kojima su G-proteini, serin, treonin, tirozin kinaze, ekstra- i intracelularni nivo Ca, cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), proteaze i faktor nekroze tumora (*tumor necrosis factor* – TNF- $\alpha$ ) (21).

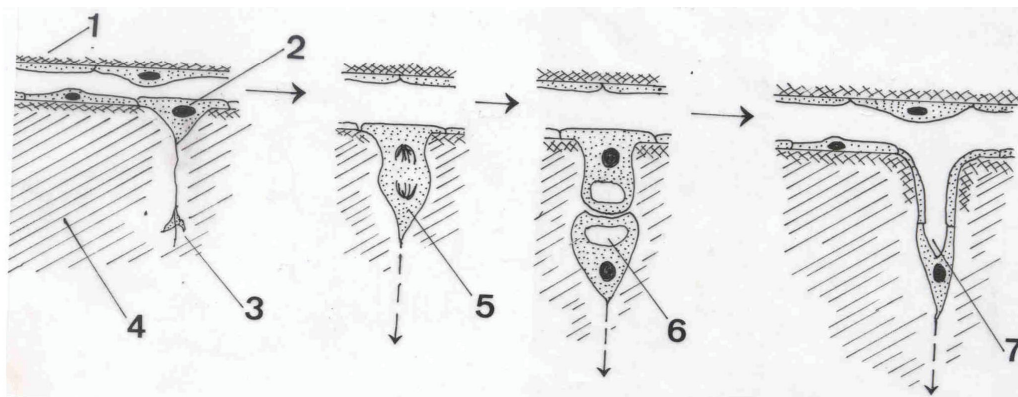
Za razliku od endotelne ćelije u ostalim kontinuiranim kapilarima, endotelne ćelije hematoencefalne barijere poseduju vrlo mali broj pinocitnih vezikula, dok transendotelni kanali i fenestre nedostaju (sl. 5) (21, 22). Ekspiruju specifične transportere, receptore i enzime (4, 23). Kompletno su okružene kontinuiranom bazalnom laminom u koju su inkorporisani periciti i citoplazmatski produžeci astrociti (sl. 5).

*Periciti* svojim kontraktilnim citoplazmatskim produžecima okružuju endotelne ćelije i ekspiruju specifične receptore za brojne vazoaktivne medijatore, kao što su kateholamini, endotelin 1, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), angiotenzin II, što ukazuje na njihovu ulogu u mikrovaskularnoj cirkulaciji (24). U procesu angiogeneze oni indukuju aktivaciju endotelne ćelije i regulaciju integrina, odgovarajući na brojne stimulse angiogeneze (3). Posle aktivacije periciti razgrađuju bazalnu membranu, migriraju iz prvobitnog krvnog suda i proliferišu kao reakcija na faktore rasta kao što su faktor rasta vaskularnog endotela (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), faktor rasta tumora (*tu-*



Sl. 4 – Ultrastrukturalna organizacija kapilara mozga – hematoencefalna barijera.

Jedro endotelne ćelije (1), citoplazma endotelne ćelije (2), bazalna lamina (3), pericit (4), moždani parenhim (5) (EM,  $\times 45000$ ).



Sl. 5 – Angiogeneza – shematski prikaz.

Bazalna lamina (1), endotelna ćelija koja će dati novu kapilarnu granu (2), pseudopode (citoplazmatski produžeci) endotelne ćelije (3), ekstracelularni matriks (4), deoba endotelne ćelije (5), vakuole u endotelnim ćelijama (6), lumen nastao fuzijom vakuola (7).

*mor growth factor  $\beta$*  - TGF- $\beta$ ) i faktor rasta fibroblasta (*fibroblast growth factor* – FGF) (25). Po završenoj angiogenezi zauzimaju poziciju oko novoformiranog krvnog suda i učestvuju u sintezi komponenti nove bazalne membrane.

*Astrociti* imaju stopalaste produžetke povezane međusobno tako da formiraju perivaskularnu glijalnu membranu koja obavija kapilar (13). Oni indukuju formiranje, permeabilnost i održavanje hematoencefalne barijere (14). Zajedno sa pericitima predstavljaju veoma značajne celularne konstituente hematoencefalne barijere regulišući njen razvoj, formiranje interendotelnih spojeva, vazodinarske aktivno-

sti, fenotipske, fagocitne, migratorne i proliferativne karakteristike endotelnih ćelija, sve faze u procesu angiogeneze, kao i njenu strukturalnu stabilnost (1, 25).

