

Usefulness of serum VEGF concentration measurement to estimate aortic aneurysm risk of rupture

Badania wartości oznaczania stężenia VEGF w surowicy w ocenie ryzyka pęknięcia tętniaka aorty brzusznej

Marek Kunecki¹, Marian Danilewicz², Agnieszka Nawrocka-Kunecka²

¹Department of General and Vascular Surgery, Medical University, Lodz, Poland (Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi)

²Department of Patomorphology, Medical University, Lodz, Poland (Katedra i Zakład Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi)

Abstract

Background. Risk of abdominal aortic aneurysm (AAA) rupture is difficult to estimate. Angiogenesis in aneurysm walls is an important morphologic finding. One of the most important factors stimulating angiogenesis is vascular endothelial growth factor (VEGF). The aim of our study was to evaluate if the two values: VEGF expression in aortic wall tissues, and VEGF serum concentration correlate with clinical manifestations of aneurysms, and if these two values correlate with each other.

Material and methods. Aorta tissue samples were taken in the operating room from patients undergoing aorta reconstruction for aneurysms: electively (group I, n = 49), emergency (group II, n = 19) or because of aortoiliac occlusion (AIO) (n = 17). Control tissue was taken from healthy organ donors (n = 9). Blood samples were obtained from these patients before surgery. Control serum samples were taken from patients undergoing surgery because of hernias and varices. Expression of VEGF in tissue was measured with use of morphometric analysis in slides after immunohistochemistry with anti-VEGF antibodies. Vascular endothelial growth factor serum concentration was measured with the use of ELISA.

Results. The highest level of serum VEGF was observed in the symptomatic AAA group (mean value: 404.3 pg/ml; sv = 331.7). Electively operated AAA showed lower serum VEGF concentration (mean value = 285.3; sv = 300.9), AIO and control: 366.4 and 277.3 respectively. These differences were not significant. Strong correlation was observed between VEGF serum level and VEGF tissue expression. Significant differences were shown in VEGF positive cell numbers between all examined groups (mean cell number in AAA symptomatic = 140.9, elective AAA = 108.5, AIO = 51.4, control = 21.0).

Conclusions. There is strong correlation in VEGF tissue expression with clinical manifestation of AAA. Vascular endothelial growth factor serum concentration is not a good clinical marker to estimate the risk of rupture.

Key words: vascular endothelial growth factor, aortic abdominal aneurysm

Streszczenie

Wstęp. Celem niniejszej pracy jest ocena przydatności oznaczania wartości stężeń VEGF w surowicy u chorych z tętniakami aorty brzusznej w celu oceny ryzyka pęknięcia. Analizowano stężenia VEGF w surowicy pacjentów z tętniakami aorty w zależności od objawów klinicznych tętniaka oraz zbadano korelację wartości stężeń VEGF w surowicy z ekspresją tego czynnika w ścianie aorty.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Marek Kunecki, Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej UM
ul. Wólczańska 195, 90-531 Łódź
tel/fax: (+48) 42 636 86 51
e-mail: mkunik@poczta.onet.pl

Materiał i metody. Materiał badawczy stanowiły próbki surowicy pobrane od chorych przed zabiegiem oraz fragmenty ściany aorty uzyskane od tych samych pacjentów podczas operacji rekonstrukcyjnej aorty. Wyodrębniono następujące grupy: I — tętniaki operowane planowo ($n = 49$), II — tętniaki objawowe i pęknięte ($n = 19$), III — niedrożności aortalno-biodrowe ($n = 17$), IV — grupa kontrolna, którą stanowiły fragmenty ściany aorty pobranej od dawców narządów ($n = 9$) oraz surowica pobrana u chorych operowanych planowo z powodu przepuklin i żyłaków kończyn dolnych ($n = 34$). Stężenie VEGF w surowicy oznaczano metodą ELISA. Ekspresję VEGF w tkance oceniono morfometrycznie, zliczając komórki VEGF-dodatnie po wykonaniu odczynów immunohistochemicznych.

Wyniki. Ekspresja VEGF w ścianie aorty była największa w grupie II. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę tej wartości w porównaniu z grupą I ($p < 0,003$). Wykazano statystycznie znamienne różnice ekspresji VEGF między pozostałymi grupami ($p < 0,001$). Największą średnią wartość stężenia VEGF w surowicy odnotowano w grupie II, ale różnice między wartościami w poszczególnych grupach nie były istotne statystycznie, mimo że korelacja między wartościami VEGF w surowicy a ekspresją w tkance okazała się silna ($p < 0,001$).

Wniosek. Wyniki badań wskazują na istotną rolę VEGF (i angiogenezy) w rozwoju tętniaka aorty, jednak brak specyficzności uniemożliwia zastosowanie pomiaru jego stężeń w ocenie dynamiki powiększania się tętniaka i ryzyka jego pęknięcia.

Słowa kluczowe: czynnik wzrostu śródbłonna VEGF, tętniak aorty brzusznej

Introduction

Despite the great progress in diagnosis and treatment of aortic aneurysms, pathogenesis of this disease is still not clear, and the criteria used to establish indications for surgery are sometimes deceptive. To-day surgical treatment of aortic aneurysm is performed when the risk of rupture seems to be higher than the risk of surgery, or if it justifies the high cost of endovascular repair. The common standard in estimation the risk of rupture is aneurysm size and rate of its enlargement. However, there are some circumstances when this tactic disappoints: aneurysm rupture before it reaches expected size limit, large aneurysms not fit for endovascular procedure in high surgical risk patients, psychical stress in patients with small aneurysms, and times when treatment is delayed with no guaranty of non-rupture. In these situations additional factors for estimating the risk of aneurysm rupture seem to be desirable.

