

Роль VEGF РЕЦЕПТОР-ЛИГАНДНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГИГАНТОКЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛИ КОСТИ

Е.В. Степанова, Э.Р. Мусаев, Е.А. Сушенцов, Н.Н. Петровичев, М.Д. Алиев, М.Р. Личиницер

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

Ключевые слова: гигантоклеточная опухоль, ангиогенез, VEGFR, остеокласты, саркомы костей

Было проведено исследование экспрессии VEGF и его рецепторов и пролиферативной активности в клетках гигантоклеточной опухоли кости. Иммуногистохимическим методом было исследовано 11 фиксированных в формалине, заключенных в формалин образцов гигантоклеточной опухоли. VEGF и его рецепторы VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR) были обнаружены во всех случаях и во всех клеточных типах, как на многоядерных остеокласт-подобных клетках, так и на стромальных. Стромальный компонент опухоли был единственным типом клеток, окрашивающихся на Ki-67. Высокая степень экспрессии Flk-1 и Flt-1 значимо коррелировала с высокой пролиферативной активностью ($\geq 5\%$) ($p=0,031$ и $p=0,048$, соответственно). Полученные результаты предполагают важную роль VEGF рецептор-лигандной системы в патогенезе гигантоклеточной опухоли кости. Дальнейшие исследования в этой области должны помочь прояснить уникальную природу и механизмы взаимодействий клеток этой опухоли.

Гигантоклеточная опухоль кости является доброкачественной, но локально агрессивной опухолью кости молодых людей в возрасте 20–40 лет. Частота встречаемости опухоли составляет 4–5% от всех опухолей кости и примерно 18% от доброкачественных опухолей кости.

Эта опухоль является хорошо диагностируемой неоплазией с определенным набором радиологических, клинических и гистологических особенностей [14, 17, 20]. Некоторые патоморфологи рассматривают гигантоклеточную опухоль как потенциально злокачественную опухоль или опухоль низкой степени злокачественности [4, 5]. Опухоль является локально агрессивной и деструктивной и имеет тенденцию к рецидивированию после простого удаления опухоли.

По данным гистологического исследования, опухоль характеризуется открытым и заметным количеством геморагий, наличием многочисленных гигантских клеток и веретеновидных стромальных клеток [15, 20]. Гигантские клетки рассматриваются как реактивные, тогда как стромальные клетки рассматриваются как «истинные» неопластические клетки. До настоящего времени идут дискуссии о природе обоих типов клеток. Предполагается, что гигантские

клетки произошли от циркулирующих моноцитов, которые превратились в остеокласты после их миграции в окружающее опухоль костное микроокружение, приобретения некоторых уникальных особенностей и экспрессии ряда дополнительных генов. Эти выводы основаны на различных световых, ультраструктурных и иммунологических маркерах [2, 8, 9, 11]. Стромальные клетки в основном рассматриваются как фибробласты, секретирующие коллаген I и III и имеющие рецепторы паратироидного гормона [13, 18]. В исследованиях было показано, что веретеновидные стромальные клетки, возможно, играют первичную роль в развитии этих опухолей. Они представляют собой пролиферирующий компонент опухоли, и предполагается, что они продуцируют факторы, вызывающие привлечение и дифференцировку остеокластов [18]. Стромальные клетки с моноцит-макрофагальной дифференцировкой также принимают участие в развитии гигантоклеточной опухоли.

В исследованиях *in vitro* было показано, что VEGF может способствовать привлечению и дифференцировке остеокластов. Так, Niida et al. показали, что единственная инъекция рекомбинантного сосудистого фактора роста эндотелия (VEGF) может индуцировать привлечение остеокластов у мышей, имеющих предрасположенность к остеопорозу [12]. Кроме того, Flt-1 (VEGFR-1) является функциональным рецептором для VEGF на моноцитах и медиатором привлечения моноцитов.

Существует лишь небольшое количество сообщений об иммуногистохимических исследованиях

Адрес для корреспонденции

Степанова Е.В.

E-mail: e_stepanova@nm.ru

ГКОК. В данных работах исследовались факторы апоптоза, различные факторы роста. Но не сообщается об исследованиях экспрессии VEGF в этой опухоли.

