

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.71-006-092:612.13]-074

И.В. Бабкина, И.Н. Кузнецов, Ю.Н. Соловьев, Е.Ю. Руссо, Е.А. Тен

**ФАКТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ**

ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва

*Доказано, что в развитии и регенерации костной ткани и образовании опухолей кости важную роль играют процессы ангиогенеза и костно-хрящевой резорбции при участии фактора роста эндотелия сосудов VEGF и его рецепторов. Проведен сравнительный анализ содержания VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 и ангиогенина в сыворотке крови практически здоровых людей, больных первичными злокачественными, доброкачественными и пограничными опухолями костей. Обследовали 366 больных с новообразованиями костей в возрасте 14–76 лет, 223 (60,9%) мужчины и 143 (39,1%) женщины. В группу контроля были включены 48 практически здоровых людей в возрасте 15–69 лет, из них 25 (52,1%) мужчин и 23 (47,9%) женщины. Концентрацию VEGF, рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 и ангиогенина определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов фирмы “R&D Systems Inc.” (США). Показано, что отдаленные результаты лечения (общая 3-летняя выживаемость) больных с типичной остеосаркомой зависели от степени злокачественности опухоли, определяемой критерием G. Показатели исходных уровней VEGF и растворимых форм его рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови при типичной остеосаркоме прогностической значимостью не обладали.*

Ключевые слова: опухоли костей; VEGF, VEGF-R1; VEGF-R2; ангиогенин

Механизмы роста опухоли и неизмененных тканей кости во многом сходны. Доказано, что в развитии и регенерации костной ткани и образовании опухолей кости важную роль играют процессы ангиогенеза и костно-хрящевой резорбции при участии фактора роста эндотелия сосудов VEGF и его рецепторов. VEGF и рецепторы VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 принимают участие во всех процессах остеогенеза, включая дифференцировку остеобластов. Рецепторы VEGF обнаружены в клетках кости, как в эмбриональном периоде, так и в зрелой кости. Отмечены различия в экспрессии рецепторов VEGF плоскими и трубчатыми костями [1].

Остеокласты играют важную роль в ангиогенезе костной ткани [2, 3]. В культурах зрелых остеокластов обнаружены высокоаффинные рецепторы VEGF (KDR/Flk-1 и Flt-1), и выявлена активация процессов резорбции под действием VEGF.

Синтез VEGF и его рецепторов (VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3) находится под контролем нескольких факторов, одним из которых является гипоксия [4], что характеризует VEGF как стрессиндуцированный фактор. В последние годы в литературе появились результаты клинических исследований по изучению содержания VEGF, как в опухоли, так и в сыворотке крови больных с опухолями костей, однако однозначных выводов о роли этого фактора роста в патогенезе развития опухоли и возможности его использования в качестве мишени для химиотерапии не сделано. Показано, что уровни VEGF в сыворотке крови при остеосаркоме выше, чем у практически здоровых людей соответствующего возраста, и его содержание в крови коррелирует с содержанием в опухоли [5–7].

G. Chen и соавт. показали, что до хирургического лечения уровни VEGF в крови были выше, чем после удаления первичной опухоли. Считают, что содержание VEGF в сыворотке крови является фактором прогноза прогрессирования остеосаркомы [5, 7, 8].

В литературе представлены различные материалы и методы исследований VEGF и его рецепторов при опухолях костей. I. Ługowska и соавт. определяли VEGF в биоптатах опухоли 91 пациента с остеосаркомой до лечения иммуногистохимическим методом [9]. Показали, что 39% опухолей состояли из клеток, экспрессирующих VEGF, в большинстве

случаев они встречались у пациентов моложе 14 лет, а максимальный размер опухоли превышал 8 см. 5-летняя как общая, так и безрецидивная выживаемость у пациентов с VEGF-положительными опухолями была достоверно ниже, чем с VEGF-негативными. S. Jawad и соавт. также с помощью иммуногистохимического исследования провели анализ содержания VEGF в остеосаркоме с учетом локализации опухоли в костях челюсти (15 пациентов) и длинных трубчатых костях (15 пациентов). Показали, что в опухолях длинных трубчатых костей содержание VEGF достоверно выше, чем в костях челюсти [10].

G. Holzer и соавт. при помощи сцинтиграфии определили в опухоли пациентов с высокозлокачественной остеосаркомой рецептор  $^{125}\text{I}$ -VEGF<sub>165</sub>. На основании результатов исследований высказали предположение о возможности использования этого метода для выбора схемы лечения больных с остеосаркомой [11].

