

УДК 616.71-006.34.04  
© Коллектив авторов

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ: ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ В КОСТНОЙ ТКАНИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ.

О.М.Кузнецова<sup>1</sup>, Н.Е.Кушлинский<sup>2</sup>, Т.Т.Березов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский Университет Дружбы Народов  
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8; тел/факс 434-04-12

<sup>2</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,  
115478, Москва, Каширское ш.24

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. Причем показатели 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.

**Ключевые слова:** фактор роста эндотелия сосудов, ангиогенез, остеосаркома, хондросаркома, опухоль Юинга, гигантоклеточная опухоль.

### Фактор роста эндотелия сосудов и его изоформы

В развитии и регенерации костной ткани важную роль играют процессы ангиогенеза и костно-хрящевой резорбции. 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] (рис.1).

VEGF - гомодимер, гепарин-связывающий белок, с молекулярной массой 34-42 кДа; молекула VEGF содержит участок возможного N-гликозилирования. Рекомбинантный VEGF, экспрессированный *Escherichia coli*, не отличается от природного белка по своей биологической активности *in vitro*. Предполагается, что для проявления биологических свойств полипептидная часть молекулы не нуждается в углеводной компоненте [3].

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

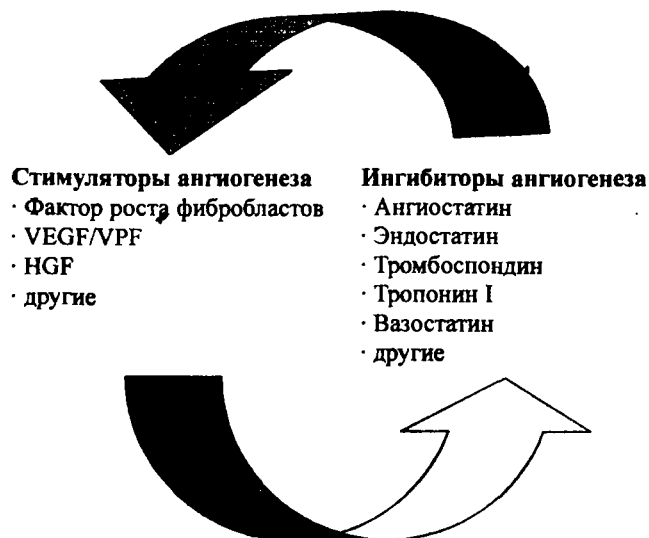


Рисунок 1  
Стимуляторы и ингибиторы ангиогенеза

VEGF - мощный митоген клеток эндотелия сосудов, который, вероятнее всего, не обладает заметной митогенной активностью в отношении других типов клеток. Фактор вызывает миграцию клеток эндотелия, их инвазию в коллагеновый гель и образование новых сосудов.

Важной характеристикой VEGF является его способность повышать проницаемость сосудов. Предполагается, что именно этот фактор является специфическим медиатором, обеспечивающим повышенную проницаемость сосудов в опухолях [4].

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 - VEGF(121), VEGF(165), VEGF(189) и VEGF(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(165), зрелая форма которой представляет собой гомодимер с мол. массой 45 кДа. В большинстве экспрессирующих VEGF клеток обнаруживаются также транскрипты, кодирующие VEGF(121) и VEGF(189), тогда как изоформа VEGF(206) встречается крайне редко.

Структурные различия изоформ VEGF обуславливают различия их физико-химических свойств. Так, VEGF(121) - полипептид, обладающий слабокислотными свойствами и не связывающийся с гепарином. VEGF(165) - напротив представлен гепарин-связывающим белком, в то время как изоформы VEGF(189) и VEGF(206) характеризуются еще более выраженными основными свойствами и проявляют более высокое сродство к гепарину. Различия в физико-химических свойствах обуславливают различия в биологической активности изоформ VEGF. Так, VEGF(121) представляет собой секретируемый белок, полностью растворимый в кондиционированной среде экспрессирующих эту изоформу клеток. VEGF(165) также секретируется из клеток, но при этом значительная его часть остается в связанном состоянии на клеточной поверхности или во внеклеточном матриксе. Изоформы VEGF(189) и VEGF(206) практически полностью находятся в связанном с внеклеточным матриксом состоянии.

Связанные формы VEGF могут освобождаться в результате воздействия таких агентов, как сурамин, гепарин или гепариназа. Тот факт, что гепарин освобождает более длинные формы VEGF, дает основание предположить, что местами их связывания могут быть содержащиеся на клеточной поверхности или во внеклеточном матриксе гепарин-содержащие протеоглики [5].

Более крупные молекулярные формы VEGF могут освобождаться в результате воздействия такой протеазы, как плазмин. Плазмин, в свою очередь, образуется в результате расщепления протеолитически неактивного плазминогена под действием активатора плазминогена. Плазмин расщепляет VEGF(189) или VEGF(206) в области С-конца с образованием фрагмента с примерной молекулярной массой 34 кДа, проявляющего активность в качестве митогена для клеток эндотелия и агента, повышающего проницаемость сосудов [6].

Следовательно, VEGF 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 активного VEGF 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 [7].

