

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МЕДИЦИНЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

**МЕРКУРЬЕВА
ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА**

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИНГИБИТОРА
АНГИОГЕНЕЗА ЭНДОСТАТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ
ПЕРВИЧНЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН Кушлинский Н.Е.

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ЭНДОСТАТИН – ИНГИБИТОР ОПУХОЛЕВОГО АНГИОГЕНЕЗА (обзор литературы)	12
1.1. Роль ангиогенеза в процессе опухолевого роста и метастазирования	12
1.2. Структура эндостатина и механизмы его антиангиогенной активности	16
1.3. Эндостатин – потенциальный маркер при онкологических заболеваниях...21	21
1.4. Эпидемиологические и клинические особенности опухолей костей.....	26
1.5. Регуляторы ангиогенеза костной ткани.....	30
1.6. Эндостатин в составе антиангиогенной терапии.....	35
Резюме	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Характеристика пациентов и группы контроля.....	42
2.2. Дизайн исследования	49
2.3. Лабораторные методы исследования.....	51
2.4. Статистическая обработка данных.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
3.1. Содержание эндостатина в сыворотке крови больных первичными новообразованиями костей.....	57
3.2. Сывороточные уровни эндостатина в группах пациентов с различными клиничко-морфологическими характеристиками опухоли	62
3.3. Оценка связи сывороточных концентраций эндостатина с клиничко-морфологическими параметрами и проангиогенными факторами.....	73
3.4. Сравнительный анализ клинической информативности эндостатина и активаторов ангиогенеза.....	81
3.5. Концентрация эндостатина в сыворотке крови как предиктор выживаемости пациентов с опухолями костей	87
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	99
ВЫВОДЫ	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	107
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одной из актуальных проблем современной лабораторной медицины и онкологии является поиск новых диагностических и прогностических сывороточных маркеров, которые могут быть использованы для уточнения диагноза, оценки прогноза выживаемости и стратификации риска метастазирования опухоли. Регуляторы опухолевого ангиогенеза представляют собой перспективную группу биологических маркеров, которые активно исследуются при различных новообразованиях, в том числе при опухолях костей [58, 100, 101, 167].

Первичные опухоли костей – достаточно редкая патология [3]. Их особенностями являются раннее развитие отдаленных метастазов, необходимость радикальной резекции опухоли, резистентность к химиотерапии, неблагоприятный прогноз выживаемости, подъем заболеваемости в детском и подростковом возрасте [91]. Эти факторы повышают медико-социальную значимость ранней диагностики и стратификации риска у пациентов с помощью новых лабораторных маркеров, которые позволяют выбрать индивидуальную тактику лечения и тем самым повысить качество медицинской помощи.

Ангиогенез имеет решающее значение для опухолевого роста и метастазирования, поскольку пролиферация и миграция эндотелиальных клеток приводит к образованию новых сосудов, которые обеспечивают опухолевые клетки кислородом и питанием, тем самым способствуют распространению злокачественного процесса [94]. В настоящее время в практической онкологии большой интерес представляет ряд новых сывороточных маркеров, которые регулируют васкуляризацию опухоли и являются перспективными мишенями для неинвазивной диагностики и таргетной терапии. К ним относятся не только активаторы ангиогенеза (фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, инсулиноподобные факторы роста и др.), но и антиангиогенные факторы, подавляющие рост новых сосудов, одним из которых является

эндостатин [115, 124].

Эндостатин – ингибитор эндогенного опухолевого ангиогенеза, полипептид из 183 аминокислот, образующийся в результате протеолиза коллагена XVIII типа [176]. Выявлены различные механизмы противоопухолевой активности эндостатина: он не только снижает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, но и участвует в регуляции клеточного цикла, стимулирует апоптоз, подавляет сигнальные пути, которые важны для клеточной пролиферации и дифференцировки [62, 70, 77, 126]. Эти многочисленные эффекты эндостатина подчеркивают его существенную роль в поддержании ангиогенного баланса и позволяют рассматривать в качестве предиктора метастазирования опухоли и выживаемости онкологических пациентов, а также в качестве компонента антиангиогенной терапии. В настоящее время ведутся активные разработки новых лекарственных препаратов на основе рекомбинантного эндостатина, которые могут способствовать более широкому применению этого ингибитора ангиогенеза в клинической онкологии [134, 139, 153].

Ряд работ российских и зарубежных авторов посвящен оценке диагностической и прогностической значимости регуляторов ангиогенеза при опухолях различных локализаций, в том числе при поражении костей [6, 86, 178]. Однако имеющиеся сегодня в научных публикациях сведения о сывороточных концентрациях эндостатина у пациентов с опухолями костей и их корреляциях с клиническими, лабораторными и морфологическими параметрами опухоли довольно противоречивы. На данный момент недостаточно изучено влияние сывороточного эндостатина на отдаленные результаты лечения больных опухолями костей. В литературе практически не освещен вопрос о прогностическом потенциале этого маркера, не проводился сравнительный анализ эндостатина с другими ангиогенными факторами.

Решение указанных вопросов позволит оценить клинико-лабораторное значение определения сывороточного уровня эндостатина у пациентов с первичными опухолями костей, а также перспективы его применения в качестве биомаркера в практической онкоортопедии.

Степень разработанности темы исследования

На протяжении нескольких последних десятилетий проводятся многочисленные исследования регуляторов ангиогенеза, их прогностического и терапевтического потенциала при онкологических заболеваниях. После того, как в 1971 году J. Folkman сформулировал концепцию антиангиогенеза и его роли в процессе подавления опухолевого роста, наряду с достаточно изученными ростовыми факторами (VEGF, IGF, FGF) внимание исследователей стали привлекать и их антагонисты, в том числе ингибитор ангиогенеза эндостатин, выделенный O'Reilly M.S и соавт. из гемангиоэндотелиомы мыши в 1997 году [30]. За прошедшие годы были описаны множественные пути влияния эндостатина на эндотелиальные клетки, что позволило понять молекулярные механизмы его антиангиогенного воздействия [69].

Проведены экспериментальные исследования на моделях животных и клеточных культурах, которые подтвердили высокую эффективность антиангиогенной терапии с использованием эндостатина [129, 154]. Человеческий рекомбинантный эндостатин продемонстрировал высокую клиническую эффективность в составе комплексной противоопухолевой терапии и одобрен в некоторых странах для лечения ряда онкологических заболеваний [66,80].

В нескольких работах были обнаружены более высокие концентрации эндостатина в сыворотке крови при различных злокачественных новообразованиях, таких как рак молочной железы, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточная карцинома, саркомы мягких тканей, рак желудка, назофарингеальная карцинома гепатоцеллюлярный рак [28, 35, 51, 63, 66]. В литературе представлены также единичные исследования эндостатина в сыворотке крови больных новообразованиями костей [20, 49, 171], которые в недостаточной степени раскрывают роль эндостатина как диагностического и прогностического маркера при данной патологии. В связи с чем необходимо дальнейшее изучение этих вопросов в рамках данного диссертационного исследования.

Цель исследования

Оценить клинико-лабораторное значение сывороточного уровня эндостатина и перспективы его применения в качестве предиктора прогноза общей и безметастатической выживаемости пациентов с первичными опухолями костей.

Задачи исследования

1. Определить содержание эндостатина в сыворотке крови больных первичными злокачественными и промежуточными опухолями костей до проведения специфического противоопухолевого лечения и сравнить с концентрацией эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров.

2. Проанализировать сывороточные уровни эндостатина в группах пациентов, выделенных с учетом клинико-морфологических характеристик новообразований костей.

3. Сравнить показатели клинической информативности эндостатина и других регуляторов ангиогенеза.

4. Оценить влияние исходного сывороточного уровня эндостатина на показатели общей и безметастатической выживаемости больных первичными опухолями костей.

Научная новизна

Впервые у пациентов с первичными опухолями костей измерены сывороточные уровни ингибитора ангиогенеза эндостатина в комплексе с другими ангиогенными факторами (VEGF, VEGF-R1, VEGFR-2, IGF-1, IGF-2) с учетом основных клинических параметров и морфологического варианта опухоли. Выявлены прямые корреляционные связи между содержанием эндостатина, IGF-2, VEGF-R1 и VEGF-R2 в сыворотке крови пациентов, а также зависимость сывороточного уровня эндостатина от возраста, размера опухоли и стадии опухолевого процесса.

Впервые определены показатели клинической информативности эндостатина и других факторов ангиогенеза (чувствительность, специфичность, пороговый уровень), дана их сравнительная характеристика.

Проанализированы отдаленные результаты лечения больных саркомами костей с учетом исходного сывороточного уровня эндостатина до начала противоопухолевого лечения. Доказано, что пациенты с повышенным уровнем эндостатина (более 140,5 нг/мл) имеют статистически значимо сниженные показатели общей выживаемости. Разработана прогностическая модель для расчета индивидуального прогноза выживаемости пациентов на основе исходного сывороточного уровня эндостатина.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате работы получены новые теоретические данные, подтверждающие гипотезу выработки эндостатина эндотелиальными клетками по механизму отрицательной обратной связи с целью компенсации патологического неоангиогенеза. На основании изучения роли эндостатина в поддержании ангиогенного баланса можно сделать теоретический вывод о том, что у больных опухолями костей сывороточные уровни ингибитора ангиогенеза эндостатина и факторов роста изменяются в одном направлении – статистически значимо повышаются по сравнению с контрольной группой несмотря на то, что они оказывают противоположный эффект на эндотелий сосудов опухоли. При этом повышение концентраций проангиогенных факторов более значительно по сравнению с повышением концентрации эндостатина, что свидетельствует о смещении ангиогенного баланса в сторону активации ангиогенеза.

Выявленные пороговые значения эндостатина позволяют усовершенствовать алгоритм комплексного клинико-лабораторного обследования пациентов с опухолями костей. Разработанная прогностическая модель для расчета прогноза выживаемости пациентов с учетом исходного сывороточного уровня эндостатина до начала лечения обуславливает целесообразность определения этого маркера в сыворотке больных и его практическое использование в качестве предиктора при стратификации риска у пациентов с первичными опухолями костей. Предложена шкала оценки риска смерти через определенные временные интервалы на основании исходного сывороточного уровня эндостатина, которая может быть использована для выделения группы

высокого риска и оптимизации тактики лечения.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование в соответствии со своим дизайном представляет собой наблюдательное (обсервационное) аналитическое исследование. Методология исследования базировалась на определении сывороточного уровня эндостатина в исследуемой и контрольной группе с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа и последующей сравнительной оценке полученных данных с учетом клинико-морфологических характеристик заболевания.

Для решения поставленных задач применялись следующие методы: клинический (анализ медицинской документации, в т.ч. результатов морфологических исследований), лабораторные (иммуноферментное определение сывороточных уровней эндостатина, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-1, IGF-2), методы статистического анализа (описательная статистика, ROC-анализ, корреляционный и регрессионный анализ, анализ выживаемости и построение прогностических моделей).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Содержание ингибитора ангиогенеза эндостатина в сыворотке крови больных первичными опухолями костей статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых доноров.

2. Сывороточный уровень эндостатина зависит от возраста пациента, размера опухоли и стадии опухолевого процесса и не зависит от типа пораженной кости, морфологического варианта и локализации опухоли, степени дифференцировки и наличия отдаленных метастазов.

3. Повышенный сывороточный уровень эндостатина статистически значимо ассоциирован с неблагоприятным прогнозом выживаемости больных злокачественными новообразованиями костей. Разработана модель для оценки прогноза общей выживаемости больных саркомаами костей с учетом исходного содержания эндостатина в сыворотке крови.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность результатов диссертационной работы основана на математическом расчете достаточного объема репрезентативной выборки для исследуемой и контрольной группы, строгом соответствии запланированному дизайну исследования и использовании современных лабораторных, клинических и статистических методов. Глубокий анализ отечественных и зарубежных публикаций по теме исследования позволяет интерпретировать результаты работы в контексте современных научных взглядов и теоретических концепций.

Апробация диссертационной работы

Материалы диссертации представлены на VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2021), XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2022), VIII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2022), VIII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2022), XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической медицины» (Москва, 2023), V Юбилейном Международном Форуме онкологии и радиотерапии ForLife (Москва, 2023), V Всероссийской конференции «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Республика Алтай, с. Майма, 2023), IX Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2023), Форуме университетской науки (Москва, 2024).

Внедрение результатов работы в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в диагностический процесс централизованного научно-клинического лабораторного отдела консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материалы диссертации используются на курсах повышения квалификации, проводимых кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики научно-образовательного института непрерывного профессионального образования имени Н.Д. Ющука ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы, постановке целей и задач, разработке дизайна исследования, сборе биологического материала и лабораторном определении факторов ангиогенеза в образцах сыворотки пациентов и здоровых доноров. Диссертантом лично проведен поиск отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации, выполнен систематический обзор и метаанализ литературных данных. На основании ретроспективного анализа первичной медицинской документации и проведенных лабораторных исследований сформирована база данных с результатами диссертационной работы. Автором самостоятельно выполнена статистическая обработка данных, графическое представление и интерпретация результатов исследования, подготовлены рукописи публикаций и доклады на научно-практических конференциях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика по направлению исследования согласно пунктам:

- 1) определение качественных и количественных характеристик химических параметров биологических материалов;
- 2) определение диагностической информативности лабораторных тестов;
- 3) клинико-лабораторные методы исследования для определения тяжести, периода и срока болезни, прогноза.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 41 рисунком и 21 таблицей. Список литературы включает 180 публикации, из них 21 – отечественных авторов и 159 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ЭНДОСТАТИН – ИНГИБИТОР ОПУХОЛЕВОГО АНГИОГЕНЕЗА (обзор литературы)

1.1. Роль ангиогенеза в процессе опухолевого роста и метастазирования

Под термином «ангиогенез» понимают формирование новых кровеносных сосудов из уже существующих. Впервые данный процесс описал британский хирург John Hunter в конце XVIII века [114]. Затем этот термин получил широкое распространение в научных работах по эмбриологии, поскольку физиологический ангиогенез обеспечивает эмбриональное развитие, нормальный рост, заживление ран и восстановление тканей [120]. Однако в ряде случаев неоваскуляризация может быть патологической: при диабетической ретинопатии, псориазе, ревматоидном артрите, опухолевом росте и метастазировании [93, 152].

Ангиогенез в нормальной ткани включает дифференцировку эндотелиальных клеток из ангиобластов, их пролиферацию, формирование новых капиллярных трубок, разветвление и создание анастомозов, ремоделирование и формирование зрелого сосудистого сплетения [101].

Опухолевые клетки характеризуются быстрой пролиферацией, активным метаболизмом, большей потребностью в кислороде и питательных веществах по сравнению с нормальными клетками [30]. Способность индуцировать ангиогенез или иным образом получать доступ к кровоснабжению с целью инвазии и метастазирования является одним из отличительных признаков опухолевых клеток [94]. Опухоль может получать кислород и питательные вещества, используя уже существующие кровеносные сосуды, либо стимулируя неоваскуляризацию одним из трёх способов: прорастанием новых сосудов из уже имеющихся (неоангиогенез), формированием новых сосудов из клеток-предшественников гемопоэза (васкулогенез), инвагинацией сосудистой стенки и разделением одного сосуда на два (интуссусцептивный ангиогенез) [19, 120]. Ранее считалось, что васкулогенез происходит только на ранних стадиях эмбриогенеза, а ангиогенез имеет место и в постнатальном периоде, но современные исследования показали, что ангиобласты могут включаться в

существовавшие ранее кровеносные сосуды и васкулогенез может способствовать неоваскуляризации опухоли [156]. Ещё одним способом формирования кровеносных сосудов в опухоли является васкулогенная мимикрия – способность опухолевых клеток к образованию трубчатых структур, в просвете которых находятся эритроциты [169].

Опухолевый неоангиогенез – комплексный и сложно регулируемый процесс, который протекает в несколько последовательных этапов [165]. На первой стадии начинается активация перицитов и их миграция от базальной мембраны капилляров, ослабление межклеточных контактов, диссоциация перицитов и эндотелия. Затем происходит секреция различных протеаз, расщепляющих внеклеточный матрикс, что приводит к высвобождению про- и антиангиогенных полипептидов. Далее следует миграция и пролиферация эндотелиальных клеток, образование трубочко-подобных структур и анастомозов с ближайшими кровеносными сосудами. Таким образом формируется сосудистая сеть, по которой начинается кровоток [10, 19]. Однако, вследствие постоянной передачи проангиогенных сигналов она является недостаточно зрелой и имеет ряд специфических свойств.

К морфо-функциональным особенностям опухолевых кровеносных сосудов относятся следующие: отсутствует деление на артериолы, капилляры и вены, калибр сосудов является неоднородным, а кровоток в такой сосудистой сети хаотичным [39, 116]. Возникают участки персистирующей и интермиттирующей гипоксии [40]. Такая аномальная сосудистая сеть способствует резистентности к химиотерапии, ограничивая доставку лекарственных препаратов к опухолевым клеткам [116].

Опухолевые и эндотелиальные клетки оказывают взаимное влияние друг на друга. Опухолевые клетки способствуют увеличению пролиферации эндотелиальных клеток, которые, в свою очередь, могут оказывать косвенное влияние на скорость роста опухоли. В микроокружении опухоли также присутствуют различные воспалительные клетки, такие как опухоль-ассоциированные макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и

дендритные клетки [144]. Опухоль-ассоциированные макрофаги секретируют цитокины и факторы роста, которые индуцируют рост опухоли, ее инвазивную и метастатическую активность. Нейтрофилы и тучные клетки выделяют стимуляторы ангиогенеза и ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс [180].

На молекулярном уровне формирование новых кровеносных сосудов регулируется балансом между про- и антиангиогенными факторами. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), индуцируемый гипоксией фактор (HIF) являются активаторами ангиогенеза. К ингибиторам относятся эндостатин, ангиостатин, тромбоспондин, интерфероны α и β [173]. В нормальных тканях между ними поддерживается равновесие и ангиогенез не активируется вследствие подавляющего влияния эндогенных ингибиторов. Внезапное смещение равновесия в сторону проангиогенных факторов, называемое ангиогенным переключением, приводит к индукции ангиогенеза и росту новых капилляров в обычно покоящейся сосудистой системе [162].

Переключение на ангиогенный фенотип имеет аваскулярную фазу, характеризующуюся дремлющей опухолью, и сосудистую фазу, в которой происходит экспоненциальный рост опухоли. В аваскулярной фазе опухолевые клетки пролиферируют, но скорость их гибели (апоптоза) уравнивает эту пролиферацию и поддерживает опухолевую массу в стабильном состоянии [162]. На важность этого переключения указывает высокая частота обнаружения микроскопических опухолей при вскрытии людей, у которых никогда при жизни не был диагностирован рак и которые умерли в результате иных причин [111].

Ключевую роль в активации опухолевого ангиогенеза играет фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Он представляет собой димерный белок массой 40–45 кДа, который был открыт в 1983 году [168]. В 1989 году впервые была установлена его роль в процессе ангиогенеза [87, 172]. Семейство факторов роста эндотелия сосудов состоит из пяти ростовых факторов,

обозначаемых соответственно VEGF-A, VEGF -B, VEGF -C, VEGF -D, VEGF -E, а также плацентарного фактора роста (placental growth factor, PIGF) [7].

Семейство FGF содержит более 20 ангиогенных факторов роста, среди которых первым был выявлен основной фактор роста фибробластов (FGF basic, или FGF-2) [96]. Все представители данного семейства в отличии от большинства факторов роста лишены цитоплазматических последовательностей для внеклеточного экспорта и используют альтернативные пути транспорта из клетки [54]. Белки семейства FGF обладают высоким сродством к гепарансульфат-протеогликанам, расположенным на поверхности клеток и внутри внеклеточного матрикса, и осуществляют свое биологическое действие путем передачи сигналов через рецепторы (FGFR1-4), которые экспрессируются на клеточной мембране [25, 102]. Роль сигнального пути FGF-FGFR в онкогенезе заключается в стимулировании пролиферации, выживания, миграции и инвазии опухолевых клеток, активации ангиогенеза и уклонения от иммунного ответа [102, 109].

Система инсулиноподобного фактора роста (IGF) включает два ростовых фактора (IGF-1 и IGF-2), их рецепторы (IGF1R и IGF2R) и семь белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBP). Циркулирующий IGF-1 высвобождается преимущественно в ответ на стимуляцию гормоном роста и способствует клеточному росту и пролиферации, а также повышает уровень глюкозы в крови и играет активную роль в стимулировании ангиогенеза [104, 163].

Основополагающие работы по изучению активаторов и ингибиторов ангиогенеза были опубликованы в 60-70-х годах прошлого века. Так, J. Folkman ввел понятие «опухолевого антиангиогенеза» для обозначения способа предотвращения проникновения новых сосудов в опухоль. Им также было установлено, что рост солидных опухолей всегда сопровождается неоваскуляризацией, поскольку в отсутствие капилляров опухоли получают питательные вещества путем диффузии и могут достигать лишь незначительных размеров (около 1-3 мм³ в объеме) [90]. Чем больше расстояние от клетки до ближайшего капилляра, тем меньше вероятность митотического деления этой

клетки [157]. Лишенная сосудов опухоль, переходит в состояние покоя, в котором может оставаться неограниченное время. Без развития функциональной сосудистой сети опухоль также не может метастазировать в отдаленные органы и более подвержена клеточно-опосредованной иммунной атаке [52, 176]. Однако гипоксия и ацидоз приводят к активации молекулярных сигналов и нарушению ангиогенного баланса, происходит смещение «ангиогенного переключателя» и индукция ангиогенеза, который имеет критическое значение для дальнейшего опухолевого роста и метастазирования [95, 173].

В течении нескольких лет после разработки концепции антиангиогенеза не удавалось выделить специфический эндогенный ингибитор, что ограничивало экспериментальные возможности подтверждения этой теории. Эта проблема была решена в 1994 году, после открытия ангиостатина, который был активен только в отношении эндотелиальных клеток [149]. Этот полипептид был выделен из субклона карциномы легких Льюиса, при которой первичная опухоль подавляла рост метастазов. Ангиостатин образуется в результате протеолитического расщепления плазминогена и состоит из первых пяти крингл-доменов (K1-K4) [31, 32]. Эти же авторы затем выделили другой специфический ингибитор ангиогенеза – эндостатин, который более эффективно подавлял рост опухоли [78]. Эндостатин наряду с тумстатином выделяют в группу ингибиторов ангиогенеза матриксного происхождения, поскольку они являются протеолитическими фрагментами компонентов межклеточного матрикса [4, 122]. В настоящее время известно около 30 различных белковых и низкомолекулярных ингибиторов ангиогенеза [5, 93].

1.2. Структура эндостатина и механизмы его антиангиогенной активности

Эндостатин – С-концевой фрагмент коллагена XVIII типа молекулярной массой 20кДа, впервые выделенный O'Reilly M.S. и соавт. из кондиционированной среды клеток гемангиоэндотелиомы мыши (клеточной линии EOMA) в 1997 году [78]. Этот полипептид состоит из 183 аминокислот и образуется в результате протеолитического отщепления С-концевого

неколлагенового (NC1) домена от коллагена XVIII типа. Данный процесс катализируют различные ферменты: цистеиновые протеиназы (катепсины L, В и К), сериновые протеиназы (эластазы), матриксные металлопротеиназы (ММР-2, ММР-3, ММР-7, ММР-9, ММР-12, ММР-13, ММР-14 и ММР-20) [80, 176].

Предшественник эндостатина, коллаген XVIII типа (гепарансульфат-протеогликан), является компонентом различных базальных мембран и членом семейства нефибриллярных белков, к которому также относятся коллагены IV и XV типов [106, 132, 135]. Кроме того, коллагены XVIII и XV типов образуют подсемейство мультиплексинов, содержащих множество чередующихся коллагеновых (COL) и неколлагеновых (NC) доменов [80, 99]. В состав молекулы коллагена XVIII типа входят 10 тройных спиралей, которые чередуются с доменами неколлагенового типа [176]. Эта структура окружена N-концевым доменом NC11 и С-концевым доменом NC1 [136]. Домен NC1 содержит соединительный фрагмент, участвующий в олигомеризации трёх α 1-цепей (домен тримеризации), шарнирный домен, который служит мишенью для протеазы, и эндостатиновый домен массой 20 кДа [80, 151]. У человека обнаружены два тканеспецифичных варианта коллагена XVIII типа: короткая изоформа, которая находится в сердце, почках, плаценте, яичниках, скелетных мышцах, тонком кишечнике, и длинная изоформа, специфичная для печени (рисунок 1) [80].



Рисунок 1 – Схематическая модель коллагена XVIII типа, который является членом подсемейства мультиплексинов, поскольку содержит несколько чередующихся коллагеновых (COL) и неколлагеновых (NC) доменов.

Неколлагеновый N-концевой домен (NC11) может подвергаться альтернативному сплайсингу с образованием двух различных изоформ. Неколлагеновый C-концевой домен (NC1) содержит соединительный участок, шарнирный домен и эндостатиновый домен массой 20 кДа. Адаптировано из Walia et al. (2015) [80]

Эндостатин является глобулярным белком, имеющим структурное сходство с углевод-распознающим доменом лектинов С-типа [179]. Каждая молекула эндостатина содержит один атом цинка и стабилизирована двумя внутримолекулярными дисульфидными связями [105]. Поскольку эндостатин является фрагментом макромолекулы внеклеточного матрикса и отличается по свойствам от своего предшественника, его можно отнести к группе матрикинов, а именно матрикриптинов (в связи с протеолитическим отщеплением в качестве мономера от полимера) [138].

Расположение эндостатина в базальной мембране указывает на его участие в регуляции роста сосудов, однако эта гипотеза не нашла однозначного экспериментального подтверждения, поскольку физиологические уровни эндостатина в циркуляторном русле значительно ниже тех концентраций, при которых он оказывает антиангиогенное воздействие [97, 176]. Несмотря на то, что биологическая роль эндостатина до сих пор остается невыясненной, многочисленные исследования показали, что рекомбинантный эндостатин является мощным ингибитором опухолевого ангиогенеза, способен подавлять рост первичной опухоли и предотвращать образование метастазов [34, 155]. Так, Zogick et al. установили, что пациенты с синдромом Дауна имеют более низкую частоту солидных опухолей и одновременно повышенный сывороточный уровень эндостатина, поскольку ген COL18A1 локализован в 21 хромосоме, которая удваивается при этом синдроме [97].

Эффекты эндостатина включают ингибирование миграции эндотелиальных клеток, индукцию остановки клеточного цикла в фазе G1 и стимулирование апоптоза путем ингибирования циклина D1, что приводит к снижению васкуляризации опухолей [71, 72, 75, 78]. Dhanabal et al. (1999) показали, что

эндостатин активирует механизм апоптоза за счет подавления синтеза антиапоптотического белка Bcl-2 [72]. Эндостатин препятствует передаче сигнала, индуцированного фактором роста фибробластов (FGF-2), подавляет экспрессию VEGF и блокирует его рецептор VEGF-R2 [70, 75, 158]. Таким образом, эндостатин имеет широкий спектр противоопухолевой активности: препятствует пролиферации опухолей, подавляя активность факторов роста [77, 92], ингибирует ангиогенез, замедляет миграцию и инвазию опухолевых клеток [62, 89].

Эндостатин реализует свои многообразные функции путем связывания с различными рецепторами (рисунок 2). Например, взаимодействуя с $\alpha_5\beta_1$ интегрином на клеточной поверхности пролиферирующих эндотелиоцитов, он конкурирует с фибронектином, проангиогенным лигандом.

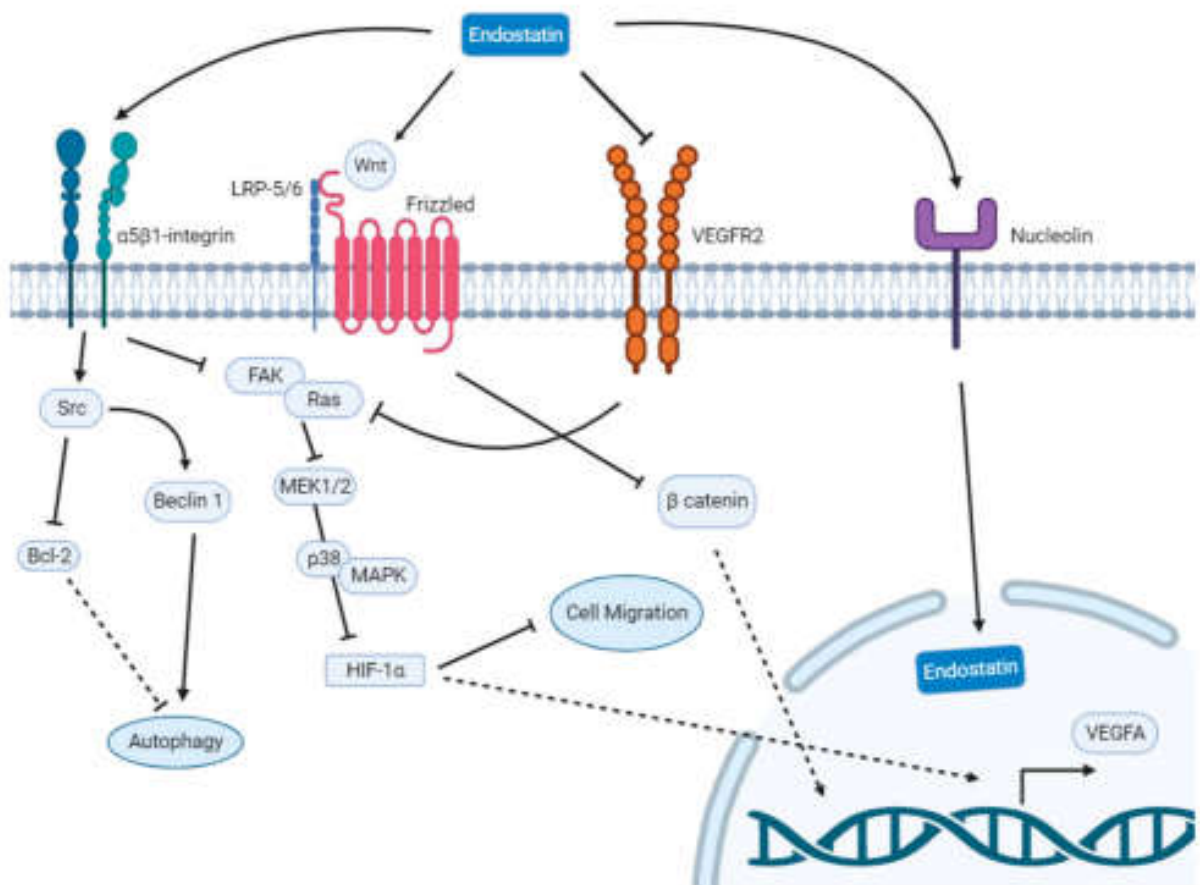


Рисунок 2 – Схема основных механизмов действия эндостатина на эндотелиальные клетки. Воспроизведено из Mendez-Valdes et al. (2023) [69]

Эндостатин способствует связыванию $\alpha_5\beta_1$ интегрин с кавеолином-1 и

инициирует каскад фосфорилирования тирозина, который активирует цитоплазматическую Src-тирозинкиназу. Фосфорилированная Src-тирозинкиназа затем напрямую связывается с кавеолином-1 Src, разрушает фокальные контакты и актиновые стресс-волокна, ингибирует миграционную активность эндотелиальных клеток [23, 26, 175]. За счет связывания $\alpha_5\beta_1$ интегрина эндостатин подавляет индуцируемый гипоксией фактор роста, влияя таким образом на миграцию эндотелиальных клеток [69].

Эндостатин ингибирует ангиогенез путем прямого связывания с VEGFR-1 (flt-1), блокируя взаимодействие VEGF с этим рецептором и все последующие сигнальные события [80]. Эндостатин подавляет неоваскуляризацию путем конкурентного ингибирования рецептора VEGFR-2 на поверхности кровеносных и лимфатических сосудов и предотвращает VEGF-индуцированный сигнальный каскад ERK/p38/MAPK [67, 70, 76, 123].

Аналогично эндостатин ингибирует лимфогенез через рецептор VEGFR-3 (flt-4) на поверхности лимфатических сосудов [46]. Кроме того, он оказывает антиангиогенный эффект, связываясь с интегрином $\alpha_v\beta_3$, глипиканом-1 и глипиканом-4. Экспрессия глипикана-1 имеет решающее значение для ингибирования VEGF эндостатином [45].

Эндостатин также взаимодействует с белками, ассоциированными с клеточной поверхностью: тромбоспондином-1 (повышается экспрессия тромбоспондина-1), эндорепеллином (подавляется антиангиогенная активность эндостатина), нуклеолином (происходит ингибирование клеточной миграции и образования трубочко-подобных структур) [64, 79, 80, 121, 161]. Ингибируя антиангиогенные свойства эндостатина посредством непрямого механизма, эндорепеллин одновременно реализует свои антиангиогенные свойства с помощью прямых механизмов [64, 80].

На данный момент описаны несколько прямых механизмов ингибирования ангиогенеза с помощью эндорепеллина: ингибирование миграции эндотелиальных клеток, ингибирование коллаген-индуцированного морфогенеза эндотелиальных трубок и ингибирование роста кровеносных сосудов *in vitro* и в

хорион-аллантаисных мембранах [64, 127].

Эндостатин проникает через ядерную мембрану с помощью фосфопротеина нуклеолина, который играет роль рецептора, расположенного на клеточной поверхности. Нуклеолин – ангиогенный белок, который находится преимущественно в ядрышке, но под влиянием VEGF транспортируется на поверхность эндотелиальных клеток. Присутствие нуклеолина на клеточной поверхности характерно только для опухолевого ангиогенеза и не свойственно для зрелых эндотелиальных сосудов. Этот белок ингибируется антиангиогенными факторами, в том числе эндостатином, который, связываясь с нуклеолином, проникает в ядра эндотелиальных клеток [121, 164].

Эндостатин подавляет Wnt/ β -катенин-сигнальный путь, который важен для регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, подвижности и морфогенеза [68, 73]. Когда Wnt связывается с белками семейства Frizzled (трансмембранные рецепторы, сопряженные с G-белками), активируются цитоплазматические белки Dishevelled, приводящие к стабилизации β -катенина – обязательного медиатора Wnt/ β -катенин-сигнального пути [126]. Эксперименты Hanaï и соавторов показали, что эндостатин подавляет активность β -катенина. Ингибирование Wnt сигнального пути подтверждено в эндотелиальных клетках пупочной вены человека, которые трансформировались β -катенином и эндостатином [73]. Этот механизм связан с подавлением некоторых генов, участвующих в клеточном цикле, что приводит к запрограммированной гибели клеток [69].