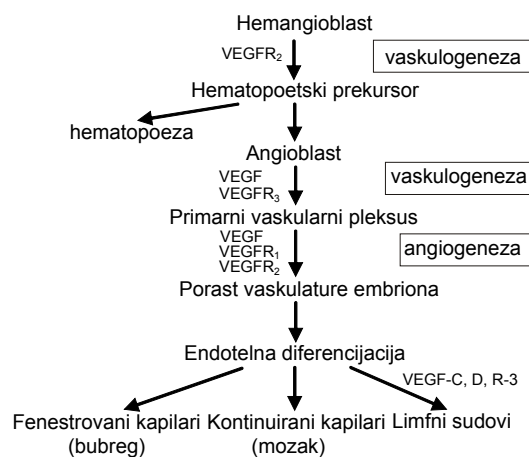
Oko mikrovaskularnih krvnih sudova mozga dijametara 20–50  $\mu\text{m}$  nalaze se i ćelije mikroglije koje se nazivaju perivaskularna mikroglija (makrofagi) imaju ulogu u prezentaciji antigena u CNS-u (26). Nalaze se između bazalne membrane endotelnih ćelija i citoplazmatskih produžetaka astrocita. Pokazuju izraženu fagocitnu aktivnost, sposobnost sekrecije specifičnih citokina, kao i značajnu internalizaciju proteina i partikulisanih supstanci oslobođenih iz moždanog parenhima (27). Po imunofenotipskim karakteristikama slični su monocitima, odnosno eksprimuju antigene CD11c, CD14, CD45, CD68, RFD7, proteine glavnog kompleksa histokompatibilnosti (*major histocompatibility complex* – MHC) klase II i marker za makrofage ED2 (28, 29).

*Razvoj krvnih sudova.* Krvni sudovi se formiraju procesima zvanim vaskulogeneza i angiogeneza (30). U embrionalnom periodu odigravaju se oba procesa, dok je u adultnom periodu angiogeneza primarno odgovorna za razvoj krvnih sudova.

*Vaskulogeneza* podrazumeva razvoj krvnih sudova *de novo* u embrionu od primordijalnih endotelnih ćelija nastalih diferencijacijom angioblasta mezodermnog porekla (31, 32). Angioblasti su prekursori endotelnih ćelija koji još uvek ne formiraju lumen, a od kojih kasnije njihovim grupisanjem nastaju prvobitni krvni sudovi, odnosno primarni vaskularni pleksus ranog embriona (sl. 6) (33).

*Angiogeneza* (neovaskularizacija) predstavlja dalji rast krvnih sudova od već postojećih i dešava se kako u embrionskom, tako i u adultnom periodu u fiziološkim i patološkim uslovima (31, 34). Važno je napomenuti da je angiogeneza prominentni proces kod brojnih oboljenja kao što su dijabetesna retinopatija, reumatoidni artritis, psorijaza, neoplazme, bubrežna oboljenja i hipertenzija (35–37). Tumorska angiogeneza ima poseban značaj, jer mnogi solidni tumori imaju sposobnost da indukuju proces angiogeneze koji je značajan, jer rast tumorskih ćelija i razvoj metastaza zavise od formiranja novih krvnih su-

dova koji će ih snabdevati kiseonikom, hranom i faktorima rasta (7).



Sl. 6 – Shematski prikaz formiranja vaskularne mreže tokom embriogeneze

Proces angiogeneze se odvija u više faza: produkcija faktora angiogeneze, vezivanje ovih faktora za receptore na endotelnim ćelijama, aktivacija endotelnih ćelija, proteolitika razgradnja bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa, proliferacija i migracija endotelnih ćelija, pupljenje i rast solidnih endotelnih traka, formiranje kapilarne petlje i vaskularna stabilizacija (38).