Таким образом, белковые продукты, кодируемые одним единственным геном, но образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, могут обеспечивать достаточно гибкую систему контроля ангиогенеза. Небольшие молекулярные формы VEGF в случае необходимости могут быть быстро и эффективно секретированы из экспрессирующих их клеток. В то же время крупные формы, находящиеся в связанном состоянии во внеклеточном матриксе, могут представлять собой некий резервуар молекул VEGF, из которого более короткие растворимые формы могут высвобождаться при разрушении этой структуры.

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.

#### **Плацентарный фактор роста (PlGF)**

Недавно идентифицированный PlGF обладает рядом свойств характерных для VEGF; так показано, например, что в структуре молекулы плацентарного фактора роста имеется участок гомологичный VEGF, содержащий также восемь цистеиновых остатков. Предшественники мономеров PlGF, кодируемые двумя различными мРНК, содержат 149 и 170 аминокислот соответственно [8]. Меньшая изоформа PlGF-1 имеет сигнальный пептид из 20 аминокислотных остатков, который отщепляется при образовании зрелого белка, содержащего 129 аминокислот. Большая изоформа (PlGF-2) идентична по составу PlGF-1, за исключением участка, кодируемого 6-ю экзонами. Он состоит из 21-ого аминокислотного остатка и обладает сильно основными свойствами. Наличие этого участка повышает аффинность PlGF-2 к гепарину или гепариноподобным молекулам. Таким образом, PlGF-1 легко секретируется в кондиционированную среду, тогда как PlGF-2, вероятнее всего, соединяется с клеточной поверхностью или внеклеточным матриксом.

PlGF-ген кодирует три изоформы плацентарного фактора роста, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга (PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3). Эти изоформы обладают различными способами секреции, гепарин-связывающим сродством и свойствами к димеризации. PlGF характеризуется высоким сродством к рецептору VEGFR-1 и не взаимодействует с VEGFR-2. Экспрессия PlGF ограничена плацентой и не обнаруживается в большинстве нормальных зрелых тканей [3].

Все изоформы PlGF способны образовывать гетеродимеры с VEGF, наделенные разными биологическими свойствами. В частности, PlGF(129)/VEGF(165) гетеродимер, подобно VEGF гомодимеру, оказывает митогенный эффект на эндотелиальные клетки *in vitro*. Хотя митогенная

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

активность PlGF/VEGF гетеродимеров ниже, чем VEGF(165) гомодимеров, PlGF(129) гомодимер даже в достаточно высокой концентрации практически не оказывает эффекта на стимуляцию синтеза ДНК эндотелиальных клеток. Гомодимер VEGF(165) и гетеродимер PlGF/VEGF оказались важными хемотактическими факторами для эндотелиальных клеток сосудов, в то же время PlGF гомодимер слабо повышает хемотактический ответ в этих клетках. Таким образом, формирование гетеродимеров PlGF и VEGF способствует образованию продуктов, снижающих митогенную активность, но повышающих хемотактические эффекты VEGF на эндотелиальные клетки [3].

PlGF может снижать биоаккумуляцию активных VEGF-молекул, в то же время он способен также усиливать активность субоптимальных концентраций VEGF. Поскольку митогенный эффект PlGF-1 зависит от типа эндотелиальных клеток, было высказано предположение о том, что предпочтительной мишенью PlGF-1 является эндотелий посткапиллярных вен, тогда как VEGF стимулирует с одинаковым потенциалом макро- и микроваскулярный эндотелий [9].

### VEGF-B

VEGF-B открыт в различных клетках органов, особенно богаты им сердце и скелетные мышцы. Существуют две изоформы VEGF-B, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, VEGF-B(167) и VEGF-B(186).

VEGF-B(167) представляет собой основной белок, связанный с гепарином, который подобно VEGF(189) и VEGF(206) прочно соединяется с клеткой или внеклеточным матриксом и не высвобождается до тех пор, пока клетки не будут обработаны гепарином. С другой стороны, VEGF-B(186) гомодимер, который легко секретируется. VEGF-B способен к гетеродимеризации с VEGF посредством образования дисульфидных связей. Такие гетеродимеры могут оказывать влияние на биоактивность молекул подобно PlGF. VEGF-B стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, но не соединяется с VEGFR-2. Функции VEGF-B осуществляются с участием VEGFR1 [10].

### VEGF-C

VEGF-C синтезируется в виде прополипептида, который протеолитически расщепляется до молекулы массой 21 кДа. По своим биологическим свойствам он существенно отличается от других изоформ, в частности, он не соединяется с гепарином. VEGF-C увеличивает проницаемость сосудов и стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, но действует в значительно более высоких концентрациях, чем VEGF [10]. При взаимодействии VEGF-C с тирозинкиназным рецептором Flt-4 (VEGFR-3) происходит автофосфорилирование рецептора. VEGF-C также активирует VEGFR-2, но не взаимодействует с VEGFR-1. Протеолиз VEGF-C генерирует синтез различных форм VEGF-C с разной активностью по отношению к VEGFR-3, но только VEGF-C, полностью подвергнутый протеолизу, может соединяться с VEGFR-2. Другие представители семейства VEGF, за исключением VEGF-D, не способны активировать VEGFR-3. VEGF-C вырабатывается в период эмбрионального развития в отделах, где из венозной системы формируются лимфатические сосуды. VEGF-C обнаруживается и в зрелых тканях, где ему отводится роль поддерживающего фактора в процессах дифференциации лимфатической системы. VEGFR-3, являющийся рецептором VEGF-C, активно экспрессируется ангиобластами в венах и лимфатических сосудах в период эмбрионального васкулогенеза, но его количество в лимфатическом эндотелии зрелых тканей становится незначительным.

