

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

Н.Е. Кушлинский, И.В. Бабкина, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева, Г.Н. Мачак

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Ключевые слова: FGF-1, FGF-2, эндостатин, опухоли костей, сыворотка крови

Изучили содержание факторов роста фибробластов первого и второго типа (FGF-1 и FGF-2) и эндостатина в сыворотке крови 58 больных первичными опухолями костей (до начала лечения) и у 21 практически здорового человека иммуноферментным методом с помощью реактивов фирмы «R&D» (США). Частота выявления FGF-1 в сыворотке крови при опухолях костей была в 2,5 раза выше, чем у практически здоровых людей ($p=0,004$); значимые уровни FGF-2 и эндостатина выявлены у всех обследованных. Среднее содержание эндостатина в сыворотке крови практически здоровых людей было достоверно ниже, чем у больных новообразованиями костей ($p=0,005$). Содержание FGF-1 при остеосаркоме было достоверно выше, чем при хондросаркоме ($p<0,05$), достоверных отличий в уровнях FGF-2 с учетом гистологического строения новообразования не обнаружили. Не выявили зависимости между уровнями FGF-1, FGF-2 и эндостатина у практически здоровых людей и у больных первичными опухолями костей. Обнаружены различия в показателях 3-летней общей выживаемости больных саркомами костей с учетом исходного содержания FGF-1 и эндостатина в сыворотке крови.

Пристальный интерес онкологов к проблеме роста и метастазирования первичных сарком костей связан с тем, что это один из самых сложных разделов клинической онкологии. В литературе представлено достаточное число исследований, направленных на изучение особенностей метаболизма костной ткани в норме и при новообразованиях костей с целью выявления новых потенциальных молекулярно-биологических маркеров опухолевого роста. К таким маркерам относят эндостатин и факторы роста фибробластов (FGF) [1, 2]. Так, стало известно, что дифференцировка остеобластов, основных клеток кости, находится под контролем FGF [3]. Доказано, что факторы роста фибробластов первого и второго типа (FGF-1 и FGF-2) принимают участие не только в дифференцировке остеобластов, но и в минерализации костной ткани [4]. Некоторые исследователи полагают, что дисбаланс экспрессии этих факторов роста может быть одной из причин опухолевого роста [5]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что клетки остеосаркомы человека U2OS способны экспрессировать FGF-2 [6], а клетки остеосаркомы человека SaOS-2 – рецепторы, связывающие FGF-1 и FGF-2 [7]. Также показано, что FGF-2 оказывает супрес-

сивное действие на рост клеток саркомы Юинга, путем индукции апоптоза [8, 9].

Известно, что саркомы костей – чрезвычайно агрессивные злокачественные опухоли, склонные к быстрому гематогенному метастазированию. Следует отметить, что механизмы, определяющие способность опухолевых клеток к инвазии в окружающие ткани и диссеминации, с последующим образованием вторичных очагов опухолевого роста, до конца не изучены. Вместе с тем показано, что важную роль в этих процессах играют активаторы и ингибиторы неоангиогенеза в опухоли [10, 11]. Так, обнаружено, что ключевой активатор ангиогенеза фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) осуществляет свой эффект в синергизме с FGF-2 [12]. Одним из известных ингибиторов ангиогенеза является эндостатин [13]. В эксперименте показано, что при остеосаркоме мышей LM 8 введение эндостатина, после удаления первичной опухоли, приводит к снижению ангиогенной активности, результатом чего является уменьшение размеров метастазов в легких [14]. Полагают, что эндостатин можно использовать в комплексном лечении остеосаркомы у людей [14–16].

Анализ представленных данных экспериментальных исследований послужил основанием для проведения клинического исследования.

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение содержания эндостатина, FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови практически здоровых

Адрес для корреспонденции

Кушлинский Н.Е.

E-mail: biochimia@mtu-net.ru

людей и больных первичными опухолями костей до проводимого лечения для выявления их возможной взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками заболевания и прогнозом.