Posle produkcije angiogenih faktora i njihovog vezivanja za receptore na endotelnim ćelijama, dolazi do aktivacije endotelnih ćelija i njihove diferencijacije u angiogeni fenotip (39). Tokom ovog procesa endotelna ćelija reorganizuje svoj citoskelet, menja fenotip, raskida adhezije, migrira kroz bazalnu membranu i proliferiše (40). Proliferacijom endotelnih ćelija formira se pupoljak koji raste od postojećeg krvnog suda kao solidna traka (sl. 5). Kasnije dolazi do stvaranja lumena, spajanja sa drugim kapilarnim tubusom, formiranja kapilarne petlje i uspostavljanja cirkulacije. Svi krvni sudovi prvo nastaju kao kapilari. Zatim se taj primordijalni endotelni tubus širi i zadebljava dodavanjem novih ćelijskih elemenata sa spoljašnje strane krvnog suda koji se transformišu u pericite ili glatke mišićne ćelije zavisno od vrste krvnog suda. Ove periendotelne ćelije utiču na maturation krvnog suda, ne samo obezbeđujući mu strukturu potporu nego i kontrolišući proliferaciju endotelnih ćelija, vaskularnu permeabilnost i tonus (41).

**Faktori regulacije angiogeneze.** Angiogeneza je regulisana balansom između stimulišućih faktora i inhibitora koji se vezuju za specifične ćelijske receptore na ciljnim ćelijama i rezultat je niza složenih celularnih i supcelularnih mehanizama. Specifične stadijume angiogeneze regulišu: adhezioni proteini (integrini, selektini, kadherini) koji omogućavaju pričvršćivanje ćelija za komponente ekstracelularnog matriksa (ECM), proteini ECM (kolageni, fibronektin, laminin, proteoglikani, trombospondin-1, tenascin-C i SPARC – *secreted protein acidic and rich in cysteine*) koji su odgovorni za interakcije između ćelija i matriksa, enzimi

ECM (matriks metaloproteinaze – MMPs) koji dovode do proteolize komponenti ECM (prvenstveno kolagena), faktori koagulacije krvi, citokini (IL-1 $\beta$ , interferon  $\alpha$  i  $\beta$ , faktor nekroze tumora – TNF) i faktori rasta (VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , EGF – faktor rasta epiderma, angiopoetin-1) koji pretežno predstavljaju proangiogeneze faktore (1, 2, 7).

Jedan od najznačajnijih i najjačih stimulatora angiogeneze je vaskularni endotelni faktor rasta za koji endotelne ćelije poseduju specifične receptore (42). VEGF se još zove i vaskularni faktor permeabilnosti (VPF), jer je pokazano da povećava mikrovaskularnu permeabilnost i fenestraciju endotela. On predstavlja najznačajniji ćelijski mitogen koga proizvode endotelne ćelije u uslovima hipoksije, a stimuliše i migraciju endotelnih ćelija (43–45). Pored uloge u inducovanju angiogeneze, VEGF omogućava opstanak endotelnih ćelija u novoformiranim krvnim sudovima, uključujući i one formirane u tumorima (7). Familija VEGF uključuje šest članova: VEGF, placentalni faktor rasta, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E (46).

Savremena istraživanja su pokazala da VEGF-C pored angiogeneze stimuliše i veoma značajan proces limfogeneze vezujući se za VEGFR-3 receptor specifičan za endotelne ćelije limfnih sudova (47). Ovo je od velikog značaja s obzirom da je aberantna funkcija limfnog sistema uključena u mnoga patološka stanja kao što su edem, ascit, inflamacija, fibroza, Kaposijev sarkom i limfangiomi (48).

Stimulus za ekspresiju VEGF predstavlja stepen hipoksije tkiva (49). Nedostatak kiseonika izaziva povećanje intracelularne koncentracije aktivne forme regulatornog proteina HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*). HIF-1 stimuliše transkripciju VEGF koji se luči, difunduje kroz tkivo, doppeva do endotelnih ćelija i vezuje se za specifične receptore na njihovoj površini (50). Utvrđeno je postojanje tri tipa humanih receptora za VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3 (51–53). Prva dva tipa su karakteristična za endotelne ćelije krvnih sudova, dok je treći karakterističan za endotel limfnih sudova (53, 54).

Na proces angiogeneze utiču i mnogi inhibitorni faktori, kao što su trombocitni faktor 4, CDI (*cartilage derived inhibitor*), GP 140/trombospondin, interferon  $\alpha$  i  $\beta$ , 16K-prolaktin, placentalni inhibitor ribonukleaze, angiogenezni modulator 1480, talidomid i angiostatin (55, 56). Savremena istraživanja su pokazala da je jedan od važnih inhibitora angiogeneze transmembranski receptorski protein Notch 4, koji se primarno eksprimuje u endotelnim ćelijama (57). Mehanizam inhibitornog delovanja Notch 4 na angiogenezu je da podstiče adheziju endotelnih ćelija za ekstracelularni matriks putem  $\beta$ 1 integrina.