Aortic aneurysm aetiology is still not known; especially the initial factor or process is unclear. Inflammatory infiltration, increased proteolytic activity, smooth muscle cell apoptosis, degeneration and remodelling of extracellular matrix and angiogenesis are defined as typical changes observed in the aneurysm wall.

Increased angiogenesis is observed in many physiological processes and in pathologies such as hyperplastic retinopathies, rheumatoid arthritis, psoriasis and neoplastic diseases. In recent years many articles have shown the role of angiogenesis in the development and dissemination of malignant neoplasms and indicate the usefulness of its intensity estimation in foreseeing the

Wstęp

Mimo ogromnego postępu w diagnostyce i leczeniu chorych z tętniakami aorty patogenezą tej choroby jest niejasna, a kryteria ustalania wskazań do leczenia operacyjnego — zawodne. Obecnie leczenie tętniaka aorty brzusznej podejmuje się, gdy możliwość jego pęknięcia przewyższa ryzyko operacji lub uzasadnia poniesienie wysokich kosztów związanych z metodą endowaskularną. Powszechnie przyjętą miarą ryzyka pęknięcia tętniaka jest jego największy poprzeczny wymiar i/lub szybkość powiększania się [1–3]. Jednak istnieją okoliczności, w których ta taktyka zawodzi: pęknięcie tętniaka zanim osiągnie on oczekiwaną graniczną wielkość, występowanie dużego tętniaka u chorego z wysokim ryzykiem operacji, stwierdzenie tętniaka niekwalifikującego się do leczenia endowaskularnego z przyczyn technicznych, wreszcie znaczny psychiczny stres występujący u części pacjentów, u których odroczone leczenie operacyjne małego tętniaka bez pewności, że nie nastąpi jego pęknięcie. Powyższe okoliczności uzasadniają poszukiwania dodatkowych parametrów specyficznie określających ryzyko pęknięcia tętniaka.

Etiologia tętniaka aorty pozostaje nadal nieznaną, zwłaszcza w aspekcie czynnika lub procesu inicjującego jego powstawanie. Stałymi zmianami obserwowanymi w ścianie tętniaka są: nacieki zapalne, wzmożona aktywności proteolityczna, apoptoza komórek mięśni gładkich, rozkład i przebudowa elementów macierzy międzykomórkowej oraz nasiloną angiogeneza [1, 4, 5].

Angiogenezę obserwuje się w wielu procesach fizjologicznych. Wykazano również jej istotną rolę w re-

rapidity of tumour growth and sensitivity to some kinds of treatment.

Many investigators have shown high intensity of angiogenesis as a phenomenon constantly observed in aortic aneurysm walls. Direct methods of estimation of angiogenesis rate in aorta specimens obtained during surgery (morphometry of vessel density, expression of angiogenic mediators, expression of mRNA of angiogenic cytokines with RT-PCR) showed that intensity of new vessel development in aneurysms is higher than in healthy aorta or in atherosclerotic aorta. Results of previous author studies indicated that the angiogenesis rate is higher in symptomatic and ruptured aneurysms than in symptomless aneurysms and does not depend on aneurysm size [10]. The factor which induces vessel development in aortic walls remains unknown. Probably the cytokines released from inflammatory cells permanently present in the aneurysm wall are mediators of angiogenesis. Another possible factor is tissue ischemia in the aorta wall below the renal arteries, originally lacking in *vasa vasorum* [1].

These observations lead to the hypothesis that angiogenesis intensity in the aorta wall may be estimated with indirect methods and might be a tool in the evaluation of the risk of rupture. Vascular endothelial growth factor (VEGF), the mitogen with high specificity to endothelial cells is the most commonly estimated mediator of angiogenesis. According to recent investigations, this factor may be produced by all tissues, and the main stimulation to its release is tissue ischemia. Additionally, the expression of the VEGF gene is regulated by estrogens, TSH, NO and neoplasm derived cytokines p-53 mutation. This factor causes the increased permeability of endothelium for proteins, activation of proteolytic enzymes including metalloproteinases degrading the extracellular matrix proteins, hyperplasia and migration of endothelial cells and new vessel formation [6–9].

The aim of this study is to examine the relationship between VEGF expression in the aorta wall and VEGF concentration in serum of patients with aortic aneurysm, and to examine the correlation of these two parameters with clinical manifestations of aneurysms. The existence of a strong correlation would allow the use of the level of this mediator as an indicator of the risk of rupture.

Material and methods

Fresh aortic wall specimens were obtained in the operating room from patients undergoing aortic reconstruction for abdominal aortic aneurysms (elective operations — group I, AAAplan, n = 49, ruptured and symptomatic aneurysms — group II, AAAsympt, n = 19), patients operated for aorto-iliac occlusion (group III, AIO,

tinopatiach rozrostowych, reumatoidalnym zapaleniu stawów, łuszczycy oraz chorobach nowotworowych. W ostatnich latach opublikowano wiele prac przedstawiających wyniki badań nad znaczeniem angiogenezy w rozwoju i rozprzestrzenianiu się nowotworów złośliwych oraz zastosowaniem oceny aktywności tego zjawiska w prognozowaniu szybkości rozwoju guza oraz podatności na niektóre sposoby leczenia [6–8].