1.3. Эндостатин – потенциальный маркер при онкологических заболеваниях

После экспериментального подтверждения различных противоопухолевых эффектов эндостатина возрос научный интерес к данному белку как к перспективному маркеру различных онкологических заболеваний. Уровни эндостатина были определены в сыворотке и плазме пациентов с мелкоклеточным раком легкого, аденокарциномой желудка, раком мочевого пузыря, колоректальным раком, раком почки, саркомами костей и мягких тканей [11, 53,

143, 146, 177].

Традиционно для измерения сывороточных уровней эндостатина используется метод иммуноферментного анализа. С его помощью концентрацию эндостатина также измеряют в плевральном выпоте [59, 74, 177]. Ещё одним объектом изучения эндостатина в качестве маркера является его экспрессия в ткани опухоли, которую оценивают при иммуногистохимическом исследовании [24, 86, 110]. В настоящее время разрабатываются новые методы и аналитические инструменты определения эндостатина в биологических жидкостях и тканях. Так, Tejerina-Miranda et al. (2024) создали электрохимическую биоплатформу, которая сочетает в себе преимущества использования магнитных микрочастиц для проведения сэндвич-иммуноанализа и амперометрической трансдукции [28].

Первое исследование концентрации эндостатина в сыворотке крови при гинекологических злокачественных новообразованиях было опубликовано Hefler и соавт. в 1999 году. Эта группа ученых провела сравнительный анализ эндостатина в сыворотке пациенток с плоскоклеточным раком вульвы и здоровых женщин. Медианы сывороточных концентрации в исследуемой группе были повышены по сравнению с контролем и составили 52,3 нг/мл и 49,8 нг/мл соответственно ($p=0,4$). Однако сывороточные концентрации эндостатина не коррелировали со стадией опухоли ($p=0,5$) и степенью дифференцировки ($p=0,7$), а также отсутствовала связь с безрецидивной и общей выживаемостью пациенток [141].

Landt et al. (2011) оценили сывороточные уровни эндостатина у женщин с раком шейки матки и выявили корреляции со стадией заболевания и статистически значимые различия между инвазивным, неинвазивным и рецидивирующим раком. Авторам не удалось определить пороговое значение и связь с отдаленными результатами лечения, поэтому был сделан вывод, что эндостатин не подходит для стратификации риска у пациенток с раком шейки матки [131].

Коç M et al. (2006) измерили уровень эндостатина в сыворотке крови у 30 пациентов с раком желудка и у 30 пациентов, оперированных по поводу

доброкачественных патологий, в возрасте от 18 до 69 лет. Было установлено, что уровень эндостатина в сыворотке крови не коррелирует с клинико-патологическими показателями, за исключением гистологического типа по классификации Lauren [147]. Данные результаты не подтвердились в исследовании Masiak et al. (2011), этими авторами были обнаружены статистически значимые различия сывороточного уровня эндостатина в зависимости от степени дифференцировки рака желудка: при G2 среднее значение сывороточного уровня эндостатина составило $4,95 \pm 2,2$ нг/мл, при G3 – $8,37 \pm 0,34$ нг/мл ($p=0,04$) [84]. Две вышеуказанные публикации наряду с десятью другими исследованиями были включены в систематический обзор и метаанализ, который выявил статистически значимое повышение среднего значения сывороточного эндостатина у больных раком желудка по сравнению с группой здоровых доноров [53]. Кроме того, результаты данного метаанализа показали, что пациенты со стадией T4 имели более высокие уровни эндостатина, чем пациенты со стадией T2, что позволяет предположить связь эндостатина с агрессивностью опухоли [53].

Kantola et al. (2014) выявили, что у пациентов с колоректальным раком уровни эндостатина в сыворотке были значительно выше, чем в контрольной группе, а также обнаружили положительную корреляцию с маркерами системного воспалительного ответа и отрицательную корреляцию с плотностью инфильтрирующих опухоль тучных клеток и дендритных клеток. Высокие уровни эндостатина коррелировали с инвазией через собственную мышечную оболочку, но не коррелировали с наличием отдаленных метастазов [144].

Несмотря на то, что ангиогенез играет более значительную роль в патогенезе солидных опухолей, ряд работ посвящен исследованию эндостатина в сыворотке у пациентов с гемобластомами. Так, Bertolini et al. (1999) оценили циркулирующие уровни эндостатина у пациентов с неходжкинской лимфомой. Уровни эндостатина не отличались у пациентов с рецидивом и не коррелировали с бессобытийной выживаемостью [29]. Hidman et al. (2023) определяли средние уровни эндостатина в плазме пациентов с индолентной В-клеточной

неходжкинской лимфомой. Все пациенты были разделены на две группы: с симптоматической формой заболевания и с бессимптомным течением. Статистически значимой разницы между этими двумя группами не обнаружено. Однако средний уровень эндостатина в плазме пациентов обеих групп был повышен по сравнению с контролем [100].

Концентрации эндостатина в сыворотке также значительно повышены при светлоклеточном раке почки (среднее значение в исследуемой группе составило 24,6 нг/мл, в контрольной – 14, 1 нг/мл) и коррелируют с уровнем VEGF [143]. Дооперационные сывороточные уровни эндостатина у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой не отличались от контроля и не коррелировали с долгосрочной выживаемостью [130].

Szarvas et al. (2012) выявили повышенное содержание эндостатина в сыворотке и моче больных раком мочевого пузыря. Высокие уровни эндостатина в сыворотке коррелировали с наличием метастазов в лимфатических узлах и концентрацией MMP-7 и были ассоциированы с неблагоприятным прогнозом выживаемости [146].

Feldman et al. (2001) провели анализ дооперационных уровней эндостатина в сыворотке крови пациентов с саркомой мягких тканей и обнаружили, что средняя концентрация эндостатина у больных саркомой была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров (43,0 нг/мл и 25,8 нг/мл соответственно, $p=0,0002$). Более того, уровень эндостатина, превышающий среднее значение на два стандартных отклонения (более 55 нг/мл), был ассоциирован с повышенным риском рецидива опухоли после резекции ($p=0,047$) [145]. Yoon et al. (2004) установили, что средний уровень эндостатина в плазме пациентов с саркомой мягких тканей был на 22% выше по сравнению с контролем, однако различия не были статистически значимыми. Авторы также обратили внимание на выявленную корреляцию уровня эндостатина с наличием метастазов, но не с безрецидивной выживаемостью. У пациентов с метастазами уровень эндостатина был на 45% ниже, чем у пациентов без метастазов ($p = 0,047$) [48].

В 2003 году в Японии было опубликовано первое исследование

клинической информативности определения эндостатина в злокачественном плевральном выпоте, по результатам которого чувствительность и специфичность этого биомаркера составляли 0,68 и 0,55 соответственно. В последующие годы в Китае был проведен ряд аналогичных исследований [59, 177, 178]. Их результаты были включены в метаанализ, в котором была рассчитана объединенная чувствительность и специфичность эндостатина в плевральном выпоте (0,69 и 0,78 соответственно) [59]. В целом, эти показатели не позволяют считать эндостатин информативным маркером [125]. Более актуальный систематический обзор литературы по данному вопросу был опубликован в 2021 году Yang et al. Его авторы рассчитали объединенную чувствительность эндостатина при злокачественном плевральном выпоте 0,65 и специфичность 0,77, что согласуется с более ранними исследованиями [58]. По данным Suzuki et al. (2002), средний уровень эндостатина в сыворотке крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого составил $42,4 \pm 40,4$ нг/мл, а у здоровых лиц $16,3 \pm 10,3$ нг/мл, различия были статистически значимыми ($p=0,0003$). Концентрации эндостатина в сыворотке, превышающий средний уровень, были связаны с неблагоприятным прогнозом [142]. Hu et al. (2014) оценили клиническую значимость эндостатина в сыворотке и опухолевой ткани у пациентов с операбельным немелкоклеточным раком легкого. Уровень эндостатина в сыворотке крови у больных был статистически значимо выше, чем у здоровых лиц ($p=0,0018$) [50]. Эти данные подтверждаются результатами другой работы, авторы которой установили, что уровни эндостатина у пациентов с злокачественными заболеваниями легких значительно выше, чем в группе пациентов с доброкачественной патологией и в группе здоровых доноров [160]. Более высокий уровень эндостатина в сыворотке коррелировал с более низкой степенью дифференцировки ($p=0,008$). Не было выявлено корреляции между экспрессией в опухолевой ткани и клиническими параметрами, такими как стадия TNM, степень дифференцировки, гистологический тип. Более высокая экспрессия эндостатина в опухолевой ткани была связана с более высоким сывороточным уровнем ($r=0,223$). Ни уровни эндостатина в сыворотке, ни его экспрессия в опухолевой ткани не влияли на

выживаемость пациентов [50].

Mo et al. (2013) оценили прогностическую значимость сывороточного уровня эндостатина у пациентов с поздней стадией назофарингеальной карциномы и продемонстрировали его значительное повышение у больных раком носоглотки по сравнению с контрольной группой. Однофакторный анализ выявил значительные различия между группами с высоким и низким уровнем эндостатина в отношении 5-летней общей выживаемости (63,9% против 90,5%; $p = 0,003$), выживаемости без прогрессирования (50,2% против 79,3%; $p = 0,003$) и безметастатической выживаемости (59,1% против 85,3%; $p = 0,01$) [63].

1.4. Эпидемиологические и клинические особенности опухолей костей

Эпидемиология. Первичные опухоли костей исключительно редки, и в нашей стране еще не сформирован единый регистр, позволяющий охарактеризовать их распространенность и другие эпидемиологические особенности. Заболеваемость саркомами костей имеет бимодальное возрастное распределение с пиками во второй декаде жизни и в возрасте старше 60 лет [88, 112, 170]. По имеющимся международным данным, первичные опухоли костей составляют от 0,2% до 1% всех новообразований человека [91]. Первое место по частоте встречаемости среди них занимает остеосаркома (35%), за ней следуют хондросаркома (25%) и саркома Юинга (16%) [16, 88]. Источником этих сведений является программа Национального института рака США SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), которая предоставляет информацию об онкологических заболеваниях, эпидемиологии и результатах лечения. Согласно статистическим исследованиям Ортопедического института Риццоли (Италия), злокачественные опухоли костей чаще встречаются у мужчин (59,1%), чем у женщин (40,9%) [57]. Аналогичные данные приводят исследователи из Хорватии: доля мужчин с новообразованиями костей составила 56,9% [82].

Большинство злокачественных опухолей локализируются в длинных трубчатых костях, половина – в метаэпифизах костей, формирующих коленный сустав [81]. Чаще всего саркомы костей метастазируют в легкие, реже в другие

органы, а в лимфоузлы крайне редко.

В России ежегодно диагностируются не более 1500 новых случаев заболевания [3]. Распространённость сарком костей у взрослых 1,03 на 100 тыс. населения [1]. Данные российских авторов об эпидемиологии опухолей костей у детей несколько отличаются, но не противоречат друг другу. Так, А.Д. Каприн и соавт. (2022) указывают, что в структуре онкологической заболеваемости детского населения (0-14 лет) саркомы костей составляют 4,4% всех злокачественных новообразований и 8,5% солидных опухолей. У лиц в возрасте до 30 лет на их долю приходится 4,0%. Саркомы костей вносят существенный вклад в показатели смертности от злокачественных новообразований и находятся на третьем месте после гемобластозов и новообразований ЦНС. В младших возрастных группах (0-29 лет) смертность от опухолей костей составляет 8,6% [2]. М.Ю. Рыков и соавт. выделяют возрастную группу от 0 до 17 лет, для которой приводят следующие значения: саркомы костей составляют 4,8% в структуре заболеваемости и 7,3% в структуре смертности от злокачественных новообразований [21]. На протяжении последнего десятилетия прослеживается тенденция к увеличению показателей заболеваемости и смертности [14]. Наибольшая заболеваемость среди детей отмечается в возрастной группе 15 – 17 лет: 11,9 человек на 1 млн детского населения [8].

В США в 2008-2014 гг. 5-летняя выживаемость при остеосаркоме составила 69,6% у детей до 14 лет и 65,7% у подростков от 15 до 19 лет, а при саркоме Юинга 77,7% и 64,3% соответственно [148]. У детей (в возрасте 0–14 лет) нет различий в заболеваемости остеосаркомой в зависимости от пола, но заболеваемость саркомой Юинга среди мальчиков несколько выше, чем у девочек [81]

Заболеваемость остеосаркомой и саркомой Юинга имеет географическую гетерогенность. Более высокие показатели отмечаются у детей в Португалии, Зимбабве, Италии и США. Самые низкие показатели наблюдаются в Азии и некоторых африканских странах. Саркома Юинга более распространена среди населения Западной Европы, Новой Зеландии, США, Израиля. Низкие показатели

заболеваемости в странах Африки и Восточной Азии могут объясняться недостаточным уровнем медицинского обеспечения и затрудненной диагностикой. В то же время различия заболеваемости между этническими группами и ассоциация с определенными мутациями подчеркивают роль генетического фактора в этиологии злокачественных опухолей костей [81].

Классификация опухолей костей.

Пятое издание классификации ВОЗ было опубликовано в апреле 2020 года и подразделяет опухоли костей на следующие группы: 1) хондрогенные, 2) остеогенные, 3) фиброгенные, 4) сосудистые, 5) опухоли, богатые остеокластическими гигантскими клетками, 6) опухоли нотохорды, 7) другие мезенхимальные опухоли и 8) гемопоэтические опухоли костей [118]. По потенциалу злокачественности выделяют доброкачественные, промежуточные (локально агрессивные), промежуточные (редко метастазирующие) и злокачественные новообразования. Гигантоклеточная опухоль была отнесена к промежуточным (редко метастазирующим) новообразованиям. Из нового издания классификации ВОЗ исключены доброкачественная фиброзная гистиоцитома, липосаркома, лейомиосаркома, гигантоклеточное поражение мелких костей. Кроме того, была выделена группа недифференцированных мелкокруглоклеточных сарком костей, к которым относится саркома Юинга, круглоклеточная саркома с EWSR1-non-ETS fusion, CIC-перестроенная саркома и саркома с генетической альтерацией BCOR [3, 47].

Краткая характеристика наиболее распространённых опухолей костей.

Остеосаркома – наиболее распространенная первичная саркома кости у детей и молодых людей, имеющая мезенхимальное происхождение. Отличительным признаком остеосаркомы является присутствие остеоида, неминерализованного внеклеточного матрикса, продуцируемого опухолевыми клетками [174].

В зависимости от расположения в кости и степени злокачественности остеосаркомы могут быть:

- интрамедуллярные: высокой (более 80% случаев) и низкой степени

злокачественности;

- юкстакортикальные: к ним относятся паростальная остеосаркома с высокой степенью дифференцировки G1, периостальная остеосаркома (G2) и поверхностная остеосаркома с низкой степенью дифференцировки G3. Особые формы остеосаркомы — мелкоклеточная и телеангиэктатическая [3, 12].

При наличии метастазов в момент установления диагноза прогноз считается особенно неблагоприятным. В таком случае до хирургического лечения проводится неoadъювантная химиотерапия. Совершенствование методов лечения позволило сократить число ампутаций и улучшить прогноз выживаемости. Так, с введением неoadъювантной терапии пятилетняя выживаемость пациентов с остеосаркомой возросла до 70-80%, а частота ампутаций снизилась на 10-20%, но исходы существенно не улучшились [3, 119].

Хондросаркома – злокачественная опухоль хондрогенного происхождения. Это локально агрессивное новообразование, продуцирующее гиалиновый хрящ. Выделяют классическую хондросаркому grade 1-3, периостальную, светлоклеточную, мезенхимальную, дедифференцированную хондросаркому [118]. В 90% случаев диагностируется классическая хондросаркома; 10–15% приходится на остальные типы [3]. Мутация IDH1/IDH2 характерна для 50% центральных хондросарком клетками [174]. Типичная локализация хондросаркомы: бедренная кость, кости таза, плечевая кость, ребра, грудина, лопатка [3]

Саркома Юинга – мелкокруглоклеточная саркома, для которой характерна хромосомная транслокация t (11;22) (q24; q12), выявляемая у 85% больных. При этом ген EWSR1 на хромосоме 22 q12 сливается с геном FLI1 на хромосоме 11. В 10% случаев обнаруживается слияние EWSR1 и ERG, у 3% пациентов наблюдается слияние гена EWSR1 с другими транскрипционными факторами семейства ETS [3,12, 47]. В половине случаев саркома Юинга локализуется в конечностях, также частой локализацией являются таз, ребра и позвонки. Частота выявления отдаленных метастазов на момент постановки диагноза – 25% [3]. Обязательные критерии диагностики – мелкокруглоклеточная морфология клеток

и экспрессия CD99 в мембранном локусе [118]. Маркер CD99 выявляется в 97 % случаев, но не является специфическим и также обнаруживается при других мелкокруглоклеточных опухолях. Диагностический потенциал имеют также антитела к белкам NKX2, PAX7, ATP1A1, BCL11B и GLG1, экспрессия которых индуцируется химерным транскриптом EWSR1-FLI1 [15, 85].

Гигантоклеточная опухоль – локально агрессивная редко метастазирующая опухоль из неопластических мононуклеарных стромальных клеток с макрофагами и остеокластоподобными гигантскими многоядерными клетками [47]. Гигантоклеточная опухоль кости, как правило, доброкачественная, однако в редких случаях она может претерпевать злокачественную трансформацию. Злокачественная гигантоклеточная опухоль кости может быть первичной или вторичной (на месте ранее пролеченной опухоли кости). Частота злокачественных новообразований среди пациентов с ГКО составляет 4,0%, из них 1,6% приходится на первичные и 2,4% на вторичные злокачественные ГКО [117].

В соответствии с восьмым изданием международной TNM-классификации злокачественных опухолей отдельно рассматриваются опухоли позвоночника и таза. При классификации опухолей позвоночника учитывается вовлечение различных анатомических сегментов позвонка и распространение на позвоночный канал и прилежащие сосуды. При оценке опухолей таза принимается во внимание максимальный размер опухоли, вовлечение различных сегментов таза и распространение за пределы кости. Согласно новой версии классификации саркомы позвоночника и костей таза не стадируют. TNM классификацию не применяют к множественной миеломе, лимфоме, поверхностной остеосаркоме, периостальной остеосаркоме и периостальной хондросаркоме [44].

1.5. Регуляторы ангиогенеза костной ткани

Кость представляет собой богато васкуляризованную соединительную ткань. Скелетная сосудистая сеть обеспечивает костную ткань кислородом, гормонами, факторами роста и нейротрансмиттерами [166].

В эмбриональном периоде кости формируются с помощью двух механизмов: эндохондральное окостенение (с хрящом в качестве промежуточной

стадии) характерно для длинных костей, например бедренной или большеберцовой, тогда как внутримембранозное окостенение (связанное с прямой дифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты) является основным механизмом, приводящим к развитию плоских костей, например, костей черепа, лопатки [41, 166].

При любом механизме остеогенеза большое значение для нормального формирования костей имеет ангиогенез, связанный с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) [166]. За счет хемотаксиса VEGF привлекает эндотелиальные клетки к костной ткани и контролирует дифференцировку и функции остеобластов и остеокластов [98]. Сосудистая сеть также участвует в регенерации и ремоделировании кости [56]. В ряде исследований было показано, что VEGF определяет правильное формирование кости через энхондральное окостенение. Этот ростовой фактор регулирует дифференцировку и активность хондроцитов, остеобластов и остеокластов, влияет на васкуляризацию кости и морфогенез ростовой пластинки [7, 166]. Таким образом, VEGF является основным проангиогенным фактором, критически важным для формирования сосудов кости в норме и при патологии.

В некоторых работах отмечается, что активация ангиогенеза является одним из ключевых патогенетических звеньев при развитии опухолей костной ткани и ангиогенные факторы вовлечены в этот процесс [6, 7, 20, 61, 128]. В экспериментах на мышах было установлено, что резекция первичной остеосаркомы индуцирует активацию системного ангиогенеза и усиливает прогрессирование легочных метастазов [128]. Авторы данной публикации измеряли сывороточные уровни VEGF и эндостатина у мышей до и после удаления первичной опухоли и обнаружили повышение сывороточных уровней обоих регуляторов ангиогенеза. Показано, что после выделения VEGF и эндостатина в кровотока, концентрация VEGF в циркуляторном русле быстро снижается, в то время как сывороточные уровни эндостатина более стабильны и поддерживают ангиогенный баланс, препятствующий метастазированию опухоли [128].

Kubo et al. (2013) обнаружили более высокие значения плотности микрососудов (microvessel density, MVD) при остеосаркоме и саркоме Юинга, чем при хондросаркоме. При остеосаркомах гипervasкуляризация способствовала лучшему ответу опухоли на химиотерапию и более благоприятному прогнозу, тогда как при хондросаркомах высокие значения MVD коррелировали со степенью дифференцировки и были ассоциированы с неблагоприятным прогнозом [60].

Во многих работах отечественных и зарубежных авторов были определены сывороточные уровни про- и антиангиогенных факторов у больных опухолями костей [6, 11, 18, 20, 49, 171]. Например, у пациентов с саркомой Юинга сывороточные уровни фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) были статистически значимо выше по сравнению с больными, имеющими доброкачественные опухоли костей, и по сравнению со здоровыми донорами. Подобные результаты были получены и для пациентов с остеосаркомой: у них средний уровень VEGF в сыворотке крови превышал аналогичный показатель как у больных доброкачественными новообразованиями, так и у здоровых лиц [7, 18].

В другой публикации представлены результаты измерения факторов роста фибробластов и эндостатина в сыворотке крови больных первичными опухолями костей (до начала специфического лечения) и здоровых доноров. Среднее содержание эндостатина в сыворотке крови практически здоровых людей было статистически значимо ниже, чем у больных новообразованиями костей ($p=0,005$). У больных остеосаркомой обнаружены более высокие концентрации FGF-1 в сыворотке крови, чем у больных хондросаркомой. Однако уровни FGF-2 и эндостатина в этих двух группах, выделенных в зависимости от морфологического варианта опухоли, не отличались. Показано влияние FGF-1 и эндостатина на прогноз общей выживаемости больных опухолями костей [11].

Повышение содержания IL-16 в сыворотке крови больных опухолями костей было выявлено в 93% случаев. Показано, что сывороточный уровень IL-16 не зависит от размера опухоли. Определено пороговое значение IL-16, превышение которого ассоциировано с более низкими показателями общей 3- и 5-

летней выживаемости больных злокачественными опухолями костей [6].

Некоторые исследователи изучали не только содержание факторов ангиогенеза в сыворотке и плазме пациентов, но и экспрессию в ткани опухоли. Так, Dou et al. (2021) оценивали экспрессию про- и антиангиогенных факторов в образцах остеосаркомы, саркомы Юинга и гигантоклеточной опухоли кости методами протеомного профилирования и вестерн-блоттинга. В тканях остеосаркомы и саркомы Юинга было выявлено увеличение экспрессии VEGF и эндостатина по сравнению с контролем, в образцах гигантоклеточной опухоли – только эндостатина. Уровень экспрессии эндостатина был трехкратно повышен в образцах остеосаркомы по сравнению с контролем, в тканях саркомы Юинга и гигантоклеточной опухоли – почти в два раза [167].

Однонуклеотидный полиморфизм с.4309G> A (p.D104N) в эндостатиновом домене гена COL18A1 был идентифицирован при различных типах новообразований, в том числе при опухолях костей. Гомозиготный вариант данного полиморфизма значительно чаще обнаруживался у пациентов с остеосаркомой, чем у здоровых лиц, что позволяет предположить его ассоциацию с более высоким риском остеосаркомы [43].

В рамках данного диссертационного исследования был проведен систематический обзор литературы, посвященной изучению концентрации эндостатина в сыворотке крови пациентов с опухолями костей, его экспрессии в опухолях и связи этих показателей с клинико-морфологическими характеристиками заболевания [9]. Авторы двух найденных публикаций определяли содержание эндостатина в сыворотке крови больных первичными опухолями костей методом иммуноферментного анализа [20, 49]. Бабкина и соавт. (2009) не выявили статистически значимых различий между группами пациентов с различными гистологическими типами опухолей, а также корреляций с клинико-демографическими характеристиками, но определили пороговый уровень эндостатина 130 нг/мл, превышение которого было связано с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости [20]. С этими результатами частично согласуются данные Chen et al (2012), которые также обнаружили

повышение сывороточного уровня эндостатина у больных остеосаркомой и не установили корреляций со степенью дифференцировки опухоли и плотностью микрососудов, но выявили отрицательную связь с наличием отдаленных метастазов [49].

Urunbaev et al. (2014) также изучали уровень эндостатина в сыворотке крови пациентов с опухолями костей и установили, что его содержание статистически значимо повышено по сравнению с группой здоровых доноров. Однако авторы не исследовали зависимость сывороточного уровня эндостатина от демографических характеристик пациентов и клинико-морфологических параметров опухоли [171].

В ряде работ была исследована экспрессия эндостатина в тканях остеосаркомы методом иммуногистохимии. Kim et al. (2009) выявили у трети пациентов экспрессию эндостатина, которая продемонстрировала положительную корреляцию с максимальным размером опухоли, стадией опухолевого процесса, степенью дифференцировки и наличием легочных метастазов. Статистически значимые связи между экспрессией эндостатина и показателями общей выживаемости не обнаружены [110].

C.J. Xu et al. (2010) оценивали в тканях остеосаркомы экспрессию не только эндостатина, но и фактора роста фибробластов 2-го типа и CD34. При сравнительном анализе экспрессии эндостатина в ткани злокачественной опухоли (остеосаркомы) и доброкачественной опухоли (остеохондромы) более выраженная экспрессия отмечена при остеосаркоме, чем при остеохондроме (93,3% и 40,0% соответственно). Для FGF-2 уровни экспрессии составили 76,7% и 43,3% в ткани остеосаркомы и остеохондромы соответственно. Экспрессия эндостатина отрицательно коррелировала с наличием метастазов и положительно – со степенью дифференцировки опухоли и с экспрессией CD34[86].

Авторы ещё одной публикации оценили экспрессию эндостатина как в тканях первичной остеосаркомы, так и в легочных метастазах [24]. Уровень экспрессии в ткани опухоли составил 45,9%. В отличие от предыдущей работы были выявлены прямые корреляционные связи между экспрессией эндостатина и наличием отдаленных метастазов. Также экспрессия эндостатина зависела от

размера новообразования и стадии опухолевого процесса, но не зависела от возраста, пола и локализации опухоли. Авторы данной работы оценили прогностическую роль эндостатина при остеосаркоме и пришли к выводу, что уровень экспрессии эндостатина в опухоли статистически значимо не связан с общей выживаемостью пациентов [24].

Метаанализ литературных данных о частоте экспрессии эндостатина в ткани опухоли кости показал, что сводная частота экспрессии составила 57,5% (95% ДИ: 18,4 – 96,7) при значительной статистической гетерогенности данных ($I^2 = 97,11\%$). Ввиду недостаточного количества публикаций метаанализ данных о содержании эндостатина в сыворотке крови больных опухолями костей не проводился [9].

1.6. Эндостатин в составе антиангиогенной терапии

В 1971 году J. Folkman и соавт. впервые выделили из опухолевой ткани фактор, стимулирующий ангиогенез, и предложили использовать антитела к нему для контроля над ростом солидных опухолей, тем самым заложив основы антиангиогенной терапии [90]. В дальнейшем эта концепция получила развитие в многочисленных работах, посвященных исследованию различных активаторов и ингибиторов ангиогенеза на экспериментальных моделях опухолей, а также клиническим исследованиям новых лекарственных препаратов, подавляющих рост и метастазирование новообразований за счет блокады ангиогенеза [27]. Антиангиогенная терапия является перспективным подходом в лечении онкологических заболеваний, поскольку нацелена на эндотелиальные клетки, которые в отличие от опухолевых клеток генетически стабильны и менее склонны к накоплению мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости [176].

Сегодня антиангиогенная терапия включает различные классы таргетных препаратов: моноклональные антитела к VEGF (бевацизумаб), ингибиторы тирозинкиназы (сорафениб, апатиниб, пазопаниб, регорафиниб, ленватиниб), рецепторы-ловушки VEGF (афлиберцепт), олигонуклеотидные молекулы – аптамеры (бегаптаниб) и человеческий рекомбинантный эндостатин [33, 37, 55, 139]. Возможными мишенями для этих препаратов являются факторы

транскрипции или сигнальные пути, которые прямо или косвенно влияют на VEGF, PDGF, FGF, фактор роста гепатоцитов, интегрин, циклооксигеназу, матриксные металлопротеиназы (MMP-2, MMP-9), индуцированный гипоксией фактор (HIF-1). VEGF и его рецепторы (VEGFR) являются ключевыми медиаторами опухолевого ангиогенеза, поэтому в настоящее время большинство антиангиогенных препаратов предотвращают ангиогенез опухоли путем ингибирования сигнального пути VEGF [102]

Характеризуя применение антиангиогенных препаратов при опухолях костей, следует отметить, что большинство исследований таргетных препаратов, подавляющих ангиогенез, проводилось при остеосаркоме, поскольку это наиболее распространенный тип злокачественных новообразований костей. Антиангиогенная терапия подавляет миграцию и инвазию клеток остеосаркомы, ингибирует рост легочных метастазов, нормализует сосудистую сеть, усиливает эффекты лучевой терапии и химиотерапии в доклинических исследованиях. Таким образом, стратегия комбинирования ингибиторов ангиогенеза и системной химиотерапии привлекательна для синергизма с цитотоксическими препаратами и снижения лекарственной устойчивости.

Бевацизумаб – первый ингибитор VEGF, одобренный для лечения рака в 2004 году Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA). Это рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, которые селективно связываются с VEGF и предотвращают его взаимодействие с рецепторами. Несколько доклинических исследований подтвердили противоопухолевые эффекты бевацизумаба в клеточных линиях остеосаркомы, продемонстрировав перспективы его возможного применения в качестве эффективного неoadъювантного терапевтического средства для пациентов с этой опухолью костей [42, 103].

Сорафениб – первый мультикиназный ингибитор рецепторов VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3). В доклинических исследованиях при остеосаркоме ингибирует пролиферацию клеток, вызывает апоптоз, подавляет

образование сосудов. В клинических исследованиях сорафениб показал минимальный и кратковременный эффект. В связи с этим исследуются комбинации сорафениба с другими таргетными препаратами при остеосаркоме, что повысит его клиническую эффективность [55].

Апатиниб – низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы, высоко селективен к VEGFR-2. Индуцирует апоптоз за счет инактивации сигнального пути VEGFR2/STAT3/BCL-2. Апатиниб безопасен и эффективен при остеосаркоме в клинических исследованиях [38].

Ленватиниб – мультикиназный ингибитор. В настоящее время ведутся клинические исследования данного препарата у пациентов с рецидивирующей остеосаркомой в дополнение к системной химиотерапии [113, 140].

Побочные эффекты ингибиторов VEGF не зависят от пути введения и дозы препарата, а являются следствием подавления сигнальных путей, регулирующих поддержание микроциркуляторного русла. Некоторые побочные эффекты встречаются достаточно часто (гипертензия, протеинурия), другие менее распространены (нарушение заживления ран, перфорация желудочно-кишечного тракта, кровотечение и тромбоз, сердечная недостаточность и эндокринная дисфункция) [69]. Со временем опухоль может производить избыточное количество ангиогенных факторов, что вызывает устойчивость к антиангиогенной терапии. Поэтому для расширения терапевтической эффективности монотерапия чаще заменяется комбинацией антиангиогенных препаратов в сочетании с химиотерапией [30].

Учитывая побочные эффекты и высокую токсичность антиангиогенных препаратов, воздействующих на VEGF, в качестве потенциальной альтернативы рассматривается эндогенный ингибитор ангиогенеза эндостатин. Вскоре после его открытия были опубликованы первые экспериментальные исследования, подтвердившие, что эндостатин подавляет рост первичных опухолей и образование метастазов [34, 92, 155]. Авторы отмечали, что при циклическом введении эндостатина удавалось достичь длительного периода покоя, опухоль не увеличивалась в размере между курсами терапии [34].

Несмотря на выраженный антиангиогенный эффект эндостатина и отсутствие лекарственной устойчивости, нерастворимая и нестабильная природа этого белка в сочетании с высокой стоимостью производства затруднили его внедрение в клиническую практику. Однако ученые из Китая разработали способ рефолдинга рекомбинантного человеческого эндостатина, что позволило обеспечить экономически эффективный выпуск стабильной и растворимой формы белка [115].

В 2005 году человеческий рекомбинантный эндостатин, запатентованный под названием ENDOSTAR®, был одобрен Государственным управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств Китая для лечения немелкоклеточного рака легкого [66, 80]. Проводятся доклинические и клинические исследования эндостатина при других онкологических заболеваниях [17, 35, 51, 134].

В литературе также представлены результаты применения рекомбинантного эндостатина при саркомах костей [62, 65, 108, 137, 153]. Доклинические исследования на модели мышинной остеосаркомы показали, что антиангиогенная терапия эндостатином предотвращает прогрессирование легочных метастазов после удаления первичной опухоли. Эта стратегия позволяет сохранить микроскопические метастазы в дремлющем состоянии и улучшить прогноз [129]. На модели остеосаркомы у мышей доказан синергетический эффект комбинированной терапии эндостатином и адриамицином, поскольку антиангиогенная терапия способствует нормализации сосудистой сети и улучшает доставку химиотерапевтических агентов к опухолевым клеткам. Несмотря на то, что эта терапевтическая стратегия не обеспечивает излечение от остеосаркомы, она позволяет сохранить микроскопические метастазы в дремлющем состоянии и улучшить прогноз [154].

В клиническом исследовании с участием 116 больных остеосаркомой продемонстрировано, что химиотерапия повышает экспрессию VEGF и плотность микрососудов, а добавление эндостатина, наоборот, ингибирует ангиогенез, индуцированный химиотерапией. Однако не выявлено различий в

гистологическом ответе опухоли между группами пациентов, прошедших курсы монокимиотерапии, и пациентов, получавших комбинацию химиотерапевтических препаратов с эндостатином. Добавление эндостатина к стандартной химиотерапии увеличило 5-летнюю бессобытийную выживаемость на 14% и снизило частоту метастазирования на 10% [62]. В другом исследовании установлено, что добавление рекомбинантного эндостатина к периоперационной химиотерапии может значительно улучшить безметастатическую и общую выживаемость при остеосаркоме [124]. Ma et al. (2018) провели систематический обзор исследований рекомбинантного эндостатина в терапии сарком костей и мягких тканей. Авторы установили, что при оценке 1-летней и 2-летней общей выживаемости результаты комбинированного лечения с использованием рекомбинантного эндостатина были значительно лучше по сравнению с монокимиотерапией [137]. Sui et al. (2023) изучали эффективность рекомбинантного человеческого эндостатина в сочетании с неoadъювантной химиотерапией при остеосаркоме и продемонстрировали более высокую частоту объективного ответа по сравнению с контрольной группой, получавшей химиотерапию без эндостатина (84,2% против 64,6% соответственно) [153].

