

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТЕОСАРКОМОЙ**О.М.КУЗНЕЦОВА, Т.Т.БЕРЕЗОВ, Н.Н.ЧЕРНОВ**

Кафедра биохимии РУДН. Москва. 117198, ул. Миклухо-Маклая, 8.

*Медицинский факультет***Н.Е.КУШЛИНСКИЙ**

Лаборатория клинической биохимии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина

Москва. 115478, Каширское ш. 24

Остеосаркома - наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль костной ткани. Необходимым условием для роста опухоли и метастазирования является развитие ангиогенеза. Ключевой фактор в развитии ангиогенеза - фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), является мощным митогеном клеток эндотелия сосудов. VEGF-опосредованная инвазия капилляров служит важным сигналом, который регулирует морфогенез ростовой пластинки и "запуск" ремоделирования хрящевой ткани. VEGF координирует гибель хондроцитов, функции хондрокластов, ангиогенез и формирование кости в ростовой пластинке. Экспрессия VEGF-A в первичных остеосаркомах коррелирует с ростом локальной плотности сосудов в ткани опухоли, с развитием легочного метастазирования и неблагоприятным прогнозом для пациентов с указанным диагнозом. Содержание VEGF-A в сыворотке крови больных остеосаркомой повышено по сравнению с нормой и доброкачественными новообразованиями. У пациентов с метастазами при остеосаркоме концентрация VEGF-A в сыворотке крови существенно выше, чем у пациентов без метастазов. Причем показатели VEGF-A у пациентов с метастазами, обнаруженными в период до года, достоверно выше, чем у пациентов с более поздними сроками метастазирования. Результаты, полученные при изучения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов у больных остеосаркомой, указывают на существование прямой зависимости между экспрессией VEGF-A и степенью злокачественности опухоли, а также процессами метастазирования.

Термин остеосаркома применяется для обозначения злокачественных опухолей, способных продуцировать остеостероид. По-видимому, источником возникновения остеосаркомы являются клетки, детерминированные в сторону остеогенеза, и недифференцированные мультипотентные клетки мезенхимального генеза

Остеогенная саркома - наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль костей. Удельный вес остеосарком среди всех опухолей костей составляет 70-80%. Пик возникновения остеосаркомы - это поздний пубертатный период и подростковый возраст. Это дает основание для предположения о существовании связи бластоматозного процесса с периодом усиленного роста костей. С меньшей частотой остеосаркома развивается в более поздние возрастные периоды[1].

В старших возрастных группах остеосаркомы иногда возникают у больных с болезнью Педжета. Мужчины заболевают приблизительно в два раза чаще женщин. Наиболее частые локализации процесса - бедренная, большеберцовая и плечевые кости - их метафизарные отделы.

Необходимым условием роста и восстановления костей является развитие ангиогенеза, процесса формирования и роста новых кровеносных сосудов. К настоящему времени известен целый ряд факторов, стимулирующих ангиогенез. Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) видимо является основным регулятором процесса инвазии сосудов в формирующейся или восстанавливающейся костной ткани.

VEGF представляет собой гликопротеин, гомодимер с молекулярной массой 34-42 кДа. Этот фактор роста является мощным митогеном клеток эндотелия сосудов, который не обладает заметной митогенной активностью в отношении других типов клеток. Фактор вызывает миграцию клеток эндотелия, их инвазию в коллагеновый гель и образование новых сосудов.

Еще одной важной характеристикой VEGF является его способность повышать проницаемость сосудов. Считается, что именно этот фактор является специфическим медиатором, обеспечивающим повышенную проницаемость сосудов в опухолях [2].

В настоящее время известно, что семейство VEGF включает 6 ростовых факторов: VEGF-A (более раннее обозначение - VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентарный ростовой фактор PlGF [3, 4].