W licznych badaniach wykazano, że w ścianie aorty zmienionej tętniakowato obserwuje się znaczne nasilenie angiogenezy. W bezpośrednio zastosowanych metodach oceny tego zjawiska w pobranych operacyjnie preparatach aorty (morfometria gęstości naczyń, ocena immunohistochemicznej ekspresji mediatorów angiogenezy, ocena ekspresji mRNA angiogenetycznych cytokin za pomocą RT-PCR) dowiedziono, że intensywność tworzenia nowych naczyń w tętniakach jest znamienne większa niż w zdrowej aorcie i zmienionej miażdżycowo [9]. W badaniach opublikowanych przez autora niniejszej pracy wykazano, że nasilenie angiogenezy w ścianie tętniaków objawowych i pękniętych jest większe niż w tętniakach bezobjawowych, niezależnie od ich wielkości [10]. Czynnikiem pobudzającym rozwój naczyń w ścianie aorty jest nieznan. Prawdopodobnie mediatorami angiogenezy są cytokiny wydzielane przez komórki nacieku zapalnego, którego obecność opisuje się jako stałą cechą tętniaków aorty. Możliwy jest również udział niedotlenienia tkanek w pierwotnie pozbawionej *vasa vasorum* ścianie aorty poniżej tętnic nerkowych [1].

Obserwacje te skłoniły do wysunięcia hipotezy, że ocena nasilenia angiogenezy w ścianie tętniaka, dokonana metodami pośrednimi, może posłużyć oszacowaniu ryzyka pęknięcia. Najczęściej oznaczanym mediatorem angiogenezy w surowicy jest naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), mitogen o dużej specyficzności wobec komórek śródbłonka. Według ostatnich badań czynnik ten może być produkowany przez wszystkie tkanki, a głównym stymulatorem jego wydzielania jest niedotlenienie tkanek. Ponadto na ekspresję genu *VEGF* wpływają estrogeny, TSH, NO, cytokiny produkowane przez nowotwory, mutacje p-53. Pod wpływem tego czynnika następuje znaczny wzrost przepuszczalności śródbłonka dla cząsteczek białka, aktywacja enzymów proteolitycznych, w tym metaloproteinaz rozkładających białka macierzy międzykomórkowej, rozrost i migracja komórek endotelium i formowanie nowych naczyń [6–9].

Celem niniejszej pracy jest zbadanie zależności między nasileniem ekspresji VEGF w ścianie aorty a jego stężeniem w osoczu u chorych z tętniakami aorty oraz korelacji między nimi a klinicznymi objawami tętniaka. Istnienie silnej korelacji pozwoliłoby na zastosowanie badania stężenia tych mediatorów w ocenie ryzyka pęknięcia tętniaka.

n = 17). The blood samples were obtained from the same patients before the operation. Control tissue samples were obtained from the aorta of healthy organ donors (group IV, DN, n = 9). Serum control samples were taken from patients operated on for inguinal hernias and lower extremity varices (group IV, control, n = 34).

Symptomatic aneurysm was diagnosed when there was a coexistence of abdominal or lumbar region pain, often with radiation to the inguinal and perineal region and if tenderness of the aneurysm was found during palpation. Diagnosis of symptomatic aneurysm was preceded by the examination of other abdominal organs to eliminate other reasons for these symptoms. The diagnosis of rupture was confirmed with Doppler sonography, computer tomography and intraoperative examination.

Tissue specimens were taken from the antero-lateral aortic wall beneath the renal arteries (protocol described by Holmes). Tissues were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and processed for routine paraffin embedding.

Blood samples were taken in the morning from unfed patients (except patients with ruptured aneurysms, where the blood samples were usually taken just before emergency operation). The samples were left for 30 minutes at room temperature for clot formation and were later centrifuged for 10 minutes (1400 g). The serum was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until measurement. The level of VEGF in the serum was estimated with ELISA using a Quantikine kit from R&D Systems, Abingdon, Great Britain. Every serum sample was measured twice.

Immunohistochemistry was performed in $4\ \mu\text{m}$ thin slides with streptavidin – biotin method, using anti-VEGF antibodies obtained from Santa Cruz and Immunocruz visualization kit. Endogenic peroxidase was blocked by incubation in 0.3% H_2O_2 , and later — to increase the availability of antigen – a 5 minute bath in 0.1 M/L citrate buffer in microwave was carried out. After overnight incubation with the first antibody (at 4°C) the slides were incubated with secondary biotinylated antibodies (Immunocruz visualization kit). 3,3-diaminobenzidine was a chromogen to develop the colour reaction.

