

*С.Н. Наврузов<sup>1</sup>, Д.Ш. Полатова<sup>1</sup>, М.С. Гельдиева<sup>1</sup>, Э.И. Нуриева<sup>2</sup>*

## **ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ ЦИТОКИНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ С ОСТЕОГЕННОЙ САРКОМОЙ**

<sup>1</sup>Республиканский Онкологический Научный Центр Министерства здравоохранения республики Узбекистан,  
<sup>2</sup>Институт иммунологии Академии наук республики Узбекистан, г. Ташкент

**Целью исследования** явилось изучение спонтанной продукции основных цитокинов иммунной системы у больных остеогенной саркомой. Изучены сывороточные концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10), а также содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Выявлен дисбаланс в содержании основных цитокинов иммунной системы у больных остеосаркомой, проявляющийся значительным повышением как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Обнаружено повышение наиболее агрессивных тканевых цитокинов (ИЛ-6 и VEGF), играющих важную роль в формировании и прогрессировании заболевания. Выявленные иммунологические признаки, не исключено, могут служить важным прогностическим критерием в определении дальнейшей тактики лечения больных остеосаркомами, что нуждается в дальнейшем изучении.

**Ключевые слова:** остеосаркома, цитокины, иммунная система.

Саркомы костей – чрезвычайно агрессивные злокачественные опухоли, склонные к гематогенному метастазированию [1,2,6,14,16,20-22]. Остеосаркома встречается преимущественно у детей и лиц молодого возраста, отличается быстрым течением, ранним метастазированием в легкие [13,22]. Первичные опухоли костей считаются одним из наиболее сложных разделов клинической онкологии. Прогноз этих заболеваний крайне неблагоприятный, однако, среди них выделяются саркомы, которые протекают относительно благоприятно, поздно метастазируют и высокочувствительны к химиотерапии.

Индивидуальные особенности опухоли, специфика ее «биологического» поведения характеризуются взаимоотношениями тканевых, клеточных и молекулярных маркеров самой опухоли и организма [12,18,22]. Маркеры характеризуют фундаментальные свойства опухолевых клеток – такие, как метастазирование, инвазия, неограниченная пролиферация, активность процессов неоангиогенеза, способность противостоять апоптозу, а также

их чувствительность к экзогенным и эндогенным регуляторам. Механизмы, определяющие способность опухолевых клеток к инвазии в окружающие ткани и их диссеминацию с образованием вторичных очагов опухолевого роста, остаются до конца не изученными. Показано, что важную роль в этих процессах играют активаторы и ингибиторы неоангиогенеза и пролиферации в опухоли [3,5,8-10,17]. В частности, обнаружено, что ключевой активатор ангиогенеза фактор роста эндотелия сосудов осуществляет свой эффект в синергизме с другими маркерами неоангиогенеза [4,5,8,9,11]. Каскад событий, которые происходят при формировании и метастазировании злокачественного процесса, приводит к высвобождению целого спектра про- и противовоспалительных цитокинов. Циркуляция избыточных количеств этих эндогенных медиаторов провоцирует нарушения, приводящие к развитию органной и полиорганной недостаточности. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению диагностической и прогностической значимости концентрации цитокинов в сыворотке периферической крови онкологических больных единого мнения по этому вопросу до настоящего времени не имеется.

Это справедливо и в отношении такого заболевания как саркома костей. Изучение биологических особенностей остеосаркомы является актуальной проблемой современной онкологии [7,15], конечная цель которой – ранняя диагностика и разработка эффективных патогенетических методов лечения. Целью настоящего исследования была попытка изучить основные цитокины иммунной системы в крови у больных с остеогенной саркомой.

### **Материал и методика**

В исследование включены 42 больных с гистологически верифицированной остеосаркомой, проходивших лечение в РОНЦ МЗ РУз с 2009 по 2012гг, среди которых было 55,4% пациентов мужского пола, и 44,6% женского. Средний возраст больных составил 19,5 лет.