Особенности экспрессии VEGF-C и VEGFR-3 оказывают определенное влияние на лимфогенез, процесс формирования новых лимфоцитов. Экзогенный VEGF-C избирательно стимулирует пролиферацию лимфосистемы в хориоаллантоисной мембране, тогда как VEGF стимулирует ангиогенез кровеносных сосудов. В соответствии с этими наблюдениями, локальная сверхэкспрессия VEGF-C в коже трансгенных мышей вызывает гиперплазию лимфатических сосудов.

Основное действие VEGF-C, вероятнее всего, связано с формированием в лимфатических эндотелиальных клетках гетеродимера VEGFR-2/VEGFR-3 [11].

#### VEGF-D

VEGF-D, новейший представитель VEGF-семейства, который на 48% идентичен VEGF-C. Сходное строение позволяет объединить эти ростовые факторы в одну независимую подгруппу VEGF-родственных белков. Экспрессия VEGF-D регулируется геном *c-fos*. Этот ростовой фактор активно продуцируется в легком плода. Во взрослом организме VEGF-D обнаруживается в основном в скелетных мышцах, сердце, легком и кишечнике. VEGF-D является лигандом и для VEGFR-2, и для VEGFR-3, но он не связывается с VEGFR-1. VEGF-D стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток [8,10,].

#### Рецепторы VEGF

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 относятся 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] (рис.2).

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

Рецепторы VEGF-A экспрессируются почти исключительно в клетках эндотелия кровеносных сосудов, преимущественно в сосудах, прилегающих к опухли и проникающих в нее. При этом третий из рецепторов этой группы, VEGFR3 или FLT4, во взрослом организме преимущественно экспрессируется в эндотелии лимфатических сосудов, что дало основания предполагать, что лимфангиогенез, возможно, регулируется через взаимодействие именно этого рецептора со своими лигандами. Это предположение подтверждается данными о том, что гиперэкспрессия VEGF-C, одного из лигандов VEGFR3, в коже трансгенных мышей приводила к гиперплазии лимфатических, но не кровеносных сосудов, проявлявшейся в пролиферации эндотелия и увеличении размеров сосудов.

Относительно недавно выяснилось, что нейропилин-1, рецептор для семафоринов/коллапсинов, участвующих в процессах проводимости аксонов, выполняет функции изоформ-специфичного корецептора для VEGF165 и PlGF-2. Помимо экспрессии в нейронах, нейропилин-1 также обнаруживается в развивающихся эндотелиальных клетках эмбриональной кровеносной системы и в мезенхимальных клетках, окружающих кровеносные сосуды, а также в некоторых других тканях, включая клетки эндокарда эмбрионального сердца. Значение нейропилина-1 для кровеносной системы было доказано в экспериментах, связанных с гомозиготным нокаутом генов, ответственных за синтез нейропилина-1. В этих экспериментах смерть эмбриона наступала из-за нарушений в формировании сердечно-сосудистой системы. Повышенная экспрессия нейропилина-1 также ведет к смерти из-за ряда аномалий как в нервной, так и в сердечно-сосудистой системе. Аминокислотные остатки, кодируемые 7-ым экзоном VEGF165, опосредуют взаимодействие нейропилина-1, который повышает способность к связыванию с VEGFR-2 и стимулирует хемотаксис. VEGF-B167 также взаимодействует с нейропилином-1. За это взаимодействие отвечает экзон 6B, который кодирует последовательность, гомологичную нейропилин-связывающему пептиду VEGF165, и ведет к соединению VEGF-B167 с гепарином. Интересно, что изоформы VEGF-B186, не связывающиеся с гепарином, также взаимодействуют с нейропилином-1, но только после протеолитического расщепления до образования более коротких форм.