Несмотря на выраженную противоопухолевую эффективность, подтвержденную многократно в экспериментальных и клинических исследованиях, практическое применение эндостатина в составе комбинированной лекарственной терапии онкологических заболеваний весьма ограничено. Одной из основных проблем является очень высокая доза препарата, при которой достигаются биологические эффекты. Таким образом, его необходимо производить в больших количествах, что создает экономические трудности. Первоначально эндостатин выделяли из мочи мышей с опухолями, что позволило получить небольшое количество белка для анализа аминокислотной последовательности. Затем для экспрессии рекомбинантного мышинового эндостатина использовали клетки *E. coli*, однако белок был нерастворим и выпадал в осадок. Позже ученым удалось получить растворимый рекомбинантный эндостатин [13]. Также были разработаны методики получения

растворимой формы эндостатина в системе экспрессии дрожжей *Pichia Pastoris* [89]. В процессе очистки этого белка нарушается его структура и снижается выход конечного продукта. Кроме того, эндостатин имеет короткий период полувыведения, что приводит к необходимости непрерывной инфузии в течение длительных периодов времени [159].

Для преодоления этих ограничений используют различные векторные системы, обеспечивающие непрерывную доставку эндостатина к солидным опухолям. Невирусные системы включают липосомальные комплексы и поливинилпирролидон [150]. Кроме того, имеется большое разнообразие вирусных векторных систем, например, аденовирусный вектор (Ad-Endo, E10A) [36]. Применение наночастиц для адресной доставки антиангиогенных молекул позволяет уменьшить нежелательные побочные эффекты и токсичность [133].

Резюме

Первичные опухоли костей имеют низкую распространенность и бимодальное возрастное распределение с пиками во втором и седьмом десятилетиях. Высокая агрессивность и медико-социальная значимость этих новообразований обуславливают необходимость поиска новых сывороточных маркеров для стратификации риска и прогнозирования результатов лечения таких больных.

Эндостатин - эндогенный ингибитор опухолевого ангиогенеза, который подавляет миграцию клеток, вызывает апоптоз и задержку клеточного цикла, что приводит к снижению кровоснабжения опухолей. Кроме того, эндостатин подавляет экспрессию VEGF и блокирует его рецепторы. Таким образом, эндостатин выполняет различные противоопухолевые функции: препятствует пролиферации опухолей, подавляя активность факторов роста, ингибирует ангиогенез, замедляет миграцию и инвазию опухолевых клеток.

В некоторых исследованиях были обнаружены более высокие концентрации эндостатина в сыворотке крови при различных злокачественных новообразованиях.

Несмотря на высокий интерес исследователей к эндостатину как

потенциальному маркеру у онкологических пациентов, он мало изучен при такой редкой нозологии, как саркомы костей. Выполненный нами систематический обзор и метаанализ литературных данных подтверждают, что этот вопрос недостаточно освещен в международных базах данных.

С 2005 года человеческий рекомбинантный эндостатин (Endostar) используется в терапии рака легкого, назофарингеальной карциномы и опухолей пищеварительной системы [22, 83]. Проводятся доклинические исследования эндостатина в качестве антиангиогенной терапии при остеосаркоме.

Однако практическое применение эндостатина в клинической онкологии имеет ряд серьезных ограничений, в их числе трудности введения и дозировки, необходимость производства растворимых форм и промышленного синтеза в большом количестве с помощью современных биотехнологических разработок.

Проанализировав современное состояние вопроса о применении эндостатина в качестве потенциального маркера при опухолях костей, мы сделали вывод, что в литературе подробно описаны молекулярные механизмы противоопухолевой активности эндостатина, его структура и взаимодействие с различными рецепторами, а также результаты клинических исследований эндостатина в составе антиангиогенной терапии при онкологических заболеваниях, однако перспективы применения эндостатина как сывороточного маркера с целью прогнозирования и стратификации риска изучены недостаточно, особенно при таких редких нозологиях, как первичные опухоли костей.

Все вышесказанное подчеркивает актуальность и научную новизну сравнительного анализа сывороточных концентраций эндостатина и других факторов ангиогенеза у данной категории пациентов. Диссертационное исследование направлено на решение данной междисциплинарной проблемы на стыке онкологии и лабораторной медицины и позволяет оценить диагностическую и прогностическую значимость сывороточного уровня эндостатина у пациентов с первичными опухолями костей, а также перспективы его применения в качестве биомаркера в практическом здравоохранении.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика пациентов и группы контроля

Диссертационная работа выполнена на базе лаборатории клинко-диагностической централизованного научно-клинического лабораторного отдела консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Исследование поддержано Межвузовским комитетом по этике при Ассоциации медицинских и фармацевтических вузов (протокол №11-21 от 16.12.2021) и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали добровольное информированное согласие на сбор, систематизацию, обработку и хранение обезличенных медицинских данных и их использование в научных целях.

В исследование включены 150 пациентов с новообразованиями костей, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с июля 2004 по декабрь 2022 гг. В контрольную группу вошли 53 практически здоровых донора. Исследуемая и контрольная группы были сопоставимы по возрасту и полу, поскольку медианы возраста участников, а также процентные доли мужчин и женщин в обеих группах статистически значимо не отличались ($p=0,094$ и $p=0,591$ соответственно) (таблица 1).

Таблица 1 – Демографическая характеристика пациентов с опухолями костей и группы здоровых доноров

Характеристика	Пациенты с опухолями костей (исследуемая группа) n=150	Здоровые доноры (контрольная группа) n=53	p
Возраст Me [Q25; Q75], годы	27,0 [18,0;42,0]	24,0 [19,0;30,0]	$p=0,094$
Мужчины, n (%)	94 (62,7)	31(58,5)	$p=0,591$
Женщины, n (%)	56 (37,3)	22 (41,5)	

Среди пациентов с опухолями костей, также как и среди здоровых доноров преобладали лица в возрасте 18-30 лет. Распределение больных опухолями костей по возрасту соответствовало литературным эпидемиологическим данным, демонстрируя пик заболеваемости во втором и третьем десятилетии жизни, за которым следовал спад и повторный подъем заболеваемости в возрасте старше 50 лет (рисунок 3).



Рисунок 3 – Распределение больных первичными опухолями костей и здоровых доноров по возрасту.

У всех больных опухоль кости диагностирована впервые. Морфологическая верификация диагноза проводилась в соответствии с Международной классификацией опухолей костей (ВОЗ, 2020). В исследуемую группу вошли 132 пациента с злокачественными новообразованиями (остеосаркома, недифференцированная плеоморфная саркома, саркома Юинга, хондросаркома) и 18 пациентов с промежуточными (редко метастазирующими) опухолями кости (гигантоклеточная опухоль). При этом преобладали пациенты с остеосаркомой, за ними по численности следовали группы больных хондросаркомой и саркомой Юинга, что также согласуется с литературными эпидемиологическими данными (рисунок 4).

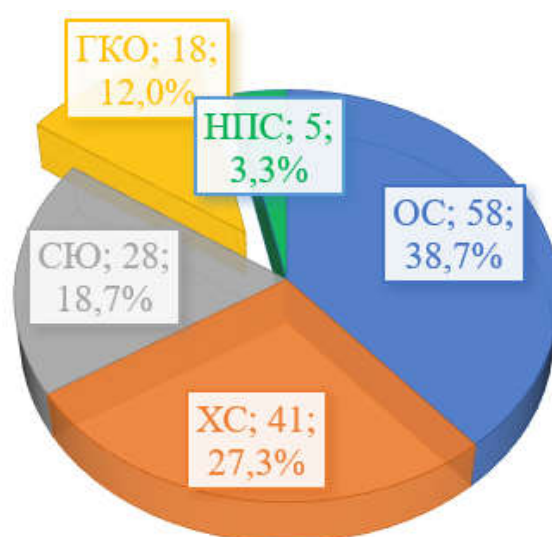


Рисунок 4 – Распределение пациентов с учетом морфологически верифицированного диагноза: абсолютные значения и доли (ОС-остеосаркома, ХС-хондросаркома, СЮ-саркома Юинга, ГКО-гигантоклеточная опухоль, НПС – недифференцированная плеоморфная саркома).

Самой частой локализацией опухоли являлись трубчатые кости, самой редкой – смешанные (рисунок 5). Среди трубчатых преобладали поражения бедренной, большеберцовой и плечевой костей (рисунок 6).

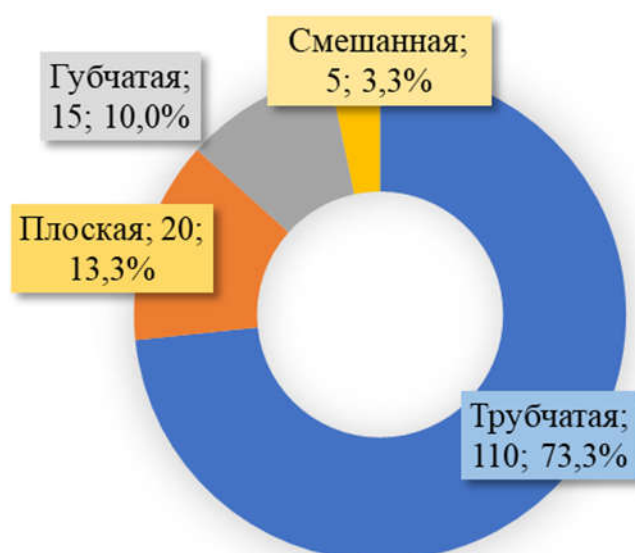


Рисунок 5 – Распределение пациентов с учетом типа пораженной опухолью кости: абсолютные значения и доли.

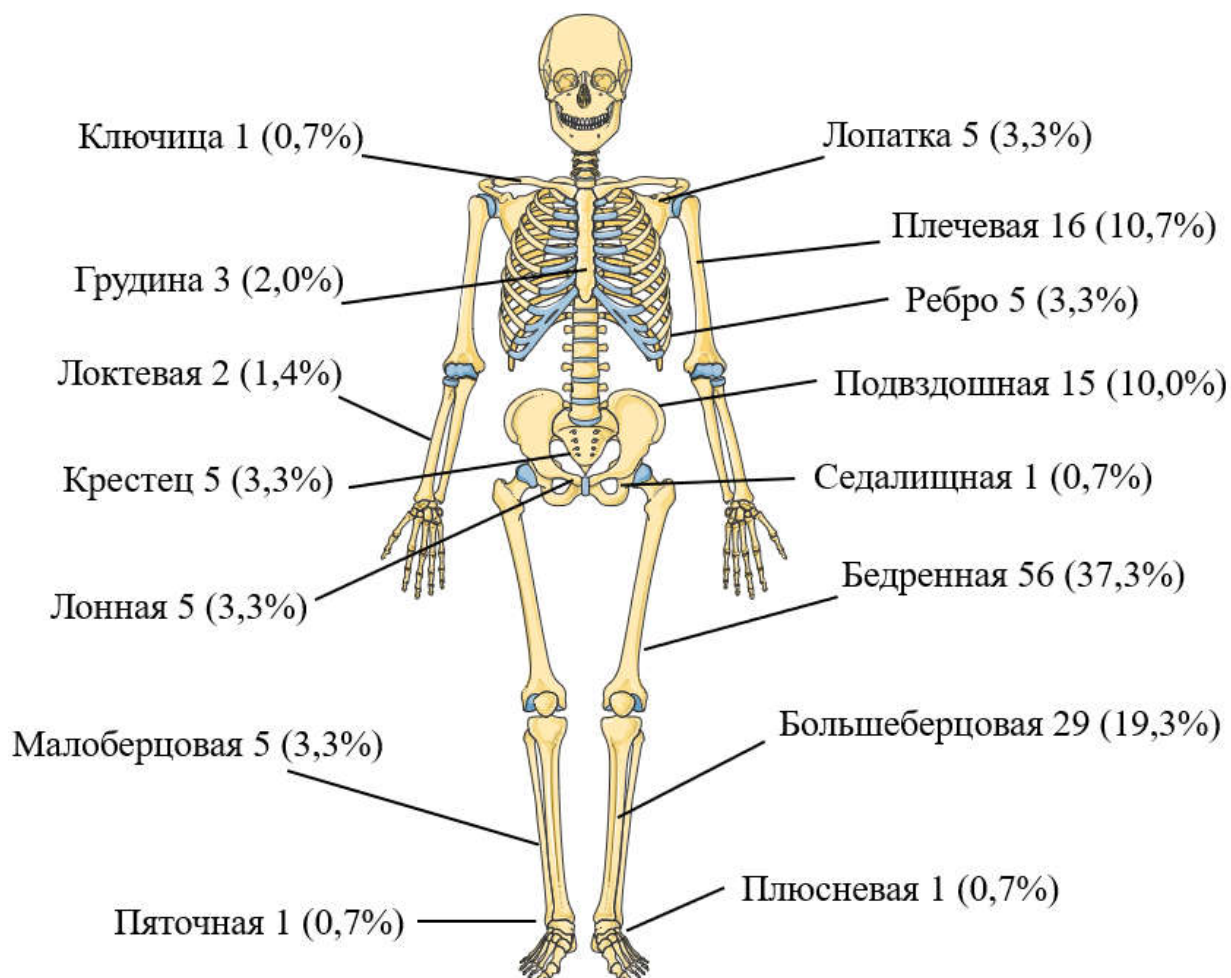


Рисунок 6 – Абсолютное и относительное число случаев поражения опухолью различных видов костей. Рисунок создан с использованием сервиса бесплатных медицинских изображений Servier Medical Art (smart.servier.com).

Более чем у половины пациентов опухоль локализовалась в нижней конечности – 92 случая (61,4%). Практически с одинаковой частотой встречалась локализация опухоли в верхней конечности и в области таза – 24 случая (16,0%) и 26 случаев (17,3%) соответственно. Реже всего были поражены кости грудной клетки – 8 случаев (5,3%), из них у трех пациентов опухоль локализовалась в груди (2,0%) и у пяти – в ребре (3,3%).

У всех 132 пациентов с саркомами костей была проведена оценка степени злокачественности, основанная на трехуровневой классификации, согласно которой Grade 1 (G1) считают низкой степенью злокачественности, а Grade 2 (G2)

и Grade 3 (G3) – высокой. 16 пациентов имели высокодифференцированную опухоль (с низкой степенью злокачественности) – Grade 1. У 30 больных установлена вторая степень злокачественности – Grade 2. Самая многочисленная группа пациентов с низкодифференцированными новообразованиями высокой степени злокачественности (Grade 3) насчитывала 86 человек (рисунок 7).

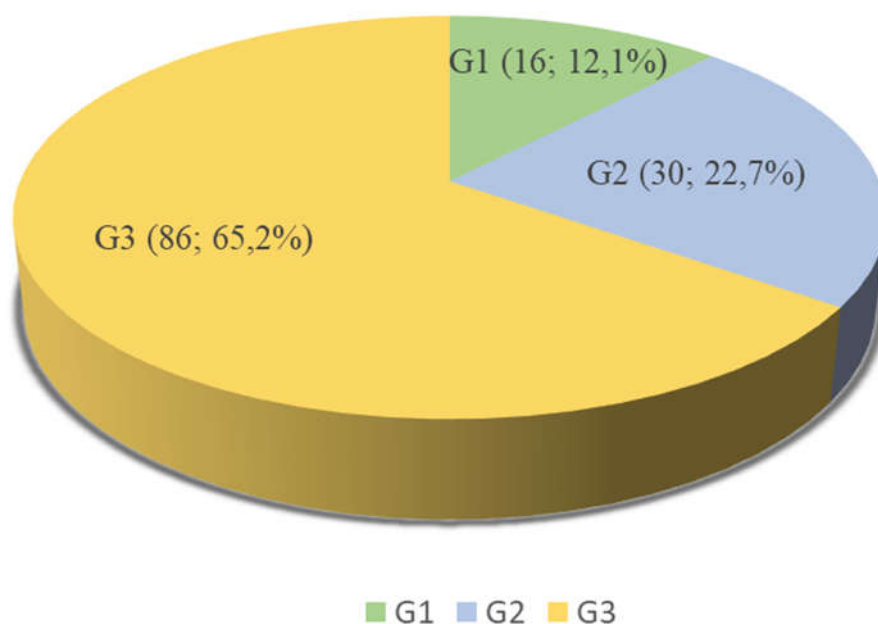


Рисунок 7 – Распределение пациентов с учетом степени злокачественности опухоли: G1 – низкая, G2 и G3 – высокая.

Клинико-морфологическая характеристика опухоли включала в себя наряду с определением морфологического варианта и степени злокачественности оценку по системе TNM. На основании двух последних параметров определяли стадию (Stage) опухолей костей, локализованных в грудной клетке, верхних и нижних конечностях. Среди больных саркомаами костей 26 человек имели опухоли костей таза, которые в соответствии с восьмым изданием классификации TNM не стадировали, а для определения критерия T учитывали не только максимальный размер опухоли, но и вовлечение в опухолевый процесс соседних тазовых сегментов. Подробная клинико-морфологическая характеристика обследуемых пациентов приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение пациентов с учетом морфологического варианта, TNM критериев, стадии и степени злокачественности.

Классификация опухоли			Гистологический тип опухоли				
Stage	TNM	Grade	ОС	НПС	СЮ	ХС	Всего (n/%)
IA	T1N0M0	low	4	0	0	2	6/4,5
IB	T2N0M0	low	8	0	3	5	16/12,1
IIA	T1N0M0	high	4	1	3	3	11/8,3
IIB	T2N0M0	high	29	3	13	12	57/43,2
III	T3N0M0	high	1	0	0	1	2/1,5
IVA	T1N0M1a	high	1	0	0	0	1/0,8
	T2N0M1a	high	6	0	1	3	10/7,6
IVB	T1N0M1b	high	0	0	1	0	1/0,8
	T2N0M1b	high	1	0	1	0	2/1,5
Опухоли костей таза (n=26)	T2aN0M0	low	0	0	0	2	2/1,5
	T2aN0M0	high	2	0	2	7	11/8,3
	T2aN0M1	high	2	0	1	0	3/2,3
	T2aN1M1	high	0	0	0	1	1/0,8
	T2bN0M0	high	0	0	2	3	5/3,7
	T3aN0M0	high	0	1	0	1	2/1,5
	T3aN1M1	high	0	0	1	0	1/0,8
	T3bN0M0	high	0	0	0	1	1/0,8
Всего (n/%)			58/43,9	5/3,8	28/21,2	41/31,1	132/100

Как следует из таблицы 2, в исследуемую группу вошли только два пациента с метастазами в регионарные лимфатические узлы.

На рисунке 8 показано распределение пациентов с злокачественными опухолями костей с учетом значения критерия Т по системе TNM.

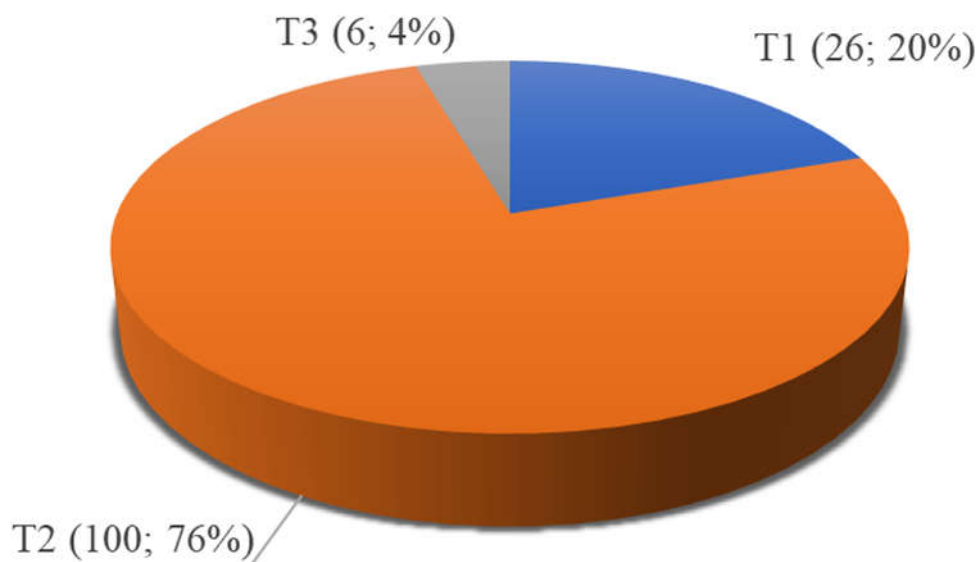


Рисунок 8 – Распределение больных саркомами костей в зависимости от критерия Т по системе TNM.

На момент взятия биоматериала отдаленные метастазы уже были выявлены у 19 больных, что составило 14,4% от всех пациентов с злокачественными опухолями (рисунок 9).



Рисунок 9 – Распределение пациентов с учетом выявления отдаленных метастазов на этапе включения в исследование.

2.2 Дизайн исследования

Проведено двухэтапное наблюдательное (обсервационное) аналитическое исследование. На первом этапе сравнивали исходные сывороточные уровни эндостатина у пациентов с опухолями костей до начала специфического противоопухолевого лечения (исследуемая группа) и у здоровых доноров (контрольная группа), оценивали корреляции с клиническими параметрами, сывороточными уровнями других факторов ангиогенеза, а также проводили сравнительный анализ клинической информативности эндостатина, VEGF, IGF-1, IGF-2. На втором этапе после анализа отдаленных результатов лечения оценивали влияние исходных сывороточных уровней эндостатина на показатели общей и безметастатической выживаемости и разрабатывали прогностическую модель с целью определения риска смерти на основании исходного сывороточного уровня эндостатина.

Критерии включения пациентов в исследование:

- 1) гистологически подтвержденное злокачественное или промежуточное новообразование кости;
- 2) подписанное добровольное информированное согласие на использование обезличенных медицинских данных в научных целях.

Критерий невключения: неоадьювантная химиотерапия, лучевая терапия или хирургическое лечение, начатое до взятия сыворотки для исследования. Критерий исключения: потеря связи и отсутствие информации об отдаленных результатах лечения для анализа выживаемости.

Отдаленные результаты лечения удалось проследить у 140 пациентов, которые находились под наблюдением от 1 до 231 месяца. Медиана периода прослеженности составила 30,0 мес (Q1-Q3: 12,5–181,5 мес). Таким образом, в статистический анализ показателей клинической информативности исследуемых маркеров вошли 150 пациентов, а в анализ прогностической значимости – 140 пациентов. Основные этапы исследования показаны на рисунке 10.

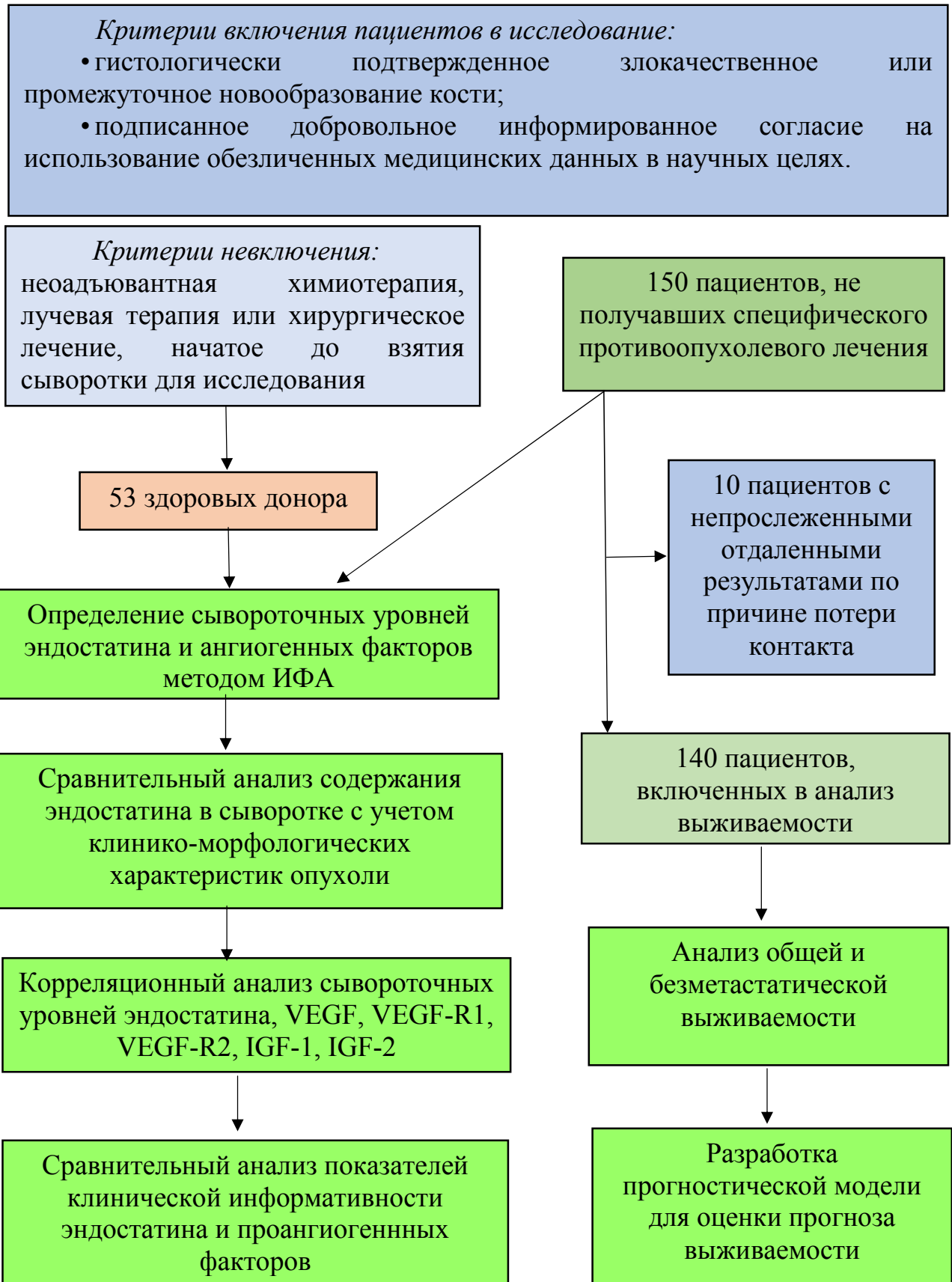


Рисунок 10 – Дизайн исследования.

2.3. Лабораторные методы исследования

Измерения сывороточных уровней эндостатина и других регуляторов ангиогенеза (VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-1, IGF-2) проводились с помощью гетерогенного (твердофазного) неконкурентного иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА, ELISA). В таблице 3 перечислены используемые наборы реактивов и фирмы-производители.

Таблица 3 – Наборы реагентов для определения факторов ангиогенеза в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

Показатель	Название набора реактивов	Фирма-производитель
Эндостатин	Human Endostatin Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, США
VEGF	Human VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, США
VEGF-R1	Human VEGFR1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, США
VEGF-R2	Human VEGFR2/KDR Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, США
IGF-1	DSL IGF-I ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories Inc., США
IGF-2	DSL IGF-II ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories Inc., США

Взятие образцов венозной крови у всех пациентов и здоровых доноров осуществлялось утром натощак с использованием вакуумных систем S-Monovette (Sarstedt, Германия). После взятия образцы цельной крови хранились в пробирке с активатором свертывания и гелем в течение 30 мин при комнатной температуре для образования сгустка. Затем образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут на центрифуге Rotina 380 (“Hettich Zentrifugen”, Германия),

аликвотировали по 0,5 мл в пробирки типа Eppendorf и хранили при температуре -80°C до проведения иммуноферментного анализа. Сывороточную концентрацию эндостатина, IGF-1, IGF-2 выражали в нг/мл, сывороточную концентрацию VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 – в пг/мл.

В соответствии с инструкцией производителя набора реагентов для определения эндостатина в сыворотке крови выполняли подготовку образцов, которая состояла в 50-кратном разбавлении (20 мкл образца сыворотки и 980 мкл растворителя калибратора). Подготовка реагентов включала в себя приготовление раствора промывочного буфера, раствора субстрата и стандартного раствора эндостатина концентрацией 100 нг/мл. Исходный стандартный раствор использовали для получения серии разведений: 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл и 0,313 нг/мл. Перед процедурой анализа все реагенты и пробы сыворотки крови доводили до комнатной температуры. 100 мкл разбавителя для анализа, а также по 50 мкл калибровочных стандартов и образцов добавляли в лунки микропланшета с предварительно нанесенным моноклональным антителом, специфичным к эндостатину, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После этого лунки четыре раза промывали промывочным буфером. Затем в каждую лунку добавляли конъюгат, повторно инкубировали в течение 2 часов, промывали, добавляли хромогенный раствор и проводили инкубацию еще 30 мин. После добавления стоп-раствора цвет в лунках изменялся с синего на желтый. Интенсивность цвета измеряли на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Принцип анализа сывороточных концентраций проангиогенных факторов (VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-1, IGF-2) был аналогичным. Моноклональное антитело, специфичное к соответствующему фактору роста, предварительно нанесено на планшет. В лунки пипетировали стандарты и образцы, содержащийся в них антиген связывался с иммобилизованным антителом. После вымывания всех несвязанных веществ в лунки добавляли связанное с ферментом поликлональное антитело, специфичное к данному фактору роста. После повторной промывки

добавляли раствор субстрата, вносили стоп-раствор и измеряли оптическую плотность на иммуноферментном анализаторе.

Для приготовления серии разведений исходный стандартный раствор VEGF концентрацией 2000 пг/мл последовательно разбавляли в два раза. Был получен следующий диапазон концентраций: 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 125 пг/мл, 62,5 пг/мл, 31,3 пг/мл. Процедура анализа отличалась от определения эндостатина только количеством вносимого в лунку образца (100 мкл вместо 50 мкл) и временем инкубации после добавления субстрата (25 мин).

В процессе подготовки реагентов для иммуноферментного определения VEGF-R1 готовили исходный стандартный раствор 20000 пг/мл и серию его разведений: 2000 пг/мл, 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 125 пг/мл, 62,5 пг/мл и 31,3 пг/мл. В лунку вносили по 100 мкл стандарта или исследуемого образца. Этапы анализа не отличались от измерения эндостатина.

Перед проведением анализа для определения VEGF-R2 образцы сыворотки 5-кратно разбавляли, готовили исходный стандартный раствор 50000 пг/мл и серию его разведений: 5000 пг/мл, 2500 пг/мл, 1250 пг/мл, 625 пг/мл, 313 пг/мл, 156 пг/мл, 78,1 пг/мл. В лунку вносили по 100 мкл стандарта или исследуемого образца.

Для определения инсулиноподобных факторов роста (IGF-1 и IGF-2) в лунки микропланшета, покрытые моноклональным антителом к IGF-1 и IGF-2 соответственно, вносили по 20 мкл предварительно разведенного образца сыворотки с последующим добавлением 100 мкл аналитического буфера и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После этого лунки промывали 5 раз промывочным буфером и добавляли 100 мкл конъюгата, инкубировали 30 мин и повторно промывали. Далее инкубировали 10 мин, добавив 100 мкл хромогенного раствора, добавляли стоп-раствор и измеряли оптическую плотность.

Основные этапы лабораторных методов исследования представлены на рисунке 11.

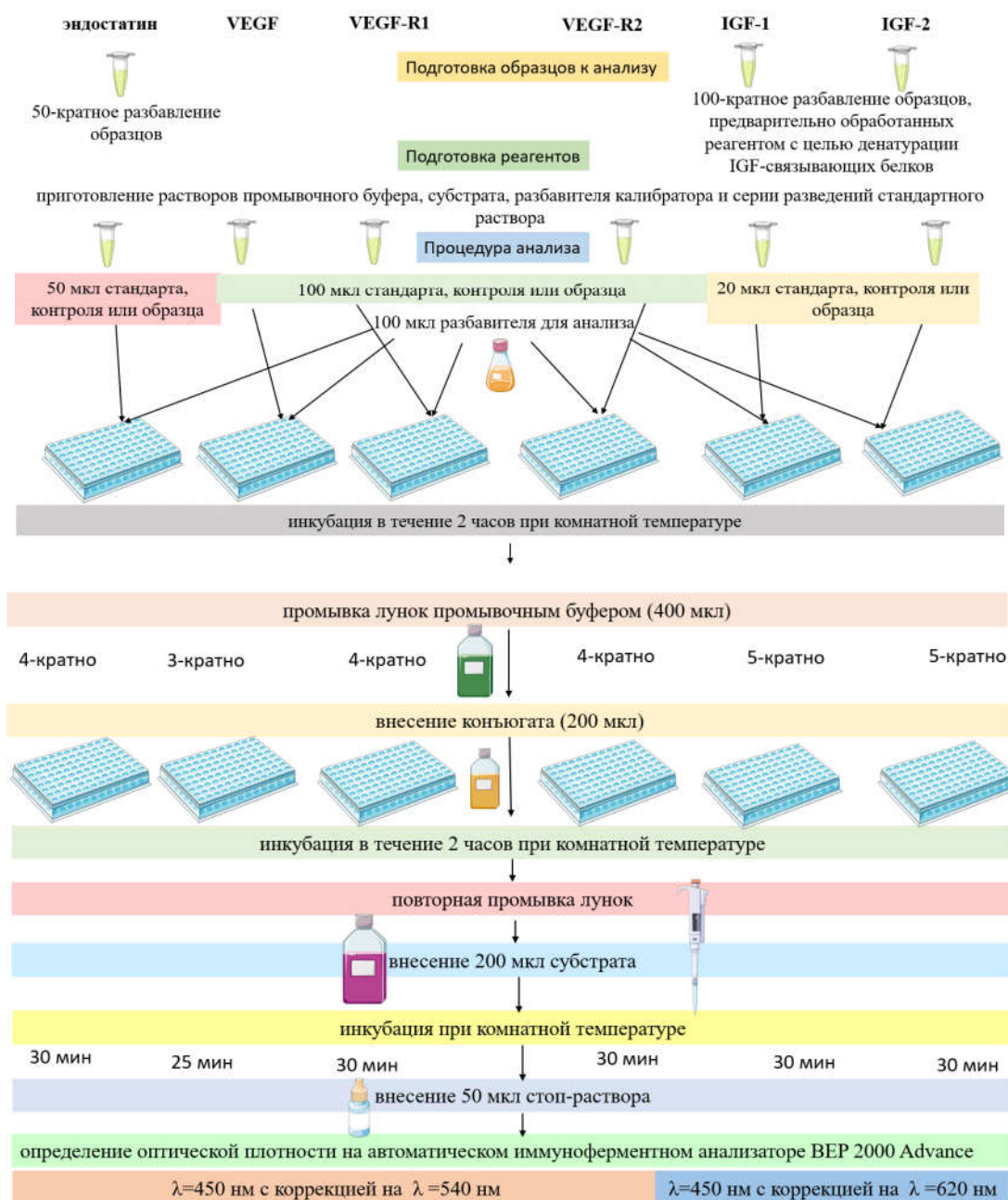


Рисунок 11 – Схема основных этапов лабораторных исследований. Рисунок создан с использованием сервиса бесплатных медицинских изображений Servier Medical Art (smart.servier.com)

2.3. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проведен с использованием программного обеспечения IBM SPSS v.26.0, Medcalc 10.0 и Microsoft Excel 2010 (США). Объем выборки для основной и контрольной группы был рассчитан с помощью программы G*Power 3.1.9.7. Перед сравнительным анализом количественных переменных в исследуемых группах проверялось соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Поскольку распределение данных имело отличия от нормального, количественные показатели были представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me — медиана, Q1 — первый квартиль (25%), а Q3 — третий квартиль (75%). Для оценки статистической значимости различий между сравниваемыми количественными показателями в двух группах использовался U-критерий Манна–Уитни. Для трех и более групп применялся непараметрический аналог дисперсионного анализа — критерий Краскела-Уоллиса с апостериорными парными сравнениями, для которых использовался критерий Данна с поправкой Бонферрони. Для сравнения качественных и порядковых переменных применяли критерий Пирсона χ^2 и точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Силу связи определяли по шкале Чеддока. Зависимость сывороточного уровня эндостатина от клинико-морфологических характеристик опухоли оценивали методом парной линейной регрессии. С целью определения диагностической чувствительности и специфичности эндостатина и других факторов ангиогенеза проведен ROC-анализ с определением пороговых значений. Показатели клинической информативности рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора оценки диагностических тестов Medcalc. Для расчета общей и безметастатической выживаемости строили таблицы дожития и кривые Каплана-Майера. Влияние каждого из исследуемых ангиогенных факторов на общую выживаемость оценивали с помощью longrank критерия Мантеля–Кокса. Для этого выполняли перевод количественных показателей результатов измерения сывороточных концентраций определяемых

маркеров в категориальные с использованием медианы и квартилей. С целью выявления предикторов выживаемости использовали регрессионную модель пропорциональных рисков Кокса с определением статистической значимости (p), отношения рисков (hazard ratio, HR) и доверительных интервалов (95% ДИ). Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Содержание эндостатина в сыворотке крови больных первичными новообразованиями костей

Определили концентрации эндостатина в сыворотке крови пациентов с новообразованиями костей и здоровых доноров. Учитывая распределение данных, отличное от нормального, для описания результатов использовали медиану и квартили. Сывороточный уровень эндостатина у пациентов с опухолями костей статистически значимо повышен по сравнению с контрольной группой и характеризуется большей вариабельностью (рисунок 12).