Методика исследования

Под наблюдением находились пациенты с опухолями костей (58 человек) в возрасте от 14 до 59 лет и практически здоровые люди соответствующего возраста (21). У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. У 22 диагностирована первичная остеосаркома (37%), при этом опухоль чаще выявлялась у мужчин (15), чем у женщин (7). Преобладающее число больных были во втором и третьем десятилетиях жизни. Второй и третьей, по частоте выявления после остеосаркомы, были первичные хондросаркома – 14 (24%) и саркома Юинга – 10 (17%), далее – злокачественная фиброзная гистиоцитома кости (ЗФГ) – 6 (11%) и гигантоклеточная опухоль кости (ГКО) – 6 (11%).

У 41 пациента опухоль локализовалась в трубчатых, у 17 – в плоских костях.

У 47,8% больных максимальный размер первичной опухоли был менее или равен 10 см, у 52,2% – более 10 см.

Определение эндостатина, FGF-1 и FGF-2 проводили иммуноферментным методом с помощью реактивов фирмы «R&D» (США) при использовании автоматического ридера «Elx 800» («Biotek Instruments Inc.», США).

Результаты исследования

Значимый уровень эндостатина выявили во всех образцах сыворотки крови практически здоровых людей и больных опухолями костей. Среднее содержание эндостатина в сыворотке крови практически здоровых людей равнялось $109,2 \pm 2,4$ нг/мл и было достоверно ниже, чем у больных новообразованиями костей ($131,8 \pm 4,8$ нг/мл; $p=0,005$) (табл. 1). При остеосаркоме среднее содержание эндостатина составило $131,6 \pm 8,2$ нг/мл, саркоме Юинга – $121,7 \pm 5,3$ нг/мл, хондросаркоме – $131,1 \pm 12,2$ нг/мл, ГКО – $131,2 \pm 7,7$ нг/мл. При ЗФГ среднее содержание эндостатина было несколько выше, чем при других морфологических вариантах опухоли – $151,2 \pm 18,6$ нг/мл, однако достоверных отличий в уровнях эндостатина с учетом гистологического строения новообразования кости не обнаружено.

Не выявлено достоверных различий в исходных уровнях эндостатина в сыворотке крови при поражении плоских ($131,9 \pm 7,1$ нг/мл, медиана – 130,3 нг/мл) и трубчатых ($131,7 \pm 6,2$ нг/мл, медиана – 134,3 нг/мл) костей. Минимальные показатели цитокина обнаружены при поражении опухолью

большеберцовой кости – 7,7 нг/мл, максимальные – 232,5 нг/мл при поражении пяточной кости.

Зависимости между уровнями эндостатина в сыворотке крови, полом и возрастом ни у практически здоровых людей, ни у больных опухолями костей не выявили. Также не отметили зависимости между уровнем эндостатина в сыворотке крови и максимальным размером опухоли ни в общей группе пациентов, ни в подгруппах, с учетом гистологического строения опухоли.

Таким образом, уровни эндостатина в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей были достоверно выше, чем у практически здоровых людей. Достоверных различий в уровнях эндостатина с учетом гистологического строения новообразования не выявили.

Частота обнаружения FGF-1 у практически здоровых людей была в 2,5 раза достоверно ниже, чем у пациентов с опухолями костей и составила 29 и 72% соответственно ($p=0,004$). Значимый уровень FGF-1 выявлен у 6 практически здоровых людей и у 42 пациентов с опухолями костей. Среднее содержание FGF-1 у практически здоровых людей составило $43,9 \pm 15,6$ пг/мл, медиана – 26,2 пг/мл, у пациентов с опухолями костей уровень FGF-1 был не достоверно выше, как по среднему содержанию, так и по медиане, и составил соответственно $75,6 \pm 13,9$ и $54,3$ пг/мл.

