

ANNA MARKOWSKA, KRZYSZTOF DREWS

Angiogeneza w rozrodczości

Angiogenesis in Reproduction

Klinika Perinatologii i Chorób Kobietych AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Angiogeneza w warunkach fizjologicznych jest związana głównie z rozrodczością kobiet. Dynamiczna równowaga między czynnikami stymulującymi (VEGF, bFGF, PlGF, TGF- α/β , TNF- α , IL-8, HGF, PDGF, GCSF) a hamującymi (VEG1, PF-4, IL-12 i IL-18, angiostatyna i endostatyna) zachodzi w wielu procesach związanych z owulacją, miesiączkowaniem, implantacją zarodka i tworzeniem się jego naczyń, powstawaniem kosmówki i łożyska oraz porodem. Ciężce powikłane wykazują często nieprawidłowe unaczynienie kosmków łożyskowych, co może być jednym z czynników odpowiedzialnych za nieprawidłowy rozwój płodu. Stan przedrzucawkowy wydaje się związany z nieprawidłowym stężeniem VEGF (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 123–127).

Słowa kluczowe: angiogeneza, rozrodczość, czynniki pro- i antyangiogenne.

Abstract

In physiological conditions angiogenesis used to be related mainly to female reproductiveness. Dynamic equilibrium between relevant stimulatory factors (VEGF, bFGF, PlGF, TGF- α/β , TNF- α , IL-8, HGF, PDGF, GCSF) and inhibitory factors (VEG1, PF-4, IL-12, IL-18, angiostatin and endostatin) persists in several processes linked to ovulation, menstruation, embryo implantation and formation of embryonic vessels, development of chorion, placenta and delivery. Complicated pregnancies frequently manifest aberrant vascular supply to placental villi, which may represent one of variables responsible for abnormal development of the foetus. Pre-eclampsia seems to be linked with abnormal level of VEGF (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 123–127).

Key words: angiogenesis, reproductiveness, pro- and antiangiogenic agents.

Angiogeneza jest to tworzenie się nowych naczyń krwionośnych, które w warunkach fizjologicznych dotyczy głównie podstawowych procesów związanych z rozrodem kobiet: miesiączkowania i jajczkowania, implantacji zarodka, tworzenia kosmówki i łożyska, a następnie porodu. Tworzenie się naczyń krwionośnych u zarodka i płodu to waskulogeneza, która jest konieczna do rozwoju układu sercowo-naczyniowego zapewniającego dopływ krwi do każdego rozwijającego się narządu [1–4].

Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę

Proces angiogenezy zależy od wielu czynników, w tym powodujących proliferację i migrację komórek śródbłonna, rozwoju komórek mięśni-

wych, uwalniania białek stymulujących i hamujących tworzenie się naczyń, a także stanu macierzy międzykomórkowej i cząstek adhezyjnych, w tym integrzyn i kadheryn [3, 5].

Angiogeneza zależy od dynamicznej równowagi między aktywatorami i inhibitorami tego procesu. Znana jest pokaźna liczba zarówno czynników proangiogennych, stymulujących, jak i hamujących angiogenezę.

Do czynników stymulujących angiogenezę należą: VEGF (*vascular endothelial growth factor* – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), bFGF/aFGF (*basic, acidic fibroblast growth factor* – zasadowy i kwasowy czynnik wzrostu fibroblastów), PlGF (*placental growth factor* – łożyskowy czynnik wzrostu), TGF- α/β (*transforming growth factor α i β* – transformujący czynnik wzrostu α i β), TNF- α (*tumor necrosis factor α* – czynnik

martwicy guza α), IL-8 (*interleukin 8* – interleukina 8), HGF (*hepatocyte growth factor* – czynnik wzrostu hepatocytów), PDGF (*platelet-derived growth factor* – płytkowy czynnik wzrostu), GCSF (*granulocyte colony stimulating factor* – czynnik wzrostu kolonii granulocytów), folistatyna i leptyna [5, 6].