**Angiogeneza u centralnom nervnom sistemu.** Angiogeneza igra glavnu ulogu u razvoju mnogih patoloških procesa u CNS-u koji se zajedničkim imenom zovu angiogenezne bolesti (34). Predstavlja ključni faktor u rastu tumora (58). Vaskularna proliferacija je posebno karakteristična za gliome i često je osnov po kome se određuje njihov gradus, jer je neovaskularizacija u korelaciji sa stepenom malignosti i agresivnosti moždanih tumora. Od nje zavisi klinička slika

i postoperativna prognoza (59). Stepen neovaskularizacije je u obrnutom odnosu sa postoperativnim preživljavanjem bolesnika sa anaplastičkim astrocitomom. Infiltracija moždanog tkiva malignim tumorom, može da sledi puteve krvnih sudova. Novoformirani krvni sudovi moždanih tumora poseduju defektnu krvno-moždanu barijeru i odgovorni su za nakupljanje kontrasta u moždanim tumorima (60). Povezani su sa povećanim rizikom od hemoragije unutar tumora i patogeneza edema usled tumora (61). Slično gliomima visokog gradusa, i hemangioblastomi su veoma vaskularizovane neoplazme. Formiraju se od dve vrste ćelija i to vaskularnih i stromalnih ćelija. Neki naučnici smatraju da su stromalne ćelije u stvari glavne tumorske ćelije, a da je vaskularna komponenta tumora rezultat velike reaktivne vaskularne proliferacije (62).

U nastanku *apscesa* mozga postoje dva glavna stadijuma: cerebritis i inkapsulacija (63). Svaki od ova dva procesa obuhvata rani i kasni podstadijum. Rani stadijum cerebritis (od 1. do 3. dana) je udružen sa propagacijom mikroorganizama kroz oštećen zid krvnog suda, kao i sa ranom nekrozom, vaskularnom kongestijom, petehijalnom hemoragijom, mikrotrombozom, perivaskularnim fibrinoznim eksudatom i akutnom inflamacijom. Čak i u ovom ranom stadijumu endotelne ćelije bubre. Međutim, definitivna neovaskularizacija se obično otkriva u kasnom stadijumu cerebritisa (od 4. do 9. dana). Tada je nekrotski purulentni centar okružen uskim, iregularnim slojem granulacionog tkiva infiltrovanog neutrofilima, limfocitima i ponekim makrofagom i često ispunjava perivaskularne prostore. U ovom stadijumu endotelne ćelije pokazuju hipertrofiju i hiperplaziju, odnosno dolazi do neovaskularizacije. Kao posledica toga (od 10. do 13. dana), nagomilavanje matriksa oko brojnih novoformiranih krvnih sudova dovodi do početka razvoja slabo definisanog zida apscesa. Posle 14. dana zid apscesa postaje čvršći, dobro definisan i jasno razdvojen od okolnog edematoznog tkiva mozga. Tako neovaskularizacija igra glavnu ulogu u organizaciji zida apscesa od perioda depozicije matriksa do inkapsulacije (63).

Histološka slika kod *infarkta* mozga i *traume* je slična (64, 65). Međutim, molekularni sloj korteksa kod infarkta je po pravilu očuvan, kod kontuzovanog girusa je obično oštećen. U oba ova stanja neuroni u povređenom području podležu nekrozi što je evidentno na osnovu prisustva ishemijskih promena u ćelijama. Ali, najranije mikroskopske promene tkiva su predstavljene edemom bele mase. Oko trećeg dana od prvobitnog insulta rana vaskularna proliferacija može biti otkrivena na ivici procesa nekroze i kod infarkta i kod traume. Petog do sedmog dana kapilari proliferišu sa ivice nekroze. Tako kod cerebralnog infarkta edem prethodi angiogenezi (66). U toku sledeće dve do tri nedelje povećava se neovaskularizacija sa značajnom proliferacijom kapilara, što je udruženo sa gliozom i aktivacijom mikroglije.