Morphometric analysis

Paraffin slides after immunohistochemistry were examined in light microscopy at a magnification of $45\times$ and classified to the study. Later the slides were examined at high magnification ($400\times$) with the use of a computer-camera-microscope system. 6–8 consecutive fields were measured in every slide. Positive cells were identified by two independent observers and counted automatically.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły próbki krwi pobrane od chorych przed operacją oraz fragmenty ściany aorty od tych samych pacjentów. Wycinki ze ściany aorty pobierano na sali operacyjnej w czasie zabiegu rekonstrukcyjnego z powodu tętniaka w trybie planowym (grupa I, n = 49), pilnym w przypadku tętniaków objawowych i pękniętych (grupa II, n = 19) i ze względu na niedrożność aortalno-biodrową (grupa III, n = 17). Fragmenty ściany aorty zdrowej, służące jako kontrolne, pozyskiwano od zdrowych dawców narządów (grupa IV, n = 9). Surowice kontrolne pobierano od chorych operowanych planowo z powodu przepuklin i żyłaków kończyn dolnych (grupa IV — kontrola, n = 34). Tętniak objawowy rozpoznawano, gdy towarzyszyły mu bóle brzucha i/lub okolicy lędźwiowej, dość często z promieniowaniem do krocza i pachwin, oraz kiedy stwierdzano jego bolesność podczas badania palpacyjnego. Rozpoznanie to zwykle poprzedzano oceną pozostałych narządów jamy brzusznej i stwierdzeniem braku innej przyczyny opisywanych dolegliwości. Rozpoznanie pęknięcia potwierdzano w badaniu USG-dopplerowskim, tomograficznym oraz w ocenie śródoperacyjnej.

Wycinki pobierano z przednio-bocznej ściany aorty poniżej tętnic nerkowych (wg protokołu opisanego przez Holmes'a). Tkanki utrwalano w 10-procentowej zbuforowanej formalinie przez 24 godziny, a następnie przeprowadzano rutynowo do bloczków parafinowych. Odczyny immunohistochemiczne wykonywano w skrawkach grubości $4\ \mu\text{m}$.

Próbki krwi pobierano w godzinach porannych na czczo; pozostawiano je na 30 min w temperaturze pokojowej do wytworzenia skrzepu, a następnie poddawano 10-minutowemu odwirowaniu (1400 g). Surowicę zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -70°C do chwili wykonania oznaczeń. Stężenie VEGF w surowicy oznaczano metodą ELISA z zastosowaniem odczynników Quantikine f-my R&D Systems, Abingdon, Wielka Brytania. Każde oznaczenie wykonywano 2-krotnie.

Immunohistochemię wykonywano z użyciem metody znakowanej streptawidyny-biotyny. Zastosowano przeciwciała anti-VEGF (Santa Cruz) i kit wizualizacyjny Immunocruz. Endogenną peroksydazę blokowano, inkubując w 0,3% H_2O_2 , a następnie w celu zwiększenia dostępności antygeny stosowano 5-minutową kąpiel w 0,1 M/L buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej. Po nocnej inkubacji z pierwszym przeciwciałem (w temp. 4°C) skrawki inkubowano z biotylnowanymi kolejnymi przeciwciałami (Immunocruz visualisation kit). Jako chromogenu używano 3,3-diaminobenzydynę w celu wywołania odczynu barwnego.

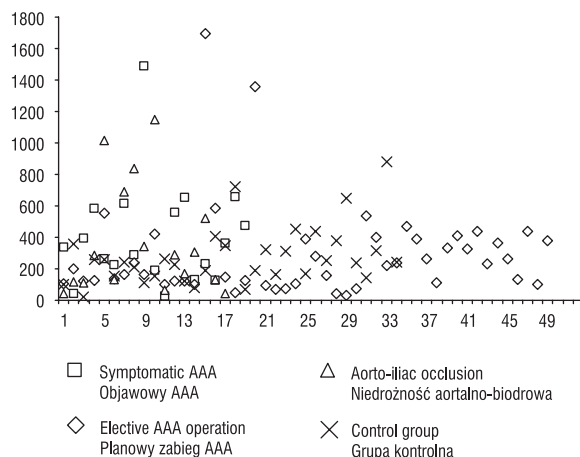


Figure 1. Vascular endothelial growth factor serum level [pg/L].

Rycina 1. Wartości VEGF w surowicy [pg/L]. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami badawczymi

Statistical analysis

differences between the groups were tested using unpaired Student's t-test preceded by evaluation of normality and Levine's test. The Mann-Whitney U test was used where appropriate. Correlation coefficients were calculated using Spearman's method. Results were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

The presence of VEGF was revealed in all serum samples. The distribution of values in groups is shown in Figure 1. In group I the mean value of VEGF concentration was 404.3 (32.45–1488.0) pg/ml, in group II it was 285.3 (31.3–1696) pg/ml, in group III $mv = 366.0$ (43–1148) and 277.3 (22.4–880) pg/ml in group IV.

There was no statistical significance between groups I and II ($p = 0.066$), I and III ($p = 0.69$), nor between II and III ($p = 0.23$). There was no statistical significance between groups I, II and III when compared to group IV (Figure 2). Microscopic images illustrating VEGF immunoreactivity are presented in Figure 3. The number of VEGF positive cells in aorta walls is presented in Figure 4. The study showed that the highest number of these cells was found in the wall of symptomatic AAA [mean value (mv) = 141; 82–188]. The mean value in group II was 108.59 (34–171), in AIO $mv = 51.4$ (23–81), in organ donors $mv = 21$ (8–28). Statistical analysis showed the significant difference between I and IV ($p < 0.0001$), I and III ($p < 0.001$) and I and II ($p < 0.003$). The differences in VEGF positive cell numbers between electively operated aneurysms and groups II and IV were significant where $p < 0.001$ (Figure 5).

