

РОЛЬ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В РАЗВИТИИ АНГИОГЕНЕЗА КОСТНОЙ ТКАНИ

О.М. КУЗНЕЦОВА, Т.Т. БЕРЕЗОВ

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

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – димер, гепарин-связывающий белок, с молекулярной массой 34-42 кДа. Он является мощным митогеном клеток эндотелия сосудов, вызывает миграцию клеток эндотелия, их инвазию в коллагеновый гель и образование новых 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 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 в сыворотке крови больных остеосаркомой и опухолью Юинга повышено по сравнению с нормой и доброкачественными новообразованиями. У пациентов с метастазами при остеосаркоме концентрация VEGF в сыворотке крови существенно выше, чем у пациентов без метастазов. Показатели же VEGF у пациентов с метастазами, обнаруженными в период до года, достоверно выше, чем у пациентов с более поздними сроками метастазирования. Результаты, полученные при изучении экспрессии фактора роста эндотелия сосудов у больных различными морфологическими вариантами новообразований костей, указывают на существование прямой зависимости между экспрессией VEGF и степенью злокачественности опухоли, а также процессами метастазирования; эти результаты свидетельствуют о вероятном участии VEGF в биологии опухоль-трансформированных тканей.

Костная ткань представляет собой динамичный, обильно снабженный сосудами орган с энергичным обменом веществ. Ошибочность бытовавших в течение длительного времени представлений о "брадитрофности" (т.е. метаболической инертности) кости подтверждается данными биохимических исследований.

Кровоток кости близок по напряженности к кровотоку скелетной мышцы. Пересчет энзиматической активности костной ткани на массу активных клеточных элементов свидетельствует о том, что активность гликолитических ферментов сравнима с активностью этих ферментов в тканях печени и сердца.

Процессы ангиогенеза и костно-хрящевой резорбции являются ключевыми в развитии и регенерации костной ткани. Они тесно связаны между собой и, следовательно, можно предположить существование в костной ткани общих для этих процессов медиаторов [1].

Одним из таких медиаторов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [2].

VEGF – гомодимер, гепарин-связывающий белок, с молекулярной массой 34-42 кДа. VEGF – мощный митоген клеток эндотелия сосудов, который не обладает заметной митогенной активностью в отношении других типов клеток. Важной характеристикой является его способность повышать проницаемость сосудов. Предполагается, что этот фактор является специфическим медиатором, обеспечивающим повышенную проницаемость сосудов в опухолях [3].

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.

Рассмотрим биологическую роль VEGF-A в развитии ангиогенеза костной ткани в норме и при некоторых патологических состояниях.

Чаще всего VEGF выявляют в цитоплазме нормальных клеток методами иммуногистохимии. VEGF в этих клетках находится в связанной форме, обеспечивая быструю секрецию в случае местного повреждения или каких-либо других стимулов.

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), зрелая форма которой представляет собой гомодимер с мол. массой 45 кДа.

VEGF-A может становиться доступным для клеток эндотелия с помощью двух различных механизмов: в виде свободного полностью растворимого белка или в результате активации протеаз и

расщепления более крупных изоформ. Образование биологически активной молекулы после ограниченного протеолиза предшественника может играть, очевидно, исключительную роль в процессах опухолевого роста, поскольку известно, что в этих тканях наблюдается повышенная экспрессия протеаз, в том числе активаторов плазминогена [4].

Биологический эффект VEGF-A реализуется через взаимодействие фактора роста со своими высокоаффинными рецепторами. В настоящее время известно 2 таких рецептора: Flt1 (VEGFR1) и Flk1/KDR (VEGFR2), образующих отдельную группу в суперсемействе рецепторных тирозинкиназ. К этой же группе относится еще один рецептор - FLT4 (VEGFR3), с которым взаимодействуют VEGF- C и VEGF- D, но не VEGF- A. Эта группа рецепторов представляет собой трансмембранные белки со сходной структурой: их внеклеточная рецепторная часть состоит из 7 иммуноглобулин-подобных доменов, а во внутриклеточной области находится тирозинкиназный домен, разделенный на 2 участка короткой последовательностью, так называемой интеркиназной вставкой, специфичной для каждого рецептора [5].

При взаимодействии с лигандом происходит димеризация рецепторов с последующей активацией их каталитической активности.

Активация ангиогенеза, по-видимому, является решающим шагом в экспансии роста опухолей и развития метастазов.