Среди пациентов с опухолями костей FGF-1 обнаружен в сыворотке крови у 17 (77%) больных остеосаркомой, 9 (64%) – хондросаркомой, 8 (80%) – саркомой Юинга, 6 (100%) – ГКО, 2 (33%) – ЗФГ. При остеосаркоме среднее содержание цитокина было равно $96,3 \pm 32,2$ пг/мл, при хондросаркоме – $38,2 \pm 6,9$ пг/мл, при саркоме Юинга – $71,2 \pm 12,4$ пг/мл, при ГКО – $66,6 \pm 15,5$ пг/мл. Только у двух больных ЗФГ уровень FGF-1 в сыворотке крови был отличен от нуля и равнялся 52,4 и 74,9 пг/мл соответственно. Достоверные различия отмечены только при сравнении средних показателей FGF-1 у больных остеосаркомой и хондросаркомой ($p=0,04$). Следует указать, что при остеосаркоме выявлены недостоверные различия в содержании FGF-1 в сыворотке крови с учетом пола пациентов. Так, у мужчин содержание этого фактора роста было равно $60,9 \pm 12,5$ пг/мл, а у женщин – $181,3 \pm 53,1$ пг/мл соответственно.

При локализации опухоли в трубчатых костях уровень FGF-1 был не достоверно выше, чем при локализации опухоли в плоских костях, $81,6 \pm 17,9$ пг/мл и $56,7 \pm 10,9$ пг/мл соответственно.

У пациентов с опухолями костей содержание указанного фактора роста было достоверно выше в возрасте до 30 лет ($116,8 \pm 41,4$ пг/мл), чем старше 50 лет ($42,7 \pm 7,6$ пг/мл) ($p<0,01$).

Достоверных различий в содержании FGF-1 в сыворотке крови при локализации опухолей в плоских и трубчатых костях, а также с учетом размера

опухоли, не выявлено. Однако следует отметить, что при саркоме Юинга отмечена тенденция к повышению содержания FGF-1 с увеличением размера опухоли ($r=0,70$; $p=0,08$).

Таким образом, нами отмечено снижение содержания FGF-1 в сыворотке крови больных опухолями костей с возрастом. Кроме того, уровни FGF-1 при остеосаркоме были достоверно выше, чем при хондросаркоме, что указывает на связь уровней цитокина с гистологическим строением опухоли.

Частота выявления FGF-2 в сыворотке крови практически здоровых людей и больных составила 100%. Среднее содержание FGF-2 в сыворотке крови практически здоровых людей равнялось $13,4 \pm 2,2$ пг/мл и достоверно не отличалось от показателей у больных остеосаркомой ($16,2 \pm 2,4$ пг/мл), хондросаркомой ($15,4 \pm 4,2$ пг/мл) и саркомой Юинга ($18,8 \pm 3,6$ пг/мл). При ГКО среднее содержание FGF-2 в сыворотке крови больных было несколько ниже, чем в группе контроля ($9,8 \pm 1,3$ пг/мл), а при ЗФГ, наоборот, отмечена тенденция к его повышению ($21,7 \pm 8,8$ пг/мл). Зависимости между уровнями FGF-2 в сыворотке крови с учетом пола и возраста ни у практически здоровых людей, ни у больных опухолями костей не выявили.

При поражении плоских костей содержание FGF-2 в сыворотке крови равнялось $18,2 \pm 3,8$ пг/мл, при поражении трубчатых костей – $15,6 \pm 1,9$ пг/мл, различия статистически не достоверны. Максимальный уровень FGF-2 в сыворотке крови обнаружен при поражении пяточной кости – $66,6$ пг/мл, минимальный – при поражении лопатки – $4,7$ пг/мл. Зависимости между максимальным размером новообразования и содержанием FGF-2 в сыворотке крови не выявлено.

Таким образом, уровни FGF-2 в сыворотке крови больных остеосаркомой, хондросаркомой и сар-

комой Юинга не отличались от таковых у практически здоровых людей, при ГКО они были достоверно ниже, а при ЗФГ – недостоверно выше, чем у практически здоровых людей соответствующего возраста.

Корреляционный анализ зависимости между уровнями FGF-1, FGF-2 и эндостатина в сыворотке крови, как больных опухолями костей, так и практически здоровых людей, не выявил.