Kod hroničnog *subduralnog hematoma*, u toku prve nedelje počinje invazija krvnog ugruška angioblastima, odnosno angiogeneza. Novi kapilari gotovo u celini potiču sa unutrašnje površine tvrde moždanice. Oni penetriraju ugru-

šak i oko njega stvaraju vrlo vaskularizovanu membranu. Penetracija se nastavlja ka unutrašnjosti hematoma. Ovaj proces se završava do kraja treće nedelje. Mali krvni sudovi locirani u kapsuli hematoma imaju istanjene endotelne ćelije sa širokim međućelijskim prostorima i mogu spontano, ili posle male traume, biti uzrok ponovljenog krvarenja i transudacije plazme (67). To dovodi do povećanja hroničnog subduralnog hematoma. Prema tome, angiogeneza u subduralnoj membrani igra najvažniju ulogu u organizaciji hroničnog subduralnog hematoma i u njegovom povećavanju.

*Značaj VEGF za angiogenezu u CNS-u.* Kod svih pomenutih neoplastičkih i neneoplastičkih bolesti (tumori mozga, cerebralni apscesi, infarkti, traume) gde angiogeneza ima uticaja (angiogenezne bolesti), dokazana je povećana ekspresija VEGF (68, 69).

Što se tiče tumora CNS-a sledeće činjenice ukazuju na to da VEGF stimuliše procese angiogeneze u okviru njih: VEGF stvaraju ćelije glioma u *in vitro* uslovima, ekspresija VEGF *in vivo* se značajno povećava kod moždanih tumora koji su visoko vaskularizovani, utvrđeno je prisustvo receptora za VEGF u gliomima i najzad, dokazano je da eksperimentno indukovana angiogeneza i rast moždanih tumora miša mogu specifično da se inhibišu anti-VEGF monoklonskim antitelima (70–73).

Ekspresija VEGF dokazana je i kod netumorskih stanja, (eksperimentni animalni model cerebralnog infarkta i traume), i u mnogim netumorskim tipovima ćelija kao što su neuroni, astrociti, periciti, glatkomišićne ćelije, makrofagi, limfne ćelije, trombociti i fibroblasti (74). Endotelne ćelije različitih organa, uključujući mozak, u *in vitro* uslovima takođe ekspresuju VEGF (75). Pored toga što stimuliše angiogenezu, VEGF povećava i mikrovaskularnu permeabilnost cerebralnih krvnih sudova, povećavajući broj fenestra i vezikulo-vakuolarnih organela, što dovodi do pojave cerebralnog edema (76, 77).

*Edem mozga* je jedan od najznačajnijih faktora koji doprinosi morbiditetu i mortalitetu kod svih opisanih bolesti CNS-a, kao što su tumori, apscesi, trauma i infarkt mozga, kod kojih je edem glavni uzrok rane smrti (78). Kod tumora edem uvek komplikuje postoperativni period, kod cerebralnih apscesa se rano razvija i značajno povećava efekat lokalne lezije, kod cerebralnog infarkta je glavni uzrok rane smrti, dok je kod traume mozga vrlo varijabilan tako da kod bolesnika sa malim potresom mozga može da obuhvati veliki deo bele mase hemisfere (79–81).

U svim ovim procesima edem povećava intrakranijalni pritisak izazvan primarnom lezijom. Takođe može da pogorša postojeći neurološki deficit, doprinoseći razvoju hemipareze, disfunkcije govora i konvulzija, a u najtežim slučajevima je uzrok fatalnog sindroma cerebralne hernijacije sa sekundarnim oštećenjem moždanog stabla. Cerebralni edem je ključan za prognozu kliničkog ishoda kod ovih tzv. edematogenih bolesti (82). Potencijalno letalni aspekt edema mozga je očigledan ako se ima u vidu smanjenje smrtnosti usled neurohirurških operacija, kao i naglo neurološko

poboljšanje kod bolesnika koji su koristili terapiju protiv edema za koju je dokazano da inhibiše ekspresiju VEGF u *in vitro* uslovima (83, 84). Uprkos napretku u razumevanju prirode i terapije cerebralnog edema, on ostaje zajednički problem kod bolesnika sa različitim cerebralnom patologijom (83, 85, 86).