Проведено исследование экспрессии факторов ангиогенеза VEGF и его рецепторов VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1/KDR), а также других молекулярно-биологических маркеров в ткани ГОК. Оценка их связи с пролиферативной активностью опухоли помогла бы лучше понять патогенез этой опухоли.

Материалы и методы

В исследование включены 11 больных с гигантоклеточной опухолью кости, получивших хирургическое лечение в РОНЦ в течение 1996–1999 гг. Образцы были фиксированы в 10% формалине по стандартной методике и заключены в парафин. Средний возраст пациентов был 27,1 года (от 17 до 40 лет). Локализация опухолей была: лучевая кость – 2 случая; плечевая кость – 1; большеберцовая кость – 4; малоберцовая кость – 2; нижняя челюсть – 1; грудина – 1. В 9 случаях была исследована первичная опухоль GCT, а в 2 – рецидив опухоли.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Для выявления антигенных детерминант проводили обработку срезов в Target Retrieval Solution [DAKO Corp] в течение 30 мин при 95 °C. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4 °C. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к Ki-67 (клон Ki-S5, разведение 1:50, DAKO Corp), VEGF (клон A-3, разведение 1:1000, Santa Cruz Biotech), Flk-1 (клон A-1, разведение 1:1000, Santa Cruz Biotech) и Flt-1 (разведение 1:500, Santa Cruz Biotech). Для визуализации реакции антиген-антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit [DAKO Corp]. Хромогеном служил ДАБ+ [DAKO Corp]. Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «SPSS» (v. 9.0. for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ^2) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95% точности).

Результаты

Результаты окрашивания гигантских остеокластоподобных и стромальных клеток представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

В 11 случаях из 11 (100%) опухоли были оценены положительно по VEGF. Цитоплазматическое окрашивание присутствовало как в стромальных клетках, так и в гигантских остеокластоподобных клетках (табл. 1 и 2). Интенсивность окраски варьировала от слабой до сильной. Окраска VEGF в гигантских клетках часто была сильнее с одной стороны клетки, в т. н. базальной части.

В 8 случаях из 11 (73%) опухоли были оценены положительно по рецептору к VEGF типа I: Flt-1. Рецептор к VEGF 2-го типа Flk-1/KDR определялся в 11 из 11 (100%) опухолей, как на гигантских, так и на стромальных клетках. По уровню экспрессии Flk-1 на стромальных клетках опухоли были разделены на опухоли с низкой экспрессией рецептора (менее 50%) – 4 из 11 (36%) – и высокой степенью экспрессии (более 50%) – 7 из 11 (63,6%). В целом количество Flk-1-положительных клеток по сравнению с Flt-1-положительными клетками было выше (данные статистически значимые). Но при этом высокая степень экспрессии Flk-1 коррелировала с экспрессией Flt-1 на стромальных клетках ($p=0,048$).

В ткани опухоли определялось также окрашивание части сосудов на рецепторы к VEGF.

Стромальный компонент опухоли был единственным типом клеток, окрашивающихся на Ki-67. Гигантские остеокластоподобные клетки были всегда отрицательными по Ki-67. По количеству положительных клеток опухоли были разделены на

Таблица 1. Экспрессия ангиогенных и апоптотических факторов при гигантоклеточной опухоли кости

Маркеры	Экспрессия маркеров, % (n)		Разброс окрашенных клеток	
	стромальные	гигантские	стромальные	гигантские
VEGF	100 (11)	100 (11)	30–100%	50–100 %
Flt-1	63,6 (7)	72,7 (8)	25–50%	2–100%
Flk-1	100 (11)	100 (11)	30–100%	30–100%
Ki-67	90,9 (10)	0	2–30%	0
Bcl-2	81,8 (9)	45,5 (5)	2–25%	10–75%
Bax	72,7 (8)	100 (11)	2–50%	30–100%