Не так оптимистичны в своих выводах о роли VEGF в качестве фактора прогноза остеосаркомы J. Qi и соавт. Авторы обследовали 367 больных с остеосаркомой. С помощью иммуногистохимического метода определяли наличие VEGF в опухоли. Показали, что только при 3-й стадии заболевания, остеобластическом гистологическом варианте у VEGF-положительных пациентов, получавших неoadъювантную химиотерапию, 5-летняя выживаемость была ниже, чем у VEGF-отрицательных пациентов. В других сравниваемых подгруппах достоверных различий не было [12].

S. Limmahakun и соавт. исследовали содержание VEGF в сыворотке крови 28 больных с остеосаркомой и 30 практически здоровых людей. Различий в содержании не обнаружили [13].

К потенциальным регуляторам ангиогенеза, способствующим росту как первичной опухоли, так и метастазов, кроме VEGF, относится и ангиогенин [14]. “Ангиогенин” переводится с греческого языка, как “рождающий сосуды”. Ангиогенин индуцирует ангиогенез путем активации эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, в результате чего происходит запуск ряда биологических процессов, включая миграцию клеток, инвазию, распространение и формирование трубчатых структур клеток. Показано, что ангиогенин осуществляет свои функции в четыре этапа: 1) проявляет рибонуклеазную активность; 2) связывается с актином мембраны, что приводит к деградации базальной мембраны; 3) связывается с необходимым белком, в результате чего происходит трансдукция сигнала в цитоплазму; 4) перемещается в ядро клетки-мишени, где происходит повышение транскрипции рибосомальной РНК. По-

Для корреспонденции:

Бабкина Ирина Валентиновна, д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр.  
Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24  
E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Таблица 1

**Содержание VEGF и его рецепторов в сыворотке крови больных с новообразованиями костей и в контрольной группе**

Показатель	Группы	Количество больных	$\bar{X} \pm m$ , пг/мл	Пределы колебания, пг/мл	Нижний квартиль, пг/мл	Медиана, пг/мл	Верхний квартиль, пг/мл
VEGF	Контроль	26	211±25,8	41,7-556	120	188	247
	Больные	362	380±18,8	21,3-2 700	139	271	506
VEGF-R1	Контроль	22	70,0±8,9	5-142	35	74,5	89
	Больные	132	97,8±3,1	5-223	76,2	94,7	115
VEGF-R2	Контроль	22	9 768±658	6 420-14501	8 675	9 654	11 357
	Больные	109	11 622±269	157-24556	10 222	11 360	12 867

Примечание. VEGF<sub>контроль-больные</sub>  $p=0,014$  (Mann–Whitney  $U$ -test); VEGF-R1<sub>контроль-больные</sub>  $p=0,0026$  (Mann–Whitney  $U$ -test); VEGF-R2<sub>контроль-больные</sub>  $p=0,043$  (Mann–Whitney  $U$ -test).

лагают, что по такому же механизму ангиогенин принимает участие в пролиферации опухолевых клеток [15].

Мы проводили сравнительный анализ содержания VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 и ангиогенина в сыворотке крови практически здоровых людей, больных первичными злокачественными, доброкачественными и пограничными опухолями костей для оценки его взаимосвязи с основными клинико-морфологическими, биохимическими характеристиками новообразований и прогнозом. Обследовали 366 больных с новообразованиями костей в возрасте от 14 до 76 лет, прошедших обследование и лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 1999 по 2009 г. Из них 223 (60,9%) мужчины и 143 (39,1%) женщины.

В группу контроля были включены 48 практически здоровых людей в возрасте от 15 до 69 лет, 25 (52,1%) мужчин и 23 (47,9%) женщины.

Концентрацию VEGF, рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 и ангиогенина определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием реактивов фирмы “R&D Systems Inc.” (США).

Для анализа полученных результатов больные с новообразованиями костей были разделены на 3 группы: 1-я – с доброкачественными новообразованиями костей 42 (12,5%) наблюдения; 2-я – с пограничными (гигантоклеточная опухоль кости – ГКО) 39 (10,6%); 3-я – со злокачественными (саркомы) опухолями костей 285 (77,9%): остеосаркома (138), хондросаркома (56), опухоль Юинга (68), злокачественная фиброзная гистиоцитома кости (18), хордома (5).

Во всех образцах сыворотки крови практически здоровых людей (группа контроля) и больных с новообразованиями костей выявлены измеримые уровни фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), растворимых форм его рецепторов (VEGF-R1, VEGF-R2) и ангиогенина.

На первом этапе исследования мы провели оценку содержания VEGF и его рецепторов в сыворотке крови. У пациентов 1-й и 2-й групп концентрации маркеров были достоверно выше, чем в контроле (табл. 1).

Сравнили уровни маркеров при доброкачественных, пограничных (гигантоклеточная опухоль кости – ГКО), злокачественных опухолях (саркомах) костей и в контроле (табл. 2).