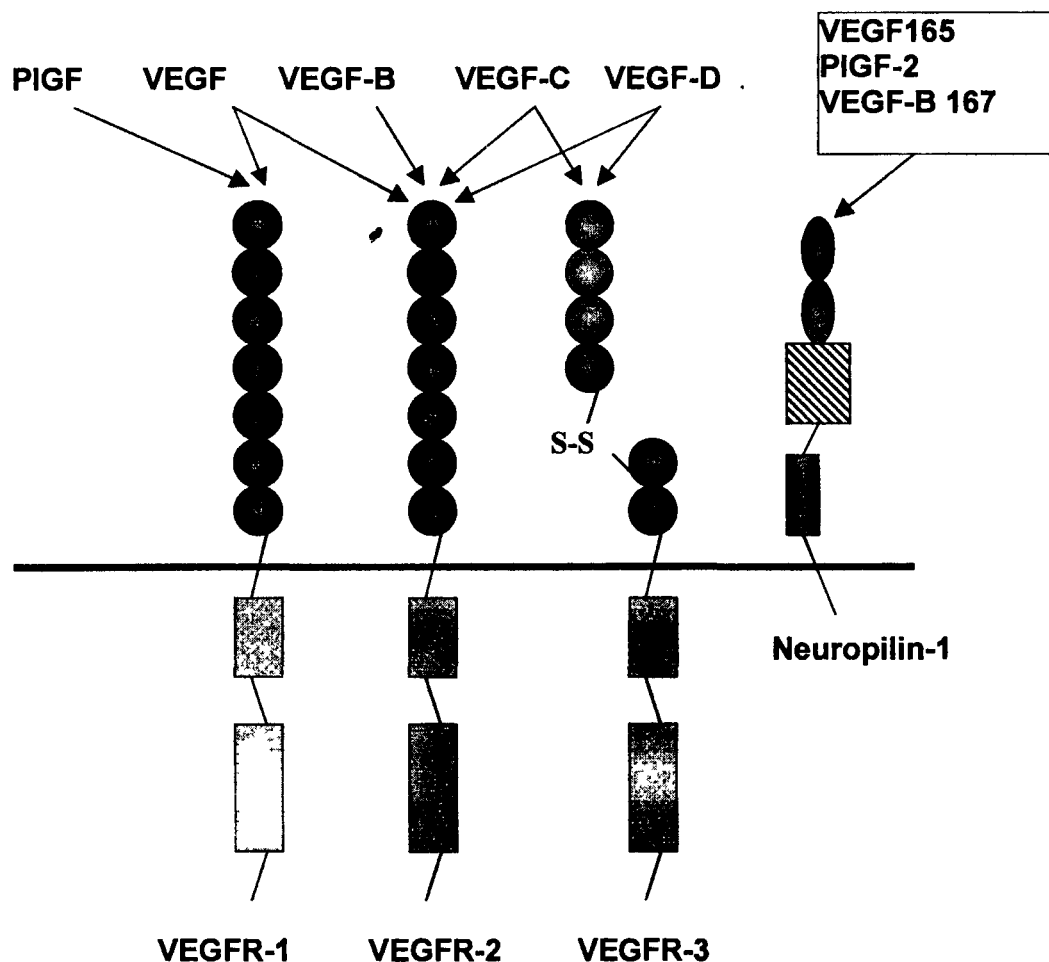


Рисунок 2.

Схема взаимодействия членов семейства VEGF с рецепторами VEGFR: VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (Flk1/KDR), VEGFR-3 и нейропилином-1

Нейропилин-1-связывающий эпитоп в VEGF-B186 содержит 12 первых аминокислотных остатков, следующих за центральным участком, который является общим и для VEGF-B167 и для VEGF-B186. Протеолитическое расщепление VEGF-B186 открывает эпитоп для связывания нейропилина-1. Можно предположить, что все члены семейства VEGF содержат в дополнение к VEGF-подобной сердцевине, удаленный домен с уникальными характеристиками, которые определяют специфичность связывания [10].

#### Регуляция активности VEGF и родственных молекул

Регуляция активности VEGF и родственных молекул осуществляется с помощью различных механизмов. Например, факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), и активирующие цитокины, такие как интерлейкин1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), увеличивают содержание мРНК VEGF и VEGF-C, но не эффективны по отношению к VEGF-B. Амплификация онкогена *ras* является причиной повышения уровня VEGF, но остается неизменным уровень экспрессии VEGF-B и VEGF-C. Гипоксия значительно активирует экспрессию мРНК VEGF, но оказывает незначительный эффект на VEGF-B, VEGF-C или PlGF. Мутированный ген *p53* активно воздействует на экспрессию мРНК VEGF, но он не активен по отношению к мРНК VEGF-B или VEGF-C. Хорионический гонадотропин человека вызывает экспрессию VEGF гранулярными клетками,

уменьшая продукцию VEGF-C, не влияя при этом на образование VEGF-B. Среди мРНК VEGF-родственных молекул мРНК VEGF-B оказалась наиболее стабильной и не регулируется ни одним из исследованных факторов [8].

#### **Экспрессия VEGF опухолевыми тканями**

Активация ангиогенеза может происходить при таких физиологических и патологических процессах в организме, как заживление ран и рост опухоли. Индукция васкуляризации (т.е. ангиогенез) представляется решающим шагом в экспансии роста опухолей и развития метастазов. Большинство опухолей, которые в диаметре составляют менее 0,5 мм, могут получать кислород и питательные вещества с помощью диффузии, но некоторые опухоли, размером более 0,5 мм, для роста требуют ускорения процессов пролиферации и морфогенеза эндотелиальных клеток сосудов.

Таким образом, 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. Действительно, для того чтобы популяция опухолевых клеток могла увеличиваться, необходимо, чтобы клетки были обеспечены питательными веществами и кислородом, которые поступают из близлежащих кровеносных сосудов. 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 [5].

