



Киселев Л.П., Савицкая Т.В., Алейникова О.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Kisialeu L., Savitskaia T., Aleinikova O.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Экспрессия факторов роста эндотелия сосудов VEGF в качестве прогностического маркера биологического поведения онкологического процесса у пациентов детского возраста с костными и мягкоткаными саркомами

Expression of VEGF, its isoforms and receptors as prognostic markers for pediatric patients with bone and soft tissue sarcomas

Резюме

Актуальность. Формирование патологической сосудистой сети (ангиогенез) новообразованием является критически важным для его роста и метастазирования, но в то же время может представлять мишень для терапевтического воздействия.

Цель. Поиск отличий в уровне экспрессии иРНК (информационной рибонуклеиновой кислоты) спектра маркеров ангиогенеза в субстрате злокачественных и незлокачественных новообразований у пациентов детского возраста с костными и мягкоткаными саркомами.

Материалы и методы. Изучена экспрессия маркеров ангиогенеза: факторы роста эндотелия сосудов VEGFA (включая изоформы 121, 165, 189) и VEGFC, рецепторы VEGFR1 и VEGFR2 в образцах патологической ткани у 39 пациентов со злокачественной и 23 – с незлокачественной природой заболевания.

Результаты. В злокачественных опухолях констатирован значимо больший уровень экспрессии мРНК изоформ VEGFA121, VEGFA165 и соотношения VEGFA165/189, в то время как экспрессия остальных маркеров была выше у пациентов без онкопатологии. Соотношение VEGFA165/189 было выше при локализованных формах злокачественных новообразований ($p < 0,05$).

Заключение. По результатам анализа литературы это первое исследование такой комбинации маркеров ангиогенеза у педиатрических пациентов с саркомами костей и мягких тканей. Показано, что экспрессия значительной части компонентов изученного спектра не является прерогативой неоплазм и показывает большие значения у пациентов без злокачественного процесса. Соотношение изоформ VEGFA165/189 отличает пациентов с локализованными формами онкологического процесса от когорты с IV стадией заболевания, эти показатели могут расцениваться как убедительные прогностические маркеры онкологического процесса.

Ключевые слова: ангиогенез, ткань опухоли, саркомы костей и мягких тканей у детей, диагностика и лечение.

Abstract

Without own vasculature formation (angiogenesis) it is impossible further tumor development and production of metastases.

Aim. To assess the mRNA (messenger ribonucleic acid) expression levels of the angiogenesis markers spectrum in malignant and non-malignant pathological foci.

Materials and methods. VEGFA (including isoforms of 121, 165, 189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 in tissues of pathological foci were examined before treatment using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR). 62 (39 malignant and 23 nonmalignant) samples from pediatric patients with bone and soft tissues pathology were studied.

Results. Significantly higher level of isoforms VEGFA121, VEGFA165 as well as VEGFA165/189 ratio ascertained for malignancies. Other markers expression levels were higher in patients without cancer pathology. Level of VEGFA165/189 ratio was greater for localized cancer vs. metastatic forms ($p<0.05$).

Conclusions. Expression of several angiogenesis factors is not the extraordinary prerogative of neoplasms and may be greater in patients without malignancy. VEGFA165/189 ratio distinguished localized and metastatic cancer pediatric patients and can be used as a tumor prognostic marker.