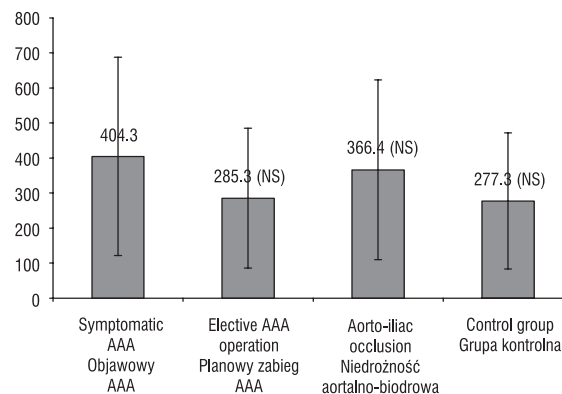


Figure 2. Mean serum VEGF level [pg/L]

Rycina 2. Średnie wartości stężeń VEGF w surowicy [pg/L]

Analiza morfometryczna

Po wykonaniu odczynu na obecność VEGF skrawki parafinowe oglądano w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 45-krotnym i klasyfikowano do dalszej oceny. Następnie skrawki oceniano w 400-krotnym powiększeniu z użyciem systemu komputer-kamera-mikroskop. Badano 6–8 kolejnych pól w każdym skrawku. Komórki wykazujące dodatni odczyn oznaczano 2-krotnie (przez 2 niezależnych badaczy) na ekranie komputera, a następnie zliczano automatycznie.

Analiza statystyczna

Różnice między badanymi grupami badano z użyciem testu t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych poprzedzonym analizą rozkładu i testem Levena. Stosowano także test Mana-Whitneya dla danych nieparametrycznych.

Wyniki

Obecność VEGF wykazano we wszystkich badanych próbkach surowicy. Rozkład wartości w poszczególnych grupach przedstawiono na rycinie 1. W grupie I średnia wartość stężenia VEGF wyniosła 404,3 pg/mL (32,45–1488,0). W grupie II — 285,3 pg/mL (31,3–1696,0), w grupie III — 366,0 pg/mL (43,5–1148), a w grupie IV — 277,3 pg/mL (22,4–880). Nie stwierdzono istotności statystycznej różnic między grupami I i II ($p = 0,066$), I i III ($p = 0,69$), II i III ($p = 0,23$) oraz różnic poszczególnych grup w porównaniu z grupą IV (ryc. 2).

Obrazy mikroskopowe odczynów immunohistochemicznych przedstawiono na rycinie 3. Liczby komórek wykazujących dodatni odczyn z przeciwciałami anti-VEGF w ścianie aorty w poszczególnych grupach przedstawiono na rycinie 4. W badaniu wykazano, że największa liczba takich komórek występuje w ścianach tętniaków objawowych: średnia 141 (82–188). W grupie II śred-