Ekspresija VEGF je primarno određena hipoksijom, nedostatkom glukoze, tumor supresornim genima, onkogenima i citokinima (49). Tumorski ili reparativni procesi u CNS-u uključuju izvestan stepen hipoksije, astrocitima visokog i niskog gradusa pokazuju nekrotične i/ili infarktno oblasti, apscesi imaju nekrotski centar sa ishemičnim ili hipoksičnim tkivom, infarkt po svojoj prirodi ima ishemijsku komponentu (87). Najzad, traume glave, udružene sa subarahnoidnom hemoragijom i cerebralnom kontuzijom, praćene su vazospazmom koji indukuje hipoksiju i/ili ishemijsku doprinosi razvoju edema mozga. Da je hipoksija kritična za povećanje ekspresije VEGF pokazano je u *in vitro* uslovima na astrocitima kod kojih, kada su izloženi hipoksiji, dolazi do povećane ekspresije VEGF, kao i u *in vivo* uslovima kada kod polimorfonuklearnih neutrofila posle povrede takođe dolazi do povećane ekspresije VEGF (88, 89).

Najvažniji faktor koji je odgovoran za sintezu VEGF je HIF-1 koji se aktivira u uslovima hipoksije (49). Međutim, u nekim uslovima su i drugi mehanizmi odgovorni za povećanje ekspresije VEGF, kao što su tumor supresorni geni i onkogeni, uključujući ras, src i p53, zatim deficit glu-

koze, kao i brojni stimulatori angiogeneze kao što su FGF, faktor rasta stvoren u trombocitima – PDGF, EGF, TNF, TGF i interleukin-1 (89–91).

Na osnovu svega zaključak je da veliki broj različitih međusobno povezanih procesa reguliše porast VEGF. Ovi modulišući faktori u koje spadaju hipoksija, deficit glukoze, tumor supresorni geni, onkogeni i faktori rasta, ulaze u međusobne kompleksne interakcije u *in vivo* uslovima. Npr. hipoksija modulira ekspresiju p53 gena, a učestvuje i u povećanju vaskularne permeabilnosti verovatno povećanjem nivoa VEGF. Tako svaki od ovih mehanizama sam, ili udružen sa ostalim, može da podstakne povećanje VEGF (92).

Kod svih pomenutih patoloških stanja astrocitima visokog i niskog gradusa, hemangioblastoma, eksperimentalnog modela neoplazmi CNS-a, kao i u uslovima hipoksije/ishemije, inflamacije, infekcije i traume CNS-a gde je došlo do neovaskularizacije, istovremeno je konstatovano povećanje ekspresije VEGF, snažnog angiogenog i edematogenog citokina.

Zbog dokazane ključne uloge VEGF u neovaskularizaciji, terapija usmerena na regulaciju ekspresije ovog faktora imala bi značajan uticaj na patogenezu opisanih bolesti kod kojih dolazi do angiogeneze, posebno tumora. Potencijalno blokiranje uloge VEGF odnosilo bi se na inhibiciju njegove sekrecije, njegovo neutralisanje u mikrocirkulaciji, kao i na sprečavanje njegovog vezivanja za receptore, a time i na inhibisanje dalje transdukcije signala.

#### L I T E R A T U R A

- Moses MA, Klagsbrun M, Shing Y. The role of growth factors in vascular cell development and differentiation. *Int Rev Cytol* 1995; 161: 1–48.
- Yamada E, Tobe T, Yamada H, Okamoto N, Zack DJ, Werb Z, et al. TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol* 2001; 16(1): 87–97.
- Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 1998; 53(6): 637–44.
- Takata K, Hirano H, Kasahara M. Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int Rev Cytol* 1997; 172: 1–53.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 1998; 23(1): 1–10.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1): 27–31.
- McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5(Suppl 11): 3–10.
- Weiss L. Lymphatic vessels and lymph nodes. In: Weiss L, editor. *Cell and Tissue Biology*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1988. p. 499–538.
- Lačković V. Histology of the heart and blood vessels. In: Nedeljković SI, Kanjuh V, Vukotić M, editors. *Cardiology*. Beograd: Društveno preduzeće za izdavačko trgovinsku delatnost i stručno usavršavanje sa p.o.; 2000. p. 63–8. (in Serbian)
- Lačković V, Kanjuh V, Todorović V, Labudović-Borović M, Bajčetić M. Microcirculation - cytological characteristics. Part 2. *Kardiologija* 2002; 23(3): 53–69. (in Serbian)
- Lačković V, Japundžić M, Vuzevski V, Bumbaširević V, Stefanović B. Use of silver methanamine staining in the study of dark cell - light cell phenomenon. *Med Sci Res* 1990; 18: 615–6.
- Lačković V, editor. *The Circulatory System*. Beograd: Nauka; 2001. (in Serbian)
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671–4.
- Schlosshauer B. The blood-brain barrier: morphology, molecules, and neurothelin. *Bioessays* 1993; 15(5): 341–6.
- Staddon JM, Rubin LL. Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 622–7.
- Lačković V, Labudović-Borović M, Puškaš N, Vuković I, Mirčić A, Nešić D. Cytological characteristics of