Таблица 2. Экспрессия ангиогенных факторов в гигантских клетках

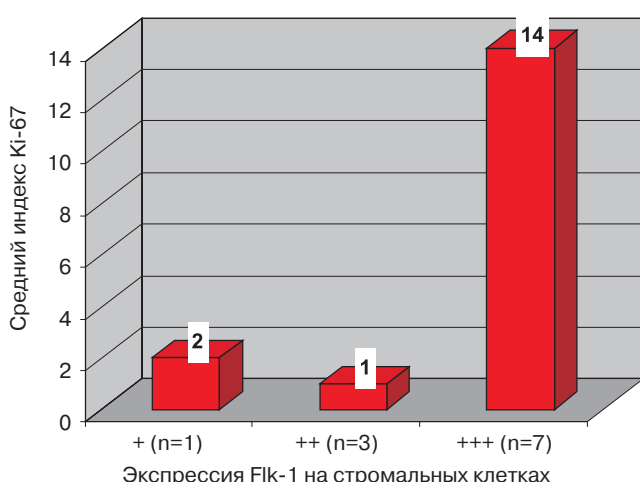
№	Степень злокачественности	VEGF уровень	Flt-1 уровень	Flk-1 уровень
1	I	+++	0	+++
2	I	+++	0	+++
3	I	+++	++	+++
4	I	+++	+++	+++
5	I	+++	+++	+++
6	I	+++	+++	+++
7	I	+++	+	+++
8	I/II	+++	+	+++
9	I/II	+++	0	++
10	II	+++	++	+++
11	II	+++	++	+++

2 группы с низкой ($Ki-67 < 5\%$) и высокой ($Ki-67 \geq 5\%$) пролиферативной активностью. Из 11 опухолей 4 (36%) обладали низкой пролиферативной активностью ($Ki-67 < 5\%$), 7 (64%) – высокой пролиферативной активностью ($Ki-67 \geq 5\%$) (рис. 1, 2).

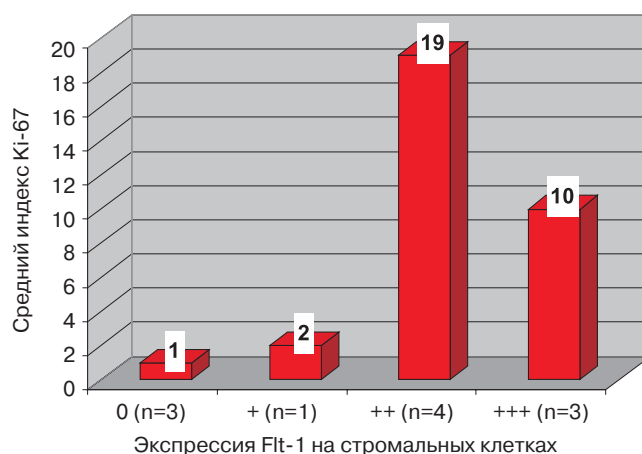
Высокая степень экспрессии Flk-1 ($\geq 50\%$) и Flt-1 значимо коррелировала с высокой пролиферативной активностью ($\geq 5\%$) ($p=0,031$, $p=0,048$ соответственно). Результаты представлены в табл. 3.

Обсуждение

Целью нашей работы было исследовать экспрессию ангиогенных факторов (VEGF и его рецепторов) при гигантоклеточной опухоли. В ходе нашего исследования было обнаружено, что VEGF и его рецепторы VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1/KDR)

**Рис. 1. Зависимость пролиферативной активности от уровня экспрессии Flk-1 на стромальных клетках (все случаи имели сильную экспрессию VEGF).**

Достоверность между группами +/++ и +++ составляет $p=0,003$

**Рис. 2. Зависимость пролиферативной активности от уровня экспрессии Flt-1 на стромальных клетках (все случаи имели сильную экспрессию VEGF).**

Достоверность между группами 0/+ и ++/+++ составляет $p=0,015$

Таблица 3. Экспрессия ангиогенных факторов в стромальных клетках

№	Степень злокачественности	VEGF	Flt-1	Flk-1	Ki-67 activity
1	I	+++	0	++	Low
2	I	+++	0	++	Low
3	I	++	+	++	Low
4	I	++	0	+++	High
5	I	++	+++	+++	High
6	I	+++	++	+++	High
7	I	++	++	+++	High
8	I/II	+++	++	+++	High
9	I/II	+++	0	+	Low
10	II	+++	+++	+++	High
11	II	+++	++	+++	High

широко экспрессированы как на стромальных, так и на многоядерных остеокласт-подобных клетках. Кроме того, оказалось, что существует значимая корреляция между экспрессиями рецепторов к VEGF, а также пролиферативной активностью опухоли.