Предположение о том, что специальные стромальные клетки костного мозга могут вовлекаться в процесс ангиогенеза, сопровождающего рост опухоли, подтверждается рядом исследований последнего времени. Источником клеток, использующих VEGF для активирования ангиогенеза, является костный мозг [11]. К настоящему времени известно два вида таких клеток. Это клетки предшественники эндотелиальных клеток и клетки предшественники гемопоэтических клеток. Первые экспрессируют VEGFR2, который ответственен за рост и выживаемость клеток. Вторые, экспрессирующие VEGFR1, ответственны за формирование сосудистой стенки. VEGF "заставляет" эти клетки покинуть костный мозг, войти в кровяное русло и таким образом достигнуть опухоли. С этого момента начинается развитие кровеносных сосудов, поддерживающих рост опухоли. Опухоль увеличивается в размере и параллельно происходит деструкция нормальных тканей.

Известны данные о том, что влияние VEGF на клетки костного мозга можно остановить, используя специфические антитела [12]. Моноклональные антитела связываются со свободно циркулирующим в крови VEGF и таким образом понижают концентрацию VEGF, способного инициировать неоваскуляризацию. Клинические испытания таких моноклональных антител уже проводятся, причем они применяются как самостоятельно, так и в сочетании с химиотерапией [13]. Высокая степень зависимости роста опухолей и развития метастазов от уровня VEGF была продемонстрирована в работах, где с помощью моноклональных антител ингибировалась активность VEGF. Клетки карциномы толстого кишечника человека при их перевивке в селезенку бестимусных мышей дают метастазы в печень. При этом наблюдается повышение экспрессии мРНК Flk-1 в сосудистой системе, связанной с метастазами печени. Введение моноклональных антител против VEGF приводило к значительному уменьшению количества и размеров метастазов: все опухоли были менее 3 мм в диаметре, причем большинство из них не превышали 1 мм в диаметре. В метастазах не наблюдалось ни развития сосудов, ни экспрессии Flk-1 [5].

В случае блокирования с помощью моноклональных антител только VEGFR1 или только VEGFR2 наблюдается частичная остановка роста опухоли, а в случае выключения обоих рецепторов - полная блокада опухолевого роста [14].

#### ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

Совсем недавно в ткани костного мозга обнаружены два белка, обозначенные как Id1 и Id3. Проведенные исследования позволили сделать предположение о том, что в случае отсутствия у мышей гена, ответственного за синтез этих соединений не происходит секреции VEGFR1-положительных гемопоэтических клеток и VEGFR2- положительных клеток-предшественников эндотелиальных клеток костного мозга и таким образом ингибируется ангиогенез.

Эти данные свидетельствуют о том, что индуцируемый VEGF ангиогенез действительно является фактором, лимитирующим рост опухоли. В связи с этим большое значение приобретает поиск, выделение и синтез разнообразных ингибиторов ангиогенеза, в том числе эндогенных факторов.

##### VEGF в костной ткани

Костная ткань представляет собой динамичный, обильно снабженный сосудами орган с энергичным обменом веществ. Ошибочность бытовавших в течение длительного времени представлений о "брадигиности" (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.

Костная система выполняет опорную, гемопоэтическую, иммунобиологическую и другие важные функции в организме. Обладая многотканевой структурой (собственно костная, хрящевая, кроветворная, ретикулярная, сосудистая, нервная, жировая ткани), кость потенциально может дать различные по своему гистологическому происхождению опухоли. Но прежде чем говорить об 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 (KDR/Flk-1 и Flt-1) в этих клетках, а также об активации процессов резорбции под действием VEGF. Соответственно функции остеокластов и ангиогенез, вероятнее всего, регулируются общим медиатором, которым является VEGF [15].

Зрелые хондроциты эпифизальной ростовой пластинки экспрессируют VEGF. Для выяснения роли VEGF в энхондральном формировании кости, указанный ростовой фактор инактивировали, используя химерный белок в качестве растворимого рецептора VEGF, который вводили 24-дневным мышам. В результате такой инактивации наблюдалось полное подавление инвазии кровеносных сосудов. Этому сопутствовали замедление темпов формирования трабекулярной кости и развития зоны зрелых хондроцитов. Была замедлена дифференцировка хондрокластов и резорбция терминальных хондроцитов. После прекращения инактивирующего воздействия на VEGF следовали восстановление роста кости, инвазии капилляров, резорбции зрелой хрящевой ткани. Таким образом, становится ясно, что VEGF-опосредованная инвазия капилляров является 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 [16].

В ряде исследований было показано, что VEGF является ключевым регулятором процесса инвазии сосудов в растущей костной пластинке. Для того чтобы выяснить механизмы регуляции ангиогенеза в растущей кости более подробно, была исследована экспрессия ангиопоэтинов в неонатальном ребре человека. 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 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, заметное окрашивание обнаруживали зоны пролиферации и минерализации. В костной ткани экспрессия Ang-1, Ang-2 и VEGF 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 определялся в клетках костной поверхности и костномозгового пространства, устойчивое окрашивание по VEGF было обнаружено в остеобластах и остеокластах зон моделирования и ремоделирования костной ткани [17].

Хотя VEGF 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 было показано наличие экспрессии VEGF, причем двух его изоформ: VEGF121, свободной растворимой формы, и VEGF189, формы, связанной с протеогликанами внутриклеточного матрикса [18].