Степень местной распространенности, а также уточнение стадии заболевания оценивали с помощью стандартной рентгенографии, КТ, МРТ и сцинтиграфии. По локализации опухолевого процесса наиболее часто наблюдалось пораже-

ние бедренной кости — 28,6% случаев и подвздошной — в 18,2%. Дистальный отдел был поражен в 26,8% случаев, проксимальный в 57,3%, диафиз в 19,5%. Наличие метастазов на момент первичного обращения в поликлинику диагностировано у 19,5% пациентов. Метастатическое поражение легких отмечено в 14,9% случаев, комбинированные метастатические поражения были диагностированы у 2,6% пациентов.

Всем больным были проведены иммунологические исследования в сыворотке периферической крови при первичном поступлении после установления диагноза до лечения с целью выявления иммунологических маркеров, играющих важную роль в диагностике, динамике лечения и прогнозировании онкологических заболеваний. С этой целью были использованы тест-системы «Вектор-Бест», Новосибирск, а сами исследования проводились в лаборатории иммуноцитокринов Института иммунологии АН РУз.

### Результаты исследования и обсуждение

Цитокины рассматривают как низкомолекулярные белки, которые продуцируются клетками различных типов и являются медиаторами межклеточных взаимодействий при иммунном ответе. Будучи тесно взаимосвязанными между собой, они образуют единую и цельную систему — цитокиновую сеть, включающую про- и противовоспалительные цитокины, которые принимают участие в формировании и прогрессировании опухолевого процесса [9]. Вопросы, касающиеся цитокиновой регуляции иммунитета при онкологических процессах, в частности, при остеосаркомах пока остаются малоизученными.

В настоящей работе нами изучены сывороточные концентрации провоспалительных (ИЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ИЛ-2) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-10), а также содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Полученные результаты представлены в табл. 1.

**Таблица 1. Основные цитокины иммунной системы (M $\pm$ m, пг/мл) в крови больных с остеогенной саркомой**

Показатели	Контрольная группа (32)	Группа больных до лечения (42)
ИЛ-1	4,32 $\pm$ 1,2	8,71 $\pm$ 2,13*
ИЛ-6	3,42 $\pm$ 0,28	79,40 $\pm$ 12,4*
ФНО-	2,58 $\pm$ 0,8	6,27 $\pm$ 1,2*
ИЛ-2	5,48 $\pm$ 0,98	7,41 $\pm$ 0,54
ИЛ-10	7,24 $\pm$ 2,7	9,35 $\pm$ 0,27*
VEGF-A	36,3 $\pm$ 0,54	520,21 $\pm$ 68,5*

Примечание: \* — достоверность различий с контрольной группой (p<0,05)

Из представленных данных следует, что по сывороточной концентрации цитокинов у больных остеосаркомой наблюдается выраженный дисбаланс, который характеризуется преобладанием продукции провоспалительных цитокинов над противовоспалительными. Так, уровень ИЛ-1 $\beta$  в группе больных с остеосаркомой был повышен в 2 раза относительно значения

контрольной группы. Анализ ФНО-альфа также позволил выявить достоверное повышение его концентрации в сыворотке крови больных с остеосаркомой в 2,4 раза относительно контрольных значений. В то же время, исследование сывороточной концентрации ИЛ-2 у больных с остеосаркомой не выявило достоверной разницы по сравнению с контролем, хотя, в среднем наблюдалось повышение ИЛ-2 у больных в 1,4 раза.