42 пациента с саркомами костей (остеосаркома – 19, хондросаркома – 13, саркома Юинга – 10) находились под нашим наблюдением в течение 3-х лет. Общая 3-летняя выживаемость в общей группе больных составила $59,7 \pm 12,2\%$, при остеосаркоме – $78,6 \pm 11\%$, при саркоме Юинга – $52,5 \pm 20,4\%$, при хондросаркоме – $72,0 \pm 17,8\%$; достоверных различий в показателях выживаемости с учетом гистологического строения опухоли не выявлено ($p=0,55$). С помощью статистических методов анализа выделены пороговые значения FGF-1 и эндостатина в сыворотке крови, при которых отмечены различия в 3-летней общей выживаемости пациентов. Так, 3-летняя общая выживаемость при исходном уровне эндостатина в сыворотке крови <130 нг/мл составила $81,3 \pm 12,4\%$, при уровне эндостатина ≥ 130 нг/мл – $62,2 \pm 12,4\%$; при FGF-1 <35 пг/мл – 100%, при FGF-1 ≥ 35 пг/мл – $61,5 \pm 14,1\%$. Различий в показателях общей 3-летней выживаемости больных саркомами костей с учетом содержания FGF-2 в сыворотке крови не обнаружили.

Таким образом, нами выявлены различия в 3-летней общей выживаемости больных саркомами костей с учетом содержания FGF-1 и эндостатина в сыворотке крови, определенных до начала специфического лечения.

Подводя итоги настоящего исследования, следует отметить, что частота выявления FGF-1 в сы-

Таблица. Эндостатин и факторы роста фибробластов первого и второго типа (FGF-1 и FGF-2) в сыворотке крови больных первичными злокачественными опухолями костей и практически здоровых людей

Категория обследованных пациентов	Количество	FGF-1		FGF-2		Эндостатин	
		Частота выявления (%)	Средний уровень (пг/мл)	Частота выявления (%)	Средний уровень (пг/мл)	Частота выявления (%)	Средний уровень (нг/мл)
Практически здоровые люди	21	291	$43,9 \pm 15,6$	100	$13,4 \pm 2,2$	100	$109,2 \pm 2,45$
Опухоли костей	58	722	$75,6 \pm 13,9$	100	$16,4 \pm 1,7$	100	$131,8 \pm 4,86$
Остеосаркома	22	77	$96,3 \pm 32,23$	100	$16,2 \pm 2,4$	100	$131,6 \pm 8,3$
Саркома Юинга	10	80	$71,2 \pm 12,4$	100	$18,8 \pm 3,6$	100	$121,7 \pm 5,3$
Хондросаркома	14	64	$38,2 \pm 6,94$	100	$15,4 \pm 4,2$	100	$131,1 \pm 12,2$
ЗФГ	6	33	52,4 и 74,9	100	$21,7 \pm 8,8$	100	$151,2 \pm 18,6$
Г О	6	100	$66,6 \pm 15,5$	100	$9,8 \pm 1,3$	100	$131,2 \pm 7,7$

Примечание: P1vs2<0,05; P3vs4<0,05; P5vs6<0,05.

воротке крови больных опухолями костей была значительно выше, чем у практически здоровых людей соответствующего возраста, тогда как значимые уровни FGF-2 и эндостатина выявлены у всех обследованных больных и здоровых людей. Средние уровни FGF-1 и FGF-2 достоверно не отличались от показателей контрольной группы, тогда как средний уровень эндостатина при опухолях костей был достоверно выше, чем у практически здоровых людей.