Известны четыре основные изоформы VEGF-A — VEGF-A(121), VEGF-A(165), VEGF-A(189) и VEGF-A(206). Они различаются по величине полипептидной цепи и состоят, соответственно из 121, 165, 189 и 206 аминокислот. Изоформы образуются в результате альтернативного сплайсинга транскриптов первичной мРНК. В секретирующих VEGF нормальных и трансформированных клетках преимущественно обнаруживается изоформа VEGF-A(165). Именно поэтому наше исследование касается изучения VEGF-A(165).

В здоровой костной ткани максимальная экспрессия VEGF-A(165) отмечается в участках перехода хрящевой ткани в костную (энхондральный остеогенез). Фактор роста не обнаруживается в "отдыхающей" зоне кости, исключая участки смежные с сосудистыми каналами. В хрящевой ткани наблюдается повышенная экспрессия VEGF-A(165), заметное окрашивание обнаруживают зоны пролиферации и минерализации. В костной ткани экспрессия VEGF-A(165) повышена в участках моделирования и ремоделирования кости. VEGF-A(165) определяется в клетках костной поверхности и костномозгового пространства, устойчивое окрашивание по VEGF-A(165) обнаруживается в остеобластах и остеокластах именно зон моделирования и ремоделирования костной ткани [4,5].

Исследование первичных остеосарком показывает, что VEGF-A(165) локализован в цитоплазме и/или мембране клеток остеосаркомы. Оценка сосудистой плотности в первичных остеосаркомах свидетельствует о том, что количество сосудов в VEGF-A(165)-позитивных опухолях и их общий периметр значительно выше, чем в VEGF-негативных образцах, калибр сосудов меньше в VEGF-позитивных опухолях [5, 6]. Остеосаркому характеризует раннее гематогенное метастазирование в легкие, которое является основной причиной смерти больных.

В последние десятилетия были достигнуты определенные успехи в области изучения первичных остеосарком. Но это в большей степени коснулось вопросов морфологии сарком скелета, создания гистологических классификаций, разработки новых подходов к лечению первичного очага поражения. Однако результаты этих исследований отчетливо показали, что любой из этих методов локального воздействия на опухоль не предупреждает гематогенного метастазирования, частота которого составляет 75-95%. Короткий интервал между лечением и появлением признаков генерализации предполагает наличие микрометастазов уже при первых симптомах заболевания. Множественная реализация их в легких и является преимущественной причиной смерти больных. Наиболее типичным путем образования метастазов опухолей костей является гематогенный, хотя в 2-3% диссеминация приводит к поражению регионарных лимфатических узлов, т.е. лимфогенным путем. Основным органом, подвергающимся метастатическому поражению, остаются легкие, однако в литературе также встречаются описание случаев диссеминации основного заболевания в органы брюшной полости, в подкожную клетчатку, кости, имеются единичные сообщения о метастатическом поражении сердца, мозга и т.д. Учитывая эти данные, особенно важным представляется оценка метастатического потенциала опухоли и корреляция этих данных с содержанием VEGF-A(165) как в самой опухоли, так и в сыворотке крови пациентов больных остеосаркомой [7].

Уровень метастазирования у пациентов с VEGF-позитивными опухолями значительно выше, чем для пациентов с VEGF-негативными опухолями. Эти результаты свидетельствуют о том, что VEGF-экспрессия может быть использована в качестве маркера, предсказывающего метастазирование у пациентов с остеосаркомой. Пациенты с высокой экспрессией VEGF-A(165) отличаются худшей выживаемостью, чем пациенты с низкой экспрессией этого показателя в долговременном тесте. Таким образом, экспрессия VEGF-A(165) в первичных остеосаркомах коррелирует с ростом локальной плотности сосудов в ткани опухоли, с развитием легочного метастазирования и неблагоприятным прогнозом [9].

Исследования, касающиеся содержания VEGF-A(165) в сыворотке крови больных остеосаркомой, демонстрируют повышенное содержание VEGF-A(165) по сравнению с нормой [7, 9]. Однако подобных работ очень мало, и полученные результаты, как правило, статистически не достоверны.