ИЛ-1 $\beta$  относится к ключевым провоспалительным цитокинам, представляющим собой полипептид с молекулярной массой 15 кД. ИЛ-1 $\beta$ , в основном, продуцируется макрофагами и фагоцитами, а также лимфоцитами, фибробластами, эпителиальными клетками. Он инициирует и регулирует воспалительные, иммунные процессы, активирует нейтрофилы, Т- и В- лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы [8,9,10]. Именно для ИЛ-1 $\beta$  характерен запуск реакции воспалительно-регуляторного каскада, а также стимуляция макрофагов и синтеза ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ . В исследованиях по изучению ИЛ-1 $\beta$  важное значение отводят механизмам, запускающим каскад цитокиновой регуляции иммунитета человека, а также формирования опухолевого процесса и его прогрессирования. В свою очередь, установлено, что ФНО- $\alpha$  является одним из самых известных и широко изученных провоспалительных цитокинов, который продуцируется макрофагами, моноцитами, тучными клетками, лимфоцитами. ФНО- $\alpha$  отводится существенная роль в повреждении ткани и прогрессировании опухолевого процесса. В итоге, избыточное содержание ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  способствует поддержанию воспалительного процесса в организме и, не исключено, росту опухоли, имеющей изолированное кровоснабжение и питание. Соответственно, полученные данные по изучению провоспалительных цитокинов у больных остеосаркомой есть основание использовать в дальнейшей оценке состояния иммунитета и, возможно, клинического течения опухолевого процесса у отдельных больных.

Действительно, важным является то, что характерными клиническими проявлениями злокачественного процесса у большинства пациентов был астенический синдром, который коррелировал с повышенной активностью провоспалительных цитокинов. Учитывая, что у данного контингента пациентов в сыворотке крови обнаружено повышенное содержание цитокинов, по сравнению с данными контрольной группы, можно предположить, что такие проявления заболевания, как вялость, слабость, субфебрильная температура к вечеру, снижение аппетита частично находятся под контролем цитокинов. Аналогичные предположения высказываются и

другими авторами [12,18,19]. Такие симптомы заболевания как похудание, повышение температуры тела, которые отмечались у больных, также напрямую коррелировали с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов.

По данным литературы, нормальная функция иммунной системы строится на балансе содержания ТХ1- и ТХ2-клеток, основанном на равноценной продукции ими регуляторных цитокинов, имеющих про- и противовоспалительные направления [8,15]. Установлено, что ТХ1-клетки продуцируют мощные цитокины, обладающие провоспалительным действием, такие как ФНО-альфа и др. [15,18]. ТХ2-клетки секретируют противовоспалительные цитокины, такие как ИЛ-10 и др., которые стимулируют преимущественно гуморальное звено иммунитета. Нарушение баланса продукции цитокинов ТХ1/ТХ2 имеет важное значение для прогрессирования многих заболеваний, включая злокачественные новообразования. Исходя из вышесказанного, нами изучено содержание таких цитокинов, как ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке периферической крови больных остеосаркомой. Исследования показали, что сывороточные концентрации интерлейкинов были достоверно повышены у больных с остеосаркомой в сравнении с данными контрольной группы. Так, ИЛ-10 был повышен в 1,3 раза, а уровень ИЛ-6 оказался в 23 раза выше, чем значения контрольной группы ( $p < 0,05$ ) (табл.1). Таким образом, исследования уровня интерлейкинов показал значительное повышение концентрации ИЛ-6 в группе больных с остеосаркомой и достоверное повышение ИЛ-10.

ИЛ-6 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 21-28 кД и является плеiotропным цитокином с широким диапазоном биологической активности, который продуцируется как лимфоидными, так и нелимфоидными клетками организма. Установлено, что ИЛ-6 регулирует иммунный и острофазный ответ, воспаление, онкогенез и гемопоэз [17]. Важное значение в патогенезе злокачественных новообразований отводится ИЛ-10 [9]. ИЛ-10 продуцируется ТХ2-клетками, В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и тучными клетками. Основными механизмами действия ИЛ-10 являются: противовоспалительный, иммуномодулирующий, иммуносупрессивный [9]. Достоверное повышение ИЛ-10 у больных с остеосаркомой, очевидно, указывает на то, что в данном конкретном случае он проявляет себя как иммуносупрессивный белок, который принимает активное участие в формировании и метастазировании опухоли.

Необходимым условием роста опухоли и метастазирования является развитие ангиогенеза.