- vascular endothelium. Part 2. *Kardiologija* 2001; 22(1–2): 1–17. (in Serbian)
17. *Matter K, Balda MS*. Biogenesis of tight junctions: the C-terminal domain of occludin mediates basolateral targeting. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 4): 511–9.
  18. *Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S*. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 1997; 138(1): 181–92.
  19. *Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR*. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 1998; 141(1): 199–208.
  20. *Wagner R, Kachar B*. Linear gap and tight junctional assemblies between capillary endothelial cells in the eelrete mirabile. *Anat Rec* 1995; 242(4): 545–52.
  21. *Kniesel U, Woldburg H*. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20(1): 57–76.
  22. *Coomer BL, Stewart PA*. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res* 1985; 30(1): 99–115.
  23. *Dehouck MP, Vigne P, Torpier G, Breittmayer JP, Cecchelli R, Frelin C*. Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(4): 464–9.
  24. *Shepro D, Morel NM*. Pericyte physiology. *FASEB J* 1993; 7(11): 1031–8.
  25. *Hirschi KK, D'Amore PA*. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996; 32(4): 687–98.
  26. *Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW*. Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20(3): 269–87.
  27. *Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weleer RO*. Directional and compartmentalised drainage from the interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 83(3): 233–9.
  28. *Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW*. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51(3): 303–11.
  29. *Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW*. Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* 1989; 22(1): 103–6.
  30. *Risau W, Flamme I*. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73–91.
  31. *Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G*. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125(4): 725–32.
  32. *Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al*. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95(10): 3106–12.
  33. *Folkman J, Klagsburn M*. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235(4787): 442–7.
  34. *Achen MG, Stacker SA*. The vascular endothelial growth factor family: proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998; 79(5): 255–65.
  35. *Folkman J, Shing Y*. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* 1992; 313: 355–64.
  36. *Jackson C*. Matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(3): 295–9.
  37. *Sage EH, Vernon RB*. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J Hypertens* 1994; 12(10): S145–52.
  38. *Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al*. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93(2): e17–24.
  39. *Zagzag D, Capo V*. Angiogenesis in the central nervous system: a role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor and tenascin-C. Common molecular effectors in cerebral neoplastic and non-neoplastic „angiogenic diseases“. *Histol Histopathol* 2002; 17(1): 301–21.
  40. *Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertszenstein M, et al*. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380(6573): 435–9.
  41. *Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J*. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669–76.
  42. *Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF*. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983–5.
  43. *Nicosia RF*. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153(1): 11–6.
  44. *Roberts WG, Palade GE*. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 6): 2369–79.
  45. *Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9–22.
  46. *Enholm B, Jussila L, Karkkainen M, Alitalo K*. Vascular endothelial growth factor-C; a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8(7): 292–7.
  47. *Goldberg IM, Rosen EM, editors*. Regulation of angiogenesis. Basel: Birkenhauser Verlag; 1997.