Содержание VEGF в сыворотке крови больных со злокачественными опухолями костей было достоверно выше, чем в контроле, у больных с доброкачественными и пограничными новообразованиями кости ( $p < 0,001$ ).

Уровни VEGF-R1 у больных с саркомами костей были достоверно выше, чем у пациентов с доброкачественными новообразованиями и ГКО. Различий в содержании VEGF-R2 в сыворотке крови больных с новообразованиями костей в сравниваемых группах не выявлено.

Достоверной связи между уровнями VEGF и VEGF-R2 в сыворотке крови ни в одной из сравни-

ваемых групп не обнаружили. При саркомах костей выявлена положительная связь между уровнями VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови ( $r=0,33$ ;  $p=0,005$ ).

Зависимости между уровнями VEGF, VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови и максимальным размером доброкачественных и пограничных новообразований и типом пораженной кости не обнаружили.

Анализ содержания VEGF, VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови при наиболее распространенной злокачественной опухоли кости – остеосаркоме – показал, что уровни VEGF у пациентов с распространенностью опухоли, соответствующей критерию T2 по системе TNM, были достоверно выше, чем при T1 ( $449 \pm 45,0$  и  $287 \pm 44,7$  пг/мл

Таблица 2

**Содержание VEGF и его рецепторов в сыворотке крови больных с новообразованиями костей и в контрольной группе**

Показатель	Группы	n	$\bar{X} \pm m$ , пг/мл	Интервалы, пг/мл	Медиана, пг/мл
VEGF	Контроль	26	211±25,8 <sup>1</sup>	41,7–556	188
	Доброкачественные новообразования костей	41	268±31,0 <sup>3</sup>	39,4–1 050	258
	Пограничные новообразования костей	37	265±41,7 <sup>4</sup>	39,0–1 300	187
	Злокачественные новообразования костей	284	411±22,6 <sup>2</sup>	21,3–2 701	298
VEGF-R1	Контроль	22	70,0±8,9 <sup>5</sup>	5–142	74,5
	Доброкачественные новообразования костей	27	79,7±5,3 <sup>7</sup>	7–147	76,8
	Пограничные новообразования костей	18	85,4±6,7 <sup>8</sup>	5–118	94,1
	Злокачественные новообразования костей	87	106,0±5,0 <sup>6</sup>	28–223	101
VEGF-R2	Контроль	22	9 768±658	6 420–14 501	9654
	Доброкачественные новообразования костей	21	11 844±765	8 343–24 556	10772
	Пограничные новообразования костей	15	11 094±423	7 870–14 889	11037
	Злокачественные новообразования костей	73	11 666±327	157–20 898	11399

Примечание.  $p_{1-2}=0,005$ ;  $p_{2-3}=0,013$ ;  $p_{2-4}=0,016$ ;  $p_{5-6}=0,0001$ ;  $p_{6-7}=0,0008$ ;  $p_{6-8}=0,02$ .

соответственно). Для уровней VEGF-R1 и VEGF-R2 такой закономерности не выявлено. Достоверных различий в содержании VEGF, VEGF-R1 и VEGF-R2 с учетом степени злокачественности опухоли не обнаружили, однако следует отметить, что средние значения VEGF были минимальными при стадии G1 (398±157 пг/мл) и максимальными при G4 (438±58,7 пг/мл). Максимальные значения содержания рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови также отмечены при G4 степени злокачественности остеосаркомы. При поражении опухолью трубчатых костей средний уровень VEGF в сыворотке крови был достоверно выше, чем при поражении плоских костей ( $p=0,037$ ). Различий в уровнях VEGF-R1 и VEGF-R2 с учетом типа пораженной кости не отметили. Корреляционный анализ зависимости между уровнями VEGF, VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови больных с остеосаркомой и максимальным размером опухоли не выявил.

112 больных с типичной остеосаркомой находились под нашим наблюдением от одного до пяти лет. Общая 3-летняя выживаемость при остеосаркоме составила 65,4%. При остеосаркоме со степенью злокачественности G1–G2 общая 5-летняя выживаемость составила 73,1±9%, при G3 – 58,9±7,9%, пациентов со степенью злокачественности G4 было 3 и все они умерли на протяжении первых двух лет наблюдения.

Показатели отдаленных результатов лечения при остеосаркоме не зависели от содержания VEGF, VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови.

Уровни VEGF в сыворотке крови пациентов при других саркомах костей – хондросаркоме, саркоме Юинга, ЗФГ и хордоме были достоверно выше, чем у практически здоровых людей, различий в показателях с учетом гистологического строения опухоли не отметили. Уровни рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 в крови больных при хондросаркоме, саркоме Юинга и ЗФГ, как и уровни VEGF, были выше, чем у практически здоровых людей, а при хордоме соответствовали показателям, полученным при обследовании контрольной группы.