Wśród czynników hamujących angiogenezę wymienia się: VEGI (*vascular endothelial growth inhibitor* – inhibitor naczyńnowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu), 16 kd fragment prolaktyny, PF-4 (*platelet factor-4* – czynnik płytkowy 4), fragment 1 i 2 protrombiny, IL-12 i IL-18 (interleukiny 12 i 18), angiostatynę i endostatynę [5, 6].

W angiogenezie wyróżnia się przynajmniej trzy sposoby tworzenia się nowych naczyń: 1) tzw. „kielkowanie” (*sprouting*) z istniejącego naczynia, co powoduje rozkrzewianie się naczyń, 2) replikacja przez wgłabianie (*intussusception*) wewnątrz już istniejącego naczynia, 3) wydłużanie (*elongation*), czyli rośnięcie wzdłuż starego naczynia do nowego miejsca [2, 7–9]. Mechanizm ten jest niezwykle złożony, gdyż komórki śródbłonka, które nie kooperowałyby z cząstkami adhezyjnymi, takimi jak integryny, kadheryny, z mięśniami gładkimi, perycytami, VEGF i innymi czynnikami wzrostu uległyby apoptozie i nie miałyby możliwości uczestniczenia w tworzeniu nowych naczyń.

Wydaje się, że jednym z najważniejszych czynników promujących angiogenezę są cytokiny proangiogenne: VEGF i bFGF. Poznano kilka izoform VEGF powstałych przez alternatywne wycinanie (*splicing*) oraz ich swoiste receptory: VEGFR-1 (Flt1) i VEGFR-2 (Flk1 lub KDR), które zdają się odgrywać kluczową rolę w przenoszeniu sygnału mitogenowego do komórki śródbłonka naczyńnowego, a jednocześnie chronią VEGF przed działaniem proteaz znajdujących się w przestrzeni międzykomórkowej. Wymienione czynniki odgrywają ważną rolę w procesach związanych z cyklem reprodukcyjnym w organizmie kobiety [2, 4, 10–13].

Miesiączkowanie i owulacja

Cykliczna, fizjologiczna regeneracja błony śluzowej macicy zależy od wzrostu i regresji naczyń krwionośnych, które ją zaopatrują.

Endometrium ma doskonale rozwinięty system naczyńnowy. Końcowa tętniczka spiralna zaopatruje około 9 mm² endometrium i jest w pełni wyposażona w komórki śródbłonka, komórki mięśni gładkich i przydanek; dopiero w zewnętrznej 1/3 błony śluzowej tętniczki te tracą błonę mięśniową i przydanek, przechodząc w naczynia wło-

sowate. Kluczowym czynnikiem angiogenetycznym związanym z endometrium utrzymującym integralność śródbłonka i przepuszczalność włósniczek jest VEGF [11, 13].

Maas et al. [14] wykazali, że ludzkie endometrium ma potencjał angiogeny w całym cyklu miesięczkowym, ale istnieją różnice w odpowiedzi angiogennej w cyklu, o czym świadczą zróżnicowane wskaźniki gęstości naczyń (VDI – *vascular density index*), które były znamienne wyższe we wczesnej fazie proliferacyjnej oraz wczesnej i późnej fazie sekrecyjnej w porównaniu do późnej fazy proliferacyjnej. Również w opinii innych badaczy [15] faza sekrecyjna jest związana z intensywną angiogenezą, a mniejsze powierzchnie komórek śródbłonka i perycytów w późnej fazie proliferacyjnej wskazują na mniejszą odpowiedź angiogenną. Gargett et al. [11] badali w ludzkim endometrium związki między VEGF a proliferacją śródbłonka w trzech warstwach endometrium w różnych fazach cyklu miesięczkowego. Odsetek naczyń proliferujących był wyższy w endometrium proliferacyjnym w stosunku do sekrecyjnego. Największą ekspresję VEGF zaobserwowano w podnabłonkowym splocie włósniczkowym, następnie w warstwie czynnościowej, a najrzadziej w podstawnej. Ogniskowa ekspresja VEGF była stwierdzona w neutrofilach, dlatego autorzy sugerują, że to właśnie one w kontakcie ze śródbłonkiem mogą być źródłem śródnaczyńnowego VEGF dla naczyń podlegających angiogenezie przez wydłużanie lub wgłabianie w czasie fazy proliferacyjnej. W badaniach Gambino et al. [7] wydłużanie naczyń jest zasadniczym mechanizmem angiogenym w fazie proliferacyjnej, a według innych wgłabianie [16]. Obecnie uważa się, że zmiany stężenia progesteronu nie mają wpływu na indukcję zmian naczyniowych w końcowej fazie cyklu. Zniszczenie otaczającej naczynia macierzy na skutek zmian w czynnikach angiogennych ma destrukcyjnie wpływać na naczynia i powodować krwawienie miesięczne. Złuszczone i wydalone endometrium czynnościowe i fragmenty włósniczek i tętnic spiralnych zwykle są już zrekonstruowane około piątego dnia cyklu [1]. Wiążąca molekularna między układem endokrynnym a naczyniowym nie jest w pełni poznana, ale do wzrostu pęcherzyków, owulacji i wytworzenia ciała żółtego są konieczne mechanizmy angiogenezy [6].