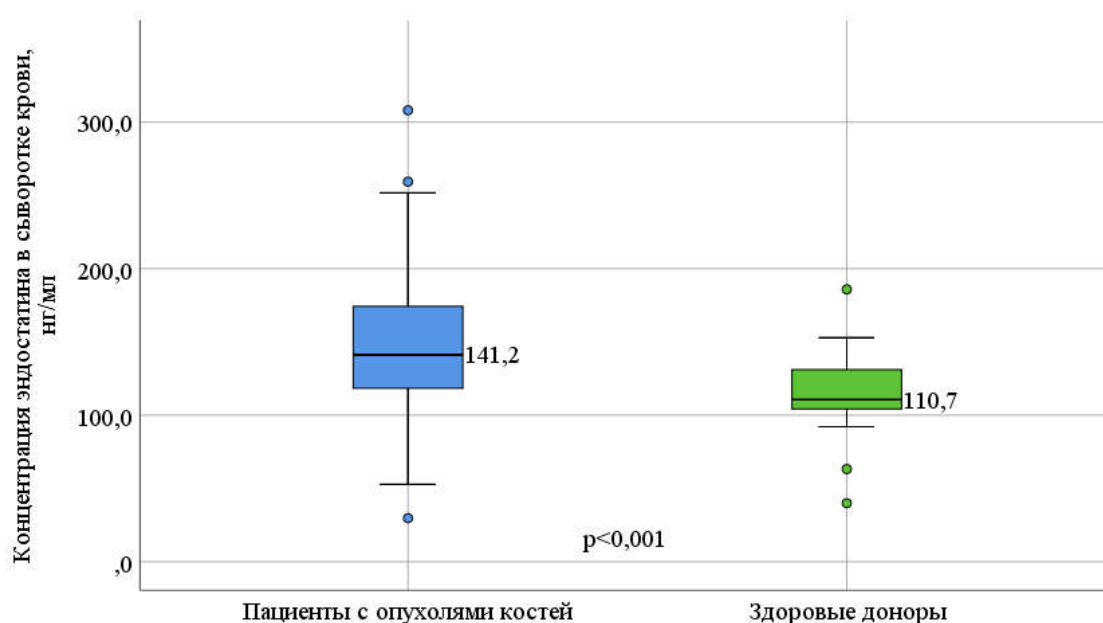


Рисунок 12 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и общей группы пациентов с опухолями костей

Не выявили статистически значимых различий по сывороточному уровню эндостатина между мужчинами и женщинами как в исследуемой, так и в контрольной группе. Однако содержание эндостатина в сыворотке у больных мужчин было статистически значимо выше, чем у здоровых лиц мужского пола. Группы больных и здоровых женщин статистически значимо не отличались между собой (таблица 4).

Таблица 4 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови пациентов и здоровых доноров с учетом их пола

№ п/п	Группы	Пол	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
				Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Пациенты с опухолями костей	жен	56	141,0	115,9 – 160,3	81,7	308,1	$p_{1-2}=0,362$ $p_{1-3}=0,081$ $p_{1-4}=0,019^*$
2		муж	94	141,8	118,6 – 186,5	29,7	259,4	$p_{1-2}=0,362$ $p_{2-3}=0,013^*$ $p_{2-4}=0,001^*$
3	Здоровые доноры	жен	12	114,3	105,4 – 125,7	95,6	152,8	$p_{1-3}=0,081$ $p_{2-3}=0,013^*$ $p_{3-4}=0,933$
4		муж	21	110,1	98,1 – 131,0	39,9	185,8	$p_{1-4}=0,019^*$ $p_{2-4}=0,001^*$ $p_{3-4}=0,933$

* различия между группами статистически значимы

При сравнении подгрупп, выделенных по полу внутри исследуемой и контрольной группы, у мужчин значения сывороточного уровня эндостатина колебались в более широком диапазоне, чем у женщин. Так, у мужчин с опухолями костей интерквартильный размах составил 68,1 нг/мл, а у женщин – 45,0 нг/мл. В контрольной группе интерквартильный размах у мужчин равнялся 38,5 нг/мл, у женщин – 25,1 нг/мл (рисунок 13).

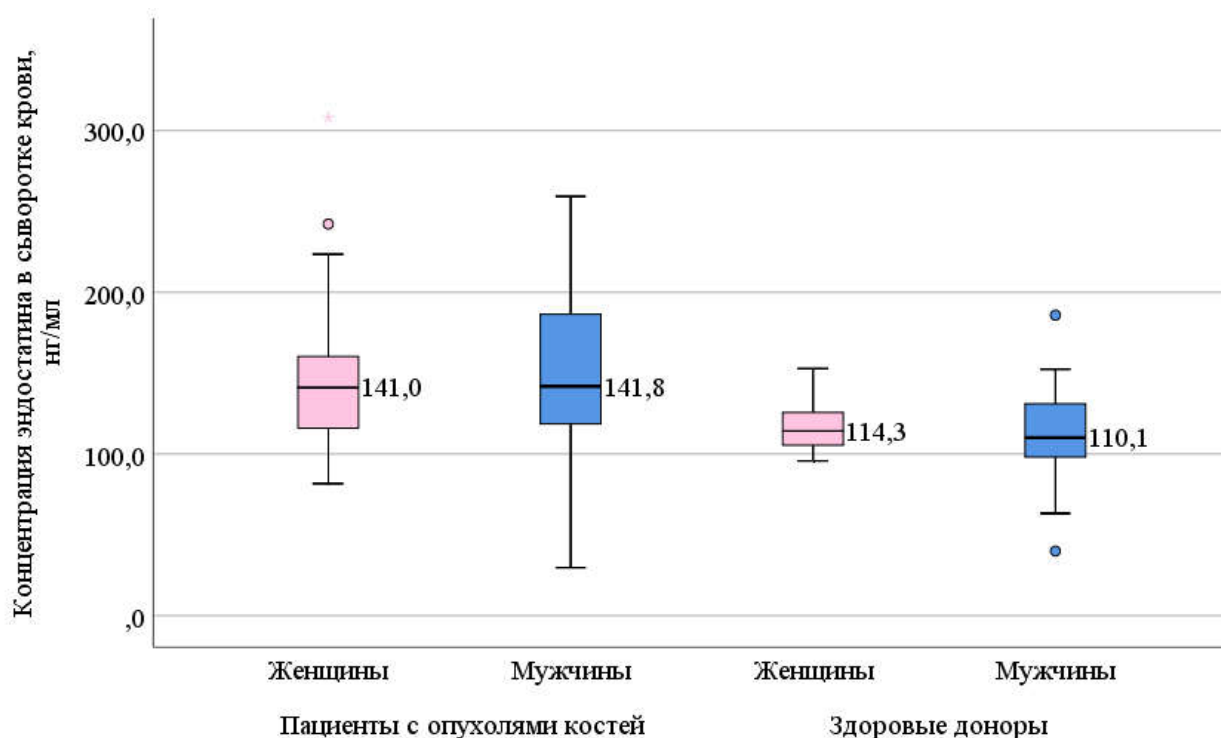


Рисунок 13 – Сывороточные уровни эндостатина у пациентов и здоровых доноров с учетом их пола.

Внутри исследуемой и контрольной группы выделили подгруппы лиц младше 18 лет. В них вошли соответственно 34 пациента и 8 здоровых доноров. При сравнении сывороточных уровней эндостатина у детей полученные медианы статистически значимо не отличались от таковых в общей исследуемой и контрольной группе и равнялись 140,8 нг/мл (Q1-Q3: 122,5 – 164,5 нг/мл) у детей с опухолями костей и 110,5 нг/мл (Q1-Q3: 78,9 – 135,7 нг/мл) у здоровых детей.

Содержание эндостатина в сыворотке здоровых взрослых было статистически значимо ниже, чем в сыворотке больных взрослых и больных детей ($p=0,001$ и $p=0,005$ соответственно). Однако сывороточные концентрации эндостатина у здоровых детей статистически значимо не отличались от таковых у больных взрослых и больных детей (таблица 5). Уровни значимости составили $p=0,118$ и $p=0,168$ соответственно. Вероятно, это объясняется низкой численностью детей в контрольной группе.

Таблица 5 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови пациентов и здоровых доноров с учетом их возрастной категории

№ п/п	Группы	Возрастн ая категория	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
				Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Пациенты с опухолями костей	дети	34	140,8	122,5 – 164,5	81,7	259,4	$p_{1-2}=1,000$ $p_{1-3}=0,168$ $p_{1-4}=0,005^*$
2		взрослые	116	141,8	117,6 – 175,2	29,7	308,1	$p_{1-2}=1,000$ $p_{2-3}=0,118$ $p_{2-4}=0,001^*$
3	Здоровые доноры	дети	8	110,5	78,9 – 135,7	39,9	185,8	$p_{1-3}=0,168$ $p_{2-3}=0,118$ $p_{3-4}=1,000$
4		взрослые	25	110,7	105,1 – 126,6	92,1	152,8	$p_{1-4}=0,005^*$ $p_{2-4}=0,001^*$ $p_{3-4}=1,000$

* различия между группами статистически значимы.

На следующем этапе сравнили сывороточные концентрации эндостатина у пациентов с промежуточными и злокачественными новообразованиями костей. Результаты показали статистически значимое повышение уровня эндостатина в обеих подгруппах пациентов по сравнению с контрольной группой. Однако различия между больными в зависимости от потенциала злокачественности новообразования не были статистически значимыми (рисунок 14).

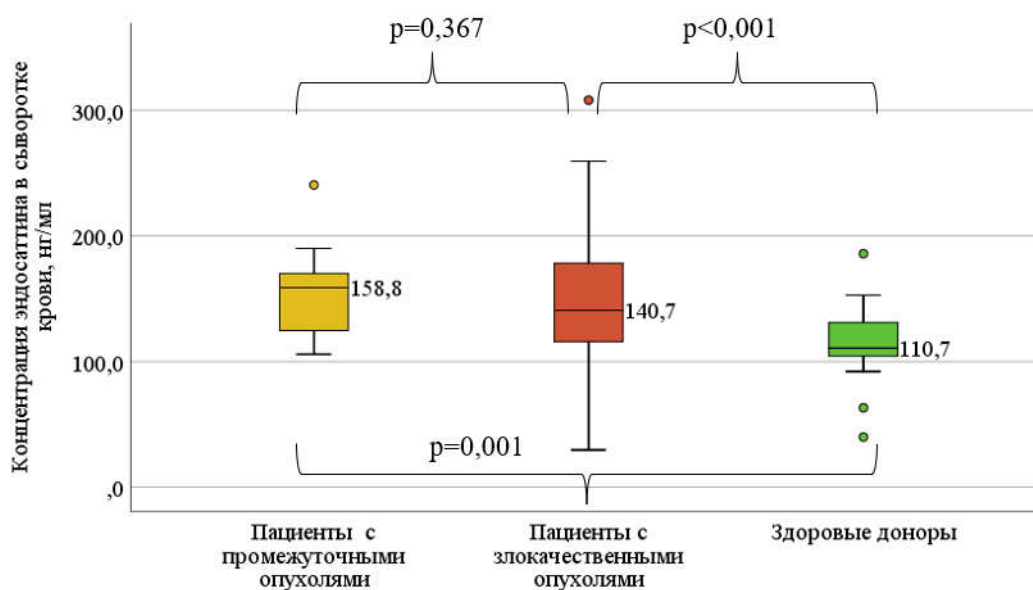


Рисунок 14 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями костей в зависимости от потенциала злокачественности новообразования.

Провели сравнительный анализ сывороточных уровней эндостатина у детей и взрослых с злокачественными опухолями костей (число обследуемых в каждой подгруппе составило 33 и 99 пациентов соответственно). Содержание эндостатина в сыворотке в этих возрастных подгруппах статистически значимо не отличалось ($p=0,912$). Медиана в подгруппе детей с саркомами костей равнялась 140,5 нг/мл (Q1-Q3: 122,5 – 160,1 нг/мл), в подгруппе взрослых – 140,8 нг/мл (Q1-Q3: 114,2 – 178,3 нг/мл).

Не обнаружены статистически значимые различия по содержанию эндостатина в сыворотке между мужчинами и женщинами, а также мальчиками и девочками с саркомами костей ($p=0,363$), несмотря на то что медиана сывороточной концентрации эндостатина у девочек оказалась ниже, чем в остальных подгруппах (таблица 6).

Среди мужчин и женщин с промежуточными опухолями костей также не обнаружены статистически значимые различия в сывороточных концентрациях эндостатина ($p=0,436$). В подгруппе пациентов с промежуточными

новообразованиями был только один ребенок, поэтому сравнения по возрастным категориям не проводились.

Таблица 6 – Концентрация эндостатина в сыворотке больных саркомами костей в зависимости от пола и возраста

№ п/п	Возрастная группа	Пол	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл			
				Me	Q25 – Q75	Min	Max
1	Дети	жен	9	130,8	110,1 – 142,8	81,7	155,1
2		муж	24	140,7	128,5 – 192,8	101,6	259,4
3	Взрослые	жен	38	141,0	115,0 – 173,9	82,7	308,1
4		муж	61	140,2	113,5 – 181,2	29,7	251,7

3.2. Сывороточные уровни эндостатина в группах пациентов с различными клинико-морфологическими характеристиками опухоли

В качестве клинико-морфологических характеристик опухоли, которые могут оказывать влияние на сывороточный уровень эндостатина, рассматривали следующие: морфологический вариант опухоли, критерии классификации TNM, степень злокачественности, стадию и расположение опухоли, тип пораженной кости.

При сравнении уровней эндостатина в сыворотке крови в подгруппах пациентов, выделенных на основании морфологического варианта опухоли, наибольшая медиана получена в группе больных недифференцированной плеоморфной саркомой, а наименьшая – в группе больных остеосаркомой (рисунок 15). Для этой подгруппы также характерна наибольшая амплитуда значений, что, вероятно, связано с большим числом пациентов (n=58), поскольку остеосаркома является самой распространенной опухолью кости как в общей популяции населения, так и в нашей исследуемой группе.

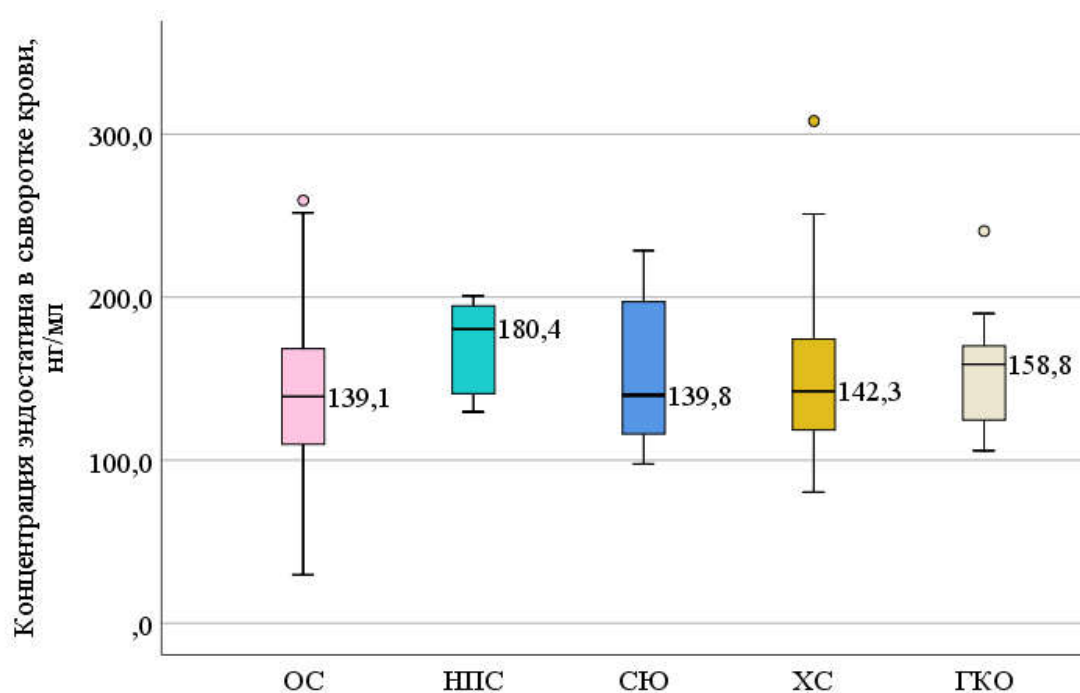


Рисунок 15 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови больных опухолями костей в зависимости от морфологического варианта опухоли (ОС-остеосаркома, НПС - недифференцированная плеоморфная саркома, СЮ-саркома Юинга, ХС-хондросаркома, ГКО-гигантоклеточная опухоль).

С целью оценки различий сывороточных концентраций эндостатина в зависимости от гистологического типа опухоли применяли непараметрический аналог дисперсионного анализа – критерий Краскела-Уоллиса. Статистически значимые отличия от группы здоровых доноров наблюдались в каждой подгруппе, кроме пациентов с недифференцированной плеоморфной саркомой. Между собой исследуемые подгруппы больных статистически значимо не отличались (таблица 7).

Следует отметить проблему множественности сравнений нескольких подгрупп пациентов с различными гистологическими типами опухоли, что приводит к необходимости коррекции подхода к оценке значимости. При статистической обработке результатов с этой целью применялся критерий Данна с поправкой Бонферрони, которая снижает вероятность выявления реально существующих различий.

Таблица 7 – Концентрации эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов с различными морфологическими вариантами опухоли.

№ п/п	Морфологический вариант опухоли	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
			Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Остеосаркома	58	139,1	109,7 – 168,4	29,7	259,4	$p_{1-2}=0,157$ $p_{1-3}=0,460$
2	Недифференциро- ванная плеоморфная саркома	5	180,4	140,8 – 194,6	129,7	200,7	$p_{1-4}=0,524$ $p_{1-5}=0,224$ $p_{1-6}=0,011^*$ $p_{2-3}=0,313$
3	Саркома Юинга	28	139,8	116,1 – 197,1	97,7	228,5	$p_{2-4}=0,263$ $p_{2-5}=0,511$
4	Хондросаркома	41	142,3	118,6 – 174,3	80,4	308,1	$p_{2-6}=0,055$ $p_{3-4}=0,871$
5	Гигантоклеточная опухоль	18	158,8	124,6 – 170,1	105,9	240,6	$p_{3-5}=0,601$ $p_{3-6}=0,006^*$
6	Здоровые доноры	33	110,7	104,3 – 131,0	39,9	185,8	$p_{4-5}=0,484$ $p_{4-6}=0,003^*$ $p_{5-6}=0,004^*$

* различия между группами статистически значимы

При сравнении медиан сывороточных концентраций эндостатина в подгруппах пациентов с саркомами костей в зависимости от критерия T по системе TNM установили, что с увеличением значения критерия T медиана концентраций эндостатина в сыворотке увеличивается (рисунок 16). Однако выявленные различия между подгруппами пациентов не были статистически значимыми ($p=0,176$). Только в подгруппе больных с критерием T2 медиана

сывороточной концентрации эндостатина статистически значимо превышала медиану в контрольной группе (таблица 8).

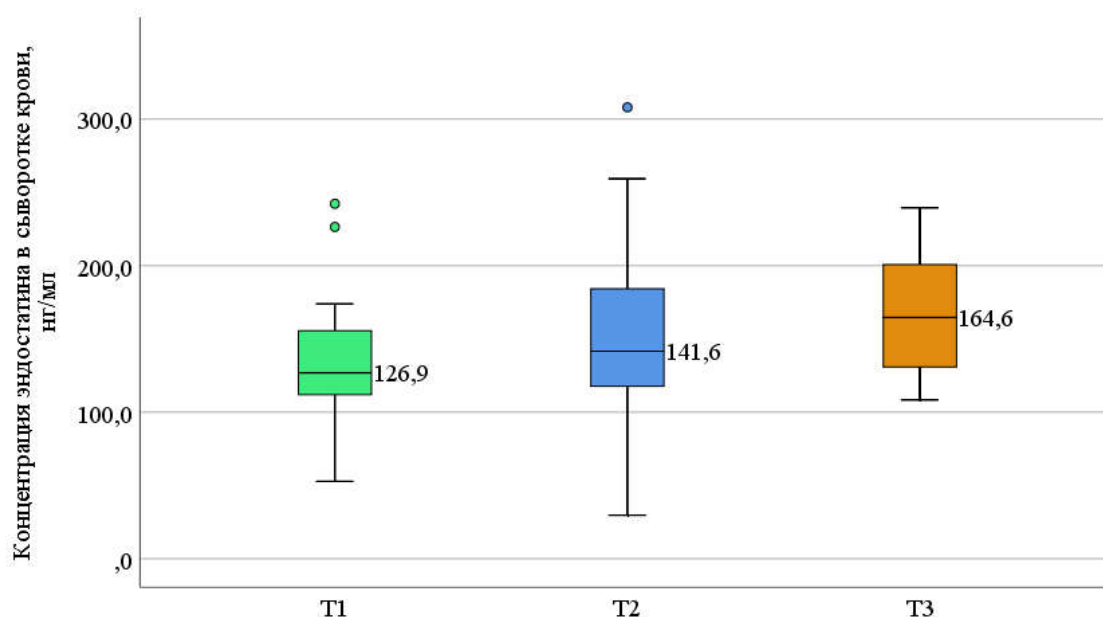


Рисунок 16 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови больных саркомами костей в зависимости от критерия Т по системе TNM.

Таблица 8 – Содержание эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов с саркомами костей в зависимости от критерия Т по системе TNM.

№ п/п	Значение критерия Т	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
			Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	T1	26	126,9	111,9 – 155,6	52,8	242,3	$p_{1-2}=0,641$
2	T2	100	141,6	117,7 – 184,3	29,7	308,1	$p_{1-3}=1,000$
3	T3	6	164,6	130,8 – 200,7	108,4	239,5	$p_{1-4}=0,274$
4	Здоровые доноры	33	110,7	104,3 – 131,0	39,9	185,8	$p_{2-3}=1,000$ $p_{2-4}<0,001^*$ $p_{3-4}=0,069$

* различия между группами статистически значимы.

Поскольку в исследуемую группу вошли только два пациента с метастазами в регионарные лимфоузлы (N1), сравнение подгрупп по критерию N не проводили. В зависимости от наличия или отсутствия отдаленных метастазов на момент включения в исследование выделили две подгруппы больных саркомаами костей. Не обнаружили статистически значимых отличий по сывороточному уровню эндостатина между пациентами, имеющими отдаленные метастазы и пациентами без метастазов (рисунок 17).

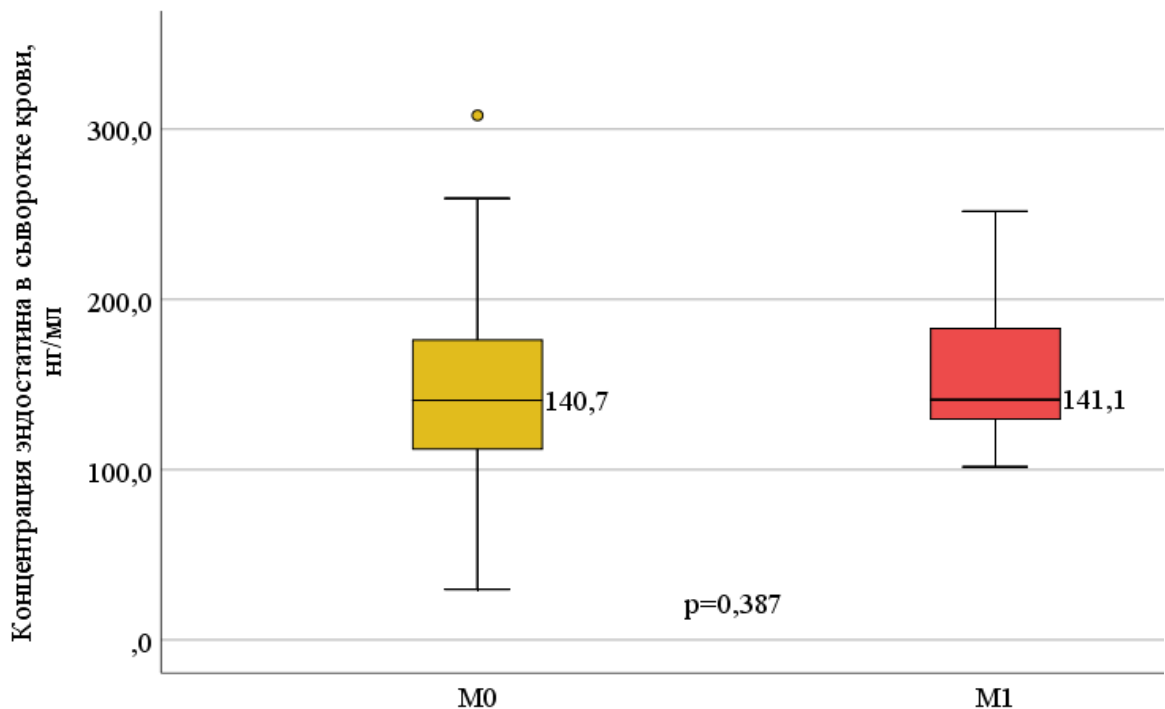


Рисунок 17 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови больных саркомаами костей в зависимости от критерия M по системе TNM.

Медианы сывороточных концентраций эндостатина в подгруппах пациентов с различными стадиями опухолевого процесса статистически значимо не отличались ($p=0,084$), попарные сравнения между выделенными подгруппами не проводились. Однако, как показано на рисунке 18, для больных с IA, IB и IIA стадиями характерны более низкие уровни эндостатина в сыворотке крови, чем для пациентов со стадиями IIB, III, IVA и IVB. Самое высокое значение медианы отмечалось именно при IVB стадии, для которой характерно наличие отдаленных метастазов не только в легких, но и других органах.

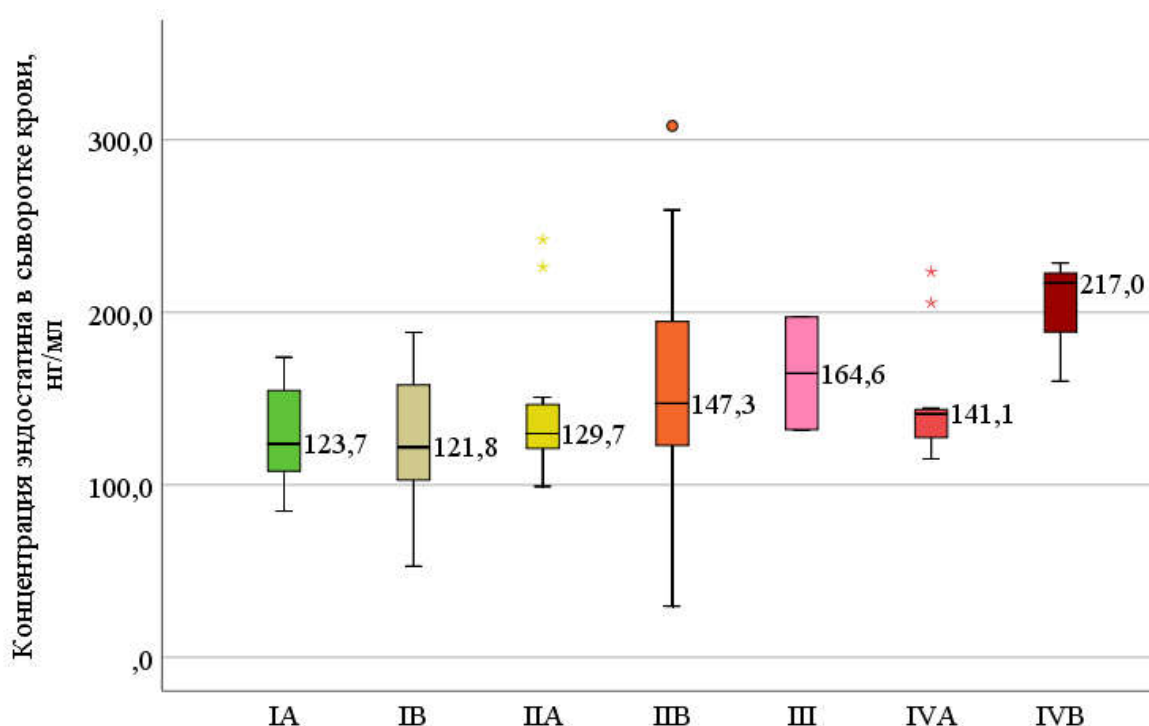


Рисунок 18 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови больных саркомами костей в зависимости от стадии опухолевого процесса.

При сравнении сывороточных концентраций эндостатина у больных в зависимости от степени дифференцировки опухоли наименьшее значение медианы было получено у пациентов с высокодифференцированными новообразованиями костей (рисунок 19). Этот показатель составил 127,6 нг/мл и статистически значимо не отличался от медианы в контрольной группе (110,7 нг/мл). Также не обнаружены различия между тремя подгруппами пациентов в зависимости от степени дифференцировки опухоли ($p=0,329$), но у больных с умеренно и низко дифференцированными опухолями наблюдались статистически значимые отличия от здоровых доноров (таблица 9).

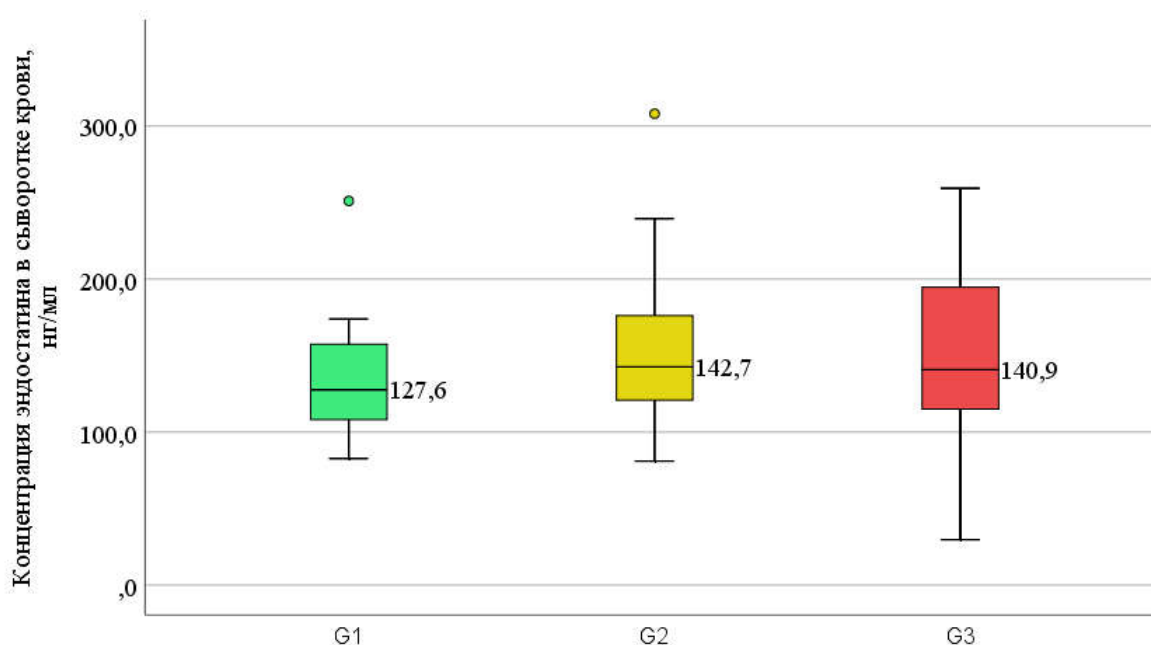


Рисунок 19 – Сывороточные концентрации эндостатина у больных саркомами костей в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Таблица 9 – Сывороточные уровни эндостатина у здоровых доноров и в подгруппах пациентов с саркомами костей, выделенных в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

№ п/п	Степень дифференцировки	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
			Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Grade 1	16	127,6	108,1 – 157,4	82,7	251,0	$p_{1-2}=0,925$ $p_{1-3}=1,000$ $p_{1-4}=0,684$ $p_{2-3}=1,000$ $p_{2-4}=0,002^*$ $p_{3-4}<0,001^*$
2	Grade 2	30	142,7	120,9 – 176,1	81,0	308,1	
3	Grade 3	86	140,9	115,0 – 194,6	29,7	259,4	
4	Здоровые доноры	33	110,7	104,3 – 131,0	39,9	185,8	

* различия между группами статистически значимы.

Провели сравнительный анализ содержания эндостатина в сыворотке крови в подгруппах пациентов в зависимости от локализации опухоли (верхние конечности, грудная клетка, таз, нижние конечности), результаты которого графически представлены на рисунке 20.