Гигантоклеточная опухоль – уникальная природная модель резорбции кости остеокластами, чье привлечение и развитие контролируются неопластической популяцией стромальных клеток [13]. Недавние исследования показывают, что стромальные клетки являются единственным пролиферирующим компонентом опухоли. Гигантские клетки являются непролиферирующими и реактивными, что было подтверждено и в нашем исследовании [7].

В культуре *in vivo* стромальные клетки, полученные из гигантоклеточной опухоли кости, индуцируют привлечение моноцитов и пролиферацию остеобластов либо путем секреции определенных факторов, либо контактами клетка-клетка. Многие из этих факторов еще не определены. 9 цитокинов, участвующих в процессах резорбции кости, ангиогенезе, опухолевом некрозе, пролиферации клеток кости, были иммуногистохимически тестированы. Mills B.G. было показано, что в многоядерных клетках опухоли по сравнению с нормальной костью уменьшено образование TGF beta, но не bFGF, PDGF и других [10]. В другом исследовании также подтверждается высокая экспрессия VEGF в клетках опухоли [20]. Возможно, что VEGF является фактором, который может способствовать привлечению и дифференцировке остеокластов. Единичная инъекция рекомбинантного VEGF может индуцировать привлечение остеокластов у мышей с остеопорозом. При этом передача сигнала от VEGF внутрь клетки осуществляется через VEGFR-1. В нашем исследовании было показано, что 100% опухолей экспрессируют VEGF. Это подтверждает гипотезу о важной роли VEGF в развитии этой опухоли.

В нашем исследовании была показана экспрессия 2 типов рецепторов к VEGF на клетках опухоли, причем уровень экспрессии Flt-1/KDR был выше, чем Flt-1. В исследованиях клеток периферической крови было показано, что моноциты в отличие от эндотелия экспрессируют только рецептор к VEGFR-1 (Flt-1) [6]. Обработка человеческих моноцитов VEGF, выделенных из супернатанта опухолевых клеток, индуцирует активацию моноцитов и их миграцию [3], что сопровождается увеличением синтеза VEGFR-1 (Flt-1). Таким образом, в норме VEGF выполняет свои функции в системе моноцит-остеокласт взаимодействий через рецептор 1-го типа. Возможно, появление рецептора 2-го типа на моноцит-подобных клетках является критическим для развития данной опухоли.

Небольшое количество иммуногистохимических исследований показывает, что эти опухоли (как стромальные, так и многоядерные клетки) обычно не содержат мутантный p53. Стромальные клетки являются отрицательными по Bcl-2 и Вах. Таким образом, нарушение механизмов движения по клеточному циклу не является основным для гигантоклеточной опухоли.

Настоящее исследование показало высокую экспрессию VEGF и его рецепторов (Flt-1 и Flk-1/KDR) в гигантоклеточной опухоли. Описанные исследования *in vitro* и обнаруженная зависимость пролиферативной активности от экспрессии рецепторов к VEGF на стромальных клетках дают возможность предполагать важную роль ангиогенных факторов в патогенезе гигантоклеточной опухоли. Дальней-

