

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОМАРКЕРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ И ОПУХОЛЕПОДОБНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ КОСТЕЙ

Пучиньян Д.М., Павленко Н.Н., Коршунов Г.В., Понамарев И.Р., Галашина Е.А.,
Гладкова Е.В.

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: puchinyan@mail.ru

У 64 пациентов с новообразованиями костной ткани (фиброзной дисплазией, костной кистой, гигантоклеточной опухолью, остеосаркомой, хондросаркомой, метастазами в кости, миеломной болезнью) были определены уровни неоптерина, растворимых межклеточных молекул адгезии I типа (sICAM-1), растворимых молекул адгезии сосудистого эндотелия I типа (sVCAM-1), васкулоэндотелиального фактора роста А (VEGF-A) в сыворотке крови иммуноферментным методом. Выявлена закономерность экспрессии неоптерина, sICAM, sVCAM и VEGF-A при доброкачественных и злокачественных новообразованиях костей: При доброкачественных опухолях костей повышенные уровни неоптерина и VEGF-A в сыворотке крови сопровождаются снижением содержания sVCAM при отсутствии сдвигов со стороны sICAM, при злокачественных – на фоне высокого уровня неоптерина, VEGF-A, sICAM отмечается значимое снижение концентрации sVCAM, при этом изменения содержания изучаемых цитокинов значимо более выражены, чем у больных с доброкачественным опухолевым процессом. Заключение. Эндотелиальная дисфункция является неотъемлемой частью патогенеза доброкачественных и злокачественных новообразований кости. Выявленная закономерность в изменении содержания изучаемых цитокинов представляет интерес для дифференцирования характера опухолевого процесса в костной ткани.

Ключевые слова: неоптерин, межклеточные молекулы адгезии I типа (sICAM-1), молекулы адгезии сосудистого эндотелия I типа (sVCAM-1), васкулоэндотелиальный фактор роста А (VEGF-A), эндотелиальная дисфункция, доброкачественные и злокачественные опухоли кости.

THE LEVELS OF SOME BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL FUNCTION OF BLOOD VESSELS IN PATIENTS WITH TUMORS AND TUMOR-LIKE BONE LESIONS

Puchinyan D.M., Pavlenko N.N., Korshunov G.V., Ponomarev I.R., Galashina E.A.,
Gladkova E.V.

Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery Saratov State Medical University. a. V.I. Razumovsky of the Ministry of Health of Russia, Saratov, e-mail: puchinyan@mail.ru

The levels of neopterin, sICAM-1, sVCAM-1 and VEGF-A in blood serum were determined by the immunoenzyme method in 64 patients with bone tissue neoplasms (fibrous dysplasia, osteocystoma, giant-cell tumor, osteosarcoma, chondrosarcoma, bone metastases, multiple myeloma). A consistent pattern of neopterin, sICAM, sVCAM and VEGF-A expression was found on the background of benign and malignant lesions. In case of benign lesions upregulated neopterin and VEGF-A in blood serum comes alongside with downregulation of sVCAM with sICAM level being steady. Malignant lesion cases demonstrate highly expressed neopterin, VEGF-A and sICAM accompanied by significant sVCAM downregulation, while changes in cytokine level are significantly more frank compared to those in patients with benign processes. Conclusion. Endothelial dysfunction is an inherent part of benign and malignant bone lesion pathogenesis. The revealed pattern in cytokine content changes might be useful for the issue of defining tumor process type in bone tissue.

Keywords: neopterin, intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), endothelial dysfunction, benign and malignant bone tumors.

В последнее время большое внимание уделяется изучению эндотелиальной дисфункции в патогенезе различных заболеваний [1], в том числе и онкологических [2, 3], что вполне обосновано, так как диффузно распределенная масса эндотелиальных клеток рассматривается как единый многофункциональный эндокринный орган [4, 5], основная задача которого связана с поддержанием гомеостаза. Будучи морфологическим субстратом

гистогематического барьера, эндотелиальные клетки являются важной частью иммунной системы, играя ключевую роль в иницировании и развитии защитных и повреждающих воспалительных реакций. Об этом, в первую очередь, свидетельствует поверхностная экспрессия эндотелиоцитами молекул адгезии, обеспечивающих специфическое взаимодействие с циркулирующими лейкоцитами [6, 7].