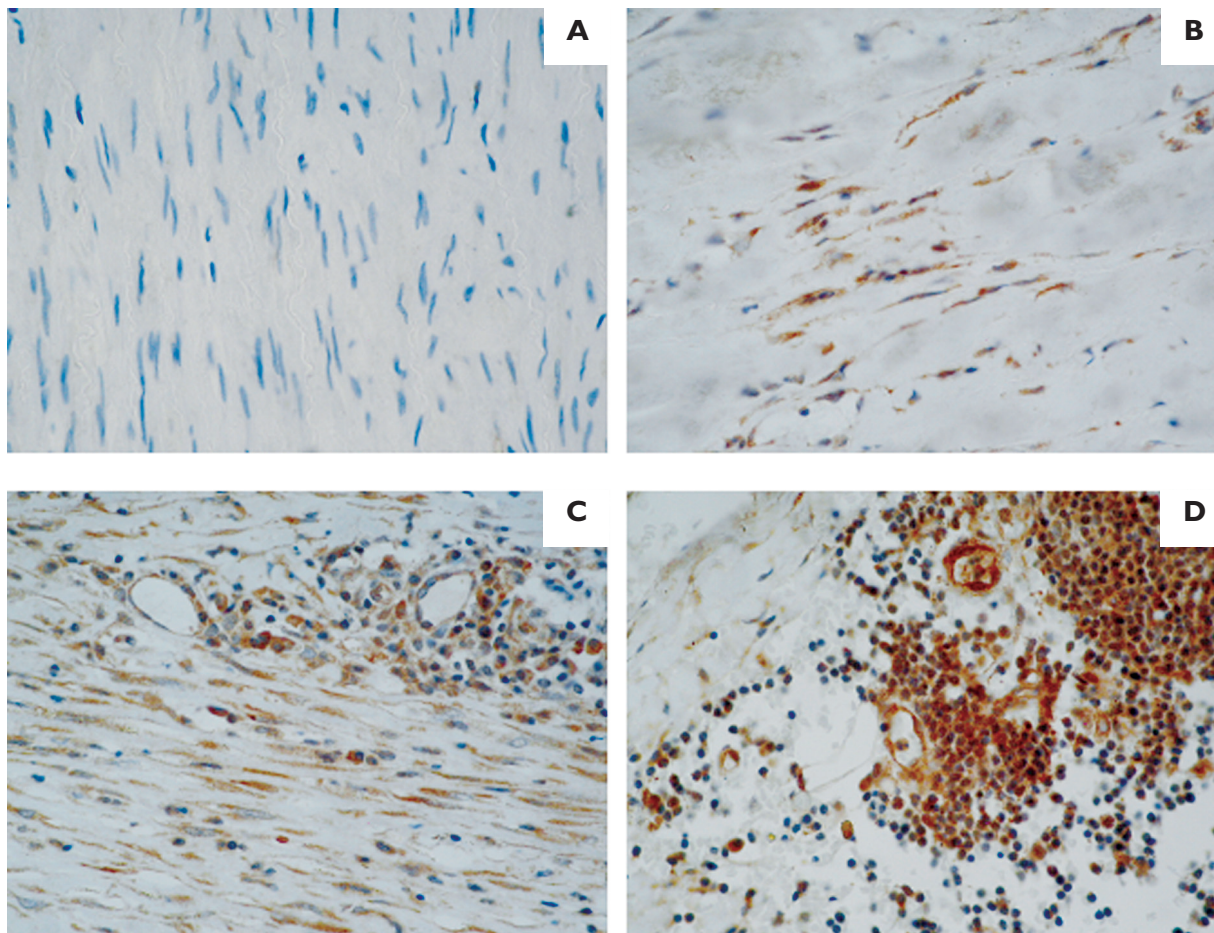


Figure 3. **A.** Negative immunoreactivity for VEGF in normal aorta control); **B.** Focal positive immunoreactivity in aortic occlusion; **C.** Numerous VEGF positive cells in asymptomatic aortic aneurysm wall; **D.** Abundant positive cells in symptomatic aortic aneurysm. Magnification 200×

Rycina 3. **A.** Brak reakcji immunohistochemicznej na obecność VEGF w ścianie prawidłowej aorty (kontrola); **B.** Nieliczne ogniska dodatniej reakcji w ścianie aorty zmienionej miażdżycowo (nieδροżność aortalno biodrowa); **C.** Liczne dodatnie komórki w ścianie tętniaka bezobjawowego (AAA); **D.** Bardzo liczne komórki dodatnie w ścianie tętniaka objawowego (AAAasymp). Powiększenie 200×

Discussion

The results of our study confirmed the role of VEGF in the stimulation of angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. VEGF positive cells were significantly more numerous in aneurysms than in healthy aorta walls or in atherosclerotic aortas. Additionally, the number of cells which revealed a positive reaction with anti-VEGF antibodies was significantly higher in symptomatic and ruptured compared to electively operated AAA, which may indicate the meaning of the angiogenesis process in the end stage of aneurysm development and in its rupture.

Vascular endothelial growth factor serum concentration levels range from 20 to over 1500 pg/ml; however, the mean values in groups range from 275 to 400 pg/ml. Similar levels were measured by other authors [7–9, 11].

nia wyniosła 108,5 (34–171), w grupie nieδροżności aortalno-biodrowych — 51,4 (23–81), a w grupie dawców narządów — 21 (8–28). W ocenie statystycznej wykazano istotność różnic między grupami: I a IV ($p < 0,0001$), I a III ($p < 0,001$) oraz I a II ($p < 0,003$). Różnice liczby komórek VEGF-dodatnich między grupą tętniaków bezobjawowych a grupami II i IV okazały się znamienne przy poziomie istotności p mniejszym niż 0,001 (ryc. 5).

Dyskusja

Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki potwierdzają znaczenie VEGF w pobudzaniu angiogenezy w tętniakach aorty. Komórki VEGF-dodatnie stwierdzono w liczbie znamiennej większej w ścianach tętniaków niż w ścianach tętnic zdrowych i zmienionych miażdżycowo. Ponadto liczba komórek wykazujących dodatni

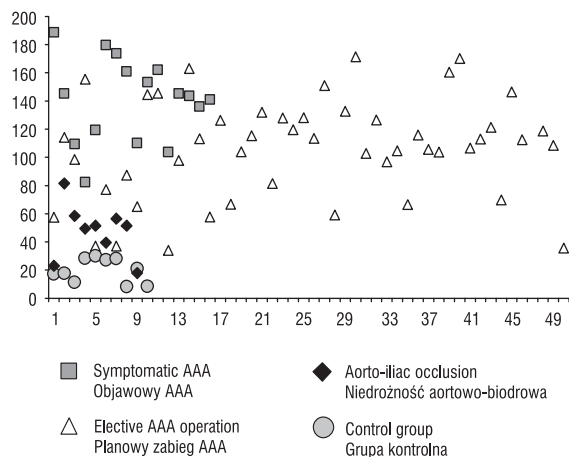


Figure 4. The number of VEGF(+) cells in the aortic media
Rycina 4. Liczba komórek VEGF(+) w błonie środkowej ściany aorty

In our study we assumed that the aortic wall is the main source of VEGF in the circulating blood, and the level of this growth factor in serum reflects angiogenesis intensity in aorta. Mean values of VEGF concentration were highest in symptomatic aneurysms, but statistical differences between the groups were not high and turned out to be statistically insignificant. The results obtained indicate that our assumption was false. We suspect now that the parietal thrombus has an influence on VEGF levels in patients with AAA, where the permanent induction of platelets to produce cytokines goes on, independently from processes in the aneurysm wall. Some investigators showed that leukocytes and platelets intensively produce VEGF during thrombus formation [9, 11].