48. *Claffey KP, Robinson GS*. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(2): 165–76.
49. *Pugh CW, Ratcliffe PJ*. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9(6): 677–84.
50. *de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT*. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255(5047): 989–91.
51. *Carmeliet P*. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653–60.
52. *Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al*. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276(5317): 1423–5.
53. *Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, et al*. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72(6): 835–46.
54. *Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, et al*. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(8): 4605–10.
55. *Yi M, Rouslahti E*. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(2): 620–4.
56. *Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, Ji XD, Wang D, Shih CC, et al*. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16): 8502–7.
57. *Leong KG, Hu X, Li L, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, et al*. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(8): 2830–41.
58. *Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA*. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 1985; 56(5): 1106–11.
59. *Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, Wiegand SJ, et al*. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest* 2000; 80(6): 837–49.
60. *Zagzag D*. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 146(2): 293–309.
61. *Castaigne P, David M, Pertuiset B, Escourolle R, Poirier J*. Ultrastructure of hem-angioblastomas of the central nervous system. *Rev Neurol (Paris)* 1968; 118(1): 5–26. (in French)
62. *Garcia JH*. The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51(4): 387–93.
63. *Britt RH, Enzmann DR*. Clinical stages of human brain abscesses on serial CT scans after contrast infusion. Computerized tomographic, neuropathological, and clinical correlations. *J Neurosurg* 1983; 59(6): 972–89.
64. *Liu HM*. Neovasculature and blood-brain barrier in ischemic brain infarct. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 75(4): 422–6.
65. *Hardman JM*. The pathology of traumatic brain injuries. *Adv Neurol* 1979; 22: 15–50.
66. *Yancopoulos GD, Dawis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J*. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801): 242–8.
67. *Yamashita T, Yamamoto S*. How do vessels proliferate in the capsule of a chronic subdural hematoma? *Neurosurgery* 1984; 15(5): 672–8.
68. *LeCouter J, Lin R, Ferrara N*. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat Med* 2002; 8(9): 913–7.
69. *Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W*. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359(6398): 845–8.
70. *Stratmann R, Krieg M, Haas R, Plate KH*. Putative control of angiogenesis in hemangioblastomas by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(11): 1242–52.
71. *Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N*. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935): 1306–9.
72. *Kim SK*. Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(5): 641–9.
73. *Volpert OV, Dameron KM, Bouck N*. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997; 14(12): 1495–502.
74. *Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, et al*. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141(7): 1659–73.
75. *Wang W, Merrill MJ, Borchardt RT*. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1996; 271(6 Pt 1): c1973–80.



76. *Hariri RJ*. Cerebral edema. *Neurosurg Clin N Am* 1994; 5(4): 687–706.
77. *Kostić VS, Mršulja BB*. Ischemic cerebral edema. In: *Mršulja BB, Kostić VS*, editors. Pathophysiology, diagnosis and therapy of cerebrovascular diseases. Beograd: Medicinski fakultet; 1989. p. 57–65. (in Serbian)
78. *Nakagawa Y, Shinno K, Okajima K, Matsumoto K*. Perifocal brain oedema in experimental brain abscess in rats. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990; 51: 381–2.
79. *Roper AH, Shafran B*. Brain edema after stroke. Clinical syndrome and intracranial pressure. *Arch Neurol* 1984; 41(1): 26–9.
80. *Bruce DA, Alavi A, Bilaniuk L, Dolinskas C, Obrist W, Uzzell B*. Diffuse cerebral swelling following head injuries in children: the syndrome of „malignant brain edema“. *J Neurosurg* 1981; 54(2): 170–8.
81. *Kostić VS*. Excitotoxic hypothesis in pathophysiology of cerebral ischemia: therapeutical promises. In: *Mršulja BB, Kostić VS*, editors. Biological Basis of the Therapy of Cerebrovascular Diseases. Beograd: Medicinski fakultet; 1992. p. 47–65. (in Serbian)
82. *Jelsma R, Bucy PC*. The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *J Neurosurg* 1967; 27(5): 388–400.
83. *Crisuolo GR, Merrill MJ, Oldfield EH*. Further characterization of malignant glioma-derived vascular permeability factor. *J Neurosurg* 1988; 69(2): 254–62.
84. *Živković M, Šternić N, Kostić V*, editors. Ischemic Heart Disease. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2000. (in Serbian)
85. *Kostić VS, Sokić D*. A novel concept for therapy of brain ischemia. In: *Živković M, Đurić S*, editors. Notebooks from Niš. Niš: Prosveta; 1998. p. 19–33. (in Serbian)
86. *Giannini C, Scheithauer BW*. Classification and grading of low-grade astrocytic tumors in children. *Brain Pathol* 1997; 7(2): 785–98.
87. *Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ*. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* 1995; 14(2): 87–93.
88. *Nag S, Takahashi JL, Kilty DW*. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(8): 912–21.
89. *Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T*, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55(20): 4575–80.
90. *Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W*. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth expression. *Oncogene* 1994; 9(3): 963–9.
91. *Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP*. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55(24): 6161–5.
92. *Louis DN, Gussella JF*. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet* 1995; 11(10): 412–5.

Rad je primljen 27. X 2003. god.