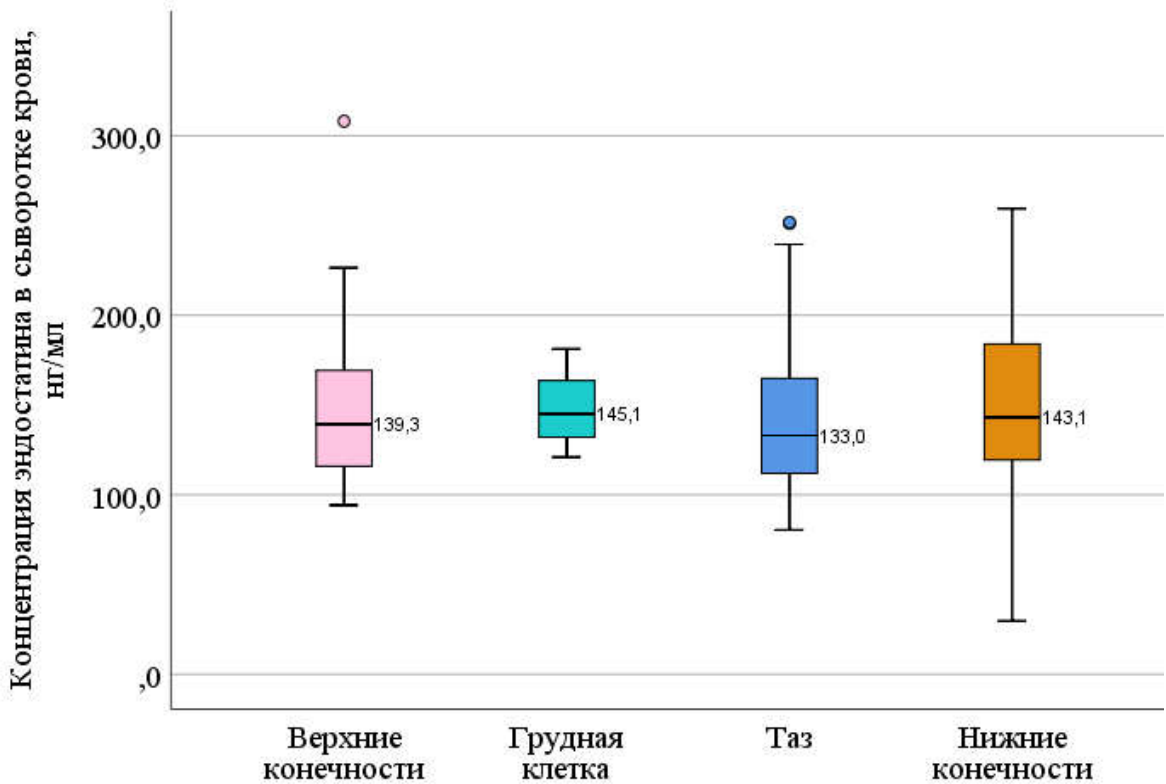


Рисунок 20 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолью костей в зависимости от локализации опухоли.

Не выявлено статистически значимых различий в сывороточных уровнях эндостатина у пациентов в зависимости от локализации опухоли ($p=0,605$). Только при поражении костей верхних и нижних конечностей содержание эндостатина в сыворотке крови статистически значимо отличалось от содержания у здоровых доноров. При локализации новообразования в костях таза и грудной клетки различия с контрольной группой не были статистически значимыми (таблица 10).

Таблица 10 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями костей в зависимости от локализации опухоли.

№ п/п	Локализация опухоли	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
			Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Верхняя конечность	24	139,3	115,9 – 169,3	94,2	308,1	p ₁₋₂ =0,568 p ₁₋₃ =0,540 p ₁₋₄ =0,637 p ₁₋₅ =0,024*
2	Грудная клетка	8	145,1	132,1 – 163,6	120,9	181,2	p ₁₋₂ =0,568 p ₂₋₃ =0,315 p ₂₋₄ =0,735 p ₂₋₅ =0,079
3	Таз	26	133,3	112,0 – 164,9	80,4	251,7	p ₁₋₃ =0,540 p ₂₋₃ =0,315 p ₃₋₄ =0,205 p ₃₋₅ =0,145
4	Нижняя конечность	92	143,1	119,3 – 184,1	29,7	259,4	p ₁₋₄ =0,637 p ₂₋₄ =0,735 p ₃₋₄ =0,205 p ₄₋₅ <0,001*
5	Здоровые доноры	33	110,7	104,3 – 131,0	39,9	185,8	p ₁₋₅ =0,024* p ₂₋₅ =0,079 p ₃₋₅ =0,145 p ₄₋₅ <0,001*

* различия между группами статистически значимы.

Сравнение сывороточных уровней эндостатина в подгруппах пациентов, выделенных с учетом расположения опухоли в определенной кости (плечевая, локтевая и т.д.) не проводилось ввиду большого количества малочисленных подгрупп, попарное множественное сравнение которых затруднено.

Самые высокие медианы сывороточных концентраций эндостатина зарегистрированы у пациентов с поражением трубчатых и губчатых костей: 143,1 нг/мл и 146,8 нг/мл соответственно (рисунок 21). В этих двух группах отличия от контрольной группы были статистически значимы. При поражении плоских и смешанных костей статистически значимые отличия от группы здоровых доноров не обнаружены так же, как и при сравнении между собой всех четырех подгрупп пациентов с поражением различных типов костей (таблица 11).

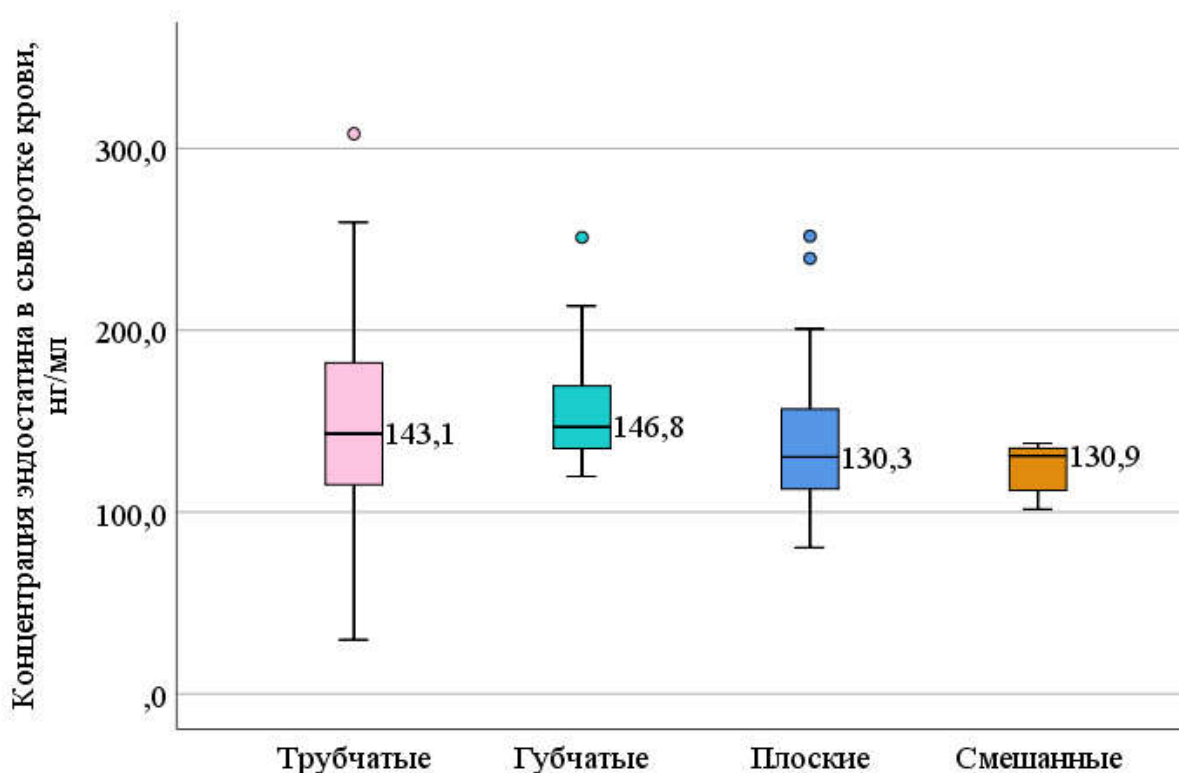


Рисунок 21 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями костей в зависимости от типа пораженной кости.

Таблица 11 – Концентрация эндостатина в сыворотке крови здоровых доноров и больных опухолями костей в зависимости от типа пораженной кости

№ п/п	Тип пораженной кости	N	Концентрация эндостатина в сыворотке крови, нг/мл				
			Me	Q25 – Q75	Min	Max	p
1	Трубчатая	110	143,1	115,0– 182,1	29,7	308,1	p ₁₋₂ =0,422 p ₁₋₃ =0,153 p ₁₋₄ =0,144 p ₁₋₅ <0,001*
2	Губчатая	15	146,8	135,0 – 169,4	119,6	251,0	p ₁₋₂ =0,422 p ₂₋₃ =0,096 p ₂₋₄ =0,085 p ₂₋₅ =0,003*
3	Плоская	20	130,3	112,6 – 156,7	80,4	251,7	p ₁₋₃ =0,153 p ₂₋₃ =0,096 p ₃₋₄ =0,520 p ₃₋₅ =0,472
4	Смешанная	5	130,9	112,0 – 135,1	101,6	137,8	p ₁₋₄ =0,144 p ₂₋₄ =0,085 p ₃₋₄ =0,520 p ₄₋₅ =0,615
5	Здоровые доноры	33	110,7	104,3 – 131,0	39,9	185,8	p ₁₋₅ <0,001* p ₂₋₅ =0,003* p ₃₋₅ =0,472 p ₄₋₅ =0,615

* различия между группами статистически значимы.

3.3. Оценка связи сывороточных концентраций эндостатина с клинико-морфологическими параметрами и проангиогенными факторами

С помощью корреляционного анализа оценили связи между содержанием эндостатина в сыворотке крови больных опухолями костей и клинико-морфологическими характеристиками опухоли, а именно: размером опухоли, критерием Т по системе TNM, степенью дифференцировки (G), стадией опухолевого процесса, а также возрастом пациентов. Учитывая отсутствие нормального распределения данных и включение в анализ порядковых переменных, корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Установлено, что концентрация эндостатина в сыворотке статистически значимо коррелирует с возрастом, размером опухоли и стадией опухолевого процесса.

Выявленная прямая корреляционная связь между возрастом и содержанием эндостатина в сыворотке крови имела слабую тесноту по шкале Чеддока (коэффициент корреляции Спирмена $\rho=0,160$, $p=0,031$), что наглядно демонстрирует диаграмма рассеяния (рисунок 22).

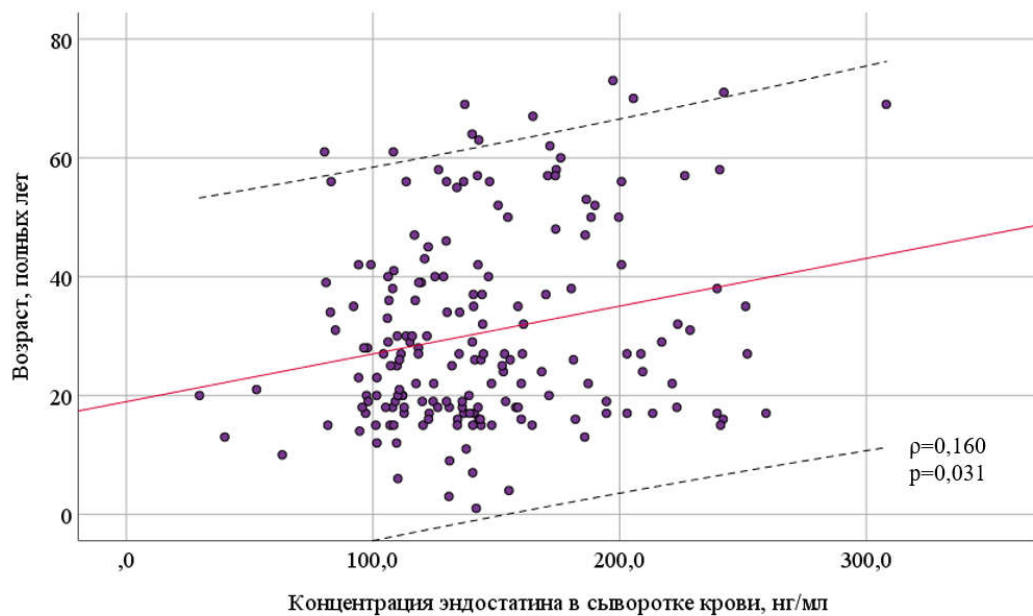


Рисунок 22 – Корреляционная связь между возрастом и содержанием эндостатина в сыворотке крови

По результатам регрессионного анализа, наблюдаемая зависимость описывается уравнением:

$$Y_{\text{эндост}} = 124,814 + 0,618 * X_{\text{возраст}} \quad (1),$$

где $Y_{\text{эндост}}$ – концентрация эндостатина в сыворотке крови (нг/мл),

$X_{\text{возраст}}$ – возраст (полных лет).

Таким образом, при увеличении возраста на 1 год следует ожидать увеличения концентрации эндостатина в сыворотке на 0,618 нг/мл. Исходя из значения коэффициента детерминации, модель (1) учитывает 5,0% факторов, определяющих изменение концентрации эндостатина в сыворотке крови, т.е. влияние возраста статистически значимое, но довольно слабое.

Корреляционная связь между размером опухоли и сывороточным уровнем эндостатина – прямая, слабая по шкале Чеддока, статистически значимая ($\rho=0,288$, $p=0,007$) (рисунок 23).

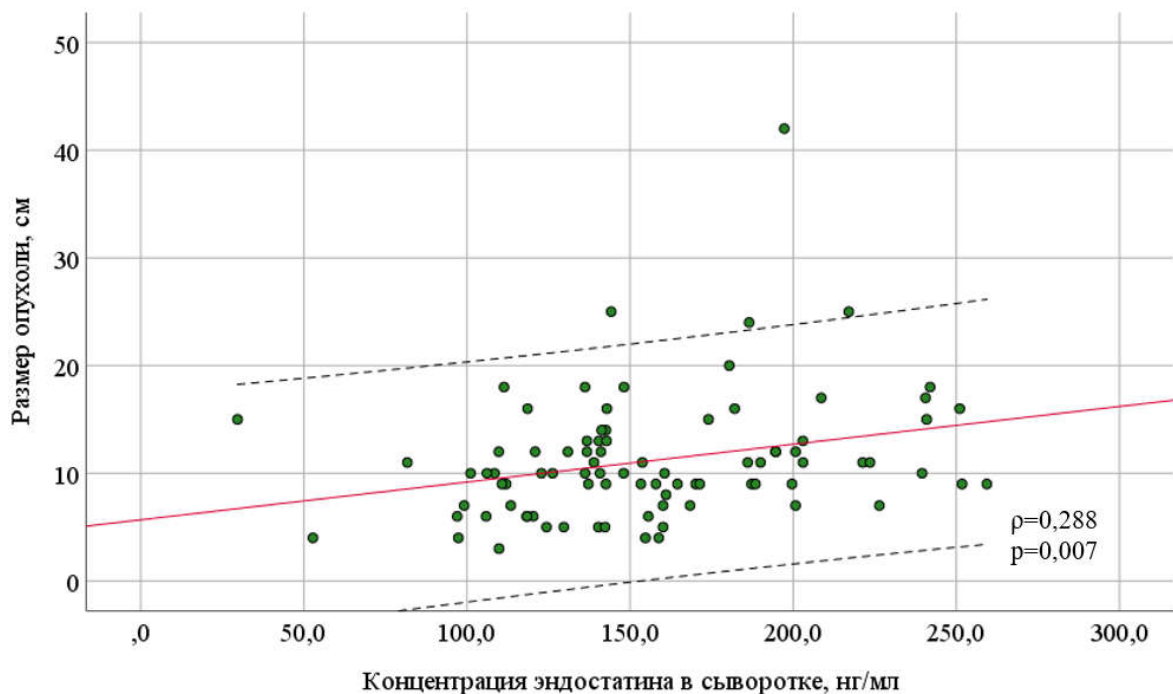


Рисунок 23 – Корреляционная связь между размером опухоли и концентрацией эндостатина в сыворотке крови

Зависимость концентрации эндостатина от размера опухоли описывается уравнением:

$$Y_{\text{эндост}} = 131,232 + 2,245 * X_{\text{размер}} \quad (2),$$

где $Y_{\text{эндост}}$ – концентрация эндостатина в сыворотке крови (нг/мл),

$X_{\text{размер}}$ – максимальный размер опухоли (см).

Из уравнения (2) следует, что при увеличении размера опухоли на 1 см ожидается увеличение сывороточного уровня эндостатина на 2,245 нг/мл. В полученной модели учтены 7,9% факторов, влияющих на изменение содержания эндостатина в сыворотке крови.

Зависимость сывороточного уровня эндостатина от стадии опухолевого процесса выражается уравнением:

$$Y_{\text{эндост}} = 119,914 + 8,294 * X_{\text{стадия}} \quad (3),$$

где $Y_{\text{эндост}}$ – концентрация эндостатина в сыворотке крови (нг/мл),

$X_{\text{стадия}}$ – стадия опухолевого процесса.

Полученная зависимость характеризуется коэффициентом корреляции $\rho = 0,259$, что соответствует слабой тесноте связи по шкале Чеддока, уровень значимости $p = 0,007$ (рисунок 24).

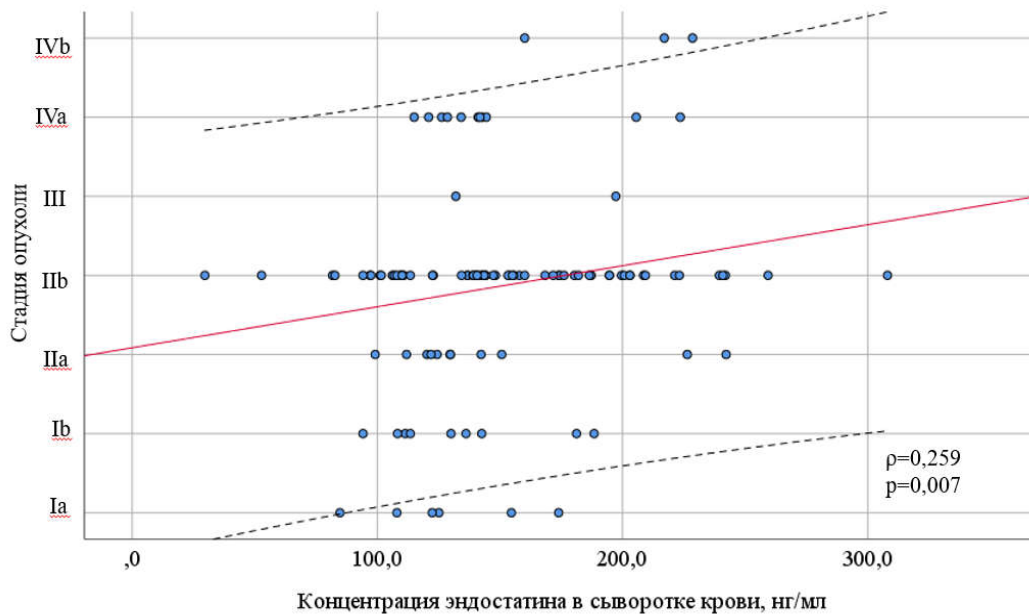


Рисунок 24 – Корреляционная связь между сывороточными уровнями эндостатина и стадией опухолевого процесса

Как видно из уравнения (3), для каждой последующей стадии опухолевого процесса ожидается увеличение сывороточного уровня эндостатина на 8,294 нг/мл по сравнению с предыдущей стадией. Исходя из значения коэффициента детерминации, полученная модель (3) учитывает 5,8% факторов, определяющих изменения сывороточной концентрации эндостатина.

Корреляционная связь между содержанием эндостатина в сыворотке и степенью дифференцировки опухоли (G) не была статистически значимой ($p=0,433$). Также не установлена статистическая значимость полученной регрессионной модели ($p=0,350$).

Критерий T занял промежуточное положение ($p=0,069$ по результатам корреляционного анализа и $p=0,050$ по результатам регрессионного анализа). Таким образом, отмечается тенденция к ассоциации критерия T с концентрацией эндостатина в сыворотке крови больных, однако уровень статистической значимости достигнут не был. Результаты корреляционного и регрессионного анализа для каждого из изучаемых факторов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Зависимости сывороточного уровня эндостатина от клинико-морфологических параметров опухоли и возраста обследуемых

Параметр	Корреляционный анализ		Регрессионный анализ		
	ρ	p	R^2	Уравнение зависимости	p
Размер опухоли	0,288	0,007*	0,079	$Y_{\text{эндост}}=131,232+2,245 \cdot X_{\text{размер}}$	0,008*
Критерий T	0,162	0,063	0,029	$Y_{\text{эндост}}=117,739+17,192 \cdot X_T$	0,050
Grade, G	0,069	0,433	0,007	$Y_{\text{эндост}}=135,577+5,509 \cdot X_G$	0,350
Стадия опухолевого процесса	0,259	0,007*	0,058	$Y_{\text{эндост}}=119,914+8,294 \cdot X_{\text{стадия}}$	0,013*
Возраст	0,160	0,031*	0,050	$Y_{\text{эндост}}=124,814+0,618 \cdot X_{\text{возр}}$	0,002*

* зависимость статистически значима.

С целью проведения корреляционного анализа эндостатина с другими регуляторами ангиогенеза, а также сравнения показателей их клинической информативности были измерены уровни фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и инсулиноподобных факторов роста 1-го и 2-го типов (IGF-1, IGF-2) как у пациентов с опухолями костей, так и у здоровых доноров.

Медиана концентрации VEGF у пациентов с опухолями костей в 2,3 раза превышала медиану в контрольной группе, различия были статистически значимыми (рисунок 25).

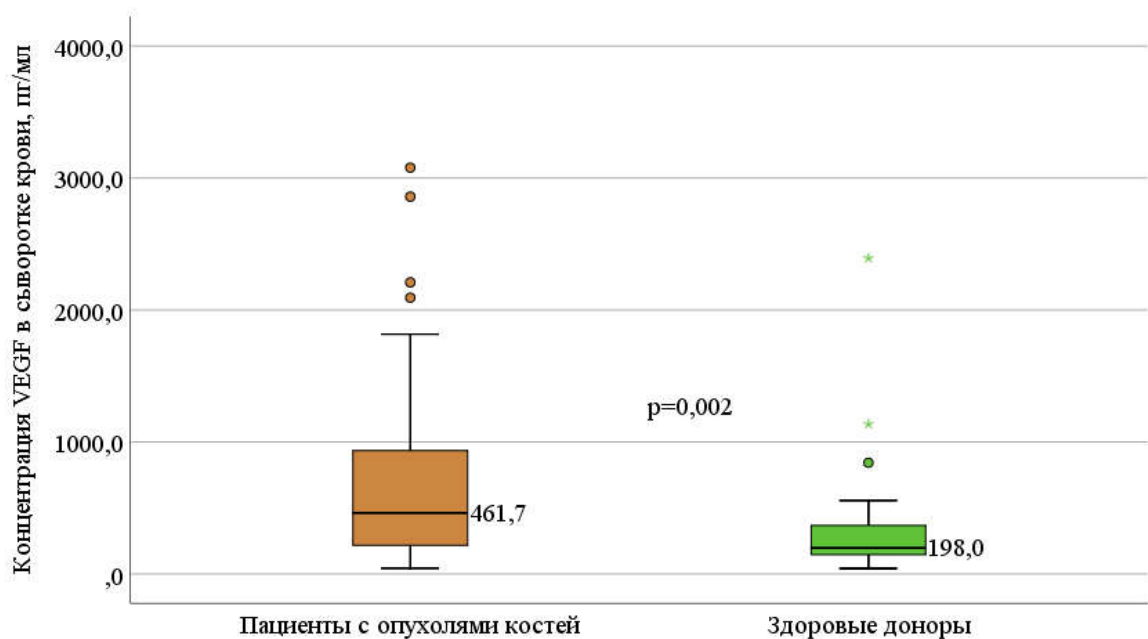


Рисунок 25 – Концентрация VEGF в сыворотке крови здоровых доноров и в общей группе пациентов с опухолями костей.

Аналогичные результаты были получены при сравнении сывороточных уровней IGF-1 и IGF-2 у больных опухолями костей и здоровых доноров (рисунки 26, 27).

Таким образом, у больных опухолями костей наблюдалось статистически значимое повышение сывороточных уровней как проангиогенных факторов, так и ингибитора ангиогенеза эндостатина. Связи между этими сывороточными маркерами оценивали с помощью корреляционного анализа по методу Спирмена.

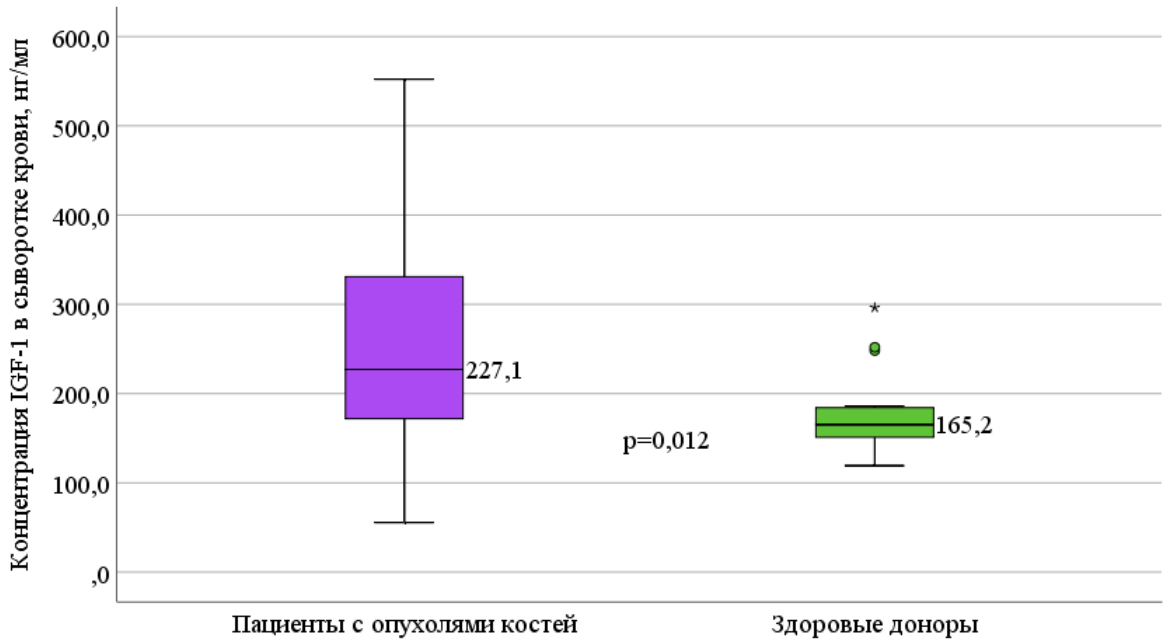


Рисунок 26 – Концентрация IGF-1 в сыворотке крови здоровых доноров и в общей группе пациентов с опухолями костей.

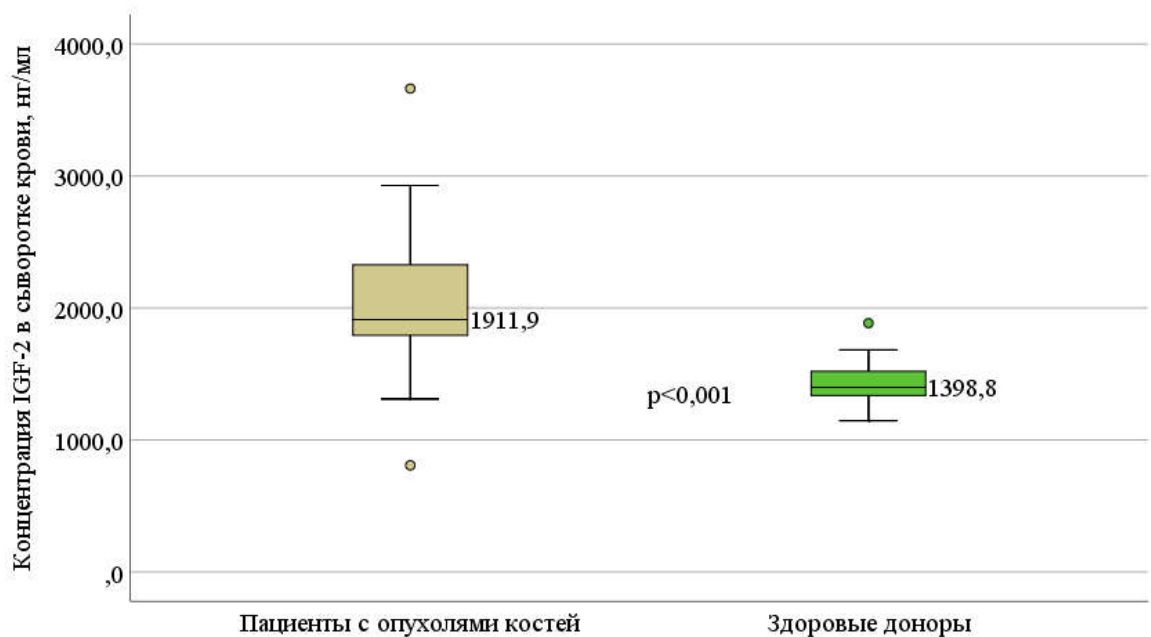


Рисунок 27 – Концентрация IGF-2 в сыворотке крови здоровых доноров и в общей группе пациентов с опухолями костей.

Установлена статистически значимая прямая умеренная корреляционная связь сывороточного уровня эндостатина у больных опухолями костей с

сывороточным уровнем IGF-2 ($\rho=0,325$, $p=0,018$). Диаграмма рассеяния, демонстрирующая корреляционную связь между сывороточными уровнями эндостатина и IGF-2, представлена на рисунке 28.

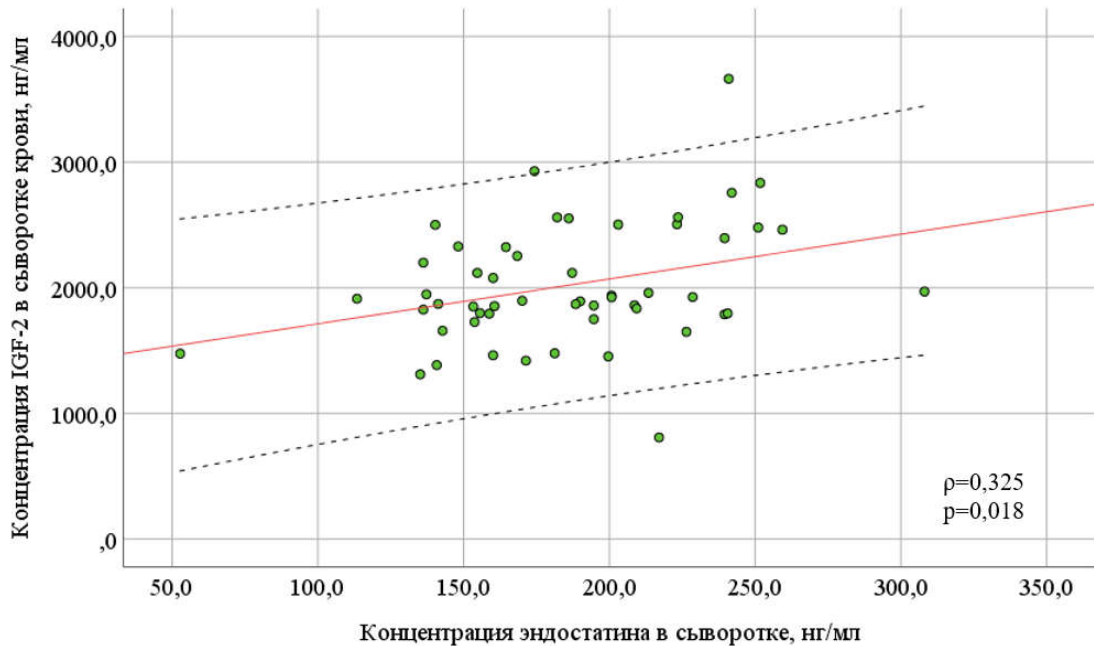


Рисунок 28 – Корреляционная связь между сывороточными уровнями эндостатина и инсулиноподобного фактора роста 2-го типа (IGF-2).

Корреляционная связь концентраций эндостатина и VEGF в сыворотке крови, оцененная с помощью коэффициента корреляции Спирмена, была статистически не значима ($p=0,478$), также как и корреляционная связь концентраций эндостатина и IGF-1 ($p=0,550$).

У больных опухолями костей дополнительно были измерены сывороточные уровни рецепторов фактора роста эндотелия сосудов 1-го и 2-го типа (VEGF-R1, VEGF-R2). Оба параметра статистически значимо коррелировали с содержанием эндостатина в сыворотке крови больных, при этом для VEGF-R1 выявлена прямая умеренная корреляционная связь ($\rho=0,376$, $p=0,006$), а для VEGF-R2 – прямая заметная корреляционная связь ($\rho=0,563$, $p<0,001$). На рисунках 26 и 27 представлены диаграммы рассеяния, отражающие корреляционные связи между концентрациями эндостатина и рецепторов фактора роста эндотелия сосудов. Линия аппроксимации на рисунке 29 имеет более острый угол наклона, чем на

рисунке 30, следовательно, сила (теснота) связи между концентрацией эндостатина и VEGF-R1 меньше по сравнению с VEGF-R2.

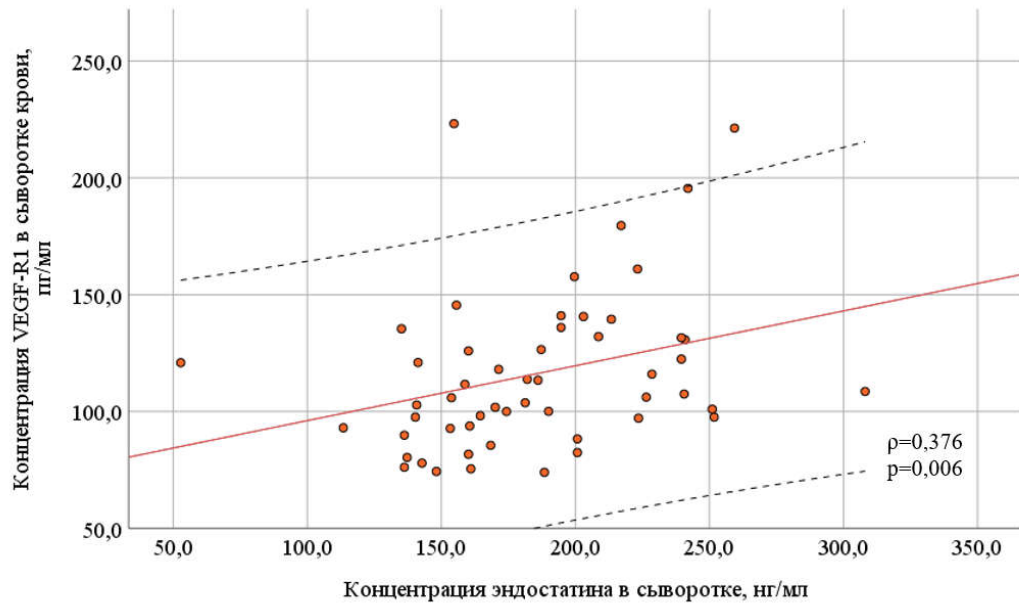


Рисунок 29 – Корреляционная связь между сывороточными уровнями эндостатина и VEGF-R1.