High levels of VEGF were observed in people with AIO. It is possible to speculate that this is the consequence of high VEGF production in tissues with chronic ischemia. There is the possibility of the presence of additional pathologic processes ongoing with stimulation of VEGF release - processes difficult or impossible to identify in a single individual.

Maybe the lack of correlation between VEGF serum level and aneurysm clinical manifestation is due to the means of selection of cases into the study groups. The main criterion to define the groups of aneurysms was clinical manifestation. It is possible to consider that selection using these criteria could be subjective. Apprehension of consequences in case of overlooking the symptoms of rupture might cause, in some doubtful cases, the establishment of diagnosis of symptomatic AAA and emergency operation. That is why, in group I, some cases could be not really symptomatic. On the other hand, we may suspect that the presence of clinical symp-

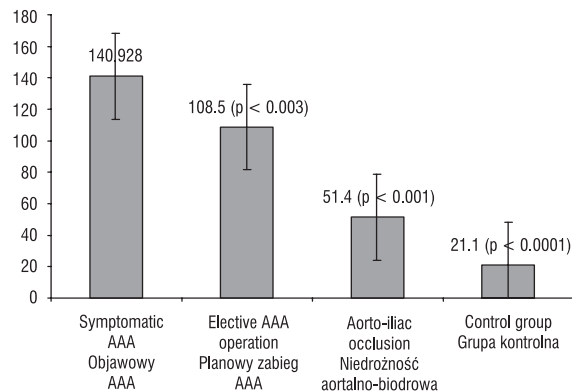


Figure 5. Average number of VEGF(+) cells in the aortic media

Rycina 5. Średnie wartości liczby komórek VEGF(+) w błonie środkowej ściany aorty w poszczególnych grupach badawczych

odczyn immunohistochemiczny z przeciwciałem anti-VEGF w grupie tętniaków objawowych i pękniętych okazała się większa w porównaniu z tętniakami bezobjawowymi, co może wskazywać na znaczenie tego procesu w końcowym stadium rozwoju tętniaka i doprowadzeniu do jego pęknięcia.

Wartości stężeń VEGF w surowicy wynosiły od 20 do ponad 1500 ng/mL, a średnie wartości w poszczególnych grupach — 275–440 g/mL. Podobne wartości uzyskiwali inni autorzy [7–9, 11]. W przedstawionym badaniu przyjęto założenie, że ściana aorty jest dominującym źródłem VEGF we krwi i stężenie tego czynnika wzrostu w surowicy odzwierciedla nasilenie angiogenezy w aorcie. Średnie wartości stężeń VEGF okazały się najwyższe w grupie tętniaków objawowych, ale różnice między badanymi grupami były niewielkie i okazały się nieistotne statystycznie. Uzyskany rezultat wykazuje, że przyjęte założenie o jednorodnym, aortalnym pochodzeniu VEGF w surowicy najprawdopodobniej jest błędne. Należy podejrzewać, że zjawiskiem wpływającym na stężenie VEGF w surowicy u chorych z tętniakiem aorty jest obecność w niemal wszystkich tętniakach skrzepliny przyściennej oraz stałego pobudzenia płytek do produkcji cytokin, dodatkowo i niezależnie od procesów toczących się w ścianie naczynia. W badaniach innych autorów wykazano, że krwinki białe i płytki intensywnie produkują VEGF podczas tworzenia skrzepu [9, 11].

Duże stężenie VEGF obserwowano u chorych z niedrożnością aortalno-biodrową. Można przypuszczać, że w tej grupie jest on następstwem pobudzania produkcji w przewlekle niedokrwionych tkankach. Możliwe jest istnienie dodatkowych procesów fizjologicznych lub

toms is a consequence of the activation of degradation and remodelling processes in aorta, and in some cases aneurysms of high activity of aorta destruction were selected to elective operation and would give clinical manifestation in the near future.

The results of this study indicated that indirect methods in angiogenesis estimation in tissue might be useful. Dynamic contrast enhanced magnetic resonance (DCE-MRI) is a possible method. This method was used with success in the estimation of angiogenesis in rectal cancer [8]. In our study, we considered the use of this method, but its technical requirements and its resolution only allowed the examination of big tissue masses with high blood flow, such as tumours. It is not possible to use it in examination of structures like the aorta wall.

In recent years, some trials of the estimation of different biochemical parameters of processes ongoing in the aortic wall were done to foresee the natural history of aneurysms. The activity of metalloproteinases, levels of products of extra cellular matrix degradation, were examined [9, 12, 13]. Some studies showed some correlations between these parameters and the risk of rupture or the enlargement rate of aortic aneurysms. However, none of these parameters correlated strongly enough and none showed enough specificity to be used in clinical practice.

The results of VEGF levels gave a similar effect; however, studies of this factor should be continued. The justification of such studies is the strong correlation between VEGF expressions in aorta walls and the clinical manifestation of aneurysms.

It seems to be interesting to examine VEGF serum levels after surgery and the estimation of the influence of angiogenesis inhibitors on the clinical course of aneurysms and enlargement rapidity.

Conclusions

There is strong correlation in VEGF tissue expression with clinical manifestation of AAA. Vascular endothelial growth factor serum concentration is not a good clinical marker to estimate the risk of rupture.