На ранних стадиях дифференцировки остеобластов обнаруживаются невысокие концентрации VEGF-A, -B и -D, максимальная экспрессия указанных молекул наблюдается на стадии минерализации [19].

Экспрессия VEGF в остеобластах может быть активирована под воздействием гидрофобных статинов, таких как симвастатин, аторвастатин. Эти соединения известны как ингибиторы синтеза холестерина [20].

Попытки оценить роль VEGF *in vivo* в период эмбрионального развития скелета были обречены на неудачу, потому что удаление всего одного аллеля VEGF приводило к эмбриональной смерти экспериментального животного до начала развития скелета. Способность мышей экспрессировать только одну VEGF 120/120-изоформу дает возможность изучать функции VEGF 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 оссификации. Это тем самым подтверждает основополагающую роль VEGF как в начальной стадии васкуляризации хрящевой ткани, так и в заключительной [21].

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

Остеогенная саркома - наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль костей. Удельный вес остеосарком среди всех опухолей костей составляет 70-80% [22].

Термин остеосаркома применяется для обозначения злокачественных опухолей, способных продуцировать остеонд. Пик возникновения остеосаркомы - это поздний пубертатный период и подростковый возраст. Это дает основание для предположения о связи бластоматозного процесса с периодом усиленного роста костей. С меньшей частотой остеосаркома развивается в более поздние возрастные периоды.

В старших возрастных группах остеосаркомы 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.

Костная ткань является мишенью многих гормонов, а также факторов роста, синтез которых может осуществляться в других органах, а также непосредственно в костной ткани, как клетками окружения, так и остеобластами. Таким образом, пролиферация остеобластов находится под эндокринным, паракринным, а также аутокринным контролем.

Исследование первичных остеосарком показывает, 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-

#### ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

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. Эти результаты свидетельствуют о том, что VEGF-экспрессия может быть использована в качестве маркера, предсказывающего метастазирование у пациентов с остеосаркомой. У пациентов с высокой экспрессией VEGF отмечен значительно меньший процент выживаемости, чем у пациентов с низкой экспрессией этого белка [23].

Напрашивается вывод о том, что 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.

Исследования, касающиеся содержания VEGF в сыворотке крови больных остеосаркомой, свидетельствуют о повышенном содержании VEGF по сравнению с нормой [24]. Однако подобных работ пока очень мало и полученные результаты часто оказываются недостоверными.

Исследования содержания VEGF 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 эффекту системной химиотерапии.

Иммуноферментное определение уровня VEGF в сыворотке крови больных первичной остеосаркомой и опухолью Юинга, а также сравнительный анализ полученных данных с аналогичными в контрольной группе показали, что концентрация VEGF в сыворотке крови здоровых людей зависит от пола: у женщин этот показатель выше, чем у мужчин. Наиболее высокая концентрация VEGF обнаружена в сыворотке крови пациентов с опухолью Юинга [25].

Сравнительный анализ VEGF в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей и в крови практически здоровых людей, составивших группу сравнения, показал, что средние значения VEGF в группах больных высокодифференцированной остеосаркомой, опухолью Юинга и хондросаркомой оказались выше, чем в группе сравнения. Но статистически достоверные различия обнаруживались только в группе опухолей Юинга по сравнению с контролем [24].

Иммуноферментный анализ экспрессии VEGF в сыворотке крови больных различными новообразованиями костей, проведенный в лаборатории клинической биохимии РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, позволил высказать ряд предположений относительно связи между экспрессией VEGF и степенью малигнизации опухоли, а также процессами метастазирования.

С помощью сравнительного анализа данных обнаружены статистически достоверные различия между показателями VEGF 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 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 ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, сравнительный анализ средних значений VEGF в вышеуказанных группах больных свидетельствует о том, что экспрессия VEGF в новообразованиях костей, вероятнее всего, связана со степенью малигнизации и, следовательно, данные о содержании VEGF могут быть использованы для дифференциальной диагностики. Такое заключение представляется особенно важным в связи с тем, что диагностические ошибки, как показывает опыт, регистрируются в 60-85% наблюдений.

Известно, что определенные трудности возникают, например, при дифференцировании остеосаркомы с остеонид-остеомой, очагами оссифицирующего миозита, гетеротипической оссификации на месте посттравматической гематомы или фиброзной дисплазии кости, особенно при ее монооссальной форме.

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

Более того, обнаружено, что средние показатели VEGF у пациентов с метастазами, обнаруженными в период до года, достоверно выше, чем у пациентов с более поздними сроками метастазирования.

Вероятнее всего, это объясняется тем, что высокие концентрации VEGF активируют развитие VEGF-зависимого ангиогенеза и усиленный рост количества мелких сосудов. В свою очередь, 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.

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

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

Хондросаркома составляет около 17-22% всех первичных опухолей. Частота возникновения опухоли варьирует от 0,2 до 0,9% на 100000 с преобладанием среди пациентов лиц старше 30 лет. Хондросаркома по клиническому течению, рентгено-морфологическим проявлениям и исходу заболевания составляет весьма неоднородную группу. Она характеризуется чрезвычайно разнообразным течением - от медленного, относительно благоприятного, до очень быстрого, агрессивного с развитием гематогенных метастазов.