Ключевой фактор в развитии ангиогенеза — фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). VEGF-опосредованная инвазия капилляров служит важным сигналом, который регулирует морфогенез ростовой пластинки и “запуск” ремоделирования хрящевой ткани [10,22]. VEGF координирует гибель хондроцитов, функции хондрокластов, ангиогенез и формирование кости в ростовой пластинке. Экспрессия VEGF-A в первичных остеосаркомах коррелирует с ростом локальной плотности сосудов в ткани опухоли, развитием легочного метастазирования и неблагоприятным прогнозом для пациентов с указанным диагнозом [10,22]. Проведенные исследования показали, что содержание VEGF-A в сыворотке крови больных с остеосаркомой было повышено в сравнении с нормой (табл.1). Так, в группе здоровых лиц сывороточная концентрация фактора роста эндотелия сосудов составила  $36,3 \pm 0,54$  нг/мл, а в группе больных с впервые выявленной остеосаркомой —  $520,21 \pm 68,5$  нг/мл (табл. 1). Следует отметить, что уровень фактора роста сосудов был повышен в 14,3 раза в группе больных по сравнению с данными контрольной группы, причем, у больных с метастазами наблюдалось достоверное повышение фактора роста сосудов по сравнению с данными у больных без метастазов. Результаты, полученные при изучении экспрессии фактора роста эндотелия сосудов у больных остеосаркомой, указывают на существование прямой зависимости между экспрессией VEGF-A и степенью злокачественности опухоли, а также процессами метастазирования. Гипотеза о том, что рост опухолей и возникновение метастазов зависят от образования новых кровеносных сосудов в настоящее время в значительной степени подтверждена последними открытиями в области молекулярных и клеточных процессов, участвующих в ангиогенезе опухолей (см. [11]).

Таким образом, проведенные исследования позволяют выделить основные про- и противовоспалительные цитокины, которые имеют важное значение в формировании и прогрессировании злокачественного процесса. Выявлен дисбаланс в содержании основных цитокинов иммунной системы у больных остеосаркомой, который может служить важным диагностическим и прогностическим критерием в определении дальнейшей тактики лечения больных с остеосаркомами.

## Выводы

1. Выявлено двукратное повышение сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1бета и ФНО-альфа у больных остеосаркомой.

2. Спонтанная продукция цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-6 была достоверно повышена. Так, ИЛ-10 был повышен в 1,3 раза, а ИЛ-6 в 23 раза выше значений в группе сравнения.