References

1. MacSweeney STR, Powell JT, Greenhalgh RM (1994) Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, 81: 935–941.
2. Hollier L, Taylor L, Ochsner J (1992) Recommended indications for operative treatment of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 15: 1046–1052.
3. Lundbom J, Hatlinghus S, Wirshing J et al (1999) Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms in Norway: the first 100 patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 18: 506–509.
4. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW (1995) Medial neovascularisation in abdominal aortic aneu-

patologicznych przebiegających wraz ze stymulacją wydzielania VEGF trudnych lub niemożliwych do zidentyfikowania, które występują u poszczególnych chorych.

Być może brak korelacji stężenia VEGF w surowicy i w tkankach wiąże się z doбором grup badawczych w niniejszej pracy. Kryterium podziału materiału były kliniczne objawy tętniaka. Można sądzić, że dobór pacjentów na podstawie takich kryteriów jest dość subiektywny, ponieważ obawa przed skutkami przeoczenia objawów pęknięcia skłania w wątpliwych przypadkach do postawienia rozpoznania tętniaka objawowego i podjęcia decyzji o operacji w trybie pilnym. Dlatego w grupie I mogli znaleźć się chorzy, u których tętniaki w rzeczywistości nie były objawowe. Jednocześnie można przypuszczać, że uaktywnienie się procesów prowadzących do rozkładu i przebudowy ściany aorty poprzedza wystąpienie opisywanych powyżej klinicznych objawów tętniaka; u części chorych zakwalifikowanych do grupy pacjentów bez objawów i operowanych planowo tętniaki wykazywały dużą aktywność procesu niszczenia ściany aorty, które mogły wywołać objawy kliniczne.

Uzyskane rezultaty skłaniają do zastosowania pośrednich metod oceny angiogenezy w badanej tkance, takich jak dynamiczny, wzm-ocniony kontrastem rezonans magnetyczny (DCE-MRI). Badanie to zastosowano z powodzeniem w ocenie nasilenia angiogenezy u chorych z rakiem odbytnicy [8]. W niniejszej pracy uwzględniano zastosowanie tej metody, ale jej techniczne wymagania oraz rozdzielczość umożliwia przeprowadzanie badania dużej masy tkankowej o znacznym przepływie krwi, takiej jak guzy nowotworowe. Według opinii specjalistów radiologów obecnie nie można uzyskać miarodajnych wyników w ocenie takich struktur, jak ściana aorty.

W ostatnich latach podejmowano kilka prób oceny różnych biochemicznych parametrów procesów toczących się w ścianie aorty w celu oceny naturalnego przebiegu tętniaka. Były to aktywności metaloproteinaz oraz stężenie produktów przemiany (rozpadu) białek macierzy międzykomórkowej [9, 12, 13]. W części prac wykazano korelację między stężeniem tych parametrów a ryzykiem pęknięcia czy szybkością powiększania się tętniaka. Jednak żaden z parametrów nie korelował wystarczająco silnie i nie miał dostatecznej specyficzności, aby można go zastosować klinicznie. Podobnie trzeba ocenić rezultat oceny pomiarów stężenia VEGF, choć należy prowadzić dalsze badania nad tym czynnikiem. Uzasadnieniem tych obserwacji jest silna korelacja między jego ekspresją w ścianie aorty a klinicznymi objawami i prawdopodobnie pęknięciem tętniaka. Wskazana wydaje się ocena stężenia tego parametru po operacji tętniaka, jak również określenie wpływu inhibitorów

- rysms: a histopathologic marker of aneurismal degeneration with pathophysiological implications. *J Vasc Surg*, 21: 761–766.
5. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J (2000) The role of inflammation in vascular diseases. *J Leuk Biol*, 67: 591–602.
 6. Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1358–C1366.
 7. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A et al (2002) Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients. *Ann Surg*, 236: 37–42.
 8. George ML, Dzik-Jurasz ASK, Padhani AR et al (2001) Non-invasive methods of assessing angiogenesis and their value in predicting response to treatment in colorectal cancer. *Br J Surg*, 88: 1628–1636.
 9. Kobayashi M, Matsubara J, Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y (2002) Expression of angiogenesis and angiogenic factors in human aortic vascular disease. *J Surg Res*, 106: 239–245.
 10. Kunecki M, Andrzejewski M, Nawrocka A (2002) Inflammatory reaction and angiogenesis intensity in aortic wall according to clinical manifestation of abdominal aortic aneurysm. *Acta Angiol*, 8: 89–98.

angiogenezy i VEGF na przebieg kliniczny tętniaka oraz szybkość jego powiększania.

Wnioski

Wyniki badań wskazują na istotną rolę VEGF (i angiogenezy) w rozwoju tętniaka aorty, jednak brak specyficzności uniemożliwia zastosowanie pomiaru jego stężeń w ocenie dynamiki powiększania się tętniaka i ryzyka jego pęknięcia.

11. Jelkmann W (2001) Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chemistry*, 47: 617–623.
12. Lindholt JS, Heickendorf L, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW (2001) Five-year results of elastin and collagen markers as predictive tools in the management of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 21: 235–240.
13. Lindholt JS, Heickendorf L, Henneberg EW, Fasting H (1997) Serum-elastin-peptides as a predictor of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 14: 12–18.