Полученные данные позволяют предположить, что экспрессия FGF-1 и эндостатина может иметь связь с патогенетическими изменениями, связанными с ростом опухоли кости и может служить предметом дальнейших клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bodo M., Lilli C., Bellucci C. et al. Basic fibroblast growth factor autocrine loop controls human osteosarcoma phenotyping and differentiation. *Molecular Medicine*. 2002, v. 8, No.7, p.393-404.
2. Powers C.J., McLeskey S.W., Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*. 2000, v. 11, p.165-197.
3. Valta M.P., Hentunen T., Qu Q. et al. Regulation of osteoblast differentiation: a novel function for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology*. 2006, v. 147, No.5, p. 2171-2182.
4. Solan J.L., Deftos L.J., Goding J.W., Terkeltaub R.A. Expression of the nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase PC-1 is induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and modulated by activation of the protein kinase A and C pathways in osteoblast-like osteosarcoma cells. *J. Bone Miner. Res.* 1996, v. 11, No. 2, p.183-192.
5. Kwabi-Addo B., Ozen M., Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2000, v. 11, p. 709-724.
6. Roomi M.W., Roomi N., Ivanov V. Inhibitory effect of a mixture containing ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on critical parameters in angiogenesis. *Oncol. Rep.* 2005, v. 14, No. 4, p. 807-815.
7. Jang J.H. Identification and characterization of soluble isoform of fibroblast growth factor receptor 3 in human SaOS-2 osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, v. 292, No. 2, p. 378-382.
8. Jung H.S., Kim H.S., Lee M.J. et al. Arsenic trioxid concentration determines the fate of Ewing's sarcoma family tumors and neuroblastoma cells in vitro. *FEBS Lett.* 2006, v. 580, No. 20, p. 4969-4975.
9. Ma C., Bower K.A., Chen G. et al. Interaction between ERK and GSK3beta mediates basic fibroblast growth factor-induced apoptosis in SK-N-MC neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 2008, v. 283, No.14, p. 9248-9256.
10. Киселев С.М., Луценко С.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Ингибиторы опухолевого ангиогенеза. *Биохимия*. 2003, том 68, № 5, с. 611-631.
11. Луценко С.В., Киселев С.М., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процесса. Под ред. М.А. Пальцева. «Введение в молекулярную медицину». М., «Медицина». 2004, с. 446-495.
12. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med.* 2000, v. 6, No. 4, p. 389-395.
13. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997, v. 88, p. 277-285.
14. Kaya M., Wada T., Nagoya S., Yamashita T. Prevention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin. *J. Orthop. Sci.* 2007, v. 12, No. 6, p. 562-567.
15. Dutour A., Monteil J., Paraf E. et al. Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol. Ther.* 2005, v. 11, No. 2, p. 311-319.
16. Kaya M., Wada T., Nagoya S. et al. Concomitant tumour resistance in patients with osteosarcoma. A clue to a new therapeutic strategy. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2004, v. 86, No. 1, p. 143-147.

Статья поступила 29.09.2009 г., принята к печати 12.10.2009 г.
Рекомендована к публикации Е.В. Степановой

MOLECULAR-BIOLOGY MARKERS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH PRIMARY BONE TUMORS

Kushlinsky N.E., Babkina I.V., Soloviev Yu.N., Bulicheva I.V., Machak G.N.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

Key words: FGF-1, FGF-2, endostatin, bone tumors, serum

We studied type 1 and 2 fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) and endostatin in the serum obtained from 58 untreated bone tumor patients and in the serum of 21 practically healthy subjects. FGF-1, FGF-2 and endostatin were measured by enzyme immunoassay in the serum using «R&D» kits (USA). Frequency of FGF-1 determination in serum was in 2,5 times higher in patients with bone tumors than in healthy subjects ($p=0,004$). All samples contained FGF-2 and endostatin. Endostatin levels in practically healthy subjects were lower than in patients with bone tumors ($p=0,005$). FGF-1 levels in patients with osteosarcoma were significantly lower than in patients with chondrosarcoma ($p<0,05$), there were no significant differences in FGF-2 concentrations in patients with various types of affected bone. No significant correlations were found between FGF-1, FGF-2 and endostatin levels in practically healthy subjects and in patients with bone tumors. We demonstrated differences in 3-years overall survival in patients with bone sarcomas depending on serum FGF-1 and endostatin levels.