В условиях отсутствия сосудов опухолевый клон достигает всего лишь нескольких миллиметров в диаметре, и только после того, как в опухоли активируется ангиогенез и первичный опухолевый клон получит доступ к сосудистой системе, начинается его усиленный рост. В отсутствие доступа к адекватному кровоснабжению опухолевые клетки некротизируются и/или вступают в апоптоз, ограничивая тем самым увеличение объема опухоли независимо от того, насколько высокими пролиферативными возможностями обладают сами опухолевые клетки [6].

Прежде чем рассматривать проблему экспрессии VEGF тканями костных опухолей, было бы целесообразно обобщить имеющиеся литературные данные об экспрессии этого ростового фактора костной тканью в норме.

Исследования, проведенные на культурах зрелых остеокластов кролика, свидетельствуют о наличии высокоаффинных рецепторов VEGF-A (KDR/Flk-1 и Flt-1) в этих клетках, а также об активации процессов резорбции под действием этого фактора. Соответственно функции остеокластов и ангиогенез, вероятнее всего, регулируются общим медиатором, которым является VEGF-A [7].

Зрелые хондроциты эпифизальной ростовой пластинки экспрессируют VEGF-A. Для выяснения роли VEGF-A в энхондральном формировании кости, указанный ростовой фактор инактивировали, используя химерный белок в качестве растворимого рецептора, который вводили 24-дневным мышам [8]. В результате такой инактивации наблюдалось полное подавление инвазии кровеносных сосудов. Этому сопутствовали замедление темпов формирования трабекулярной кости и развитие зоны зрелых хондроцитов. Была замедлена дифференцировка хондрокластов и резорбция терминальных хондроцитов. После прекращения инактивирующего воздействия на VEGF-A следовали восстановление роста кости, инвазии капилляров, резорбции зрелой хрящевой ткани. Таким образом, VEGF-опосредованная инвазия капилляров является важным сигналом, который регулирует морфогенез ростовой пластинки и "запуск" ремоделирования хрящевой ткани. VEGF-A координирует гибель хондроцитов, функции хондрокластов, ангиогенез и формирование кости в ростовой пластинке.

Для того чтобы выяснить механизмы регуляции ангиогенеза в растущей кости более подробно, была исследована экспрессия ангиопоэтинов в неонатальном ребре человека [9]. Ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 давали сходные модели окрашивания. В хрящевой ткани экспрессия ангиопоэтина-1 и ангиопоэтина-2 повышалась по мере созревания хондроцитов. Ang-1, Ang-2 и VEGF-A не обнаруживались в "покоящейся" зоне, исключая участки смежные с сосудистыми каналами, максимальная экспрессия отмечалась в участках перехода хрящевой ткани в костную. В хрящевой ткани наблюдали повышенную экспрессию Ang-2 по сравнению с Ang-1 и VEGF-A, заметное окрашивание обна-

руживали зоны пролиферации и минерализации. В костной ткани экспрессия Ang-1, Ang-2 и VEGF-A была повышена в участках моделирования и ремоделирования кости. Ang-1 выявлялся в большинстве остеобластов, остеокластов и в некоторых клетках костномозгового пространства. Ang-2 экспрессировался на различном уровне остеобластами и остеокластами в участках моделирования и ремоделирования костной ткани. VEGF-A определяли в клетках костной поверхности и костномозгового пространства, устойчивое окрашивание по VEGF-A было обнаружено в остеобластах и остеокластах зон моделирования и ремоделирования костной ткани.

Хотя VEGF-A играет важную роль в энхондральном формировании кости, этот фактор не экспрессируется нормальной зрелой хрящевой тканью (исключая зоны моделирования и ремоделирования костной ткани). Однако методами иммуногистохимического окрашивания срезов хрящевой ткани при остеоартрозе [10] было показано наличие экспрессии VEGF, причем двух его изоформ: VEGF121, свободной растворимой формы, и VEGF189, формы связанной с протеогликанами внутриклеточного матрикса.

На ранних стадиях дифференцировки остеобластов обнаруживаются невысокие концентрации VEGF-A, максимальная экспрессия фактора роста наблюдается на стадии минерализации [11].

Попытки оценить роль VEGF-A *in vivo* в период эмбрионального развития скелета были обречены на неудачу, потому что удаление всего одного аллеля VEGF-A приводило к эмбриональной смерти экспериментального животного до начала развития скелета. Способность мышей экспрессировать только одну VEGF 120/120- изоформу дает возможность изучать функции VEGF-A именно в период эмбрионального формирования скелета. У таких мышей наблюдается не только задержка проникновения кровеносных сосудов в перихондральную область костей, но и нарушенная инвазия капилляров в центр первичной оксификации [12]. Тем самым подтверждается основополагающая роль VEGF-A как в начальной стадии васкуляризации хрящевой ткани, так и заключительной.