Keywords: angiogenesis, pediatric patients, tissue tumors, sarcomas of bone and soft tissues.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс формирования опухолью собственной сосудистой сети (опухолевый ангиогенез или неоангиогенез) сопровождается существенным изменением ряда показателей, и поэтому логично полагать, что их оценка может быть целесообразна для установления факта наличия онкопатологии [1–4]. Однако выявление надежных маркеров является сложной и пока не решенной проблемой, что обусловлено многочисленностью факторов, определяющих ангиогенез, а также отсутствием четких представлений в отношении выбора оптимального биологического материала для проведения анализа. На сегодняшний день в плане критерия онкологического процесса наиболее перспективным считается семейство факторов роста, в особенности фактор роста эндотелия сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor) и его изоформы, а также ряд связанных с ним рецепторов. VEGF относят к фундаментальным медиаторам как патологического, так и физиологического ангиогенеза. Основными представителями семейства VEGF являются VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF и плацентарный фактор роста (PLGF). Особое место в этом ряду занимает VEGFA, точками приложения которого служат хемотаксис и дифференцировка предшественников эндотелиоцитов [5]. В свою очередь, выделяют как минимум 5 изоформ VEGFA, обозначаемых по количеству аминокислотных оснований в каждой – VEGFA121, VEGFA145, VEGFA165, VEGFA189 и VEGFA206 соответственно. Белок с минимальной молекулярной массой VEGFA121 обладает максимальной гидрофильностью и оказывает митогенное действие на сосудистый эндотелий. В количественном плане наибольшее представительство среди всех изоформ имеет VEGFA165, который рассматривается в качестве основного стимулятора генеза сосудистой сети. VEGFA189 присутствует в сравнительно небольших концентрациях и является лигандом рецептора VEGFR-3, локализованного преимущественно в лимфатических сосудах [4, 6].

Предметом настоящей работы стало определение уровня экспрессии факторов роста эндотелия сосудов VEGFA (включая изоформы 121, 165, 189), а также

рецепторов VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR-3 в опухолевой ткани у детей с костными и мягкоткаными саркомами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые группы были сформированы с ноября 2008 г. по март 2011 г. и состояли из пациентов детского возраста, которые были обследованы в связи с подозрением на наличие онкопатологии костных структур или мягких тканей в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь. 62 образца тканей первичных патологических очагов были получены в результате диагностического оперативного вмешательства (биопсии) до начала специального лечения. Критерием включения пациента в исследование было наличие достаточного количества материала и гистологическое (при необходимости – иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое) подтверждение диагноза. Пациенты, получавшие специальное противоопухолевое лечение до получения образца ткани, в исследование не включались. Среди 39 (62,9%) пациентов с онкозаболеванием у 16 (41,0%) диагностирована саркома Юинга (СЮ), у 16 (41,0%) – остеосаркома (ОС), у 7 (18,0%) – рабдомиосаркома (РМС). Для 23 (37,1%) диагноз онкозаболевания был исключен: у 5 были незлокачественные образования кости (остеоид-остеома, остеокластома, остеобластома, хондрома), у 5 – остеомиелит, у 3 – фиброзная дисплазия, у 3 – аневризмальная костная киста, у 3 – посттравматические изменения, у 1 – гранулематозное воспаление, у 1 – аневризмальная киста, у 1 – фиброматоз мягких тканей, у 1 – оссифицирующий миозит бедра.

Дополнительные показатели исследуемой когорты пациентов представлены в табл. 1. Диагноз и стадия (распространение) опухоли устанавливались согласно критериям международных протоколов:

- для ОС – ЕВРОАМОС (EuRAMOS1 Protocol, Version 1.0, 30 September 2004);
- для СЮ – ЕВРОЮИНГ (EURO-E.W.I.N.G.99 Protocol, Version 1999-09-27);
- для РМС, РМС-2005 (RMS 2005, EpSSG Protocol Final Version January 2005).

Выделение РНК и синтез кДНК

Образцы тканей были получены непосредственно после операции и заморожены в жидком азоте. Общую РНК выделяли с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen, xx, Germany) согласно инструкции производителя. Количественные показатели

Таблица 1
Характеристики пациентов

Характеристики (n=62)	Злокачественные опухоли				Незлокачественные образования (n=23) n (%)	Р
	всего (n=39) n (%)	СЮ (n=16) n (%)	ОС (n=16) n (%)	РМС (n=7) n (%)		
Мальчики	24 (61,5)	10 (62,5)	10 (62,5)	4 (57,1)	15 (65,2)	>0,05
Девочки	15 (38,5)	6 (37,5)	6 (37,5)	3 (42,9)	8 (34,8)	
Средний возраст, годы	12,5	12,4	13	11,9	12,4	
Медиана возраста, годы	13	12	14	15	14	>0,05
Стадия II	24 (61,5)*	11 (68,8)*	11 (68,8)*	2 (28,6)	—	<0,05*
Стадия III	2 (5,2)	—	—	2 (28,6)	—	

концентрации РНК оценивались посредством спектрофотометрии. Общую РНК (1,5 мкг) из опухолевой ткани конвертировали в первую цепь ДНК с использованием случайного праймера (0,3 мкг) и обратной транскриптазы (200 U) мышинового вируса лейкемии (Moloney murine leukemia virus, M-MLV; Promega, XX, USA).