Состояние эндотелия оценивают по содержанию биомаркеров, имеющих непосредственное отношение к той или иной её функции. Так, о регуляции адгезии лейкоцитов судят по концентрации Р- и Е-селектина, молекул адгезии сосудистого эндотелия I типа (VCAM-1) и межклеточных молекул адгезии I типа (ICAM-1), о регуляции роста сосудов – по уровню фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), факторов роста фибробластов (FGFs) и других ростовых факторов [8]. Гипер- или гипопродукция этих биомаркеров свидетельствует о наличии эндотелиальной дисфункции.

Важность определения VEGF-A в нашем исследовании определена заинтересованностью данного цитокина в развитии неопластического процесса за счёт стимуляции опухолевого ангиогенеза и экспрессии механизма антиапоптоза опухолевых клеток [9, 10, 11], а неоптерина – в связи с тем, что этот птеридин рассматривается как интегральный показатель цитокинзависимой активации моноцитов/макрофагов и является неспецифическим маркером активации клеточного звена иммунитета [12]. Более того, уровень неоптерина в крови повышается по мере прогрессирования опухоли и её метастазирования [13, 14]. Участие неоптерина в опухолевой прогрессии объясняется его стимулирующим влиянием на продукцию ангиогенных факторов роста, атакжеспособностьюингибироватьсинтезоксидазотавэндотелиисосудов, что приводит к торможению процесса апоптоза опухолевых клеток [15].

Учитывая, что эндотелиальная дисфункция является неотъемлемой стороной патогенеза неопластического процесса, состояние эндотелиального барьера при онкологической патологии из теоретической плоскости переходит в практическую, связанную с выбором адекватной таргетной терапии, оценкой её эффективности и прогнозом течения заболевания. Вместе с тем вопрос поиска биомаркеров, позволяющих целенаправленно (и, возможно, персонализировано) определять лечебную тактику улучшения функционального состояния эндотелия у онкологических больных в зависимости от характера неопластического образования, остается актуальным.

Целью исследования является изучение содержания биомаркеров, отражающих эндотелиальную функцию сосудов, в зависимости от вида и характера костных опухолей.

Материал и методы. Обследовано 64 пациента (31 мужчина и 33 женщины) с новообразованиями костной ткани (с костной кистой – 28, фиброзной дисплазией – 9,

гигантоклеточной опухолью – 7, остеосаркомой – 4, хондросаркомой – 6, метастазами в кость – 6, миеломной болезнью – 4), находившихся на стационарном лечении в Саратовском НИИ травматологии и ортопедии в период с 2013 по 2016 г.

Критериями включения больных в исследование было наличие гистологически верифицированных доброкачественных и злокачественных новообразований кости, отсутствие других хронических заболеваний или их наличие в стадии ремиссии, возраст пациентов от 14 до 65 лет; критериями исключения – отказ от участия в исследовании, наличие хронических заболеваний в стадии обострения. В контрольную группу вошли 10 практически здоровых лиц в возрасте 24–60 лет (6 мужчин и 4 женщины).

Забор крови для исследования проводили в день поступления больного в институт. Полученную сыворотку крови хранили в морозильнике при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Концентрацию биомаркеров в ней определяли иммуноферментным методом с использованием ридера «ANTOS 2020» (Австрия) и иммуноферментных наборов для количественного определения неоптерина (кат. № RE59321) фирмы «IBLHamburg» (Германия), растворимых межклеточных молекул адгезии I типа – sICAM-1 (кат. № BMS201), растворимых молекул адгезии сосудистого эндотелия I типа – sVCAM-1 (кат. № BMS232) фирмы «BenderMedSystems» (Австрия), васкулоэндотелиального фактора роста А «HumanVEGF-APlatinumELISA» (кат. № BMS277/2).