Интересные результаты были получены при попытках оценить уровень экспрессии VEGF у больных различными новообразованиями костей.

В частности, при исследовании первичных остеосарком [13] было показано, что VEGF локализован в цитоплазме и/или мембране клеток остеосаркомы. Количество сосудов в VEGF-позитивных опухолях и их общий периметр значительно выше, чем в VEGF-негативных, калибр сосудов меньше в VEGF-позитивных опухолях. Уровень метастазирования у пациентов с VEGF-позитивными опухолями значительно выше, чем для пациентов с VEGF-негативными опухолями. У пациентов с высокой экспрессией VEGF отмечен значительно меньший процент выживаемости, чем у пациентов с низкой экспрессией этого белка.

Напрашивается вывод о том, что экспрессия VEGF в первичных остеосаркомах вероятно коррелирует с ростом локальной плотности сосудов в ткани опухоли, с развитием легочного метастазирования и неблагоприятным прогнозом для пациентов с указанным диагнозом.

Исследования содержания VEGF-A в остеосаркомах показали, что ряд остеосарком экспрессирует только VEGF(121), часть остеосарком позитивны в отношении изоформ VEGF(121) + VEGF(165), и еще часть в отношении VEGF(121) + VEGF(165) + VEGF(189). В остеосаркомах, экспрессирующих VEGF(165), обнаружено значительное увеличение степени васкуляризации по сравнению с остеосаркомами, экспрессирующими только VEGF(121). Таким образом, наличия растворимой VEGF(121) изоформы, по-видимому, недостаточно для стимулирования неоваскуляризации в этом типе опухолей.

В процессе гематогенного метастазирования VEGF, вероятнее всего, играет ключевую роль, участвуя в регуляции ангиогенеза. С другой стороны, поскольку транспорт терапевтических веществ к опухоли существенно зависит от степени кровоснабжения, неоваскуляризация, вызванная VEGF, может способствовать положительному эффекту системной химиотерапии.

Иммуноферментный анализ экспрессии VEGF в сыворотке крови больных различными новообразованиями костей, проведенный в лаборатории клинической биохимии РОНЦ им.Н.Н. Блохина, позволил высказать ряд предположений относительно связи

между экспрессией VEGF-A и степенью малигнизации опухоли, а также процессами метастазирования [14].

С помощью сравнительного анализа данных обнаружены статистически достоверные различия между показателями VEGF-A в группе больных опухолью Юинга и группой пациентов с доброкачественными новообразованиями ($p < 0,01$), при сравнении значений VEGF в группе больных опухолью Юинга с группой контроля, которую составили практически здоровые люди, также обнаружена статистически достоверная разница ($p < 0,05$).

Средние показатели концентрации VEGF-A в группе больных остеосаркомой оказались несколько ниже, чем в группе больных опухолью Юинга. Проведенный сравнительный анализ выявил статистически достоверную разницу между показателями VEGF в группе больных остеосаркомой с группой контроля ($p < 0,05$) и группой пациентов с доброкачественными новообразованиями ($p < 0,05$).

Значения VEGF в группах больных хондросаркомой и гигантоклеточной опухолью были выше, чем в группах контроля и доброкачественных новообразований, однако статистическая достоверность в этих случаях была больше 0,05 ($p > 0,05$).

Проведенная оценка связи экспрессии VEGF-A с процессами метастазирования показала, что у пациентов с метастазами концентрация VEGF-A в сыворотке крови существенно выше, чем у пациентов без метастазов. Сравнительный анализ обнаружил статистически достоверную разницу между показателями VEGF-A в этих двух группах.

Обнаружено, что средние показатели VEGF у пациентов с метастазами, выявленными в период до года, достоверно выше, чем у пациентов с более поздними сроками метастазирования. Вероятнее всего, это связано с тем, что высокие концентрации VEGF-A активируют развитие VEGF-зависимого ангиогенеза и усиленный рост количества мелких сосудов. Эти процессы увеличивают шанс опухолевых клеток проникнуть в кровеносное 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 обладает большей поверхностью, через которую опухолевые клетки быстрее метастазируют [15].

Выявленная корреляция между концентрацией VEGF-A в крови, наличием метастазов и сроками метастазирования у пациентов с остеосаркомой свидетельствует о важной прогностической значимости определения VEGF-A для таких больных.

Таким образом, обобщенные результаты исследований последних лет в РОНЦ им. Н.Н. Блохина дают основание для предположения о возможности использования VEGF-A в качестве биохимического маркера, предсказывающего метастазирование у пациентов с остеосаркомой.