Количественную обратнo-транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном режиме времени для генов VEGFA (включая изоформы VEGFA121, VEGFA165 и VEGFA189), VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 проводили с использованием коммерческих систем (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA) в соответствии с протоколом производителя на оборудовании Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA). Относительные величины мРНК генов в образцах рассчитаны по показателям стандартных кривых, полученных путем амплификации серийного разведения обратнo транскрибированной общей РНК. Значения исследованных показателей представлены в виде относительных величин. В качестве внутреннего контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета программы STATISTICA 6.0. Количественные данные представлены с определением медианы (Me [25; 75]), минимумов-максимумов; качественные данные выражены в абсолютных величинах и процентах. Проверка гипотез о равенстве двух средних проведена с помощью U-критерия Манна – Уитни или Фишера для количественных признаков. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни экспрессии исследованного спектра факторов ангиогенеза в ткани опухоли и ткани незлокачественных патологических очагов представлены в табл. 2.

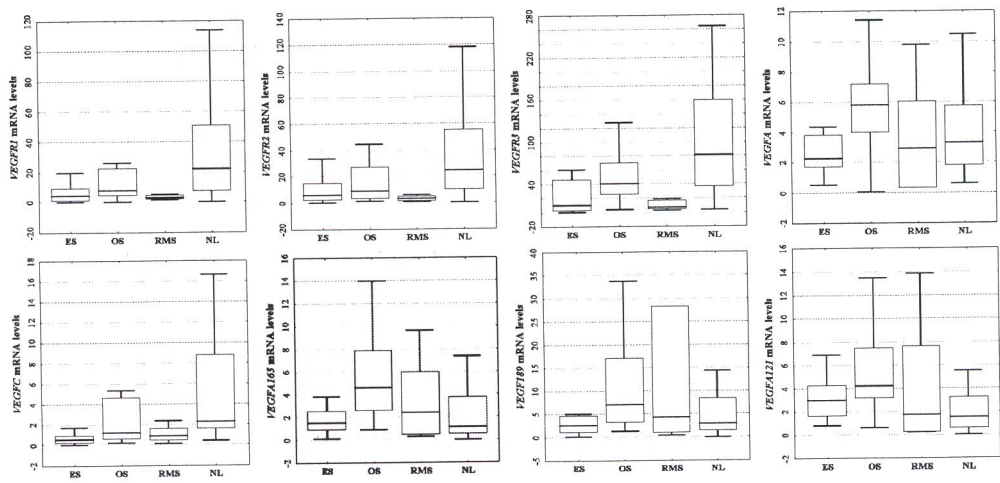
Анализируя данные, представленные в табл. 2, можно отметить, что уровни экспрессии большинства исследуемых маркеров в двух группах имели значительные отличия. Статистически значимо большая медиана экспрессии мРНК в незлокачественной ткани была отмечена для VEGFR-1 (21,865 против 4,937; $p=0,0009$), VEGFR-2 (24,488 против 5,794; $p=0,0011$), VEGFR-3 (81,181 против 18,574; $p=0,0004$) и VEGFC (2,244 против 0,782; $p=0,0006$). В то же время были определены факторы ангиогенеза, экспрессия которых была больше в опухолевых очагах: VEGFA121 (1,500 против 3,425; $p=0,0166$), VEGFA165 (1,124 против 2,516; $p=0,0228$) и соотношения VEGFA165/VEGFA189 (0,400 против 0,720; $p=0,0034$). Однако особый интерес представляет наличие выраженной корреляции значений экспрессии 2 изоформ: VEGFA165 и VEGFA189, зарегистрированной как в опухолевой ($R=0,8210$, $p=0,010$), так и в неопухолевой ($R=0,9110$, $p=0,013$) ткани.