Нами также проведен анализ содержания VEGF и ангиогенина в сыворотке крови больных с остеосаркомой и опухолью Юинга. Обследовали 16 больных с остеосаркомой и саркомой Юинга (13 мужчин и 3 женщины) в возрасте от 15 до 32 лет. В качестве контроля были использованы сыворотки крови 5 практически здоровых мужчин и 5 женщин в возрасте от 17 до 37 лет. Средняя концентрация ангиогенина в крови практически здоровых мужчин составила 193,4±59,4 нг/мл, у женщин – 240,9±31 нг/мл, во всей группе – 213,8±35,1 нг/мл. При злокачественных опухолях костей средние значения ангиогенина в сыворотке крови больных не отличались от таковых у практически здоровых людей и в среднем составили 257±23,1 нг/мл (при саркоме Юинга – 267,3±63,8 нг/мл; при остеосаркоме – 252,3±20,5 нг/мл).

Таким образом, уровни ангиогенина в крови практически здоровых людей колебались в широких пределах, у женщин были выше, чем у мужчин. Не обнаружено корреляционной зависимости между содержанием VEGF и ангиогенина как в крови практически здоровых людей, так и у больных с остеосаркомой и опухолью Юинга.

Подводя итоги исследования, посвященного изучению содержания VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 и ангиогенина в сыворотке крови больных с новообразованиями костей и практически здоровых людей, следует отметить, что отдаленные результаты лечения (общая 3-летняя выживаемость) больных с типичной остеосаркомой зависела от степени злокачественности опухоли (определяемой критерием G). Показатели исходных уровней VEGF и растворимых форм его рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови при типичной остеосаркоме прогностической значимостью не обладали.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Marini M., Sarchielli E., Toce M., Acocella A., Bertolai R., Ciulli C., Orlando C., Sgambati E., Vannelli G.B. Expression and localization of VEGF receptors in human fetal skeletal tissues. *Histol. Histopathol.* 2012; 27 (12): 1579–87.
2. Cackowski F.C., Anderson J.L., Patrene K.D., Choksi R.J., Shapiro S.D., Windle J.J., Blair H.C., Roodman G.D. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood.* 2010; 115 (1): 140–9.
3. Yin G., Bai Y., Luo E. Angiogenic suppression of osteoclasts may play a role in developing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Med. Hypotheses.* 2011; 76 (3): 347–9.
4. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992; 359 (6398): 843–5.
5. Chen Z., Chen Q.X., Hou Z.Y., Hu J., Cao Y.G. Clinical predictive value of serum angiogenic factor in patients with osteosarcoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13 (9): 4823–6.
6. Lammi J., Fan M., Rosenthal H.G., Patni M., Rinehart E., Vergara G., Ablah E., Woolley P.H., Lucas G., Yang S.Y. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int. Orthop.* 2012; 36 (11): 2307–13.
7. Rastogi S., Kumar R., Sankineani S.R., Marimuthu K., Rijal L., Prakash S., Jalan D., Khan S.A., Sharma M.C. Role of vascular endothelial growth factor as a tumour marker in osteosarcoma: a prospective study. *Int. Orthop.* 2012; 36 (11): 2315–21.
8. Chen G.L., Lin H.B., Wu X.W., Li R.Y., Chen X.H. The correlation between the level of serum VEGF and bFGF with metastasis and prognosis of osteosarcoma. [Article in Chinese] *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2011; 27 (12): 1343–5.
9. Lugowska I., Woźniak W., Klepacka T., Michalak E., Szamotulska K. A prognostic evaluation of vascular endothelial growth factor in children and young adults with osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer.* 2011; 57 (1): 63–8.
10. Jawad S.N., Abdullah B.H. Proliferative, apoptotic and angiogenic potentials in jaws and long bones osteosarcomas: a comparative immunohistochemical study. *J. Oral Pathol. Med.* 2010; 39 (9): 681–6.
11. Holzer G., Hamilton G., Angelberger P., Lai D., Ubl P., Dudczak R., Dominkus M., Li S. Imaging of highly malignant osteosarcoma with iodine-123-vascular endothelial growth factor. *Oncology.* 2012; 83 (1): 45–9.
12. Qu J.T., Wang M., He H.L., Tang Y., Ye X.J. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012; 138 (5): 819–25.
13. Limmahakhun S., Pothacharoen P., Theera-Umpon N., Arpornchayanon O., Leerapun T., Luevitoonvechkij S., Pruksakorn D. Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011; 12 (7): 1717–22.
14. Rozman A., Silar M., Kosnik M. Angiogenin and vascular endothelial growth factor expression in lungs of lung cancer patients. *Radiol. Oncol.* 2012; 46 (4): 354–9.
15. Gao X., Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2008; 40: 619–24.

Поступила 01.07.13