Статистическая обработка результатов исследования проведена с применением пакета прикладных программ Statistica (версия 12) фирмы StatSoft@ Inc., USA. После проверки вариационных рядов на нормальность распределения методом Шапиро – Уилка наличие различий между ними определяли с помощью t-теста для 2-х независимых выборок с вычислением средней арифметической (M), её среднеквадратичного отклонения ($\pm\text{SD}$) и t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при показателе вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты. Доброкачественные новообразования кости (костная киста, фиброзная дисплазия, гигантоклеточная опухоль) демонстрируют однотипные сдвиги в изучаемом цитокиновом профиле. Так, усиление ангиогенеза, подтвержденное повышенным содержанием фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A ($P < 0,001$ при всех нозологиях), и активация клеточного звена иммунитета, установленная по увеличенному уровню неоптерина ($P < 0,001$, $P < 0,05$, $P < 0,05$, соответственно перечисленным доброкачественным новообразованиям), не сопровождаются значимыми изменениями концентраций растворимых молекул адгезии sICAM и sVCAM (табл.1).

Аналогичные изменения в содержании неоптерина ($P < 0,05$) и фактора роста эндотелия сосудов ($P < 0,001$) отмечены у пациентов с остеосаркомой. Более выраженные сдвиги выявлены у больных с такими злокачественными поражениями костей, как

хондросаркома, метастазы опухолей в кость и миеломная болезнь. При хондросаркоме, наряду с повышенными уровнями неоптерина ($P<0,01$) и VEGF-A ($P<0,05$) в сыворотке крови, отмечается значимое снижение содержания молекул адгезии сосудистого эндотелия VCAM-1 ($P<0,01$). Метастазы опухолей в кость и миеломная болезнь сопровождаются однотипной картиной изучаемого цитокинового профиля: на фоне значимого увеличения уровней неоптерина ($P<0,01$ и $P<0,01$, соответственно), VEGF-A ($P<0,01$ и $P<0,001$, соответственно) и межклеточных молекул адгезии sICAM ($P<0,001$ и $P<0,01$, соответственно) наблюдается выраженное снижение sVCAM ($P<0,01$ и $P<0,001$, соответственно).

Таблица 1

Содержание неоптерина, sICAM, sVCAM и VEGF-A у больных с различными видами опухолей и опухолевидными образованиями кости

Группы больных		Цитокины (M±SD)			
		неоптерин, нмоль/л	sICAM, нг/мл	sVCAM, нг/мл	VEGF-A, пг/мл
Контрольная группа (n=10)		6,3±3,8	189,7±44,5	849,5±189,4	77,0±29,9
По видам опухолей костей	Костная киста (n=28)	13,3±5,6***	199,9±42,2	751,2±181,7	269,2±126,4***
	Фиброзная дисплазия (n=9)	12,2±6,6*	164,4±45,7	748,7±145,2	255,3±123,9***
	Гиганто- клеточная опухоль (n=7)	14,2±7,7*	187,8±46,5	741,6±198,2	286,1±81,4***
	Остеосаркома (n=4)	14,2±6,32*	225,3±26,4	702,2±154,7	189,7±83,5*
	Хондросаркома (n=6)	18,1±8,1**	226,2±27,9	648,0±49,9**	409,0±283,1*
	Метастазы в кость (n=6)	18,5±8,7**	276,3±39,0***	635,0±140,6*	431,6±290,6**
	Миеломная болезнь (n=4)	18,8±8,1**	295,2±63,1**	581,5±91,7**	414,6±63,1***

Примечание: значимая разница между группой больных и контрольной группой (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$).

Таким образом, недостаточное количество наблюдений, особенно среди больных злокачественными новообразованиями костей, исключает возможность рекомендации по использованию полученных данных для проведения дифференциальной диагностики изучаемых нозологических форм. В то же время анализ результатов позволил выявить закономерности в количественных изменениях компонентов этого цитокинового комплекса, что внушает уверенность в полезности его изучения для дифференциации доброкачественности и злокачественности неопластического процесса в костной ткани. В связи с этим нами проведена статистическая обработка численного материала,

представленного вариационными рядами доброкачественных и злокачественных опухолей костей (табл. 2).