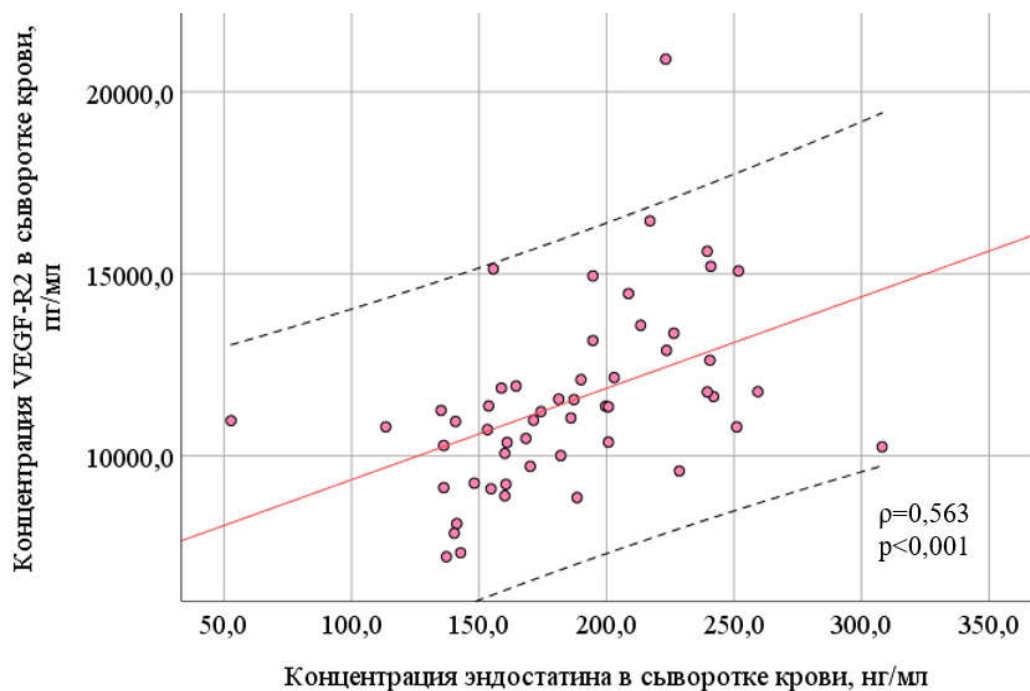


Рисунок 30 – Корреляционная связь между сывороточными уровнями эндостатина и VEGF-R2.

Регрессионный анализ выявил статистически значимые зависимости между сывороточными уровнями эндостатина и VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-2. Полученные модели учитывали соответственно 9,6%, 20,5% и 11,0% факторов, влияющих на изменение концентрации эндостатина в сыворотке.

Результаты корреляционного и регрессионного анализа связей эндостатина и исследуемых ростовых факторов резюмированы в таблице 13.

Таблица 13 – Зависимости между сывороточными концентрациями эндостатина и других регуляторов ангиогенеза

Регулятор ангиогенеза	Корреляционный анализ		Регрессионный анализ		
	ρ	p	R^2	Уравнение зависимости	p
VEGF	-0,068	0,478	0,010	$Y_{\text{эндост}} = 162,679 - 0,008X_{\text{VEGF}}$	0,286
VEGF-R1	0,367	0,006*	0,096	$Y_{\text{эндост}} = 137,591 + 0,410X_{\text{VEGF-R1}}$	0,024*
VEGF-R2	0,563	<0,001*	0,205	$Y_{\text{эндост}} = 91,493 + 0,008X_{\text{VEGF-R2}}$	0,001*
IGF-1	0,084	0,550	0,010	$Y_{\text{эндост}} = 176,660 + 0,038X_{\text{IGF-1}}$	0,481
IGF-2	0,325	0,018*	0,110	$Y_{\text{эндост}} = 123,607 + 0,031X_{\text{IGF-2}}$	0,015*

* зависимость статистически значима

3.4. Сравнительный анализ клинической информативности эндостатина и активаторов ангиогенеза

С целью определения клинической информативности эндостатина и проангиогенных факторов был проведен ROC-анализ с определением порогового значения каждого маркера. Оценивали следующие показатели клинической информативности: чувствительность (Se), специфичность (Sp), прогностическую ценность положительного результата (PPV), прогностическую ценность отрицательного результата (NPV), отношение правдоподобия положительного результата (LR+), отношение правдоподобия отрицательного результата (LR-) и индекс Юдена.

Оптимальный пороговый уровень эндостатина, превышение которого при наличии клинико-морфологических признаков статистически значимо ассоциировано с наличием опухолевого процесса в кости, составил 120,1 нг/мл (рисунок 31). Чувствительность и специфичность маркера при этом пороговом уровне составили 73,3% и 69,7% соответственно. Площадь под ROC-кривой, отражающей связь сывороточного уровня эндостатина и наличия первичных опухолей костей, равнялась $0,750 \pm 0,041$ (95% ДИ: 0,669–0,831). Полученная модель была статистически значимой ($p < 0,001$).

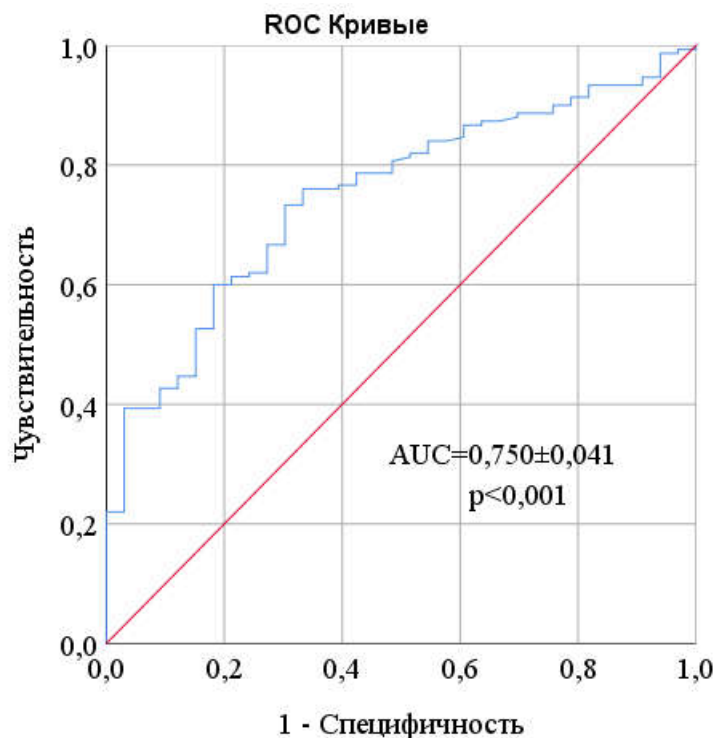


Рисунок 31 – ROC-кривая, соответствующая взаимосвязи сывороточного уровня эндостатина и наличия первичных опухолей костей.

Оптимальный пороговый уровень VEGF составил 269,4 пг/мл с чувствительностью 72,1% и специфичностью 65,4% (рисунок 32). Значение AUC для ROC-кривой, характеризующей взаимосвязи сывороточного уровня VEGF и наличия первичных опухолей костей, составила $0,691 \pm 0,055$ (95% ДИ: 0,583–0,799). Полученная модель была статистически значимой ($p = 0,002$).

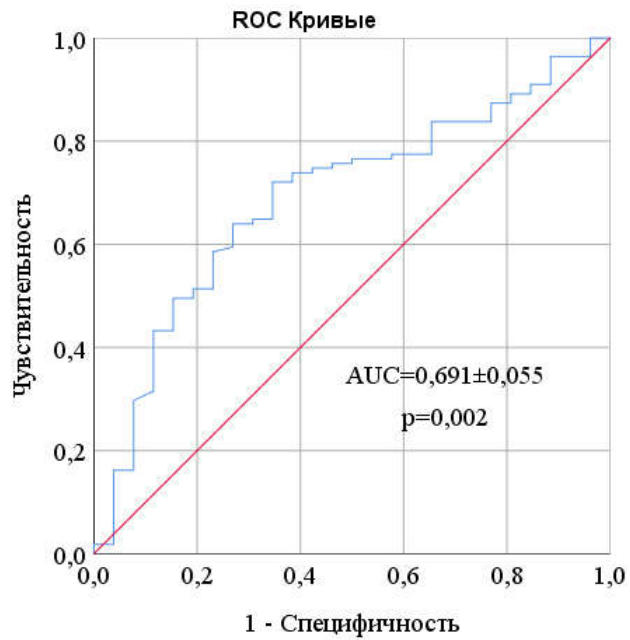


Рисунок 32 – ROC-кривая, соответствующая взаимосвязи сывороточного уровня VEGF и наличия первичных опухолей костей.

На рисунках 33 и 34 приведены ROC-кривые, демонстрирующие взаимосвязь сывороточных уровней инсулиноподобных факторов роста IGF-1 и IGF-2 с наличием опухолей костей.

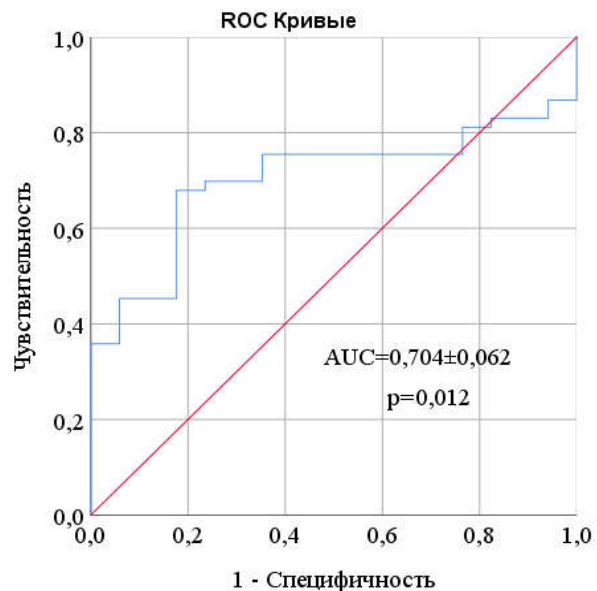


Рисунок 33 – ROC-кривая, соответствующая взаимосвязи сывороточного уровня IGF-1 и наличия первичных опухолей костей.

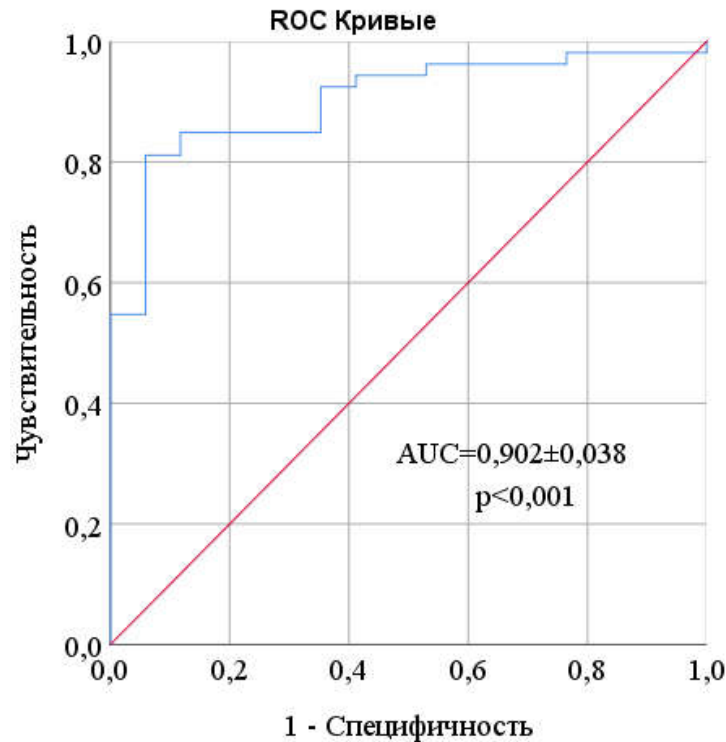


Рисунок 34 – ROC-кривая, соответствующая взаимосвязи сывороточного уровня IGF-2 и наличия первичных опухолей костей.

Для IGF-1 и IGF-2 также были рассчитаны пороговые уровни, которые составили соответственно 185,7 нг/мл (чувствительность 67,9%, специфичность 82,4%) и 1705,0 нг/мл (чувствительность 81,1%, специфичность 94,1%).

Таким образом, эндостатин уступал по чувствительности только IGF-2, а по специфичности IGF-1 и IGF-2, и превосходил VEGF по обоим показателям клинической информативности.

Расчет прогностической ценности положительного и отрицательного результата проводили с коррективкой на распространенность первичных опухолей костей, которая по литературным данным составляет 1,03 случая на 100 тыс. населения [1]. В таблице 14 представлены исследуемые нами показатели клинической информативности для эндостатина и проангиогенных факторов.

Таблица 14 – Показатели клинической информативности эндостатина, VEGF, IGF-1 и IGF-2, полученные по результатам ROC-анализа

Показатель	Эндостатин	VEGF	IGF-1	IGF-2
Пороговое значение	120,1 нг/мл	269,4 пг/мл	185,7 нг/мл	1705,0 нг/мл
Чувствительность	73,3%	72,1%	67,9%	81,1 %
Специфичность	69,7%	65,4%	82,4%	94,1%
Отношение правдоподобия положительного результата	2,42	2,08	3,85	13,79
Отношение правдоподобия отрицательного результата	0,38	0,43	0,39	0,20
Прогностическая ценность положительного результата	0,0 %	0,0%	0,0%	0,0%
Прогностическая ценность отрицательного результата	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Индекс Юдена	0,430	0,375	0,503	0,752

Самые высокие значения диагностической чувствительности и специфичности были выявлены у инсулиноподобного фактора роста 2-го типа, наименьшие – у фактора роста эндотелия сосудов. Для эндостатина характерна более высокая чувствительность, чем для инсулиноподобного фактора роста 1-го

типа, но меньшая специфичность.

Площадь под ROC-кривой для эндостатина больше, чем площадь под ROC-кривой для VEGF и IGF-1, что также указывает на более высокое качество данной модели классификации. Однако с учетом очень низкой распространенности сарком костей для всех регуляторов ангиогенеза получены одинаковые значения прогностической ценности отрицательного и положительного результатов, которые свидетельствуют о том, что ввиду низкой распространенности и претестовой вероятности наличия опухолей костей, проведение лабораторных исследований факторов ангиогенеза в общей популяции нецелесообразно.

Отношение правдоподобия положительного результата показывает, что вероятность превышения порогового уровня эндостатина у больного в 2,42 раз выше, чем у здорового. Таким образом, повышение сывороточного уровня эндостатина незначительно увеличивает вероятность наличия опухоли кости. В то время как превышение порогового уровня инсулиноподобного фактора роста 2-го типа увеличивает вероятность новообразования кости в 13,79 раза. Отношения правдоподобия отрицательного результата всех исследуемых маркеров были достаточно низкие (0,38 – у эндостатина, 0,43 – у фактора роста эндотелия сосудов, 0,39 – у инсулиноподобного фактора роста 1-го типа, 0,20 – у инсулиноподобного фактора роста 2-го типа). Вероятность того, что концентрации эндостатина в сыворотке не превышают пороговые, у здоровых лиц почти в 2,6 раза выше, чем у пациентов с опухолями костей. Для IGF-2 эта вероятность у здоровых лиц в 5 раз выше, чем у участников исследуемой группы.

ROC-анализ также был проведен среди пациентов с саркомами костей с целью поиска пороговых значений изучаемых маркеров, которые могли бы классифицировать пациентов с отдаленными метастазами от больных, у которых метастазов нет. Однако ни одна из полученных моделей классификации не была статистически значима. В таблице 15 представлены значения площади под ROC-кривой и уровни значимости для каждого исследуемого маркера.

Таблица 15 – Результаты ROC-анализа сывороточных концентраций эндостатина и проангиогенных факторов у пациентов с учетом наличия или отсутствия отдаленных метастазов

Маркер	AUC	95%ДИ	p
Эндостатин	0,562±0,065	0,436 – 0,689	0,387
VEGF	0,572±0,068	0,437 – 0,706	0,380
IGF-1	0,384±0,135	0,119 – 0,649	0,405
IGF-2	0,616±0,159	0,304 – 0,928	0,405

3.5. Концентрация эндостатина в сыворотке крови как предиктор выживаемости пациентов с опухолями костей

Проведен ретроспективный анализ отдаленных результатов лечения 140 больных с морфологически верифицированным диагнозом опухоли кости, среди них 34 пациента в возрасте младше 18 лет. У 125 больных диагностирована саркома кости, еще 15 пациентов имели гистологически подтвержденный диагноз промежуточной опухоли (ГКО). Распределение пациентов, включенных в анализ выживаемости, в зависимости от гистологического типа опухоли представлено на рисунке 35. Пациенты находились под наблюдением от 1 до 231 мес. Медиана периода прослеженности составила 30,0 мес (Q1-Q3: 12,5–181,5).

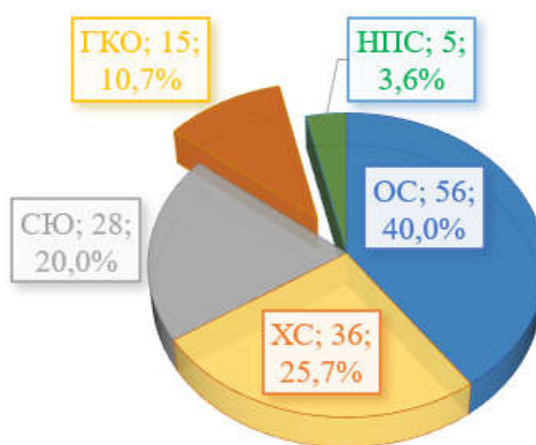


Рисунок 35 – Распределение пациентов, включенных в анализ выживаемости, в зависимости от гистологического типа опухоли.

Анализ общей выживаемости с помощью таблиц дожития показал, что максимально высокий риск смерти наблюдали у пациентов в течение первых двух лет после постановки диагноза: на первом году наблюдения отметили 14 летальных исходов из 52 (26,9%), на втором – 16 (30,8%). Как видно на кривой Каплана-Майера, общая выживаемость обследуемых пациентов через 5 лет составила 58,5%, через 10 лет – 55,1%, через 15 лет – 53,9% (рисунок 36).

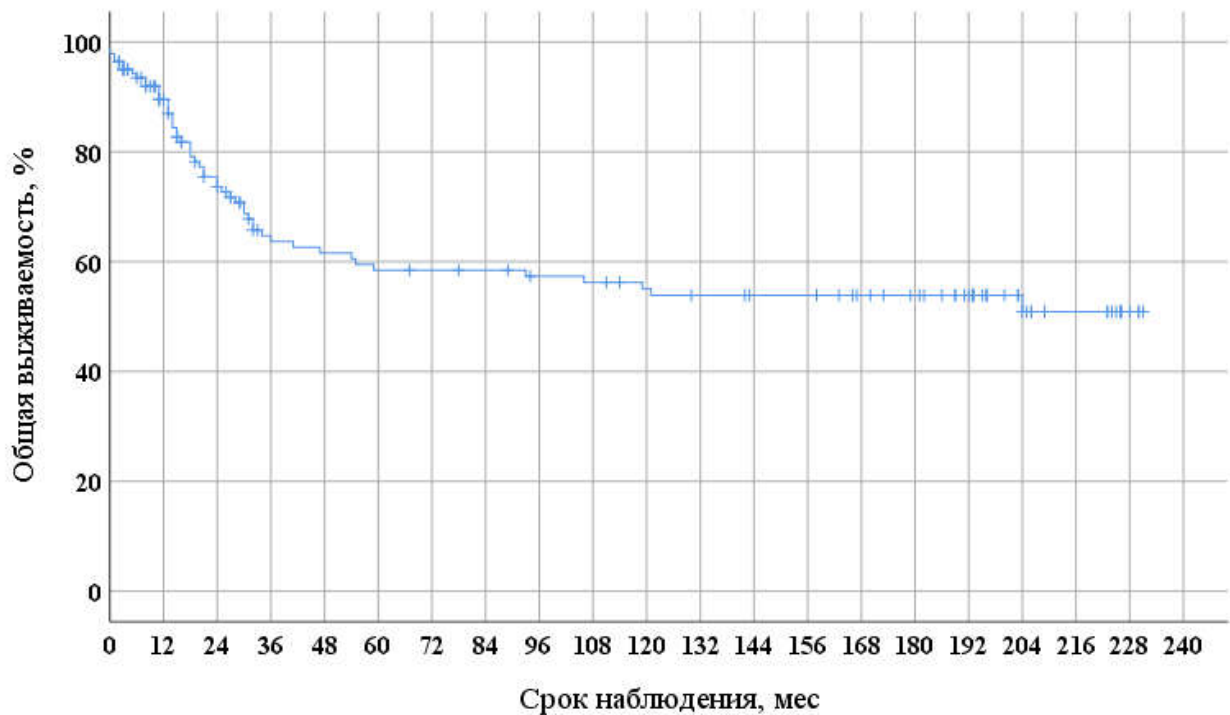


Рисунок 36 – Кривая Каплана-Майера для общей выживаемости больных опухолями костей.

Средний срок жизни больных равнялся $137,7 \pm 9,8$ месяцев (95% ДИ: 118,5–156,8 мес). Время наблюдения не позволило рассчитать медиану общей выживаемости у обследуемых больных, так как летальный исход за все время наблюдения наступил менее чем у половины включенных в исследование пациентов. Из 140 человек, у которых удалось проследить отдаленные результаты, смерть зафиксирована в 52 случаях, что составило 37,1%. Показатели общей выживаемости в исследуемой группе приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Показатели общей выживаемости больных первичными злокачественными и промежуточными опухолями костей

Срок наблюдения, годы (месяцы)	Число достигших интервала	Число выбываний в течение интервала	Число летальных исходов	Общая выживаемость	
				Абс.	%
1 (12)	140	18	14	126	89,3
2 (24)	108	10	16	110	75,4
3 (36)	82	9	11	99	64,7
4 (48)	62	0	3	96	61,6
5 (60)	59	0	3	93	58,5
6 (72)	56	1	0	93	58,5
7 (84)	55	1	0	93	58,5
8 (96)	54	2	1	92	57,4
9 (108)	51	0	1	91	56,2
10 (120)	50	2	1	90	55,1
11 (132)	47	1	1	89	53,9
12 (144)	45	2	0	89	53,9
13 (156)	43	0	0	89	53,9
14 (168)	43	4	0	89	53,9
15 (180)	39	3	0	89	53,9
16 (192)	36	6	0	89	53,9
17 (204)	30	12	0	89	53,9
18 (216)	18	5	1	88	50,4
19 (228)	12	8	0	88	50,4

Оценили показатели общей выживаемости в подгруппах в зависимости от потенциала злокачественности опухоли. Все 15 пациентов с промежуточными опухолями кости были живы на момент завершения исследования. В подгруппе

больных саркомами костей рассчитали показатели общей и безметастатической выживаемости (таблица 17).

Таблица 17 – Показатели общей и безметастатической выживаемости больных саркомами костей

Срок наблюдения, годы (мес)	Общая выживаемость больных саркомами костей		Безметастатическая выживаемость больных саркомами костей	
	Абс.	%	Абс.	%
1 (12)	111	87,9	85	66,5
2 (24)	95	72,0	69	51,5
3 (36)	84	59,6	61	43,0
4 (48)	81	55,8	58	39,5
5 (60)	78	52,1	57	38,4
6 (72)	78	52,1	57	38,4
7 (84)	78	52,1	57	38,4
8 (96)	77	50,8	56	37,1
9 (108)	76	49,4	54	34,5
10 (120)	75	48,0	53	33,1
11 (132)	74	46,5	52	31,7
12 (144)	74	46,5	51	30,2
13 (156)	74	46,5	51	30,2
14 (168)	74	46,5	51	30,2
15 (180)	74	46,5	51	30,2
16 (192)	74	46,5	51	30,2
17 (204)	74	46,5	51	30,2
18 (216)	73	42,6	51	30,2
19 (228)	73	42,6	51	30,2

Средний срок жизни больных злокачественными опухолями костей равнялся $123,2 \pm 10,6$ месяцев (95% ДИ: 102,5–144,0 мес). Медиана общей выживаемости в данной подгруппе составила $106,0 \pm 65,6$ (95% ДИ: 0,0 – 234,5 мес). Наибольшее количество летальных исходов было отмечено в первые три года после постановки диагноза – 41 из 52 (78,9%). Эта тенденция прослеживается на кривой Каплана-Майера, представленной на рисунке 37.

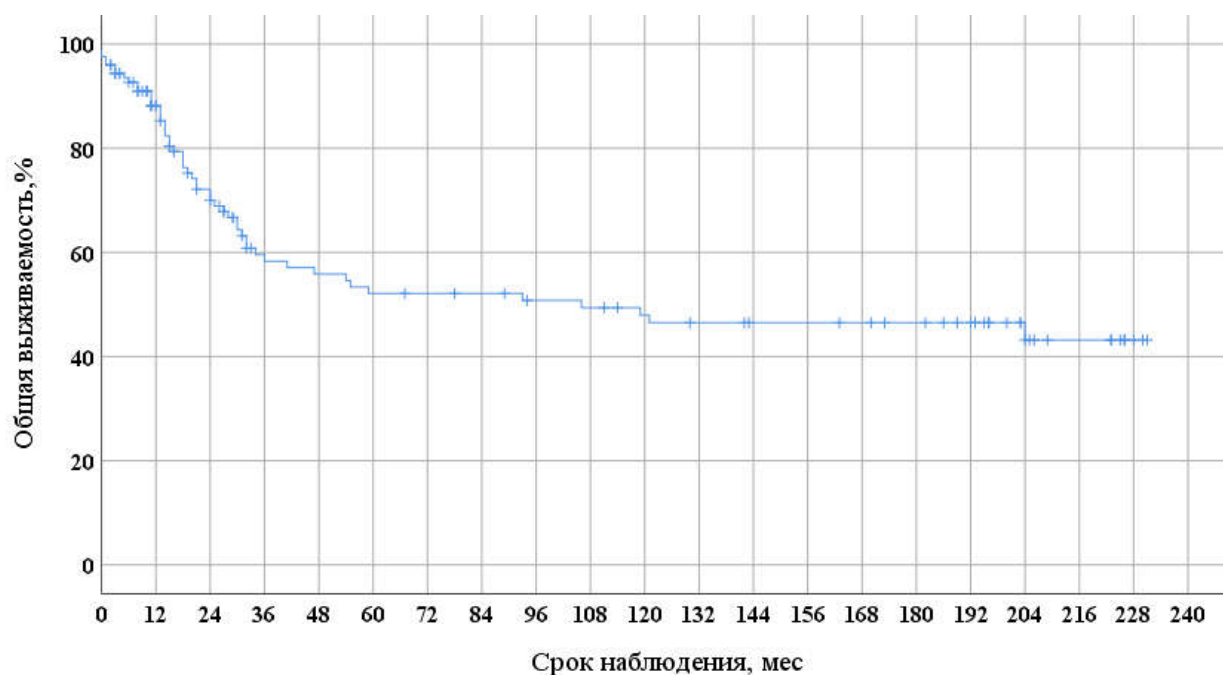


Рисунок 37 – Кривая Каплана-Майера для общей выживаемости больных злокачественными новообразованиями костей

За время наблюдения зафиксировано 44 случая выявления отдаленных метастазов, что составило 35,2%, то есть практически у каждого третьего больного с злокачественным новообразованием кости опухоль метастазировала. У 18 человек метастазы были обнаружены сразу при постановке диагноза, еще у 13 пациентов метастазирование опухоли произошло в течение первого года наблюдения. Самый поздний случай метастазирования зафиксирован спустя 11 лет после постановки диагноза. На рисунке 38 представлена кривая безметастатической выживаемости больных саркомами костей.

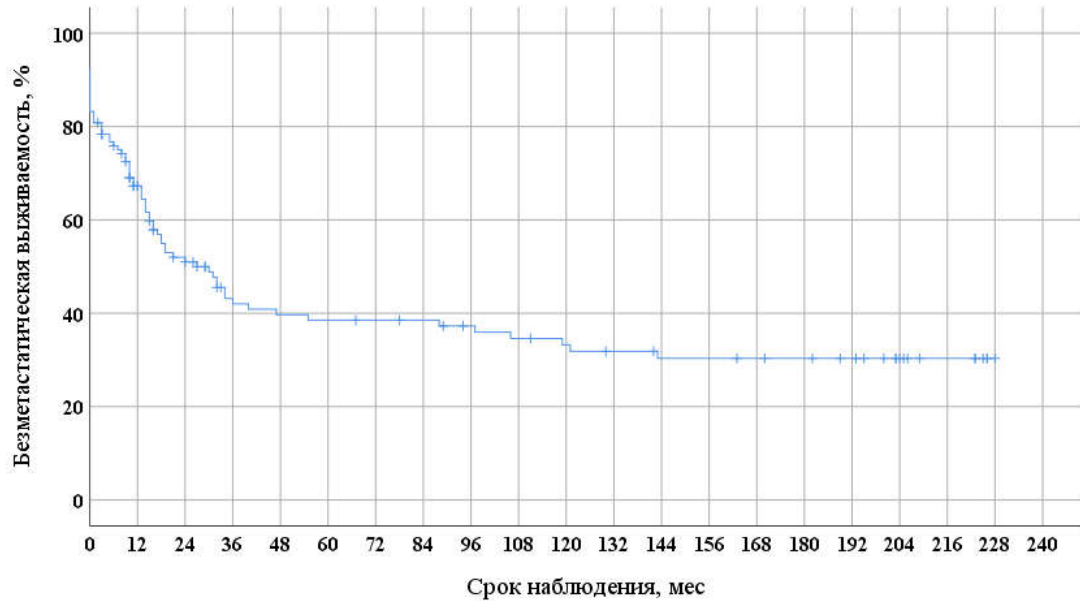


Рисунок 38 – Кривая Каплана-Майера для безметастатической выживаемости больных злокачественными новообразованиями костей.

Анализ общей выживаемости был проведен в подгруппах пациентов в зависимости от гистологического типа опухоли. Среди больных саркомами костей самые высокие показатели продемонстрировали больные недифференцированной плеоморфной саркомой, самые низкие значения были зафиксированы в группе больных саркомой Юинга (рисунок 39).

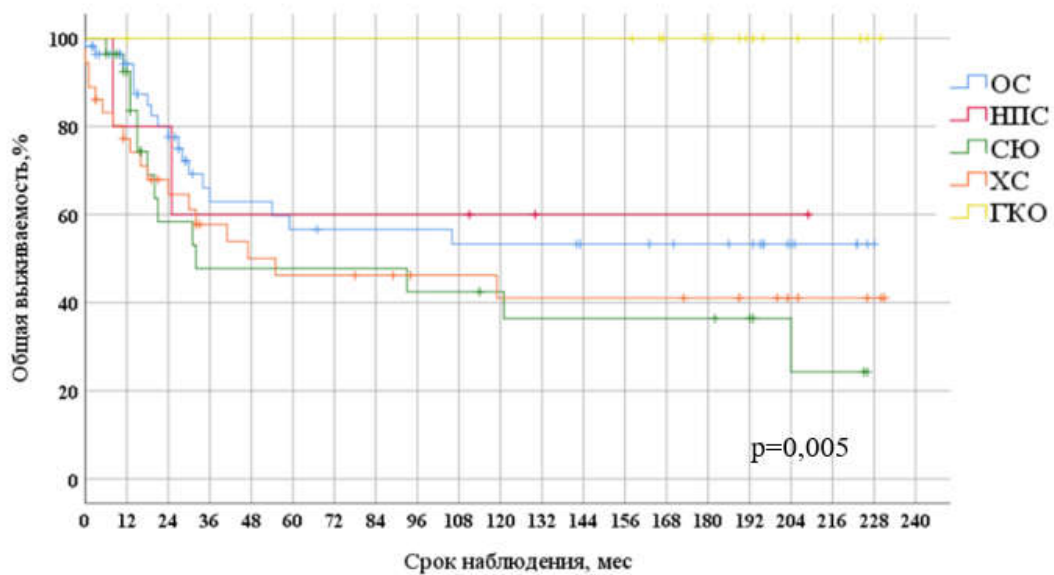


Рисунок 39 – Кривые Каплана-Майера для общей выживаемости больных новообразованиями костей в зависимости от гистологического типа опухоли .

Различия показателей общей выживаемости пациентов с разными морфологическими вариантами среди больных саркомами костей не были статистически значимыми ($p=0,337$), однако в группе больных ГКО не было зафиксировано летальных исходов за все время наблюдения, что привело к статистически значимым различиям в общей исследуемой группе больных опухолями костей ($p=0,005$).

Влияние исходного сывороточного уровня эндостатина до начала специфического противоопухолевого лечения на показатели общей выживаемости больных саркомами оценили с помощью logrank критерия Мантеля-Кокса. Для этого всех пациентов с злокачественными опухолями костей поделили на две группы: с сывороточным уровнем эндостатина меньше медианы ($<140,5$ нг/мл) и с сывороточным уровнем эндостатина, равным или превышающим медиану ($\geq 140,5$ нг/мл). В первой группе показатели общей выживаемости были статистически значимо выше ($p=0,005$), что можно увидеть при сравнении кривых Каплана-Майера (рисунок 40).