Оценка ангиогенных факторов в крови, в частности VEGF-A(165), представляется нам наиболее верным подходом в прогнозировании рака, подходом, который обладает рядом

преимуществ, а также может дать новую прогностическую информацию, которая не доступна обычным клинико-морфологическим прогностическим показателям.

В этой статье мы обратились к клиническому значению экспрессии VEGF-A(165) в крови больных остеосаркомой и связи экспрессии этого фактора с клинико-морфологическими особенностями заболевания, а также процессами метастазирования.

Клинические материалы. В исследование включены образцы сыворотки крови 38 больных первичной остеосаркомой, 9 больных доброкачественными новообразованиями костей, а также 25 практически здоровых людей, составивших группу контроля.

Возраст больных находился в пределах от 15 до 72 лет (среднее $\pm$ стандартное отклонение – $24,15 \pm 12,82$), среди них мужчин 26 (55,3%), женщин соответственно – 21 (44,7%).

Опухоли чаще всего располагались в длинных трубчатых костях: бедренной – 24 (51,1%), большеберцовой – 10 (21,3%), малоберцовой – 2 (4,3%), плечевой – 4 (8,5%). Реже в плоских костях: костях таза – 2 (4,3%), крестце – 2 (4,3%), лопатке – 1 (2,1%). А также опухоли встречались в реберных костях и локтевой кости – по одному случаю (2,1%).

В группу сравнения вошли 25 практически здоровых человек, из них 16 (64%) мужчин и 9 (36%) женщин. Возраст обследуемых колебался в пределах от 17 до 60 лет.

Иммуноферментный анализ. Для определения содержания VEGF-A(165) в сыворотке крови был использован иммуноферментный метод ELISA, набор реактивов фирмы R&D (США), автоматический ридер Elx 800 (Biotek Instruments Inc., США). Исследования проводились на базе лаборатории клинической биохимии ГУ РОНЦ РАМН.

Оценка данных и статистический анализ. Оценка гистологического строения новообразований костей проводилась на основе классификации Dahlin & Unni врачами отдела патологической анатомии опухолей человека РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН при консультации академика РАМН, профессора Ю.Н.Соловьева. Статистическую обработку данных проводили, используя пакет прикладных программ "Statistica for Windows, Version 5.1". Во всех случаях различия считались достоверными при уровне вероятности большим 95%, т.е. $p < 0,05$.

Результаты. В табл. 1. представлены полученные нами значения концентрации VEGF-A(165) (пг/мл).

По некоторым литературным данным концентрация VEGF-A(165) в сыворотке крови у женщин выше, чем показатели у мужчин [7,8]. Однако проведенная нами оценка значений VEGF-A(165) в группе контроля в зависимости от пола не дала статистически значимых результатов, поэтому дальнейшее сравнение проводили со значениями VEGF-A(165) в общей группе.

В исследуемой группе больных остеосаркомой преобладали мужчины. Значения VEGF-A(165) как у мужчин, так и у женщин характеризовались большим разбросом

Таблица 1

Концентрация VEGF-A(165) в группах (пг/мл).

Показатель	Число пациентов	Среднее	Медиана	Минимум	Максимум	Ст.отклон.
ОС	38	241,09	190,14	34,76	674,31	180,76
ДН	9	116,08	77,64	39,40	258,44	84,98
ГК	25	150,87	126,48	20,65	461,99	230,35

Примечание: ОС - остеосаркома; ДН - доброкачественные новообразования; ГК - группа контроля.

сом данных. Сравнительный анализ данных в зависимости от пола не дал статистически значимых результатов.

Наши наблюдения подтверждают данные о том, что остеосаркома - опухоль, которая чаще всего поражает лиц молодого возраста: средний возраст $20,2 \pm 7,7$ лет, интервал 15-53, причем 29 пациентов (76%) были в возрасте до 20 лет.

Сравнительный анализ концентрации VEGF-A(165) в группах больных остеосаркомой и доброкачественных новообразований в зависимости возраста пациентов также не дал статистически значимых результатов.