Таблица 2

Содержание неоптерина, sICAM, sVCAM и VEGF-A у больных с различным характером неопластического процесса кости

Группы больных	Цитокины (M±SD)			
	неоптерин, нмоль/л	sICAM, нг/мл	sVCAM, нг/мл	VEGF-A, пг/мл
Контрольная группа (n=10)	6,3±3,8	189,7±44,5	849,5±189,4	77,0±29,9
Группа пациентов с доброкачественными новообразованиями кости (n=44)	13,2±6,0	190,9±44,8	749,2±173,8	275,1±118,0
P ₁	<0,001	>0,05	<0,05	<0,001
Группа пациентов со злокачественными новообразованиями кости (n=20)	17,8±7,3	254,8±47,7	641,6±111,9	373,0±232,3
P ₁	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P ₂	<0,05	<0,001	<0,01	<0,05

Примечание: P₁ – значимая разница по сравнению с данными контрольной группы; P₂ – значимая разница между группами пациентов.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, в группе пациентов с доброкачественными новообразованиями костной ткани отмечаются изменения в изучаемом цитокиновом профиле, характеризующиеся увеличением содержания неоптерина (P<0,001) и фактора роста эндотелия сосудов (P<0,05), снижением уровня вазоэндотелиальных молекул адгезии (P<0,001). У пациентов со злокачественными опухолями кости на фоне высоких значений неоптерина (P<0,001), фактора роста эндотелия сосудов (P<0,001), межклеточных молекул адгезии (P<0,001) наблюдаются низкие показатели содержания молекул адгезии сосудистого эндотелия (P<0,001). Следует отметить, что при злокачественных опухолях костной ткани наблюдаемые сдвиги более выражены, чем при доброкачественных.

Обсуждение. У больных с доброкачественными новообразованиями костной ткани о прогрессировании опухолевого образования говорит фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A, увеличение уровня которого способствует ангиогенезу и улучшению питания опухолевых клеток. В то же время выявленный диссонанс между высоким уровнем неоптерина в сыворотке крови и нормальными величинами содержания sICAM и sVCAM позволяет предположить, что данная ситуация отражает адекватность реагирования системы иммунитета на наличие патологического очага усилением активности макрофагально-моноцитарной системы крови; при этом эндотелий сохраняет свои барьерные функции.

Можно предположить, что такой вариант функционирования клеточного иммунитета обеспечивает контроль опухолевого процесса, ограничивая его локальным развитием. Однако в нашем исследовании у больных остеосаркомой цитокиновые регуляторы клеточного звена иммунитета демонстрируют подобную картину, хотя четко прослеживается тенденция к увеличению уровня sICAM и снижению концентрации sVCAM. Вероятно, причиной получения данного результата является малое количество наблюдений. В случаях с поражениями кости хондросаркомой, метастазами в кость опухолей других органов и миеломной болезнью явно прослеживается вовлеченность эндотелия в патогенез опухолевого процесса, особенно это наглядно видно у пациентов с метастазами в кость и миеломной болезнью, когда на фоне высокого содержания неоптерина и VEGF-A появляются «ножницы» между ростом уровня sICAM и падением концентрации sVCAM. Создается впечатление, что драматизм ситуации распространился и на эндотелий, в результате чего создались благоприятные условия для транспозиции опухолевых клеток через эндотелиальный барьер в кровь и затем в интактные органы. Произошла генерализация патологического процесса, чему способствовали, с одной стороны, повышенная межклеточная адгезия фагоцитирующих мононуклеаров, существенно снижающая, если не сказать, исключая их функциональную активность, а с другой – дисфункция эндотелиальной выстилки, сопровождающаяся нарушением барьерной функции, одной из причин которой может быть снижение адгезивной привлекательности эндотелия для иммунокомпетентных клеток.

Анализ результатов исследования содержания цитокинов, принимающих участие в регуляции макрофагально-моноцитраного звена иммунитета, показал, что у пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями костей выраженность количественных изменений компонентов, входящих в изучаемый цитокиновый комплекс, подчиняется определенной закономерности и отражает характер неопластического процесса в костной ткани. Не исключено, что дальнейшие исследования позволят включить данные тесты в дифференциальную дооперационную диагностику злокачественных и доброкачественных опухолей, в частности костей. Однако уже сейчас следует констатировать, что динамическое исследование изучаемых цитокинов может быть полезным для оценки прогрессирования заболевания и эффективности проводимого лечения.