Najbardziej intensywne zmiany w naczyniach krwionośnych zachodzą w czasie owulacji. Po pęknięciu pęcherzyka nowe naczynia wzrastają do rany i pomagają w transporcie progesteronu do całego organizmu. W ciałku żółtym stwierdzono obecność izoformy VEGF (VEGF A), której stężenie przy końcu cyklu obniża się i ciało żółte ulega regresji [17]. Badania na modelu szczurzym

dostarczyły również dowodu, że ciało żółte ulega regresji na skutek zmian w czynnikach angiogenicznych. Działający proangiogenicznie VEGF może być zahamowany skróconymi rozpuszczalnymi formami receptora Flt 1 i proces ten bierze udział w hamowaniu rozwoju ciała żółtego. Autorzy sugerują, że mediatory VEGF mogą mieć związek z kontrolą płodności [18].

Ciekawym spostrzeżeniem jest związek angiogenezy z progestagenami, które są stosowane w antykoncepcji, kontrolowaniu nadmiernego krwawienia miesięczkowego i w celu zapobiegania przerostowi endometrium.

Pierwszą pracę nad tym związkiem przedstawił Hague et al. [19]. Badano kobiety w okresie przedmenopauzalnym, u których stosowano progestageny (octan medroksyprogesteronu, noretisteron i lewonorgestrel) pod kątem stężeń bFGF i FGF oraz VEGF. Okazało się, że tylko lewonorgestrel nie stymulował angiogenezy w przeciwieństwie do dwóch pozostałych progestagenów, co może świadczyć o skuteczności leku w leczeniu nieprawidłowych krwawień.

Ciąża

Na znaczenie angiogenezy i waskulogenezy w położnictwie zwrócono uwagę około 45 lat temu, kiedy od 1957 r. kobiety używały w ciąży sedatywnie działający Talidomid, wycofany w 1961 r. U ponad 10 000 dzieci urodzonych na skutek jego stosowania stwierdzono wiele wad wrodzonych, głównie niedorozwój kończyn, głuchotę, ślepotę i rozszczep podniebienia. Późniejsze badania wykazały, że talidomid jest wybiórczym inhibitorem angiogenezy; obniża stężenie takich cytokin, jak: TNF- α , VEGF i bFGF, które promują angiogenezę [20, 21]. To nieprawidłowe antyangiogenne działanie potwierdziły późniejsze badania na myszach. Podanie ciężarnym myszom inhibitora angiogenezy (AGM-1470) spowodowało całkowite zahamowanie wzrostu zarodka ze względu na zablokowanie tworzenia się doczesnej, łożyska, pęcherzyka żółtkowego i naczyń. Badania wykazały również, że angiogeneza jest zasadniczym składnikiem fizjologicznym implantacji, rozwoju zarodka i łożyska [3]. Wykazano, że VEGF i jego receptory Flt1 (VEGFR-1) i Flk1 (VEGFR-2) oraz inny czynnik proangiogeniczny – angiopoetyna 1 i jej receptor TIE2 stanowią kluczowy system transdukcji sygnałów odgrywający rolę w regulacji embrionalnych naczyń [4]. Stwierdzono również, że FGF indukuje mezodermę w czasie gastrulacji, prowadząc do tkanki wytwarzającej krew; najpierw w wyspach krwiotwórczych w pęcherzyku żółtkowym tworzą się angioblasty i komórki he-