Наибольшие значения VEGF-A(165) обнаружены в группе больных остеосаркомой, наименьшие - в группе пациентов с доброкачественными новообразованиями. С помощью сравнительного анализа данных мы обнаружили статистически достоверные различия между показателями VEGF-A(165) в группе больных остеосаркомой и группой пациентов с доброкачественными новообразованиями ($p=0,0248$), а также группой контроля ($p=0,0351$).

Таблица 2

Концентрация VEGF-A(165) в группе больных остеосаркомой в зависимости от гистологического варианта опухоли

Варианты остеосаркомы	n	Среднее	Медиана	Минимум	Максимум	Ст. откл.
ОП	9	208,9	180,3	75	458,3	138,6
ОБ	6	160,5	102,6	34,8	512,3	174,7
Смешанный	4	338,9	265	151,1	674,3	230,7
НСЗ	2	132,4	132,4	41,8	223,0	128,1
Анаплазированный	1	163,4	-	163,4	163,4	-
ХБ	1	219,3	-	219,3	219,3	-
Паростальный	2	108,8	108,8	98,3	119,3	14,8
Телеангиоэктатический	1	529,97	-	529,97	529,97	-

Примечание: ОП - остеопластический; ОБ - остеобластический; НСЗ - низкой степени злокачественности; ХБ - хондробластический.

Известно, что остеосаркома может быть представлена несколькими гистологическими вариантами, отличающимися по степени злокачественности и прогнозу. Учитывая это, представляет интерес исследовать экспрессию VEGF-A(165) в различных вариантах остеосаркомы. Средние значения VEGF-A(165) в зависимости от гистологического варианта остеосаркомы представлены в табл. 2.

Наиболее высокие значения концентрации VEGF-A(165) показывают телеангиоэктатический и смешанный вариант остеосаркомы. Проведенный нами сравнительный анализ данных в зависимости от гистологического варианта остеосаркомы не дал статистически значимых результатов, возможно для обнаружения достоверных различий необходимо большее количество наблюдений в группах.

Далее нами проведена оценка взаимосвязи экспрессии VEGF-A(165) с процессами метастазирования.

В группе пациентов с остеосаркомой выбраны больные, находившиеся под наблюдением не менее шести месяцев. Эта группа составила 31 человек. У 20 из них (64,5%) были обнаружены метастазы. Концентрация VEGF-A(165) в крови пациентов с метастазами оказалась значительно выше, чем у пациентов без метастазов (табл. 3).

Таблица 3

Концентрация VEGF-A(165) в зависимости от метастатических потенциалов остеосаркомы

Метастазы	Число пациентов	Концентрация VEGF-A(165)			
		Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
есть	20	257,8	212,6	34,8	658,8
нет	11	148,4	98,3	41,8	654,7

P=0,0113

Предполагая, что содержание VEGF-A(165) в крови больных остеосаркомой связано со сроками метастазирования, больные с метастазами были разделены на две группы: первую группу составили больные, у которых метастазы обнаружены в первые 12 месяцев от начала лечения, во вторую - больные, у которых метастазы обнаружены в более поздние сроки. Данные представлены в табл. 4.

Таблица 4

Концентрация VEGF-A(165) в зависимости от сроков метастазирования.

Сроки, мес.	Число пациентов	Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
>12	6	148,9	153,0	34,8	242,4
<=12	14	304,5	242,1	78,5	658,8

P=0,0437

Таким образом, полученные данные показывают, что содержание VEGF-A(165) было значительно выше в случаях, когда метастазы обнаруживались в период до года.

Выводы. Остеосаркома - наиболее распространенная опухоль костей, которая встречается в детском и юношеском возрасте, во время, так называемого "ростового рывка", когда начинается усиленная экспрессия гормона роста, половых стероидных гормонов и полипептидных факторов роста.

Особым пунктом в развитии заболевания остается гематогенное метастазирование. Средние сроки диссеминации обычно не превышают 8-12 месяцев.