Выводы

1. Дисфункция эндотелия сосудов является неотъемлемой частью патогенеза доброкачественных и злокачественных новообразований кости.
2. Выявлена закономерность экспрессии неоптерина, молекул адгезии лейкоцитов и фактора роста эндотелия сосудов-A при доброкачественных и злокачественных

новообразованиях костей, что позволяет расширить представления о роли эндотелиальной дисфункции в патогенезе неопластического процесса при доброкачественном и злокачественном его течении. Доброкачественный процесс сопровождается повышенными уровнями неоптерина и VEGF-A, снижением содержания sVCAM при отсутствии сдвигов со стороны sICAM, злокачественный – более выраженными количественными изменениями в цитокиновом профиле: на фоне высоких величин содержания в сыворотке крови неоптерина, VEGF-A, sICAM отмечается значимое снижение концентрации sVCAM.

Список литературы

1. Васин Л.В. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры / Л.В. Васин, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т.16, № 1 (61). – С. 4-12.
2. Дисфункции эндотелия при новообразованиях опорно-двигательной системы / Г.В. Коршунов [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – № 4 (68). – С. 43-47.
3. Cedervall J. Tumor-Induced Local and Systemic Impact on Blood Vessel Function / J. Cedervall, A. Dimberg, A.K. Olsson // Mediators Inflamm. 2015. Vol. 2015.
4. Физиологические функции сосудистого эндотелия /А.Х. Каде [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11-3. – С.611-617.
5. Wnuczko K., Szczepański M. Endothelium – characteristics and functions // Pol. Merkur. Lekarski. 2007. Vol. 23. № 133. P.60-65.
6. Lyck R., Enzmann G. The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues // Curr. Opin. Hematol. 2015. Vol. 22. № 1. P.53-59.
7. Muller W.A. Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective // Immunol Rev. 2016. Vol. 273. № 1. P. 61-75.
8. Жаринова В.Ю. Эндотелиальная дисфункция как мультидисциплинарная проблема/ В.Ю. Жаринова // Кровообращение и гемостаз. – 2015. – № 1-2. – С. 9-15.
9. Liang Y., Brekken R.A., Hyder S.M. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones // Endocr. Relat. Cancer. 2006. Vol. 13. № 3. P. 905-919.
10. Sharma B.K., Srinivasan R., Chawla Y.K., Chakraborti A. Vascular endothelial growth factor: Evidence for autocrine signaling in hepatocellular carcinoma cell lines affecting invasion // Indian J. Cancer. 2016. Vol. 53. № 4. P.542-547.

11. Liu Y., Zhang F., Zhang Z., Wang D., Cui B., Zeng F., Huang L., Zhang Q., Sun Q. High expression levels of Cyr61 and VEGF are associated with poor prognosis in osteosarcoma // *Pathol. Res. Pract.* 2017. Vol.213. № 8. P.895-899.
12. Свиридов Е.А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете / Е.А. Свиридов, Т.А. Телегина // *Успехи совр. химии.* – 2005. – Т. 45. – С. 355-390.
13. Sucher R., Schroecksadel K., Weiss G., Margreiter R., Fuchs D., Brandacher G. Neopterin, a prognostic marker in human malignancies // *Cancer Lett.* 2010. Vol. 287. № 1. P.13-22.
14. Pickert G., Lim H.Y., Weigert A., Häussler A., Myrczek T., Waldner M., Labocha S., Ferreirós N., Geisslinger G., Lötsch J., Becker C., Brüne B., Tegeder I. Inhibition of GTP cyclohydrolase attenuates tumor growth by reducing angiogenesis and M2-like polarization of tumor associated macrophages // *Int. J. Cancer.* 2013. Vol. 132. № 3. P.591-604.
15. Rieder J., Lirk P., Hoffmann G. Neopterin as a potential modulator of tumor cell growth and proliferation // *Med. Hypotheses.* 2003. Vol. 60. № 4. P.531-534.