mopoetyczne. Jest to pierwszy etap waskularyzacji, w drugim wytwarzają się prymitywne naczynia krwionośne [2]. Carmeliet et al. [22] wskazują na rolę Flk1 i Flt1 u zarodków; niedobór tych receptorów u heterozygotycznych zarodków (VEGF +/-), czyli brakiem jednego allelu VEGF powoduje obumarcie w późniejszym okresie ciąży. Poza VEGF, który jest niezbędny w działaniu angiogenicznym w okresie ciąży, istotny jest inny szlak – przez angiopoetynę 1 (ligand dla TIE2), która jest mediatorem w przekazywaniu sygnału między śródbłonkiem a otaczającą macierzą i mezenchymą [23].

Wymiana przezłożyskowa dostarcza wszystkich niezbędnych metabolicznie składników do wzrostu płodu i jego rozwoju. Szybkość tej wymiany zależy od nasilenia przepływu krwi w macicy (przepływ maczyno-łożyskowy) oraz w pępowinie. Szybkość przepływu krwi przez łożysko zależy od rozwoju naczyń w łożysku; angiogeneza łożyskowa jest więc krytyczna dla prawidłowego rozwoju płodu [24].

Clark et al. wykazali, że trofoblast wydziela rozpuszczalny receptor VEGF – sFlt1, który może być antagonistą VEGF, ale dokładna jego rola nie została jeszcze poznana [12].

Do rodziny naczyniowych czynników wzrostu śródbłonka należy również PlGF, który wiąże się z receptorem VEGF – Flt1 (ale nie Flk1 – KDR) i uczestniczy w większości angiogenicznych i proliferacyjnych efektów VEGF. Przez alternatywne wycinanie (*splicing*) istnieją formy PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3. Zarówno PlGF-1, jak i PlGF-2 indukują migrację komórek śródbłonka, ale nie mają wpływu na proliferację [25].

W wielu patologiach ciąży wykazano nieprawidłowe unaczynienie doczesnej i kosmków łożyskowych. Angiogeneza w warunkach fizjologicznych jest związana ze wzrostem i dojrzewaniem kosmków w pierwszym etapie, a w środkowym okresie ciąży następuje drugi etap: znaczna zmiana zawartości naczyń związana ze wzrostem stężeń tlenu oraz remodelowanie naczyń wynikające ze znacznej proliferacji komórek śródbłonka [26].

Sharkey et al. [27] wykonali oznaczenia stężeń VEGF w osoczu matek, u których ciąża przebiegała prawidłowo i u matek ze stanem przedrzucawkowym. Osoczowe stężenia VEGF u kobiet w ciąży o przebiegu fizjologicznym były istotnie niższe niż u kobiet z preeklampsją (odpowiednio: 11,7 ng/ml i 32,7 ng/ml).

Przypuszcza się, że stan przedrzucawkowy jest następstwem zmniejszonej perfuzji łożyskowej spowodowanej brakiem przemiany tętnic spiralnych w tętnice maciczno-łożyskowe, które na skutek braku warstwy mięśniowej umożliwiają znaczne obniżenie oporu obwodowego w łożu naczynio-

wym. W patogenezie preeklampsji odgrywa też rolę aktywacja komórek śródbłonna. Baker et al. [28] zasugerowali, że zaburzenie funkcji komórek śródbłonna może być spowodowane podwyższonym stężeniem surowiczego VEGF, co sugeruje rolę te-

go czynnika w etiologii stanu przedrzucawkowego. Wydaje się, że opisane wyżej procesy są jednymi z istotnych elementów patomechanizmu powstawania nadciśnienia indukowanego ciążą.