Источником развития хондросарком, по-видимому, могут быть персистирующие остатки эмбрионального хряща и полипотентные камбиальные клетки мезенхимального происхождения в случае первичных опухолей, а так же элементы ранее существовавшей хондромы в случае вторичной хондросаркомы [22].

Раннее выявление и первичная диагностика хондросаркомы является одной из актуальных и трудных проблем онкологии. В результате ошибок в диагностике и недостаточном учете ее различных клинико-рентгенологических и морфологических проявлений прибегают либо к излишне радикальным, порой калечащим операциям, или к неоправданному длительному консервативному

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

лечению больных. При этом неадекватный выбор тактики лечения опасен проявлением рецидивов и метастазированием первичной опухоли.

На сегодняшний день нет ясности в молекулярных изменениях, связанных с патогенезом этих опухолей. Наиболее ранними событиями в процессах канцерогенеза и прогрессирования опухолей являются нарушения пролиферации и ингибирование апоптоза. Супрессор опухолевого роста, *p53*, известен как один из главных белков, регулирующих клеточный цикл. Мутации гена *p53* - одни из самых распространенных нарушений, которые находят практически во всех типах опухолей. Есть данные о том, что ген *p53* может играть важную роль в патогенезе хондросаркомы.

Ряд иммуногистохимических исследований показал, что в механизме развития хондросарком участвуют ферменты регуляции активности плазминогена [26]. В частности, было показано, что морфологически более агрессивные опухоли (с высокой степенью инвазивности) характеризуются повышенной концентрацией протеаз.

Экспрессия VEGF хондроцитами злокачественных опухолей наблюдается в случае высокодифференцированных поражений. В доброкачественных опухолях и хондросаркомах 1 степени экспрессия VEGF не обнаруживалась. Повышенная экспрессия VEGF тесно связана с развитием внутрикостного неоангиогенеза [27].

Результаты исследований гигантоклеточной опухоли костной ткани свидетельствуют о том, что во всех проанализированных образцах наблюдались экспрессия основных изоформ VEGF (121, 165, 189). Особенно активно опухоли экспрессировали VEGF121. Более того, обнаружена корреляционная зависимость между уровнем экспрессии VEGF и стадией заболевания, в частности, в опухолевой ткани 3 стадии выявлялся более высокий уровень экспрессии VEGF, чем в опухолях 1-2 стадии. Корреляции между плотностью сосудов и стадией заболевания не обнаружено [28].

Обобщая вышеизложенные фактический материал, можно с уверенностью утверждать, что подробный анализ экспрессии VEGF в сыворотке крови здоровых людей и больных различными доброкачественными и злокачественными новообразованиями позволит получить ценную информацию, которая может быть использована для дифференциальной диагностики, оценки прогноза заболевания, определения степени малигнизации опухоли и коррекции стратегии адъювантной терапии.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** По прогнозам специалистов, в ближайшее время рак займет первое место в "летальной иерархии" болезней, вытеснив заболевания сердечно-сосудистой системы. Сейчас, по данным Всемирной организации здравоохранения, от рака в мире ежегодно умирает более 6 млн человек.

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 клиникорентгенологической картине симулировать опухоль, а порою и переродиться в костную саркому. Кроме того, кости скелета служат местом метастазирования злокачественных новообразований других локализаций.

Учитывая эти обстоятельства, а также факт более редкой патологии (до 1%), количество диагностических, тактических и лечебных ошибок при ведении этой группы больных довольно высок. Актуальность проблемы злокачественных опухолей костной ткани обусловлена еще и тем, что в большинстве случаев они поражают пациентов молодого возраста. Пик возникновения остеосаркомы - это поздний пубертатный период и подростковый возраст. Средний стандартизированный показатель колеблется от 1 до 3 на 100000 населения. 25% от всех опухолей - дети до 16 лет. Важной особенностью злокачественных опухолей костей, в особенности остеосаркомы и опухоли Юинга, является

склонность к инвазивному росту и гематогенному метастазированию.

Несмотря на определенный прогресс в мультимодальном лечении, предполагающем агрессивную адъювантную химиотерапию и радикальное удаление опухоли, в 40-50% случаев у пациентов с остеосаркомой наблюдаются легочные метастазы; преимущественная локализация метастазов у пациентов с опухолью Юинга - легкие (45-65%), кости (25-30%) и относительно редко - регионарные лимфатические узлы, головной мозг, внутренние органы. Причем, согласно данным большинства авторов, уже к моменту поступления в клинику у 20-26% больных опухолью Юинга определяются метастазы.

Имеются неоспоримые доказательства того, что рост солидных опухолей, а так же процессы инвазии и метастазирования зависят от ангиогенеза, процесса формирования и роста новых кровеносных сосудов.

Именно поэтому в обозримой перспективе наиболее многообещающим представляется применение комплексной методологии - сочетание направленной доставки антиопухолевых препаратов с иммунотерапией и антиангиогенной терапией. Антиангиогенная терапия направлена на торможение, противодействие процессам прорастания опухолью кровеносных сосудов.

По представленным выше литературным данным, VEGF является ключевым фактором в развитии ангиогенеза, следовательно, одно из ведущих направлений антиангиогенной терапии может быть связано с воздействием непосредственно на VEGF или на его рецепторы.