Относительные уровни экспрессии мРНК генов факторов ангиогенеза в группах сарком разных типов в зависимости от нозологии процесса показаны на рисунке. Характеризуя представленные данные в группах пациентов с ОС, СЮ и РМС, можно говорить об общих тенденциях с объединенной группой пациентов с онкопатологией: более высокие показатели экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA 189, а также соотношения VEGFA165/VEGFA 189 и низкие (по сравнению с неопухолевыми очагами) уровни остальных факторов ангиогенеза. Надо сказать, что группа незлокачественных заболеваний в исследовании была достаточно гетерогенна и включала пациентов с заболеваниями, для которых рутинно осуществляется дифференциальная диагностика с онкологическим процессом: доброкачественные и воспалительные изменения костных и мягких тканей. Однако

Таблица 2
Уровни экспрессии факторов ангиогенеза в ткани опухоли и ткани незлокачественных патологических очагов

Факторы	Злокачественные опухоли (n=38) Медиана (25% – 75%) минимум – максимум	Незлокачественные образования (n=23) Медиана (25% – 75%), минимум – максимум	P
VEGFR-1	4,937 (2,312–9,167) 0,003–135,803	21,865 (7,368–50,569) 0,034–118,684	0,0009
VEGFR-2	5,794 (2,838–13,517) 0,009–44,589	24,488 (10,000–55,447) 0,000–193,158	0,0011
VEGFR-3	18,574 (6,274–47,085) 0,163–390,741	81,181 (36,866–159,734) 3,159–905,263	0,0004
VEGFA	4,007 (1,804–6,253) 0,032–113,095	3,311 (1,801–5,732) 0,620–24,959	0,9414
VEGFA121	3,425 (2,281–6,908) 0,215–20,390	1,500 (0,567–3,244) 0,015–81,642	0,0166
VEGFA165	2,516 (1,166–5,504) 0,126–127,451	1,124 (0,502–3,733) 0,017–7,360	0,0228
VEGFA189	4,195 (1,526–11,854) 0,087–297,059	2,859 (1,351–8,300) 0,026–79,208	0,4271
VEGFA165/ VEGFA 189	0,720 (0,562–0,933) 0,172–213,093	0,400 (0,282–0,539) 0,093–1,085	0,0034

в подгруппах не было отмечено значимой разницы в уровне экспрессии факторов ангиогенеза (данные не показаны).



Экспрессия иРНК генов факторов ангиогенеза в зависимости от нозологии онкологического процесса

Примечания:
* – p<0,05, характеризует разницу в экспрессии типа опухоли и неонкологических очагов;
ES – саркома Юинга;
OS – остеосаркома;
RMS – рабдомиосаркома;
NL – незлокачественное образование.

Для пациентов, у которых на момент постановки диагноза было констатировано наличие отдаленных метастазов (кости, костный мозг, легкие), только соотношение уровня экспрессии изоформ VEGFA165/VEGFA 189 было достоверно более низким по сравнению с локализованными формами онкопатологии, показатели составили 0,6765 против 0,8235 соответственно (при $p=0,0073$). Содержание мРНК для остальных компонентов значимо не отличалось.