Результаты наших исследований подтверждают предположения о ключевой роли VEGF-A(165) в процессе гематогенного метастазирования. Развитие VEGF-A(165)-зависимого ангиогенеза, рост количества мелких сосудов увеличивают шанс опухолевых клеток проникать в циркуляторное русло, поскольку вновь образованные мелкие капилляры, которые имеют фрагментированную базальную мембрану, гораздо легче пропускают опухолевые клетки, чем цельные крупные сосуды. Кроме того, большое количество мелких сосудов обладают большей поверхностью, через которую опухолевые клетки быстрее метастазируют. Корреляция между концентрацией VEGF-A(165) в крови и наличием метастазов, а также со сроками метастазирования у пациентов с остеосаркомой показывает очевидность прогностической значимости VEGF-A(165) для таких больных. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о возможности использования

данных о концентрации VEGF-A(165) в сыворотке крови в качестве маркера, предсказывающего метастазирование у пациентов с остеосаркомой.

Литература.

1. Некачалов В.В. Патология костей и суставов. Руководство.- СПб.: Сотис, 2000.-288с.
2. Horner A, Bord S, Kelsall A W, Coleman N, Comptston JF. Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone// Bone 2001 28:65-71
3. Sezer O., Jakob C., Niemoller K., Poon R., Fan S., Wong J: Angiogenesis in cancer// J Clin Oncol 2001, 19: 3299-3301.
4. Кузнецова О.М., Кушлинский Н.Е., Березов Т.Т. Фактор роста эндотелия сосудов: особенности секреции в костной ткани в норме и при патологии// Вопр. мед. химии. 2003, 49, 3, 360-373.
5. Kaya M., Wada T., Akatsuka T., Kawaguchi S., Nagoya S., Shindoh M., Higashino F., Mezawa F., Okada F., Ishii S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis// Clin Cancer Res 2000, 6:572-577.
6. Holzer G, Obermair A, Koschat M, Preyer O, Kotz R, Trieb K. Concentration of vascular endothelial growth factor(VEGF-A(165)) in the serum of patients with malignant bone tumors// Med Pediatr Oncol 2001; 601-4.
7. Kushlinskii N, Babkina I, Solov'ev Y, Trapeznikov N. Vascular endothelial growth factor and angiogenin in the serum of patients with osteosarcoma and Ewing's tumor// Bull Exp Biol Med 2000; 130: 691-3.
8. Tung-Ping Poon R., Sheung-Tat F., Wong J: Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients// J Clin Onc 2001, 4: 1207- 1225.
9. Кузнецова О.М., Березов Т.Т. Роль фактора роста эндотелия сосудов в развитии ангиогенеза костной ткани// Вестник РУДН. 2004, 27, 3, 18-22.

ANALYSIS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR CONCENTRATION IN SERUM OF PATIENTS WITH OSTEOSARCOMA.

O.M.KUZNETSOVA, T.T.BEREZOV, N.N.CHERNOV

Department of biochemistry RPFU. Moscow. 117198, M-Maklaya st 8. Medical faculty.

N.E.KUSHLINSKI

Laboratory of clinical biochemistry, Cancer Research Center, Moscow. 115478, Kashirski st 24.

Osteosarcoma is the most common malignant bone tumour in adolescents and young adults. Angiogenesis elicits proliferation and migration of endothelial cells to allow the formation of new capillaries. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A(165)) is a homodimeric heparin-binding protein (34-42 kDa) which induces formation of new blood vessels (angiogenesis). VEGF-A(165)-mediated capillary invasion is an essential signal that regulates growth plate morphogenesis and triggers cartilage remodeling. VEGF-A(165) is essential coordinator of chondrocyte death, chondroclast function, extracellular matrix remodeling, angiogenesis and bone formation in the growth plate. VEGF-A(165) expression in untreated osteosarcoma is predictive for pulmonary metastasis and poor prognosis. VEGF-A(165) concentration in the serum of patients with osteosarcoma increased in comparison with norm and benign tumors. VEGF-A(165) expression in the serum of patients with osteosarcoma associated with the development of metastasis and without metastasis period. The results of investigation indicate to the existence of dependence between VEGF-A(165) expression and degree of tumor malignancy and metastasis.