шие исследования в этой области должны помочь пролить свет на уникальную природу и механизмы взаимодействий этих опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abe Y., Yonemura K., Nishida K., Takagi K. Giant cell tumor of bone: analysis of proliferative cells by double-labeling immunohistochemistry with anti-proliferating cell nuclear antigen antibody and culture procedure. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1994, v. 68, p. 407-414.
2. Atkins G.J., Kostakis P., Vincent C. et al. RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *J. Bone Miner Res*. 2006, v. 21, p. 1339-1349.
3. Barleon B., Sozzani S., Zhou D. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996, v. 87, p. 3336-3343.
4. Cheng J.C., Johnston J.O. Giant cell tumor of bone. Prognosis and treatment of pulmonary metastases. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 1997, v. 338, p. 205-214.
5. Chuong R., Kaban L.B., Kozakewich H. Central giant cell lesions of the jaws: clinicopathologic study. *J. Oral Maxillofac Surg*. 1986, v. 44, p. 708-713.
6. Clauss M., Weich H., Breier G. et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications of functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem*. 1996, v. 271, p. 17629-17634.
7. Ismail F.W., Shamsudin A.M., Wan Z. et al. Ki67 immunohistochemistry index in stage III giant cell tumor of the bone. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2010, v. 12, p. 29-25.
8. Lau Y.S., Sabokbar A., Gibbons C.L. et al. Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. *Hum. Pathol*. 2005, v. 36, p. 945-954.
9. Liao T.S., Yurgelun M.B., Chang S.S. et al. Recruitment of osteoclast precursors by stromal cell derived factor-1 (SDF-1) in giant cell tumor of bone. *J. Orthop. Res*. 2005, v. 23, p. 203-209.
10. Mills B.G., Frausto A. Cytokines expressed in multinucleated cells. Paget's disease and giant cell tumors versus normal bone. *Calcif Tissue Int*. 1997, 61, p. 16-21.
11. Morgan T., Atkins G.J., Trivett M.K. et al. Molecular profiling of giant cell tumor of bone and the osteoclastic localization of ligand for receptor activator of nuclear factor kappa-B. *Am. J. Pathol*. 2005, v. 167, p. 117-128.
12. Niida S., Kaku M., Amano H. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J. Exp. Med*. 1999, v. 190, p. 293-298.
13. Robinson D., Einhorn T.A. Giant cell tumor of bone: a unique paradigm of stromal hemopoietic cellular interactions. *J. Cell Biochem*. 1994, v. 55, p. 300-303.
14. Robinson D., Segal M., Nevo Z. Giant cell tumor of bone. The role of fibroblast growth factor 3 positive mesenchymal stem cells in its pathogenesis *Pathobiology*. 2002–2003, v. 70, p. 333-342.
15. Rosai J., Ackerman L.V. Bones and Joints. In Rosai J. (Ed): *Surgical Pathology*. Mosby, St. Louis. 2004, p. 2169-2172.
16. Roux S., Quinn J., Pichaud F. et al. Human cord blood monocytes undergo terminal osteoclast differentiation *in vitro* in the

- presence of culture medium conditioned by giant cell tumor of bone. *J. Cell Physiol.* 1996, v. 168, p. 489-498.
17. Werner M. Giant cell tumor of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. *Int. Orthop.* 2006, v. 30, p. 484-489.
 18. Wüiling M., Delling G., Kaiser E. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum. Pathol.* 2003, v. 34 (10), p. 983-993.
 19. Zheng M.H., Robbins P., Xu J. et al. The histogenesis of giant cell tumor of bone: a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol.* 2001, v. 16, p. 297-307.
 20. Zheng M.H., Xu J., Robbins P. et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. *Hum. Pathol.* 2000, v. 31, p. 804-812.

Статья поступила 02.09.2010 г., принята к печати 28.09.2010 г.
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

ROLE OF RECEPTOR-LIGAND SYSTEM IN GIANT CELL TUMOR

Stepanova E.V., Musaev E.R., Sushencov E.A., Petrovichev N.N., Aliev M.D., Lichinizer M.R.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Key words: giant cell tumor, angiogenesis, VEGF, osteoclasts, bone sarcomas

Expression of VEGF and its receptors and proliferative activities were studied in cells of giant cell tumor of the bone. Immunohistochemical analysis was performed on 11 formalin-fixed, formalin-embedded samples of giant cell tumor of the bone. VEGF and its receptors VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR) was detected in all specimens and all cellular components such as reactive osteoclast-like giant cells and stromal cells. Ki-67 expression was limited to the mononuclear stromal cell component of the tumors. The high degree of expression Flk-1 and Flt-1 significantly correlated with high proliferative activity of the tumor ($\geq 5\%$) ($p=0,031$ for Flk-1 and $p=0,048$ for Flt-1). These results suggest that VEGF receptor-ligand system might play a role in the pathogenesis of giant cell tumor of the bone. The further research should help to explain a unique nature and cell interaction mechanisms of this tumor.