Поскольку выживаемость эндотелиальных клеток признана важной характеристикой развития неоваскуляризации и с учетом того, что VEGF одновременно является ангиогенным фактором и фактором выживаемости эндотелиальных клеток, именно специфическая анти-VEGF терапия может дать необходимый эффект в отношении регрессии опухолевых клеток.

В заключение следует отметить, что результаты изучения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов у больных различными морфологическими вариантами новообразований костей подтверждают высказанную выше гипотезу о существовании прямой связи между экспрессией VEGF, степенью злокачественности опухоли и процессами метастазирования, что в свою очередь свидетельствует о существенной роли этого фактора в биологии опухоле-трансформированных тканей. Последующее наблюдение за обследованными группами больных и изучение их выживаемости, с учетом выявленных метастазов, позволит проверить и обосновать указанные представления. 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 ткань опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Street J., Bao M., Guzman L., Bunting S., Franklin V. Peale Jr, Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **15**, 9656-9661.
2. Ferrara N. (1999) Kidney Int., **56**, 794-814.
3. Cao Y., Weidong-Richard Ji, Pang Qi, Rosin A. (1997) Biochem.Biophys. Res. Commun., **235**, 493-498.
4. Connolly D.T., Heivelman D.M., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel N.R., Leimgruber R.M., Feder J. (1989) J. Clin. Invest., **84**, 1470-1478.
5. Запудзе Д.Г. (2000) (ред) Канцерогенез.-М. Научный мир. 298-309.
6. Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J., Ferrara N. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 26032-26037.
7. Wartenberg M., Budde P., Marees M., Grunheck F., Tsang S.Y., Huang Y., Chen Z-Y., et al.(2003) Lab. Invest., **83**, 87-98.
8. Nicosia R.F. (1998) Am. J. Pathol., **153**, 11-16.
9. Ziche M., Maglione D., Ribatti D., Morbidelli L., Lago C.T., Battisti M.,

# ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

- Paoletti I., Barra A., Tucci M., Parise G., Vincenti V., Granger H.J., Viglietto G., Persico M.G. (1997), *Lab. Invest.* **6**, 517-531.
10. Olofsson B., Jeltsch M., Alitalo K., Eriksson U. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 528-533.
11. Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3964-3972.
12. Luo J.C., Toyoda M., Shibuya M. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 2594-2600.
13. Gordon M.S., Talpaz M., Margolin K. et al. (1998) *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **17**, 210.
14. Asano M., Yukita A., Suzuki H. (1999) *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 93-100.
15. Nakagawa M., Kaneda T., Arakawa T., Morita S., Sato T., Yomada T., Hanada K., Kumegawa M., Hakeda Y. (2000) *FEBS Lett.*, **473**(2), 161-164.
16. Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M. et al. (1999) *Development*, **126**, 1149-1159.
17. Horner A., Bord S., Kelsall A. W., Coleman N., Compston J.F. (2001) *Bone* **28**, 65-71.
18. Pufe T., Petersen W., Tillmann B., Mentlein R. (2001) *Arthritis Rheum.*, **44**, 1082-1088.
19. Deckers M., Karperien M. et al. (2000) *Endocrinology*, **141**, 1667-1674.
20. Maeda T., Kawane T., Horiuchi N. (2003) *Endocrinology*, **144**, 681-692.
21. Zelzer E., McLean W., Yin-Shan Ng., Fukai N., Reginato A.M., Lovejoy S. et al. (2002) *Development*, **129**, 1893-1904.
22. Некачалов В.В. (2000) Патология костей и суставов. СПб.: Сотис.
23. Kaya M., Wada T., Akatsuka T., Kawaguchi S., Nagoya S. et al. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 572-577.
24. Holzer G., Obermair A., Koschat M., Preyer O., Kotz R., Trieb K. (2001) *Med. Pediatr. Oncol.*, **4**, 601-604.
25. Кушлинский Н., Бабкина И., Словьев Ю., Трапезников Н. (2000) Бюлл. экспер. биол. мед., **130**, 691-693.
26. Praus M., Wauterickx K., Collen D., Gerard R.D. (1999) *Gene Ther.*, **6**, 227-236.
27. Ayala G., Liu C., Nicosia R., Horowitz S., Lackman R. (2000) *Hum. Pathol.*, **31**, 341-346.
28. Zheng M.H., Xu J., Robbins P., Pavlos N., Wysocky S., Kumta S.M., Wood D.J., Papadimitriou J.M. (2000) *Hum. Pathol.*, **31**, 804-812.

Поступила 27.02.03

## EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN BONE DEVELOPMENT AND BONE TUMORS.

O.M.Kuznetsova<sup>1</sup>, N.E.Kushlinskaya<sup>2</sup>, T.T.Berezov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>People's Friendship University, Moscow, Russia. Tel/fax: (095) 434-0412,

<sup>2</sup>Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia.

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 the existence of dependence between VEGF expression and degree of tumor malignancy and metastasis. These results testify probable participation of VEGF in biology of the tumor-transformed tissue.

**Key words:** Vascular endothelial growth factor, angiogenesis, osteosarcoma, chondrosarcoma, Ewing's tumor, giant cell tumor.