Piśmiennictwo

- [1] **Smith SK:** Angiogenesis and reproduction. *Br J Obstet Gynaecol* 2001, 108, 777–783.
- [2] **Risau W, Flamme J:** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11, 73–91.
- [3] **Sherer DM, Abulafia O:** Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001, 22 (1), 1–13.
- [4] **Breier D, Damert A, Plate KH, Risau W:** Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 1997, 78 (1), 678–683.
- [5] **Scappaticci FA:** Mechanisms and future directions for angiogenesis – based cancer therapies. Review article. *J Clin Oncol* 2002, 20, 3906–3927.
- [6] **Espinosa-Cervantes MC, Rosado-Garcia A:** Angiogenesis in reproductive physiology. Follicular development, formation and maintenance of the corpus luteum. *Ginecol Obstet Mex* 2002, 70, 17–27.
- [7] **Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery, Lederman F, Rogers PA:** Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod* 2002, 17 (5), 1199–1206.
- [8] **Risau W:** Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997, 386, 671–674.
- [9] **Brooks PC, Clark RAF, Chares DA:** Requirement of vascular integrin alpha (V) beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994, 264, 569–571.
- [10] **Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Perrot-Appiant M:** A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF 189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 30 (99) 9, 6023–6028.
- [11] **Gargett CE, Lederman F, Heryanto B, Gambino LS, Rogers PA:** Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum Reprod* 2001, 16 (6), 1065–1075.
- [12] **Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS:** A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998, 59 (6), 1540–1548.
- [13] **Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF:** Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87, 12, 37–45.
- [14] **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker-Boudier HA, Evers JL:** Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2001, 16 (8), 1557–1561.
- [15] **Wulff C, Dickinson SE, Duncan WC, Fraser HM:** Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod* 2001, 16 (22), 2515–2524.
- [16] **Rogers PA, Lederman F, Taylor N:** Endometrial microvascular growth in normal and dysfunctional states. *Hum Reprod Update* 1998, 2, 503–508.
- [17] **Charnok-Jones DS, Smith SK:** Vascular endothelial growth factor and corpus luteum angiogenesis. *Angiogenesis* 1998, 2, 119–121.
- [18] **Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH:** Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Natl Med* 1998, 4 (3), 336–340.
- [19] **Haque S, Mackenzie IZ, Bicknell R, Rees MC:** *In vivo* angiogenesis and progestagens. *Hum Reprod* 2002, 17 (3), 786–793.
- [20] **D'Amato RJ, Loughnan ME, Flynn E, Folkman J:** Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 4082–4085.
- [21] **Ching LM, Xu ZF, Gummer BH, Palmer BD, Joseph WR, Baguley BC:** Effect of thalidomide on tumour necrosis factor production and anti-tumour activity induced by 5,6 dimethylxanthone-4 acetic acid. *Br J Cancer* 1995, 72, 339–343.
- [22] **Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pallefeyt S, Kickens L, Gersenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declerog C, Pawling J, Moous L, Collen D, Risan W, Nagy A:** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996, 380 (6573), 435–439.
- [23] **Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre P, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD:** Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE 2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996, 87 (7), 1171–1180.
- [24] **Reynolds LP, Redmer DA:** Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001, 64 (4), 1033–1040.
- [25] **Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G:** Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 1998, 273 (35), 22272–22278.
- [26] **Mayhew TM:** Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodeling of vascular endothelial cells. *Placenta* 2002, 239 (10), 742–780.

- [27] **Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, Morris NH, Smith SK:** Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1996, 26 (12), 1182–1185.
- [28] **Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT:** Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 1995, 86 (5), 815–821.

Adres do korespondencji:

Anna Markowska
Klinika Perinatologii i Chorób Kobietych AM im. K. Marcinkowskiego
ul. Polna 33
60-535 Poznań

Praca wpłynęła do Redakcji: 23.03.2004 r.

Po recenzji: 7.05. 2004 r.

Zaakceptowano do druku: 7.05.2004 r.

Received: 23.03.2004

Revised: 7.05. 2004

Accepted: 7.05.2004