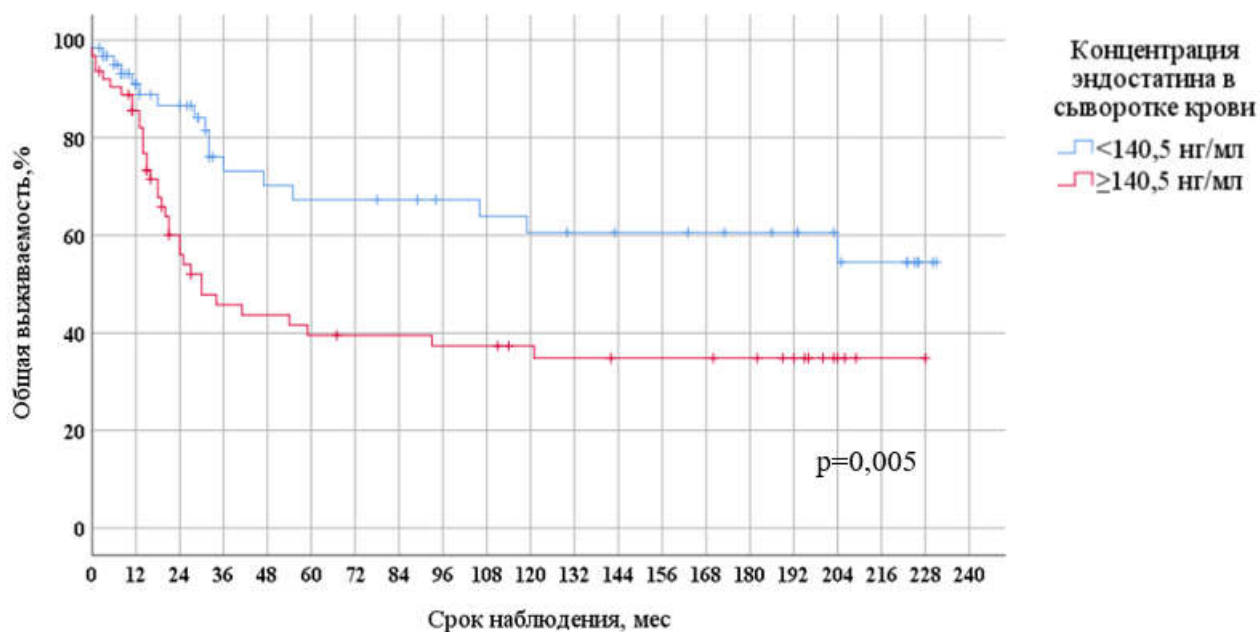


Рисунок 40 – Кривые Каплана-Майера для общей выживаемости больных саркомами костей в зависимости от исходного сывороточного уровня эндостатина.

Следует отметить, что в группе пациентов с уровнем эндостатина $\geq 140,5$ нг/мл летальные исходы наступали вдвое чаще, чем в группе больных с сывороточным уровнем эндостатина $< 140,5$ нг/мл (35 и 17 случаев соответственно).

В группе пациентов с повышенным уровнем эндостатина в сыворотке крови ($\geq 140,5$ нг/мл) также были рассчитаны более низкие показатели безметастатической выживаемости, однако полученные различия не достигли необходимого уровня статистической значимости ($p=0,055$, рисунок 41).

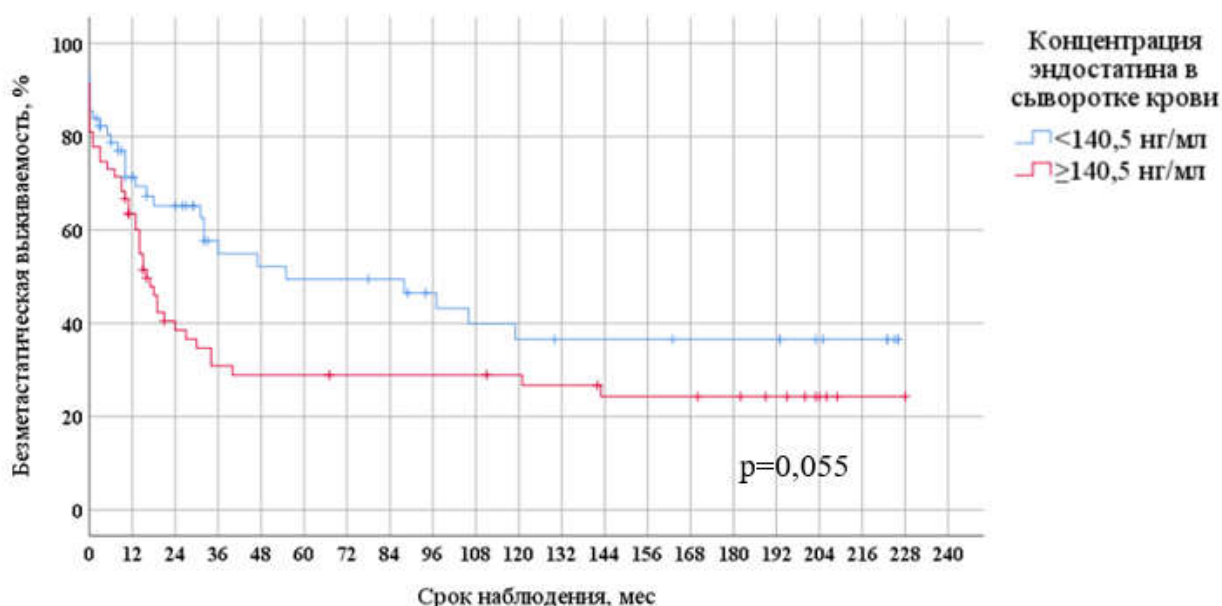


Рисунок 41 – Кривые Каплана-Майера для безметастатической выживаемости больных саркомами костей в зависимости от исходного сывороточного уровня эндостатина.

С целью оценки комплексного влияния исходных сывороточных уровней эндостатина и проангиогенных факторов на общую и безметастатическую выживаемость больных злокачественными опухолями костей построили две модели пропорциональных рисков Кокса. В качестве предикторов в модели включали сывороточную концентрацию эндостатина, VEGF, IGF-1, IGF-2. При оценке комплексного влияния сывороточных концентраций вышеперечисленных маркеров на общую выживаемость пациентов с саркомами костей отмечалось

статистически значимое снижение выживаемости при увеличении сывороточного уровня эндостатина (HR=1,012; p=0,018). Влияние VEGF, IGF-1 и IGF-2 на риск смерти обследуемых больных не было статистически значимым (p=0,869, p=0,992, p=0,484 соответственно).

Таким образом, с помощью метода регрессии Кокса была получена следующая статистически значимая модель пропорциональных рисков (4):

$$h_i(t) = h_0(t) \times \exp(0,012 \times X), \text{ где}$$

$h_i(t)$ – прогнозируемый риск смерти для i -того пациента (%);

$h_0(t)$ – базовый риск смерти за определенный временной период t (%);

X – исходный сывороточный уровень эндостатина (нг/мл)

Модель (4) была статистически значима (p=0,017).

Наиболее высокий прирост базового риска смерти наблюдался в течение первых двух лет (таблица 18).

Таблица 18 – Значения базового риска смерти пациентов с саркомами костей в течение первых двух лет наблюдения

Временные периоды, мес	Значения базового риска $h_0(t)$
3	1,0%
6	1,0%
9	1,2%
12	1,8%
15	3,4%
18	3,7%
24	5,3%

Значения базового риска смерти больных злокачественными опухолями костей для разных временных периодов наблюдения представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Базовый уровень риска смерти пациентов с саркомами костей для разных временных периодов (максимальный срок – 204 месяца)

Временные периоды, годы (мес)	Значения базового риска $h_0(t)$
1 (12)	1,8%
2 (24)	5,3%
3 (36)	7,1%
4 (48)	7,1%
5 (60)	7,1%
6 (72)	7,1%
7 (84)	7,1%
8 (96)	7,7%
9 (108)	7,7%
10 (120)	8,4%
11 (132)	9,1%
12 (144)	9,1%
13 (156)	9,1%
14 (168)	9,1%
15 (180)	9,1%
16 (192)	9,1%
17 (204)	15,0%

Таким образом, зная базовый риск смерти пациента для определенного периода времени и значение сывороточного уровня эндостатина до начала специфического противоопухолевого лечения, с помощью модели пропорциональных рисков Кокса (4) можно рассчитать риск смерти конкретного пациента через определенный промежуток времени.

Путем преобразования уравнения указанной выше модели (4) получили формулу для расчета сывороточной концентрации эндостатина, при которой риск смерти достигает $h_i\%$ для различных временных интервалов:

$$X = \frac{\ln\left(\frac{h_i}{h_0(t)}\right)}{0,012} \quad (5), \text{ где}$$

$h_i(t)$ – прогнозируемый риск смерти для i -того пациента (%);

$h_0(t)$ – базовый риск смерти за определенный временной период t (%);

X – исходный сывороточный уровень эндостатина (нг/мл)

С помощью формулы (5) и значений базового риска из таблицы 18 рассчитали сывороточные концентрации эндостатина, при которых риск смерти составил 25%, 50%, 75% и 95% через 1 год, 5, 10 и 15 лет (таблица 20).

Таблица 20 – Шкала оценки риска смерти через определенные временные интервалы на основании исходного сывороточного уровня эндостатина

Временные периоды, годы	Риск смерти пациентов с саркомами костей			
	25%	50%	75%	95%
1	219,3 нг/мл	277,0 нг/мл	310,8 нг/мл	330,5 нг/мл
5	104,9 нг/мл	162,7 нг/мл	196,4 нг/мл	216,1 нг/мл
10	90,9 нг/мл	148,6 нг/мл	182,4 нг/мл	202,1 нг/мл
15	84,2 нг/мл	142,0 нг/мл	175,8 нг/мл	195,5 нг/мл

Например, как следует из таблицы 20, при исходном сывороточном уровне более 277,0 нг/мл риск смерти пациента в течение первого года наблюдения составляет 50%, а при исходном сывороточном уровне более 330,5 нг/мл – 95%.

При оценке комплексного влияния эндостатина, VEGF, IGF-1 и IGF-2 на риск развития отдаленных метастазов у больных злокачественными опухолями костей методом регрессии Кокса полученная модель пропорциональных рисков не была статистически значимой ($p=0,098$). Изменения общей выживаемости и риска метастазирования у пациентов с саркомами костей в зависимости от каждого из исследуемых регуляторов ангиогенеза указаны в таблице 21.

Таблица 21 – Многофакторный регрессионный анализ Кокса регуляторов ангиогенеза, влияющих на общую выживаемость и риск метастазирования у больных саркомами костей

Фактор, регулирующий ангиогенез	Риск смерти			Риск метастазирования		
	HR	95% ДИ	p	HR	95% ДИ	p
Эндостатин, нг/мл	1,012	1,002 – 1,022	0,018*	0,996	0,981 – 1,012	0,640
VEGF, пг/мл	1,000	0,999 – 1,002	0,869	1,001	1,000 – 1,002	0,104
IGF-1, нг/мл	0,999	0,995 – 1,005	0,992	1,001	0,995 – 1,006	0,765
IGF-2, нг/мл	1,000	0,999 – 1,001	0,480	1,001	0,999 – 1,002	0,317

* влияние фактора риска статистически значимо

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на то, что опухоли костей являются достаточно редким диагнозом в клинической онкологии, они характеризуются агрессивным течением, ранним метастазированием и устойчивостью к химиотерапии, а также встречаются чаще всего у молодых людей и подростков. Всё это обуславливает высокую медико-социальную значимость проблемы ранней диагностики, оценки прогноза и стратификации риска метастазирования у данных пациентов.

В настоящем исследовании в качестве потенциально информативного сывороточного маркера у больных опухолями костей рассматривается эндостатин – эндогенный ингибитор опухолевого неоангиогенеза, неоднократно продемонстрировавший свое клиничко-лабораторное значение при ряде других онкологических заболеваний [50, 53, 58, 63].

Необходимо отметить противоречивость литературных данных, касающихся сывороточного уровня эндостатина у пациентов с новообразованиями костей и его зависимости от демографических характеристик, а также клинических и морфологических параметров опухоли, что может быть связано с использованием различных тест-систем для лабораторных исследований и затрудняет сопоставление наших результатов с показателями, полученными другими авторами. В международных базах данных нами было найдено три публикации, посвященных анализу сывороточных концентраций эндостатина у больных опухолями костей [9]. По данным Бабкиной и соавт. (2009), средняя сывороточная концентрация эндостатина у больных остеосаркомой составила $131,8 \pm 4,8$ нг/мл, а у здоровых доноров $109,2 \pm 2,4$ нг/мл [20]. Схожие результаты представили Urunbaev et al. (2014): эти авторы определили среднее содержание эндостатина в сыворотке больных остеосаркомой и отметили статистически значимое повышение маркера по сравнению с группой здоровых доноров ($146,7 \pm 3,8$ нг/мл и $56,5 \pm 0,98$ нг/мл соответственно) [171]. В двух вышеназванных работах так же, как и в нашем исследовании, сывороточные концентрации эндостатина выражены в нг/мл. Однако ввиду распределения данных, отличного от нормального, мы не

рассчитывали среднюю концентрацию, а представили сывороточные уровни эндостатина в виде медианы и квартилей. Исходя из того, что в найденных публикациях распределение данных соответствовало нормальному и среднее значение совпадает с медианой, мы сравнили наши результаты с предыдущими исследованиями. Полученная нами медиана сывороточной концентрации эндостатина у больных опухолями костей 141,2 нг/мл сопоставима с результатами двух ранее опубликованных исследований. Z. Chen et al. (2012) использовали другие единицы измерения и получили следующие данные: $311,5 \pm 32,5$ нг/дл в исследуемой группе и $41,6 \pm 5,9$ нг/дл в контрольной группе. При переводе единиц измерения в нг/мл эти результаты оказываются значительно ниже, чем в работах Бабкиной и соавт. (2009) и Urunbaev et al. (2014), а также не соответствуют результатам данного диссертационного исследования.

Говоря о демографических характеристиках пациентов и здоровых доноров, следует подчеркнуть, что нами не обнаружены статистически значимые различия сывороточного уровня эндостатина между мужчинами и женщинами как в исследуемой, так и в контрольной группе. Среди пациентов в возрасте младше 18 лет медиана сывороточной концентрации эндостатина не отличалась статистически значимо от медианы в общей исследуемой группе. Однако, по результатам корреляционного и регрессионного анализа, имеется слабая прямая связь содержания эндостатина в сыворотке с возрастом обследуемых.

Дополнительно нами были рассчитаны медианы сывороточных уровней эндостатина в подгруппах больных с промежуточными и злокачественными новообразованиями костей. В обеих подгруппах результаты были статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых доноров. Однако мы также ожидали увидеть статистически значимые различия между подгруппами с различным потенциалом злокачественности опухоли, но эта гипотеза не подтвердилась.

Статистически значимые различия в сывороточных концентрациях эндостатина у больных с различными морфологическими вариантами опухоли кости не выявлены, что характерно и для других ранее изученных ангиогенных

факторов. Ограничением настоящего исследования является неравномерное распределение пациентов по подгруппам и значительное преобладание больных с хондросаркомой и остеосаркомой (41 и 58 человек соответственно) над пациентами с саркомой Юинга, гигантоклеточной опухолью и недифференцированной плеоморфной саркомой (28, 18 и 5 человек соответственно). Вследствие этого результаты попарного сравнения не были статистически значимыми.

Сывороточные концентрации эндостатина также статистически значимо не различались в подгруппах пациентов, выделенных в зависимости от типа пораженной кости и локализации опухоли. Эти результаты были ожидаемы в связи с имеющимися литературными данными об отсутствии влияния данных клинических параметров на продукцию факторов ангиогенеза.

Корреляционный анализ выявил статистически значимую слабую прямую корреляционную связь сывороточного уровня эндостатина с возрастом, размером опухоли и стадией опухолевого процесса. Эти данные нашли подтверждение и при проведении регрессионного анализа. С одной стороны, чем больше размер опухоли, тем больше масса опухолевых клеток, экспрессирующих про- и антиангиогенные факторы, то есть выработка регуляторов ангиогенеза определяется размером новообразования. С другой стороны, рост опухоли в свою очередь тоже зависит от активности ангиогенеза: продукция проангиогенных факторов приводит к росту опухоли, что влечет за собой усиление продукции антиангиогенных факторов по механизму отрицательной обратной связи. Также мы предполагали обнаружить зависимость сывороточных уровней эндостатина от степени дифференцировки опухоли, но статистически значимая корреляционная связь между содержанием эндостатина в сыворотке и степенью дифференцировки опухоли (G) отсутствовала.

Критерий T продемонстрировал промежуточное положение уровня значимости ($p=0,050$ по результатам регрессионного анализа). Однако, учитывая тот факт, что значения критерия T основано на максимальном размере опухоли, а этот параметр статистически значимо коррелирует с содержанием эндостатина в

сыворотке, можно считать, что имеется ассоциация между значением критерия T и сывороточным уровнем эндостатина у пациентов с новообразованиями костей.

Также у больных опухолями костей мы обнаружили повышение сывороточного уровня фактора роста эндотелия сосудов и инсулиноподобных факторов роста 1-го и 2-го типов, которые являются активаторами ангиогенеза. Учитывая противоположное влияние про- и антиангиогенных факторов на эндотелий сосудов опухоли, можно было предположить, что сывороточные концентрации активаторов ангиогенеза и эндостатина у пациентов с новообразованиями костей будут изменяться в разных направлениях. Однако, результаты исследования показали, что сывороточные уровни всех исследуемых нами регуляторов ангиогенеза у больных опухолями костей повышаются. Медианы сывороточных концентраций эндостатина и VEGF в исследуемой группе были статистически значимо повышены по сравнению с группой контроля в 1,28 и 2,33 раза соответственно. Медианы IGF-1 и IGF-2 у больных опухолями костей превышали соответствующий показатель у здоровых доноров в 1,37 раза. Также содержание эндостатина в сыворотке коррелировало с содержанием ряда других ангиогенных факторов (с IGF-2 и VEGF-R1 – прямая умеренная связь, с VEGF-R2 – прямая заметная связь). Это, вероятно, объясняется тем, что ингибитор ангиогенеза эндостатин вырабатывается по механизму отрицательной обратной связи с целью компенсации патологического образования сосудов и его концентрация в сыворотке больных повышается, хотя и в меньшей степени, чем концентрация активаторов ангиогенеза. У пациентов с опухолями костей и здоровых доноров были рассчитаны соотношения концентраций VEGF и эндостатина в сыворотке крови. Медиана этого коэффициента в исследуемой группе составила 2,87 (Q1-Q3: 1,49 – 6,17), а в контрольной – 4,88 (Q1-Q3: 3,12 – 14,26). Следовательно, у больных опухолями костей коэффициент VEGF/эндостатин был 1,7 раза выше, чем у здоровых доноров, что также свидетельствует о смещении ангиогенного баланса в сторону активации ангиогенеза. Коэффициент VEGF/эндостатин продемонстрировал слабую прямую

корреляционную связь с возрастом ($\rho=0,217$, $p=0,019$) и не коррелировал с другими клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Сравнительный анализ клинической информативности эндостатина и проангиогенных факторов показал, что классификационная модель на основе сывороточной концентрации эндостатина была достаточно эффективна: площадь под ROC-кривой составила $0,750\pm 0,041$ и превосходила соответствующий показатель для классификационных моделей на основе сывороточной концентрации VEGF и IGF-1, но уступала классификационной модели на основе сывороточного уровня IGF-2, для которой $AUC=0,902\pm 0,038$.

Найдены пороговые значения сывороточных концентраций эндостатина, VEGF, IGF-1 и IGF-2, превышение которых статистически значимо связано с наличием новообразования кости. Для порогового уровня каждого маркера рассчитана диагностическая чувствительность и специфичность теста. Среди анализируемых нами ангиогенных факторов самые высокие показатели чувствительности и специфичности продемонстрировал IGF-2 (81,1% и 94,1% соответственно). Самые низкие показатели клинической информативности были отмечены у VEGF (чувствительность – 72,1% и специфичность – 65,4%). Показатели клинической информативности эндостатина были невысокими, но их можно считать приемлемыми (чувствительность 73,3% и специфичность – 69,7%). Сравнительный анализ показателей клинической информативности свидетельствует, что эндостатин у пациентов с опухолями костей более информативен, чем VEGF, но менее информативен, чем инсулиноподобные факторы роста. Для всех исследуемых маркеров получены одинаковые значения прогностической ценности отрицательного и положительного результатов, поскольку этот параметр зависит от распространенности заболевания, а опухоли костей являются достаточно редкой патологией (их распространенность составляет 1,03 на 100 тыс. населения). Вероятность того, что отрицательный результат является истинно отрицательным и пациент с уровнем эндостатина ниже определенного нами порогового значения действительно не имеет опухоли

кости, стремится к 100%. В то же время вероятность того, что пациент с повышенным уровнем эндостатина имеет опухоль кости, практически нулевая.

По результатам ROC-анализа ни один из исследуемых регуляторов ангиогенеза не был информативен в отношении наличия у пациентов отдаленных метастазов.

В данной работе мы также оценили влияние исходных уровней эндостатина до начала специфического лечения на общую и безметастатическую выживаемость. С помощью logrank критерия показано, что пациенты с сывороточным уровнем эндостатина менее 140,5 нг/мл имеют более высокие показатели общей выживаемости ($p=0,005$). Подобная тенденция к ассоциации с уровнем эндостатина в сыворотке наблюдалась и для безметастатической выживаемости, однако уровень статистической значимости достигнут не был ($p=0,055$).

Используя метод регрессии Кокса, обнаружили, что общая выживаемость больных саркомами костей статистически значимо снижается при повышении содержания эндостатина в сыворотке ($HR=1,012$, $p=0,018$). Остальные исследуемые факторы ангиогенеза (VEGF, IGF-1, IGF-2) были исключены при комплексном анализе факторов, поскольку их влияние на общую выживаемость не было статистически значимым. Получена модель пропорциональных рисков, которая позволяет рассчитать индивидуальный риск смерти пациента на основании исходного сывороточного уровня эндостатина. Таким образом, эндостатин, в отличие от других регуляторов ангиогенеза, является предиктором общей выживаемости, но не влияет на риск развития отдаленных метастазов. Следовательно, определение содержания эндостатина в сыворотке до начала специфического противоопухолевого лечения может быть рекомендовано для оценки прогноза заболевания и стратификации риска смерти пациентов с опухолями костей.

Учитывая то, что опухоли костей являются относительно редкой патологией, исследование потенциальных диагностических и прогностических маркеров у этих больных сопряжено с определенными методологическими

трудностями. Требуется продолжительное время для набора исследуемой группы и затем многолетнее наблюдение с целью регистрации отдаленных результатов лечения и анализа выживаемости. Проведенное нами исследование охватывает почти два десятилетия наблюдения за больными опухолями костей. Предварительный расчет объема выборки и соответствие распределения больных по полу и возрасту эпидемиологическим данным обеспечивают количественную и качественную репрезентативность исследуемой группы. Однако наше исследование имеет ряд ограничений: не проводилось сравнение сывороточного уровня эндостатина у пациентов с злокачественными и доброкачественными опухолями костей, поскольку больные с доброкачественными поражениями чаще получают медицинскую помощь по месту жительства и редко наблюдаются в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина», а также не выполнялся анализ безрецидивной выживаемости ввиду отсутствия данных о времени наступления ремиссии и рецидивов у обследуемых пациентов. Эти нерешенные вопросы можно рассматривать как вектор дальнейшего развития данной темы. Ещё одной методологической проблемой является отсутствие отечественных тест-систем для определения эндостатина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Представленные на рынке наборы реагентов на данный момент не имеют регистрационного удостоверения Росздравнадзора и могут применяться только для исследовательских целей, что затрудняет применение данного маркера в клинической онкологии. Решение данной проблемы позволит провести более масштабные исследования эндостатина и других регуляторов ангиогенеза у онкологических пациентов и откроет новые перспективы внедрения полученных научных результатов в практическую медицину.

ВЫВОДЫ

1. Содержание ингибитора ангиогенеза эндостатина в сыворотке крови больных первичными опухолями костей статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых доноров.

2. Не обнаружено статистически значимых различий в подгруппах пациентов, выделенных в зависимости от типа пораженной кости, морфологического варианта, степени дифференцировки и локализации опухоли, наличия отдаленных метастазов.

3. Корреляционный анализ показал слабые прямые связи между содержанием эндостатина в сыворотке и возрастом обследуемых, размером опухоли и стадией опухолевого процесса, а также умеренные прямые связи с содержанием IGF-2, VEGF-R1 и заметную прямую связь с уровнем VEGF-R2.

4. По результатам проведенного ROC-анализа пороговое значение эндостатина, превышение которого при наличии клинико-морфологических признаков статистически значимо ассоциировано с новообразованиями костей, составило 120,1 нг/мл (чувствительность и специфичность 73,3% и 69,7% соответственно).

5. Пациенты с повышенным уровнем эндостатина в сыворотке (более 140,5 нг/мл) имели статистически значимо более низкие показатели общей выживаемости по сравнению с пациентами, у которых данных сывороточный уровень не достигался.

6. Разработана прогностическая модель для оценки риска смерти пациентов с опухолями костей на основании исходного сывороточного уровня эндостатина до начала специфического противоопухолевого лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты диссертационного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, биологов, медицинских биохимиков и научных сотрудников, занимающихся

разработкой алгоритмов лабораторного обследования онкологических больных, а также для химиотерапевтов и хирургов-онкологов, оказывающих специализированную, в том числе высокотехнологичную, медицинскую помощь.

1. Определение сывороточного уровня ингибитора ангиогенеза эндостатина до начала специфического противоопухолевого лечения целесообразно для прогнозирования общей выживаемости пациентов с опухолями костей, поскольку сывороточная концентрация эндостатина более 140,5 нг/мл является маркером неблагоприятного прогноза течения заболевания.
2. Рекомендуется включить в программы повышения квалификации врачей клинической лабораторной диагностики и практикующих онкологов учебные модули, посвященные клинико-лабораторному значению сывороточных уровней эндостатина и проангиогенных факторов у больных опухолями костей.

ПРЕСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение темы является перспективным направлением в разработке новых диагностических алгоритмов для онкологических больных, позволяющих использовать сывороточные маркеры в комплексной оценке состояния пациента и прогнозе выживаемости. Необходимо изучить влияние сывороточного эндостатина на показатели безрецидивной выживаемости, а также провести сравнительный анализ до и после хирургического лечения с целью оценки информативности сывороточного эндостатина как маркера эффективности оперативного вмешательства. В качестве еще одной не решенной в рамках данного исследования задачи можно рассмотреть оценку уровней экспрессии эндостатина в ткани опухоли. Это позволит дать полную характеристику клинико-лабораторного значения данного маркера у больных новообразованиями костей.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГКО – гигантоклеточная опухоль

НПС – недифференцированная плеоморфная саркома

ОС – остеосаркома

СЮ – саркома Юинга

ХС – хондросаркома

AUC – area under curve (площадь под ROC-кривой)

Bcl-2 – B-cell leukemia/lymphoma 2 protein (белок В-клеточной лимфомы 2)

COL – collagenous domain (коллагеновый домен)

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (твердофазный иммуноферментный анализ)

EOMA – mouse hemangioendothelioma endothelial cells (линия клеток гемангиоэндотелиомы мыши)

FAK – focal adhesion kinase (киназа фокальной адгезии)

FGF-1 – fibroblast growth factor-1 (фактор роста фибробластов 1 типа)

FGF-2 – fibroblast growth factor-2 (фактор роста фибробластов 2 типа)

FGFR – fibroblast growth factor receptor (рецептор фактора роста фибробластов)

HIF-1 α – Hypoxia induced factor 1-alpha (индуцированный гипоксией фактор 1- α)

HR – hazard ratio (отношение рисков)

IGF-1 – insulin-like growth factor-1 (инсулиноподобный фактор роста 1-го типа)

IGF-2 – insulin-like growth factor-2 (инсулиноподобный фактор роста 2-го типа)

IGF1R – insulin-like growth factor-1 receptor (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа)

IGF2R – insulin-like growth factor-2 receptor (рецептор инсулиноподобного фактора роста 2-го типа)

IGFBP – insulin-like growth factor binding protein (белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста)

LR+ – positive likelihood ratio (отношение правдоподобия положительного результата)

LR- – negative likelihood ratio (отношение правдоподобия отрицательного результата)

LRP-5/6 – Leucine-responsive regulatory protein (лейцин-чувствительный регуляторный белок)

МАРК – mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)

МЕК1/2 – mitogen-activated protein kinase kinase (киназы МАРК, компоненты сигнального пути МАРК)

MMP – matrix metalloproteinase (матриксная металлопротеиназа)

MVD – microvessel density (плотность микрососудов)

NC1 – C-terminal noncollagenous domain (С-концевой неколлагеновый домен)

NC11 – N-terminal noncollagenous domain (N-концевой неколлагеновый домен)

NPV – negative predictive value (прогностическая ценность отрицательного результата)

PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарный фактор роста)

PIGF – placental growth factor (плацентарный фактор роста)

PPV – positive predictive value (прогностическая ценность положительного результата)

Se – Sensitivity (чувствительность)

SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results (Контроль, эпидемиология и конечные результаты – программа Национального института рака США)

Sp – Specificity (специфичность)

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

VEGF-R1 – vascular endothelial growth factor receptor-1 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа)

VEGF-R2 – vascular endothelial growth factor receptor-2 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2-го типа)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Алиев, М. Д. Современная онкоортопедия / М.Д. Алиев, Е. А. Сушенцов // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2012. – №. 4. – С. 3-10.
- 2.Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 252 с. – ISBN 978-5-85502-280-3.
- 3.Злокачественные опухоли костей / А.К. Валиев, А.А. Конев, А.А. Курильчик [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13. – №. 3s2-1. – С. 335-355.
- 4.Идиятуллина, Э. Т. Современные представления о роли эндостатина и механизмах его действия / Э. Т. Идиятуллина, В. Н. Павлов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12. – №. 6 (72). – С. 126-130.
- 5.Изучение *in vitro* антиангиогенной активности природных ингибиторов ангиогенеза: эндостатина, тумстатина и PEDF / А.И. Мирошников, В.Г. Лихванцева, Е.В. Степанова [и др.] // Офтальмохирургия. – 2011. – № 1. – С. 76-81.
- 6.Клинический анализ сывороточных уровней интерлейкина-16 и фактора роста эндотелия сосудов с учетом морфологических характеристик новообразований и отдаленных результатов лечения больных опухолями костей / И. В. Бабкина, А.А. Алферов, А.В. Бондарев [и др.] //Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44. – №. 5. – С. 606-612.
- 7.Кузнецова, О. М. Роль фактора роста эндотелия сосудов в развитии ангиогенеза костной ткани / О. М. Кузнецова, Т. Т. Березов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2004. – №. 3. – С. 18-22.
- 8.Мень Т.Х. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей в России / Т.Х. Мень, В.Г. Поляков, М.Д. Алиев // Онкопедиатрия. – 2014. – Т.1. – №1. – С. 7-12.

9. Меркурьева, О.Н. Эндостатин – биомаркер ангиогенеза у больных опухолями костей: систематический обзор и метаанализ / О.Н. Меркурьева, Н.Е. Кушлинский // Технологии живых систем. – 2023. – Т. 20. – № 3. – С. 6–16.
10. Механизмы и факторы ангиогенеза / Е. Н. Шамитова, И.С. Сымулова, М.М. Леванова, Э.А. Кашеварова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – №. 9. – С. 30-34.
11. Молекулярно-биологические маркеры в сыворотке крови больных первичными опухолями костей / Н. Е. Кушлинский, И. В. Бабкина, Ю. В. Соловьев [и др.] // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2009. – №. 1. – С. 79-82.
12. Практические рекомендации по лечению первичных злокачественных опухолей костей / А. К. Валиев, В. В. Тепляков, Э.Р. Мусаев [и др.] // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO – 2022. – Т. 12. – №. 3S2-1. – С. 307-329
13. Разработка метода получения растворимой формы рекомбинантного человеческого эндостатина и исследование его противоопухолевого потенциала / Н. В. Позднякова, Д. А. Корженевский, Е. В. Луценко [и др.] // Молекулярная медицина. – 2007. – №2. – С. 13-20.
14. Рыков, М. Ю. Заболеваемость и смертность детей от злокачественных новообразований в Российской Федерации в 2011-2016 гг. // Российский онкологический журнал. – 2017. – Т. 22. – №. 6. – С. 322-328.
15. Синиченкова, К. Ю. Молекулярно-биологические и диагностические особенности саркомы Юинга и группы недифференцированных мелкокруглоклеточных опухолей костей и мягких тканей / К. Ю. Синиченкова, В. Ю. Рощин, А. Е. Друй // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2021. – Т. 13. – №. 1. – С. 24-31.
16. Соловьев, Ю. Н. Патология опухолей костей : практическое руководство для врачей / Ю. Н. Соловьев. – Москва : Общество с ограниченной ответственностью "ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА", 2019. – 272 с. – (Патологоанатомическая диагностика). – ISBN 978-5-98811-505-2.