3. Сывороточная концентрация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) у больных остеосаркомой была повышена в 14,3 раза в сравнении с данными контрольной группы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Аббасова С.Г., Липкин В.М., Трапезников Н.Н., Кушлинский Н.Е. Система FAS — FASL в норме и при патологии // *Вопр. биол., мед. фарм. химии.* — 1999. — № 3. — С. 3-17.
- Анрианов В.Л. и др. Опухоли позвоночника у детей. — М. — 1977. — С. 5-10.
- Аничков Н.М. Патогенез кахексии при злокачественных опухолях // *Архив патологии.* — 2005. — Т. 67. — № 5. — С. 51-56.
- Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Хансон К.П. Система дендритных клеток и ее роль в регуляции функциональной активности Т- и В-лимфоцитов человека // *Вопр. онкол.* — 1999. — Т. 45, № 5. — С. 473-478.
- Бережная Н.М. Система интерлейкинов и рак — Киев. — 2000. — 224 с.
- Бассалык Л.С., Кушлинский Н.Е., Ревазова Е.С., Дегтярь В.Г. Стимуляции тестостероном роста штамма остеогенной саркомы человека, трансплантированного бестимусным крысам // *Эксперим. онкол.* — 1998. — Т. 10. — № 6. — С. 29-31.
- Бизер В.А., Кудрявцева Г.Т., Зубарев А.Л. Комбинированное лечение злокачественных костномозговых опухолей позвоночника // *Вестн. травматол. ортопед. им. Н.Н. Приорова.* — 1999. — № 1. — С. 53-55.
- Ветра Я.Я., Иванова Л.В., Крейле И.Э. Цитокины // *Гематология и трансфузиология.* — 2000. — Т. 45. — № 4. — С. 44-48.
- Витковский Ю.А. Влияние интерлейкинов-4 и -10 на систему гемостаза *in vitro* // *Иммунология.* — 2001. — № 1. — С. 43 — 46.
- Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. — Киев: Наук. Думка. — 1998. — С. 317.
- Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Трапезников Н.Н. Изучение передачи митогенных сигналов фактора роста как основа для создания и использования новых противоопухолевых препаратов // *Вопр. мед. биол. и фарм. химии.* — 1999. — № 2. — С. 3-12.
- Дарьялова Л., Чиссов В.И. Диагностика и лечение злокачественных опухолей. — М. — 1993.
- Демичев Н.Д. Гигантоклеточные опухоли костей: опыт резекции и адьювантной криотерапии / *Вестн. хирургии.* — 1994. — № 7 — 12. — С.47-50.
- Еникеев Р.И., Еникеев Д.А., Никитин В.В. Патология системы скольжения при внутрисуставных переломах и пути ее коррекции. — Уфа. -1996. — 175 с.
- Дарьялова С.Л. Использование противоопухолевых препаратов в качестве модификаторов реакции злокачественных опухолей на лучевую терапию. // *Сб. докл. 2-й ежегод. Росс. онкол. конф. «Современные тенденции развития лекарственной терапии опухолей».* — 1998. — С. 76-78.
- Двойрин В.В., Аксель Е.М., Трапезников Н.Н. Статистика злокачественных новообразований в России и некоторых других странах СНГ в 1994. — М. — 1995. — С. 391.
- Иммунодиагностика и иммунокоррекция в терапии злокачественных опухолей./ Муратходжаев Н.К., Димант Д.А., Кузнецов В.Н., Атабекова К.Ю. — Метод. рекоменд. МЗ РУз.- Ташкент. — 1998. — 16 с.
- Кадагидзе З.Г. Новые подходы к регуляции противоопухолевого иммунитета // *Маммология.* — 2007. — № 1. — С. 10-13.
- Кадагидзе З.Г. Субпопуляции лимфоцитов при злокачественном росте // *Вопр. онкол.* — 1994. — Т. 30, №1. — С. 28-29.
- Ковалев Д.В. Органосохраняющие операции на современном этапе комбинированного лечения остеогенной саркомы длинных костей у детей // *Вестн. травматол. Ортопед. им. Н.Н. Приорова.* — 2000. — № 2. — С.76-79.
- Корнилов Б.М., Овчинников О.Д., Шелепов С.В. Органосохраняющие операции при лечении опухолей // *Научно-практ. конф. «Настоящее и будущее костной патологии»:* Тез. докл. — М. — 1997. — С. 49-50.
- Кушлинский Н.Е. Гормоны, аутокринные и паракриновые регуляторы опухолевого роста при остеосаркоме // *Вопр. онкол.* — 2001. -Т. 47. — № 2. — С. 168-173.

*S.N.Navruzov<sup>1</sup>, D.Sh.Polatova<sup>1</sup>, M.S.Geldieva<sup>1</sup>,  
E.I.Nurieva<sup>2</sup>*

#### **Possibilities of study of the main cytokines of the immune system in patients with osteogenic sarcoma**

<sup>1</sup> National Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan

<sup>2</sup> Institute of Immunology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan  
Tashkent

The aim of the study was to investigate the spontaneous production of the major cytokines of the immune system in patients with osteogenic sarcoma. There were studied serum concentrations of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 and IL-10) as well as the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF). It was revealed a misbalance in the presence of the main cytokines of the immune system in patients with osteosarcoma appeared by a significant increase in both pro-and anti-inflammatory cytokines. There was found an increase of the most aggressive tissue cytokines (IL-6 and VEGF), which played an important role in the formation and progression of the disease. Identified immunological characteristics can be an important predictor in determining the future tactics of treatment of patients with osteosarcomas that needs further study.

Поступила в редакцию 25.01.2013