Опухоли костей представляют собой один из наиболее сложных разделов онкологии. Обусловлено это целым рядом обстоятельств. Наряду с четко очерченными злокачественными и доброкачественными процессами имеется большая группа "условно - злокачественных" новообразований костной ткани и ряд явно доброкачественных процессов при определенных условиях трансформирующиеся в злокачественные. Существует довольно большая группа так называемых "пограничных процессов" в костях, способных по клинико-рентгенологической картине симулировать опухоль, а порою и перерождаться в костную саркому. Кроме того, кости скелета служат местом метастазирования злокачественных новообразований других локализаций

В обозримой перспективе наиболее многообещающим представляется применение комплексной методологии для терапии костных опухолей - сочетание направленной доставки антиопухолевых препаратов с иммунотерапией и антиангиогенной терапией. Антиангиогенная терапия направлена на торможение, противодействие процессам прорастания опухоли кровеносных сосудов.

По представленным выше литературным данным, VEGF является ключевым фактором в развитии ангиогенеза, следовательно, одно из ведущих направлений антиангио-

генной терапии может быть связано с воздействием непосредственно на VEGF или на его рецепторы.

Результаты изучения экспрессии VEGF-A у больных различными морфологическими вариантами новообразований костей подтверждают высказанную выше гипотезу о существовании прямой связи между экспрессией VEGF-A, степенью злокачественности опухоли и процессами метастазирования, что в свою очередь свидетельствует о существенной роли этого фактора в биологии опухоли-трансформированных тканей. Последующие наблюдения за обследованными группами больных и изучение их выживаемости, с учетом выявленных метастазов, позволят проверить обоснованность указанных представлений. С учетом этих обстоятельств, дальнейшие исследования должны быть направлены на разработку патогенетических методов лечения злокачественных новообразований костной ткани, в частности, на применение антиангиогенной терапии в сочетании с другими методами активного воздействия на опухолевый процесс.

Литература

1. Connolly DT, Heivelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. // J Clin Invest. — 1989. Vol. 84. — P. 1470-1478.
2. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular permeability, and angiogenesis. // Am J Pathol. — 1995. Vol. 36. — P. 139-155.
3. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. // Endocr Rev. — 1997. — №18. — P. 4-25
4. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? // J Natl Cancer Inst. — 1991, — Vol. 82. — P. 4-6
5. Kaya M., Wada T., Akatsuka T. et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. // Clin Cancer Res. — 2000. — № 6. — P. 572-577.
6. Nicosia RF, T'chao R, Leighton J. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. // Cancer Res. — 1983. Vol. 43. — P. 2159-2166
7. Risau W. Angiogenic growth factors. // Prog Growth Factor Res. — 1990. — № 2. — P. 71-79
8. Sezer O., Jakob C., Niemoller K. et al. Angiogenesis in cancer. // J Clin Oncol. — 2001. — Vol. 19. — P. 3299-3301.
9. Tung-Ping Poon R., Sheung-Tat F., Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. // J Clin Onc. — 2001. — №4. — P. 1207-1225.
10. Некачалов В.В. Патология костей и суставов. (2000) СПб.: Сотис
11. Wada T., Isu K., Takeda N. et al. A preliminary report of neoadjuvant chemotherapy NSH-7 study in osteosarcoma: preoperative salvage chemotherapy based on clinical tumor response and the use of granulocyte colony-stimulating factor. // Oncology. — 1996. — Vol. 53. — P. 221-227.
12. Zelzer E, McLean W, Yin-Shan Ng. et al. Skeletal defects in VEGF 120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. // Development. 2002. — Vol. 129. — P. 1893-1904.
13. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? // J Natl Cancer Inst. — 1990. — Vol. 82. — P. 4-6.
14. 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/ — Vol. 130. — P. 691-693.
15. 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. — № 3. — P. 360-373.

ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN BONE ANGIOGENESIS

O.M. KUZNETSOVA, T.T. BEREZOV

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

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a homodimeric heparin-binding protein (34-42 kDa) which induces formation of new blood vessels (angiogenesis). VEGF-mediated capillary invasion is an essential signal that regulates growth plate morphogenesis and triggers cartilage remodeling. Thus, VEGF is essential coordinator of chondrocyte death, chondroclast function, extracellular matrix remodeling, angiogenesis and bone formation in the growth plate. VEGF expression in untreated osteosarcoma is predictive for pulmonary metastasis and poor prognosis. VEGF concentration in the serum of patients with malignant bone tumors (osteosarcoma, Ewing's tumor) increased in comparison with norm and benign tumors. VEGF 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 expression and degree of tumor malignancy and metastasis. These results testify to probable participation of VEGF in biology of the tumor-transformed tissue.