Костные и мягкотканые саркомы представляют группу гетерогенных заболеваний мезенхимальной природы. Несмотря на существующие алгоритмы морфологической диагностики биопсийных препаратов при постановке онкологического диагноза, до настоящего времени остается актуальным вопрос: могут ли быть обнаружены какие-либо дополнительные маркеры, способствующие дифференцировке злокачественной и незлокачественной природы заболевания. Формирование опухолью патологической сосудистой сети происходит на фоне физиологического ангиогенеза, который особенно активен в детском растущем организме [1–4]. Не вызывает сомнения, что маркеры ангиогенеза, продуцируемые опухолевым субстратом, могут быть удобной мишенью для таргетной терапии, так же как и служить критериями для прогнозирования биологического поведения опухоли и клинического исхода заболевания. В настоящей работе мы исследовали уровни экспрессии мРНК фактора роста эпителия VEGFA (включая изоформы VEGFA121, VEGFA165 и VEGFA189) и соответствующих ингибиторов VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 у пациентов детского возраста с патологией костей и мягких тканей. Уровни экспрессии исследованных факторов у детей с онкопатологией сравнивались с результатами, полученными для контрольной когорты пациентов без злокачественного процесса. В настоящем исследовании отмечен статистически значимо более высокий уровень экспрессии некоторых изоформ VEGFA: VEGFA121, VEGFA165 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в тканях злокачественных опухолей. По известным нам данным, биологическая роль различных изоформ VEGFA остается не до конца определенной. VEGFA121 и VEGFA165 секретируются в эндотелиальных клетках и способствуют их активному митогенезу. Считается, что VEGFA165 более выгодна для опухоли, чем VEGFA189, хотя обе изоформы участвуют в локальном ангиогенезе. Отмечено, что при дефиците VEGFA165 компенсаторно повышается уровень VEGFA189, однако это не сопровождается усилением инвазии опухоли в костный мозг. Соотношение вне- и внутриклеточных изоформ VEGFA рассматривается рядом авторов как значимый биологический маркер, и в нашем исследовании мы увидели подтверждение этому [4, 7, 8]. Данные литературы свидетельствуют о повышенной экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 при остеосаркоме, почечно-клеточном раке, немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, саркоме Юинга, что ассоциировалось с ранней прогрессией опухоли и плохим прогнозом заболевания у пациентов зрелого возраста [9, 10]. По нашим данным, у детей со злокачественными саркомами уровень экспрессии этих маркеров был также значимо выше при сравнении с группой без онкопатологии, и наряду с этим соотношение VEGFA165/189 было меньше у пациентов с IV стадией заболевания в отличие от локализованных форм онкологического процесса ($p<0,05$). В целом полученные нами данные позволяют утверждать, что такие маркеры, как VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, показавшие больший уровень экспрессии мРНК при незлокачественной патологии по сравнению с опухолевой тканью, не могут ассоциироваться только с процессами опухолевого ангиогенеза. В то же время отличительными особенностями сарком костных и мягких тканей у детей являются уровни экспрессии VEGFA121, VEGFA165, соотношения VEGFA165/VEGFA 189. Причем низкий показатель соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA 189 статистически значимо отличает пациентов с распространенным онкологическим процессом от таковых с локализованными формами заболевания и может быть использован в качестве прогностического маркера тяжести протекания процесса у пациентов детского возраста с саркомами костей и мягких тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Petrovich S., Alejnikova O. (2004) Osobennosti zaboлеваemosti zlokachestvennymi novoobrazovaniyami detej pervogo goda zhizni v Respublike Belarus' [The incidence of malignant neoplasms in children of the first year of life in the Republic of Belarus]. *Mediko-biologicheskie aspekty avarii na Chernobyl'skoj AE'S*, vol. 1, pp. 3–11.
2. Rumyancev A., Karachunskij A., Rumyanceva Yu. (2009) Optimizaciya terapii ostrogo lejkoza u detej v Rossii [Optimizing therapy of acute leukemia in children in Russia]. *Pediatrica*, vol. 4, pp. 19–27.
3. Balasubramanian L., Evens A. (2006) Targeting angiogenesis for the treatment of sarcoma. *Curr Opin Oncol.*, vol. 18, pp. 354–359.
4. Altman D.G., Mcshane L.M., Sauerbrei W., Taube S.E. (2012) Reporting recommendations for tumormarker prognostic studies (REMARK): explanation and elaboration. *BMC Med.*, vol. 10, p. 51.
5. Adams R.H., Alitalo K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, vol. 8, pp. 464–468.
6. Atzori F., Tabernero J., Cervantes A., Prudkin L., Andreu J., Rodriguez- Braun E. (2011) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of dalotuzumab (MK-0646), an anti-insulin-like growth factor-1receptor monoclonal anti- body, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, pp. 6304–6312.
7. DuBois S., Marina N., Glade-Bender J. (2010) Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma. *Cancer*, vol. 1, pp. 749–757.
8. Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, vol. 9, pp. 669–676.
9. Kawai H., Minamiya Y., Ito M., Saito H., Ogawa J. (2008) VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*, vol. 59, pp. 41–47.

Поступила / Received: 14.03.2016

Контакты / Contacts: leonslight@mail.ru, t.savitskaia@mail.ru, aleinikova2004@mail.ru