17. Тугузбаева, Г. М. Анализ противоопухолевого эффекта эндостатина в отношении плоскоклеточного рака полости рта по результатам экспериментальных исследований / Г. М. Тугузбаева, В. Н. Павлов, Д. А. Еникеев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64. – №. 4. – С. 134-139.
18. Фактор роста эндотелия сосудов и ангиогенин в сыворотке крови больных остеосаркомой и опухолью Юинга / Н. Е. Кушлинский, И. В. Бабкина, Ю. В. Соловьев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т. 130. – №. 7. – С. 92.
19. Черноглазова, Е. В. Молекулярные механизмы опухолевого неоангиогенеза. Е.В. Черноглазова, Ж. Н. Дбар, Е. В. Степанова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – №. 5. – С. 480-488.
20. Эндостатин, плацентарный фактор роста и факторы роста фибробластов первого и второго типа в сыворотке крови больных первичными опухолями костей / И.В. Бабкина, Д.А. Осипов, Ю.Н. Соловьев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии. – 2009. – Т. 148. – №8. – С. 218-222.
21. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей: основные показатели в 2011–2016 гг. / Г.А. Александрова, Е.П. Какорина, Л.В. Караваяева [и др.]; под ред. М.Ю. Рыкова, В.Г. Полякова. – Москва: Изд-во Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, 2017. – 208 с.
22. A phase II multicenter randomized controlled trial to compare standard chemoradiation with or without recombinant human endostatin injection (Endostar) therapy for the treatment of locally advanced nasopharyngeal carcinoma: Long-term outcomes update / Y. Li, Y. Tian, F. Jin [et al.] // Current Problems in Cancer. – 2020. – Vol. 44. – № 1: 100492. DOI: 10.1016/j.currproblcancer.2019.06.007
23. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth / K. K. Wary, A. Mariotti, C. Zurzolo, F. G. Giancotti // Cell. – 1998. – Vol. 94. – №. 5. – P. 625-634. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81604-9

24. Abd El-Rehim D. M. Expression of a disintegrin and metalloprotease 8 and endostatin in human osteosarcoma: Implication in tumor progression and prognosis / D. M. Abd El-Rehim, N. A. A. Osman // *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. – 2015. – Vol. 27. – № 1. – P. 1-9. DOI: 10.1016/j.jnci.2014.11.001
25. Ahmad. I. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis / I. Ahmad, T. Iwata, H.Y. Leung // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1823. – N 4. – P. 850–860. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.004
26. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants / H. Gille, J. Kowalski, B. Li [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – №. 5. – P. 3222-3230. DOI: 10.1074/jbc.M002016200
27. Angiogenesis inhibition in non-small cell lung cancer: A critical appraisal, basic concepts and updates from American Society for Clinical Oncology 2019 / A. R. Cantelmo, C. Dejos, F. Kocher [et al.] // *Current Opinion in Oncology*. – 2020. – Vol. 32. – № 1. – P. 44-53. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000591
28. Angiogenesis inhibitor or aggressiveness marker? The function of endostatin in cancer through electrochemical biosensing / S. Tejerina-Miranda, M. Pedrero, M. Blázquez-García [et al.] // *Bioelectrochemistry*. – 2024. – Vol. 155. – P. 108571. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108571
29. Angiogenic growth factors and endostatin in non - Hodgkin's lymphoma / F. Bertolini, M. Paolucci, F. Peccatori [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1999. – Vol. 106. – №. 2. – P. 504-509. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01547.x
30. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer / Z. L. Liu, H. H. Chen, L. L. Zheng [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8. – №. 1. – P. 198. DOI: 10.1038/s41392-023-01460-1
31. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice / M. S. O'Reilly, L. Holmgren, C. Chen, J. Folkman // *Nature Medicine*. – 1996. – Vol. 2. – №. 6. – P. 689-692. DOI: 10.1038/nm0696-689

32. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma / M.S. O'Reilly, L. Holmgren, Y. Shing [et al.] // *Cell*. – 1994. – Vol. 79. – №2. – P. 315–328. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90200-3
33. Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: The magic bullet / A. S. Oguntade, F. Al-Amodi, A. Alrumayh [et al.] // *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. – 2021. – Vol. 33. – №. 1. – P. 15. DOI: 10.1186/s43046-021-00072-6
34. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance / T. Boehm, J. Folkman, T. Browder, M. S. O'Reilly // *Nature*. – 1997. – Vol. 390. – №. 6658. – P. 404-407. DOI: 10.1038/37126
35. Anti-tumor effect of local injectable hydrogel-loaded endostatin alone and in combination with radiotherapy for lung cancer / N. Wang, Q. Gao, J. Tang [et al.] // *Drug Delivery*. – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 183-194. DOI: 10.1080/10717544.2020.1869864
36. Antitumor efficacy of a recombinant adenovirus encoding endostatin combined with an E1B55KD-deficient adenovirus in gastric cancer cells / L. Li, Y. Zhang, L. Zhou [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 11. – P. 1-13. DOI: 10.1186/1479-5876-11-257
37. Anti - VEGF DNA - based aptamers in cancer therapeutics and diagnostics / C. Riccardi, E. Napolitano, C. Platella [et al.] // *Medicinal Research Reviews*. – 2021. – Vol. 41. – №. 1. – P. 464-506. DOI: 10.1002/med.21737
38. Apatinib as targeted therapy for advanced bone and soft tissue sarcoma: a dilemma of reversing multidrug resistance while suffering drug resistance itself / Q. K. Yang, T. Chen, S.Q. Wang // *Angiogenesis*. – 2020. – Vol. 23. – № 3. – P. 279-298. DOI: 10.1007/s10456-020-09716-y
39. Baluk P. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer / P. Baluk, H. Hashizume, D. M. McDonald // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2005. – Vol. 15. – №1. – P.102–111. DOI: 10.1016/j.gde.2004.12.005

40. Bennewith K.L. Quantifying transient hypoxia in human tumor xenografts by flow cytometry / K.L. Bennewith, R.E. Durand // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 17. – P. 6183–6189. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0289
41. Berendsen A. D. Bone development / A. D. Berendsen, B. R. Olsen // *Bone*. – 2015. – Vol. 80. – P. 14-18. DOI: 10.1016/j.bone.2015.04.035
42. Bevacizumab attenuates osteosarcoma angiogenesis by suppressing MIAT encapsulated by serum-derived extracellular vesicles and facilitating miR-613-mediated GPR158 inhibition / B. D. Wang, X. J. Yu, J. C. Hou [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2022. – Vol. 13. – №. 3. – P. 272. DOI: 10.1038/s41419-022-04620-3
43. Bi W. Z. et al. A high risk of osteosarcoma in individuals who are homozygous for the p. D104N in endostatin // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – №. 1. – P. 16392. DOI: 10.1038/srep16392
44. Brierley J. D. TNM classification of malignant tumours, 8th Edition / J.D. Brierly, M. K. Gospodarowicz, C. Wittekind (eds.). – John Wiley & Sons, 2017. – 272 p. ISBN: 978-1-119-26357-9
45. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors / S. A. Karumanchi, V. Jha, R. Ramchandran [et al.] // *Molecular Cell*. – 2001. – Vol. 7. – №. 4. – P. 811-822. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00225-8
46. Characterization of the interaction between endostatin short peptide and VEGF receptor 3 / K.Y. Han, D. T. Azar, A. Sabri [et al.] // *Protein and Peptide Letters*. – 2012. – Vol. 19. – №. 9. – P. 969-974. DOI: 10.2174/092986612802084465
47. Choi J. H., The 2020 WHO classification of tumors of bone: an updated review / J. Choi, J. Y. Ro // *Advances in anatomic pathology*. – 2021. – Vol. 28. – №. 3. – P. 119-138. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000293
48. Circulating angiogenic factor levels correlate with extent of disease and risk of recurrence in patients with soft tissue sarcoma / S. S. Yoon, N. H. Segal, A. B. Olshen [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2004. – Vol. 15. – № 8. – P. 1261-1266. DOI: 10.1093/annonc/mdh309
49. Clinical predictive value of serum angiogenic factor in patients with osteosarcoma / Z. Chen, Q.X. Chen, Z.Y. Hou, J. Hu [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer*

- Prevention. – 2012. – Vol. 9. – № 13. – P. 4823–4826. DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.9.4823
50. Clinical significance of serum and tumor tissue endostatin evaluation in operable non-small cell lung cancer / M. M. Hu, Y. Hu, H. Q. Zhang // *Biomedical Reports*. – 2014. – Vol. 2. – №. 6. – P. 898-904. DOI: 10.3892/br.2014.319
51. Co-delivery of docetaxel and endostatin by a biodegradable nanoparticle for the synergistic treatment of cervical cancer / B. Qiu, M. Ji, X. Song [et al.] // *Nanoscale Research Letters*. – 2012. – Vol. 7. – №1. – P. 666. DOI: 10.1186/1556-276X-7-666
52. Conway E. M. Molecular mechanisms of blood vessel growth / E. M. Conway, D. Collen, P. Carmeliet // *Cardiovascular Research*. – 2001. – Vol. 49. – № 3. – P. 507–521. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00281-9
53. Correlation of serum levels of endostatin with tumor stage in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis / Z. H. Wang, Z. T. Zhu, X. Y. Xiao, J. Sun // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 623939. DOI: 10.1155/2015/623939
54. Cross M. J. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition / M. J. Cross, L. Claesson-Welsh // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2001. – Vol. 22. – №. 4. – P. 201-207. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)01676-x
55. Current research progress in targeted anti-angiogenesis therapy for osteosarcoma / Y. Liu, N. Huang, S. Liao [et al.] // *Cell Prolif.*, 54:e13102. DOI:10.1111/cpr.13102 (2021).
56. Dai J. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification / J. Dai, A. B. M. Rabie // *Journal of Dental Research*. – 2007. – Vol. 86. – №. 10. – P. 937-950. DOI: 10.1177/154405910708601006
57. Diagnosis of musculoskeletal tumors and tumor-like conditions: clinical, radiological and histological correlations-the Rizzoli case archive, 2nd Edition / P. Picci, M. Manfrini, D. M. Donati [et al.] (eds.) – Cham: Springer, 2020. – 382 p. ISBN: 978-30-302-9675-9

58. Diagnostic accuracy of endostatin for malignant pleural effusion: a systematic review and meta-analysis / S.Y. Yang, Y. Zhao, X.R. Wang // *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. – 2021. – Vol. 6. – P. 5. DOI:10.21037/jlpm-20-91
59. Diagnostic accuracy of endostatin for malignant pleural effusion: A clinical study and meta-analysis / P. Tian, Y. Shen, M. Feng [et al.] // *Postgraduate Medicine*. – 2015. – Vol. 127. – №5. – P. 529-34. DOI: 10.1080/00325481.2015.1048180
60. Diversity of angiogenesis among malignant bone tumors / T. Kubo, S. Shimose, J. Fujimori [et al.] // *Molecular and Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 1. – №. 1. – P. 131-136. DOI: 10.3892/mco.2012.11
61. DuBois S. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma / S. DuBois, G. Demetri // *Cancer*. – 2007. – Vol. 109. – №. 5. – P. 813-819. DOI: 10.1002/cncr.22455
62. Effects of endostar combined multidrug chemotherapy in osteosarcoma / M. Xu, C. X. Xu, W. Z. Bi [et al.] // *Bone*. – 2013. – Vol. 57. – № 1. – P. 111-115. DOI: 10.1016/j.bone.2013.07.035
63. Elevated serum endostatin levels are associated with poor survival in patients with advanced-stage nasopharyngeal carcinoma / H. Y. Mo, D.H. Luo, H.Z. Qiu [et al.] // *Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 25. – №. 5. – P. 308-317. DOI: 10.1016/j.clon.2012.11.009
64. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan / M. Mongiat, S. M. Sweeney, J. D. S. Antonio [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – №. 6. – P. 4238-4249. DOI: 10.1074/jbc.M210445200
65. Endostar enhances the antineoplastic effects of combretastatin A4 phosphate in an osteosarcoma xenograft / X. H. Fu, J. Li, Y. Zou [et al.] // *Cancer Letters*. – 2011. – Vol. 312. – № 1. – P. 109-116. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.08.008
66. Endostar, a modified endostatin inhibits non-small cell lung cancer cell in vitro invasion through osteopontin-related mechanism / Q. Ni, H. Ji, Z. Zhao [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 614. – № 1-3. – P. 1-6. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.04.032

67. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells / Y. Ling, Y. Yang, N. Lu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 361. – № 1. – P. 79-84. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.155
68. Endostatin action and intracellular signaling: β -catenin as a potential target? / J. Dixelius, M. J. Cross, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh // *Cancer Letters*. – 2003. – Vol. 196. – № 1. – P. 1-12. DOI: 10.1016/s0304-3835(03)00267-2
69. Endostatin and Cancer Therapy: A Novel Potential Alternative to Anti-VEGF Monoclonal Antibodies / G. Méndez-Valdés, F. Gómez-Hevia, J. Lillo-Moya [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. 1-23. DOI: 10.3390/biomedicines11030718
70. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1 / Y. M. Kim, S. Hwang, Y.M. Kim [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – №. 31. – P. 27872-27879. DOI: 10.1074/jbc.M202771200
71. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1 / J. Hanai, M. Dhanabal, S.A. Karumanchi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – №. 19. – P. 16464-16469. DOI: 10.1074/jbc.M112274200
72. Endostatin induces endothelial cell apoptosis / M. Dhanabal, R. Ramchandran, M. J. Waterman [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – №17. – P. 11721-11726. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11721
73. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling / J. Hanai, J. Gloy, S. A. Karumanchi [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 2002. – Vol. 158. – №. 3. – P. 529-539. DOI: 10.1083/jcb.200203064
74. Endostatin levels in exudative pleural effusions / M. Sumi, K. Kagohashi, H. Satoh [et al.] // *Lung*. – 2003. – Vol. 181. – № 6. – P. 329-334. DOI: 10.1007/s00408-003-1035-9

75. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization / J. Dixelius, M. Cross, T. Matsumoto [et al.] // *Cancer research*. – 2002. – Vol. 62. – № 7. – P. 1944-1947.
76. Endostatin specifically targets both tumor blood vessels and lymphatic vessels / W. Zhuo, Y. Chen, X. Song, Y. Luo // *Frontiers of Medicine in China*. – 2011. – Vol. 5. – № 4. – P. 336-340. DOI: 10.1007/s11684-011-0163-5
77. Endostatin, an angiogenesis inhibitor, ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats / Y. Y. Wan, G. Y. Tian, H. S. Guo [et al.] // *Respiratory Research*. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-13. DOI: 10.1186/1465-9921-14-56
78. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth/ MS. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing [et al.] // *Cell*. – 1997. – Vol. 88. – P. 277-285. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81848-6
79. Endostatin's antiangiogenic signaling network / A. Abdollahi, P. Hahnfeldt, C. Maercker [et al.] // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 13. – № 5. – P. 649-663. DOI: 10.1016/s1097-2765(04)00102-9
80. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications / A. Walia, J. F. Yang, Y.H. Huang [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – Vol. 1850. – № 12. – P. 2422-2438. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.007
81. Epidemiology of bone tumours in children and young adults / R. Eyre, R.G. Feltbower, E. Mubwandarikwa [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2009. – Vol. 53. – № 6. – P. 941-952. DOI: 10.1002/pbc.22194
82. Epidemiology of musculoskeletal tumors in a national referral orthopedic department. A study of 3482 cases / M. Bergovec, O. Kubat, M. Smerdelj [et al.] // *Cancer Epidemiology*. – 2015. – Vol. 39. – № 3. – P. 298-302. DOI: 10.1016/j.canep.2015.01.015
83. Epidermal growth factor receptor antibody plus recombinant human endostatin in treatment of hepatic metastases after remnant gastric cancer resection / L. Sun, H. Y. Ye, Y. H. Zhang [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2007. – Vol. 13. – № 45. – P. 6115-6118. DOI: 10.3748/wjg.v13.45.6115

84. Evaluation of endostatin and EGF serum levels in patients with gastric cancer / W. Masiak, A. Szponar, G. Chodorowska [et al.] // *Polski przegląd chirurgiczny*. – 2011. – Vol. 83. – №. 1. – P. 42-47. DOI: 10.2478/v10035-011-0006-8
85. EWSR1 fusion proteins mediate PAX7 expression in Ewing sarcoma / G. W. Charville, W. L. Wang, D. R. Ingram [et al.] // *Modern Pathology*. – 2017. – Vol. 30. – №. 9. – P. 1312-1320. DOI: 10.1038/modpathol.2017.49
86. Expression of b-FGF and endostatin and their clinical significance in human osteosarcoma / C.J. Xu, J.F. Song, Y.X. Su, X.L. Liu // *Orthopaedic surgery*. – 2010. – Vol. 2. – №4. – P. 291–298. DOI: 10.1111/j.1757-7861.2010.00102.x
87. Ferrara N. From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti / N. Ferrara // *International Journal of Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 55. – №4–5. – P. 383–388. DOI: 10.1387/ijdb.103216dr
88. Fletcher C.D.M. WHO classification of tumours of soft tissue and bone: WHO classification of tumours, 4th Edition, Vol. 5 / C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens (eds.) – World Health Organization, 2013. – 427 p. ISBN: 978-92-832-2434-1
89. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action / J. Folkman // *Experimental cell research*. – 2006. – Vol. 312. – №. 5. – P. 594-607. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.015
90. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman // *New England Journal of Medicine*. – 1971. – Vol. 285. – № 21. – P. 1182-1186. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108
91. Forsyth R. Epidemiology of primary bone tumors and economical aspects of bone metastases / R. Forsyth, P. C. W. Hogendoorn // *Bone Sarcomas and Bone Metastases-From Bench to Bedside* / D. Heymann (ed.) – Amsterdam: Academic Press, 2022. – P. 17-23.
92. Genetically engineered endostatin-lidamycin fusion proteins effectively inhibit tumor growth and metastasis / W.G. Jiang, X.A. Lu, B.Y. Shang [et al.] // *BMC cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 1-12. DOI: 10.1186/1471-2407-13-479

93. Grant M. A. Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors / M. A. Grant, R. Kalluri // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – 2005. – Vol. 70. – P. 399-410. DOI: 10.1101/sqb.2005.70.017
94. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions // Cancer discovery. – 2022. – Vol. 12. – №. 1. – P. 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
95. Hanahan D. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis / D. Hanahan, J. Folkman // Cell. – 1996. – Vol. 86. – № 3. – P. 353–364. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7
96. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor / Y. Shing, J. Folkman, R. Sullivan [et al.] // Science. – 1984. – Vol. 223. – P. 1296–1299. DOI: 10.1126/science.6199844
97. High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours / T. S. Zorick, Z. Mustacchi, S. Y. Bando [et al.] // European Journal of Human Genetics. – 2001. – Vol. 9. – №. 11. – P. 811-814. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200721
98. Hu K. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair / K. Hu, B. R. Olsen // The Journal of Clinical Investigation. – 2016. – Vol. 126. – №. 2. – P. 509-526. DOI: 10.1172/JCI82585
99. Identification of a novel collagen chain represented by extensive interruptions in the triple-helical region / N. Abe, Y. Muragaki, H. Yoshioka [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1993. – Vol. 196. – № 2. – P. 576–582. DOI: 10.1006/bbrc.1993.2288
100. Increased plasma endostatin and GDF15 in indolent non-Hodgkin lymphoma / J. Hidman, A. Larsson, M. Thulin, T. Karlsson // Upsala Journal of Medical Sciences. – 2023. – Vol. 128. – e9392. DOI: 10.48101/ujms.v128.9392
101. Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches / H. Saman, S.S. Raza, S. Uddin, K. Rasul // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12. – №5. – P. 1172. DOI: 10.3390/cancers12051172

102. Inhibition of FGF - FGFR and VEGF - VEGFR signalling in cancer treatment / G. Liu, T. Chen, Z. Ding [et al.] // *Cell Proliferation*. – 2021. – Vol. 54. – №. 4. – P. e13009. DOI: 10.1111/cpr.13009
103. Inhibition of growth and metastasis of tumor in nude mice after intraperitoneal injection of bevacizumab / Z. X. Zhao, X. Li, W. D. Liu [et al.] // *Orthopaedic Surgery*. – 2016. – Vol. 8. – №. 2. – P. 234-240. DOI: 10.1111/os.12236
104. Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis: from cancer to cardiovascular disease / T. Slater, N. J. Haywood, C. Matthews [et al.] // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2019. – Vol. 46. – P. 28-35. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.03.005
105. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin / L. Ständker, M. Schrader, S. M. Kanse [et al.] // *FEBS letters*. – 1997. – Vol. 420. – №. 2-3. – P. 129-133. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01503-2
106. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins / S. P. Oh, Y. Kamagata, Y. Muragaki [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – Vol. 91. – №. 10. – P. 4229-4233. DOI: 10.1073/pnas.91.10.4229
107. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis / J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, G. Williams // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1971. – Vol. 133. – №. 2. – P. 275-288. DOI: 10.1084/jem.133.2.275
108. Jiang S. Endostar combined with chemotherapy in a pediatric osteosarcoma with pulmonary metastasis and malignant pleural effusion: A case report / S. Jiang, G. Wang, Y. Dong // *Medicine (United States)*. – 2017. – Vol. 96. – № 51. – P. 10-12. DOI: 10.1097/MD.00000000000009077
109. Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology / M. Katoh // *Nature Review Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 16. – № 2. – P. 105 - 122. DOI: 10.1038/s41571-018-0115-y

110. Kim H. S. Anti-angiogenic factor endostatin in osteosarcoma / H. S. Kim, S. J. Lim, Y. K. Park // *Apmis*. – 2009. – Vol. 117. – № 10. – P. 716-723. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02524.x
111. Kirsch M. Metastasis and angiogenesis / M. Kirsch, G. Schackert, P.M. Black // *Cancer Treatment Research*. – 2004. – Vol. 117. – P. 285–304. DOI: 10.1007/978-1-4419-8871-3_17
112. Kumar N. Global incidence of primary malignant bone tumors / N. Kumar, B. Gupta // *Current Orthopaedic Practice*. – 2016. – Vol. 27. – № 5. – P. 530-534. DOI: 10.1097/BCO.0000000000000405.
113. Lenvatinib with etoposide plus ifosfamide in patients with refractory or relapsed osteosarcoma (ITCC-050): A multicentre, open-label, multicohort, phase 1/2 study / N. Gaspar, R. Venkatramani, S. Hecker-Nolting [et al.] // *The Lancet Oncology*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 1312-1321. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00387-9
114. Lenzi P. John Hunter and the origin of the term “angiogenesis” / P. Lenzi, G. Bocci, G. Natale // *Angiogenesis*. – 2016. – Vol. 19. – P. 255-256.
115. Li K., Current status and study progress of recombinant human endostatin in cancer treatment / K. Li, M. Shi, S. Qin // *Oncology and Therapy*. – 2018. – Vol. 6. – P. 21-36. DOI: 10.1007/s40487-017-0055-1
116. Lugano R. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities / R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2020. – Vol. 77. – №9 – P. 1745-1770. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7
117. Malignancy in Giant Cell Tumor of Bone: A Review of the Literature / E. Palmerini, P. Picci, P. Reichardt, G. Downey // *Technology in cancer research & treatment*. – 2019. – Vol. 18. – P. 1-9. DOI: 10.1177/1533033819840000
118. Moch H. Soft Tissue and Bone Tumours: WHO Classification of Tumours, Vol. 3 / H. Moch (ed.) – Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020. – 368 p. ISBN: 978-92-832-4502-5
119. Moore, D.D. Osteosarcoma / D.D. Moore, H.H. Luu // *Cancer Treatment and Research*. – 2014. – Vol. 162 – P. 65-92. DOI: 10.1007/978-3-319-07323-1_4

120. Normalization of the Vasculature for Treatment of cancer and other diseases / S. Goel, D. G. Duda, L. Xu [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2011. – Vol. 91. – № 3. – P. 1071-1121. DOI: 10.1152/physrev.00038.2010
121. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin / H. Shi, Y. Huang, H. Zhou [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – № 8. – P. 2899-2906. DOI: 10.1182/blood-2007-01-064428
122. Nyberg P. Endogenous inhibitors of angiogenesis / P. Nyberg, L. Xie, R. Kalluri // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 10. – P. 3967-3979. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427
123. Pedram A. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation / A. Pedram, M. Razandi, E. R. Levin // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 41. – P. 26722-26728. DOI: 10.1074/jbc.273.41.26722
124. Perioperative rh-endostatin with chemotherapy improves the survival of conventional osteosarcoma patients: a prospective non-randomized controlled study / H. Xu, Z. Huang, Y. Li [et al.] // *Cancer Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 16. – № 1. – P. 166-172. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0315
125. Pleural biomarkers in diagnostics of malignant pleural effusion: A narrative review / M. Zhang, L. Yan, G. Lippi, Z.D. Hu // *Translational Lung Cancer Research*. – 2021. – Vol. 10. – № 3. – P. 1557-1570. DOI: 10.21037/tlcr-20-1111
126. Polakis P. Wnt signaling and cancer // *Genes & Development*. – 2000. – Vol. 14. – № 15. – P. 1837-1851.
127. Poluzzi C. Endostatin and endorepellin: A common route of action for similar angiostatic cancer avengers / C. Poluzzi, R. V. Iozzo, L. Schaefer // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 97. – P. 156-173. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.012
128. Postoperative progression of pulmonary metastasis in osteosarcoma / T. Tsunemi, S. Nagoya, M. Kaya [et al.] // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2003. – Vol. 407. – № 407. – P. 159-166. DOI: 10.1097/00003086-200302000-00024

129. Prevention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin / M. Kaya, T. Wada, S. Nagoya, T. Yamashita // *Journal of Orthopaedic Science*. – 2007. – Vol. 12. – № 6. – P. 562-567. DOI: 10.1007/s00776-007-1179-1
130. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma / R. T. P. Poon, J. W. Y. Ho, C. S. W. Tong [et al.] // *Journal of British Surgery*. – 2004. – Vol. 91. – №. 10. – P. 1354-1360. DOI: 10.1002/bjs.4594
131. Prognostic significance of the angiogenic factors angiogenin, endoglin and endostatin in cervical cancer / S. Landt, K. Mordelt, I. Schwidde [et al.] // *Anticancer Research*. – 2011. – Vol. 31. – №. 8. – P. 2651-2655.
132. Proteoglycan signaling in tumor angiogenesis and endothelial cell autophagy / M. A. Gubbiotti, S. Buraschi, A. Kapoor, R. V. Iozzo // *Seminars in Cancer Biology*. – 2020. – Vol. 62. – P. 1-8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.05.003
133. Recent advancements of nanomedicine towards antiangiogenic therapy in cancer / A. Mukherjee, V. S. Madamsetty, M. K. Paul, S. Mukherjee // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 455. DOI: 10.3390/ijms21020455
134. Recombinant human endostatin as a potential anti-angiogenic agent: therapeutic perspective and current status / J. Anakha, P. Dobariya, S. S. Sharma, A. H. Pande // *Medical Oncology*. – 2023. – Vol. 41. – №. 1: 24. DOI: 10.1007/s12032-023-02245-w
135. Rehn M. Identification of Three N-terminal Ends of Type XVIII Collagen Chains and Tissue-specific Differences in the Expression of the Corresponding Transcripts / M. Rehn, T. Pihlajaniemi // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – №. 9. – P. 4705-4711. DOI: 10.1074/jbc.270.9.4705
136. Rehn M. Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1 (XVIII) chain with its homologue, the alpha 1 (XV) collagen chain / M. Rehn, E. Hintikka, T.

- Pihlajaniemi //Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – №. 19. – P. 13929-13935.
137. Rh-endostatin concomitant with chemotherapy versus single agent chemotherapy for treating soft tissue and bone sarcomas: a systematic review and meta-analysis / Z. Ma, L. Guo, X. Cui [et al.] //Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 21. – № 1. – P. 386-397. DOI: 10.18433/jpps30034
138. Ricard - Blum S. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix / S. Ricard-Blum, R. Salza //Experimental Dermatology. – 2014. – Vol. 23. – №. 7. – P. 457-463. DOI: 10.1111/exd.12435
139. Role of angiogenesis and its biomarkers in development of targeted tumor therapies / A. Pathak, A. K. Pal, S. Roy [et al.] // Stem Cells International. – 2024. – Vol. 2024: 9077926. DOI: 10.1155/2024/9077926
140. Rutkowski P. Antiangiogenic agents combined with systemic chemotherapy in refractory osteosarcoma / P. Rutkowski // The Lancet Oncology. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 1206-1207. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00422-8
141. Serum concentrations of endostatin in patients with vulvar cancer / L. Hefler, C. Tempfer, C. Kainz, A. Obermair //Gynecologic Oncology. – 1999. – Vol. 74. – №. 1. – P. 151-152. DOI: 10.1006/gyno.1999.5496
142. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer /M. Suzuki, T. Iizasa, E. Ko [et al.] // Lung Cancer. – 2002. – Vol. 35. – №. 1. – P. 29-34. DOI: 10.1016/s0169-5002(01)00285-9
143. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer /A. L. Feldman, L. Tamarkin, G. F. Paciotti [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2000. – Vol. 6. – №. 12. – P. 4628-4634.
144. Serum endostatin levels are elevated in colorectal cancer and correlate with invasion and systemic inflammatory markers / T. Kantola, J. P. Väyrynen, K. Klintrup [et al.] // British Journal of Cancer. – 2014. – Vol. 111. – № 8. – P. 1605-1613. DOI: 10.1038/bjc.2014.456

145. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma / A. L. Feldman, H. Pak, J. C. Yang [et al.] // *Cancer*. – 2001. – Vol. 91. – № 8. – P. 1525-1529. DOI: 10.1002/1097-0142(20010415)91:8<1525::aid-cnrc1161>3.0.co;2-p
146. Serum endostatin levels correlate with enhanced extracellular matrix degradation and poor patients' prognosis in bladder cancer / T. Szarvas, V. László, F. V. Dorp [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 130. – №. 12. – P. 2922-2929. DOI: 10.1002/ijc.26343
147. Serum endostatin levels in gastric cancer patients: correlation with clinicopathological parameters / M. Koç, E. Göçmen, M. Kiliç [et al.] // *Hepatogastroenterology*. – 2006. – Vol. 53. – № 70. – P. 616–618.
148. Siegel R.L. Cancer statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2019. – Vol. 69. – №1. – P.7-34 DOI: 10.3322/caac.21551
149. Soff G. A. Angiostatin and angiostatin-related proteins / G. A. Soff // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2000. – Vol. 19. – № 1-2. – P. 97-107. DOI: 10.1023/a:1026525121027
150. Sorensen D. R. Delivery of endostatin in experimental cancer therapy / D. R. Sorensen, T. A. Read // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2002. – Vol. 83. – № 6. – P. 265-274. DOI: 10.1046/j.1365-2613.2002.00240.x
151. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin / T. Sasaki, N. Fukai, K. Mann [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1998. – Vol. 17. – №. 15. – P. 4249-4256. DOI: 10.1093/emboj/17.15.4249
152. Suh D. Y. Understanding angiogenesis and its clinical applications / D. Y. Suh // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. – 2000. – Vol. 30. – №. 3. – P. 227-238.
153. Sui W. Efficacy of Recombinant Human Endostatin plus Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma and Its Influence on Serum VEGF and MMP-9 Levels / W. Sui, G. Lin // *Journal of Oncology*. – 2023. – Vol. 2023: 8161683. DOI: 10.1155/2023/8161683

154. Synergistic antitumor efficacy by combining adriamycin with recombinant human endostatin in an osteosarcoma model / H. Xu, X. Niu, Q. Zhang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2011. – Vol. 2. – № 5. – P. 773-778. DOI: 10.3892/ol.2011.334
155. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene / P. Blezinger, J. Wang, M. Gondo [et al.] // *Nature biotechnology*. – 1999. – Vol. 17. – № 4. – P. 343-348. DOI: 10.1038/7895
156. Tang D. G. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis and tumor neovascularization / D. G. Tang, C. J. Conti // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2004. – Vol. 30. – № 1. – P. 109–117. DOI: 10.1055/s-2004-822975
157. Tannock I. F. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour / I. F. Tannock // *British Journal of Cancer*. – 1968. – Vol. 22. – № 2. – P. 258. DOI: 10.1038/bjc.1968.34
158. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down - regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells / A. Hajitou, C. Grignet, L. Devy [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2002. – Vol. 16. – № 13. – P. 1-23. DOI: 10.1096/fj.02-0109fje
159. The challenges of recombinant endostatin in clinical application: Focus on the different expression systems and molecular bioengineering / A. Mohajeri, S. Sanaei, F. Kiafar [et al.] // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 21-34. DOI: 10.15171/apb.2017.004
160. The clinical research of serum VEGF, TGF- β 1, and endostatin in non-small cell lung cancer / S. G. Liu, S. H. Yuan, H. Y. Wu // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – Vol. 72. – № 1. – P. 165-169. DOI: 10.1007/s12013-014-0431-5.
161. The first draft of the endostatin interaction network / C. Faye, E. Chautard, B. R. Olsen, S. Ricard-Blum // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 33. – P. 22041-22047. DOI: 10.1074/jbc.M109.002964
162. The history of the angiogenic switch concept / D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato [et al.] // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21. – № 1. – P. 44-52. DOI: 10.1038/sj.leu.2404402
163. The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes / N. J. Haywood, T. A. Slater, C. J. Matthews, S. B. Wheatcroft

- // Molecular Metabolism. – 2019. – Vol. 19. – P. 86-96. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.10.008
164. The nuclear translocation of endostatin is mediated by its receptor nucleolin in endothelial cells / N. Song, Y. Ding, W. Zhuo [et al.] // *Angiogenesis*. – 2012. – Vol. 15. – № 4. – P. 697-711. DOI: 10.1007/s10456-012-9284-y
165. The role of microenvironment in tumor angiogenesis / X. Jiang, J. Wang, X. Deng [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 204. DOI: 10.1186/s13046-020-01709-5
166. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning / J. Filipowska, K. A. Tomaszewski, L. Niedźwiedzki [et al.] // *Angiogenesis*. – 2017. – Vol. 20. – № 3. – P. 291-302. DOI: 10.1007/s10456-017-9541-1
167. The roles of metastasis-related proteins in the development of giant cell tumor of bone, osteosarcoma and Ewing's sarcoma / B. Dou, T. Chen, Q. Chu [et al.] // *Technology and Health Care*. – 2021. – Vol. 29. – № S1. – P. S91-S101. DOI: 10.3233/THC-218010
168. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid / D.R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak [et al.] // *Science*. – 1983. – Vol. 219. – № 4587. – P. 983–985. DOI: 10.1126/science.6823562
169. Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels / S. Krishna Priya, R.P. Nagare, V.S. Sneha [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 139. – №4. – P. 729–735. DOI: 10.1002/ijc.30067
170. Unni K. K. Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 10,165 cases / K. K. Unni, C. Y Inwards. – Lippincott Williams & Wilkins, 2010. – 416 p. ISBN: 978-0781762427
171. Urunbaev S. Serum Factors of Angiogenesis and the Growth of Fibroblasts in Osteogenic Sarcoma / S. Urunbaev, K. G. Abdikarimov, D. S. Polatova // *Annals of Oncology*. – 2014. – Vol. 25, Supplement 4. – P. iv509. DOI:10.1093/annonc/mdu354.48

172. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF / P. J. Keck, S.D. Hauser, G. Krivi [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 246. – №4935. – P. 1309–1312. DOI: 10.1126/science.2479987
173. Weinberg R. A. *The biology of cancer*. 2nd Edition / R.A. Weinberg (ed.) – New York: Garland Science, 2014. – 876 p. ISBN: 978-0815342205.
174. What's new in bone forming tumours of the skeleton? / N. Franceschini, S. W. Lam, A. M. Cleton-Jansen, J. V. M. G. Bovée // *Virchows Archiv*. – 2020. – Vol. 476. – № 1. – P. 147-157. DOI: 10.1007/s00428-019-02683-w
175. Wickström S. A. Endostatin associates with integrin $\alpha 5\beta 1$ and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells / S. A. Wickström, K. Alitalo, J. Keski-Oja // *Cancer research*. – 2002. – Vol. 62. – №. 19. – P. 5580-5589.
176. Wickström S. A. Endostatin signaling and regulation of endothelial cell-matrix interactions / S. A. Wickström, K. Alitalo, J. Keski-Oja // *Advances in Cancer Research*. – 2005. – Vol. 94. – P. 197-229. DOI: 10.1016/S0065-230X(05)94005-0
177. Zhang Y. Evaluation of serum and pleural levels of endostatin and vascular epithelial growth factor in lung cancer patients with pleural effusion / Y. Zhang, L. K. Yu, N. Xia // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. – 2012. – Vol. 5. – №. 3. – P. 239-242. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60032-7
178. Zhou W. B. Diagnostic value of vascular endothelial growth factor and endostatin in malignant pleural effusions / W.B. Zhou, M. Bai, Y. Jin // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2009. – Vol. 13. – №. 3. – P. 381-386.
179. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin / Y. H. Ding, K. Javaherian, K. M. Lo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – №. 18. – P. 10443-10448. DOI: 10.1073/pnas.95.18.10443
180. Ziyad S. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis / S. Ziyad, M.L. Iruela-Arispe // *Genes & cancer*. – 2011. – Vol. 2. – №. 12. – P. 1085-1096. DOI: 10.1177/1947601911432334