

Received: 2008.07.04  
Accepted: 2008.11.19  
Published: 2008.12.05

## Cytokiny jako markery osteolizy w diagnostyce pacjentów z przerzutami nowotworowymi do kości

### Cytokines as markers of osteolysis in the diagnostics of patients with bone metastases

Magdalena Groblewska, Barbara Mroczo, Małgorzata Czygier, Maciej Szmitkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

#### Streszczenie

W powstawaniu przerzutów do układu kostnego dochodzi do zachwiania równowagi między procesami resorpcji i kościotworzenia, jakie występują w prawidłowej tkance kostnej. Ze względu na mechanizm powstawania wyróżnia się dwa rodzaje przerzutów do układu kostnego: osteolityczne – dominującym procesem jest resorpcja kości, oraz osteosklerotyczne, w których dochodzi do nadbudowy kości przez osteoblasty. W procesach tych biorą udział liczne czynniki wzrostowe i cytokiny, które w sposób endo- lub parakryny regulują aktywność osteoklastów i/lub osteoblastów. Przerzuty nowotworowe do kości są częstym powikłaniem takich nowotworów, jak rak piersi, gruczołu krokowego, płuc, nerki. Ich rozpoznanie jest podstawowym elementem prawidłowej oceny stopnia zaawansowania raka, a co za tym idzie – wdrożenia właściwego leczenia. Poszukuje się zatem odpowiednich wskaźników diagnostycznych, w tym markerów nowotworowych, użytecznych w rozpoznawaniu obecności przerzutów do układu kostnego. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem jako markerów nowotworowych cytokin, z których największe znaczenie mają M-CSF, IL-6, TGF- $\beta$  oraz TNF- $\alpha$ . W pracy przedstawiono procesy przebudowy kostnej, zachodzące w kości prawidłowej i guzach przerzutowych, znaczenie najważniejszych cytokin w rozwoju przerzutów typu osteolitycznego i mechanizmach ich powstawania, a także możliwości ewentualnego zastosowania tych cytokin w diagnostyce najczęściej występujących nowotworów wtórnych układu kostnego.

#### Słowa kluczowe:

cytokiny • markery obrotu kostnego • osteoliza nowotworowa • przerzuty do kości

#### Summary

In normal bone there are two essential processes of bone turnover, resorption and formation, which are disrupted by bone metastases. Two types of bone metastases are known, i.e. osteolytic lesions with dominant bone resorption and osteosclerotic tumors with enhanced osteoblastic bone formation. Numerous cytokines and growth factors regulate the activity of osteoclasts and/or osteoblasts in endo- or paracrine ways, playing crucial roles in the processes of bone turnover. Bone metastases are often the consequences of certain malignant tumors, such as breast, prostate, lung, and renal cancer. The diagnosis of bone metastasis is essential for a determination of the clinical stage of cancer and appropriate treatment. Tumor markers are useful in diagnosis, prognosis, staging, and, especially, monitoring treatment. Tumor markers are also useful in detecting bone metastases. There is growing evidence that various cytokines, especially M-CSF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-6 and IL-7, may be new tumor markers useful in the diagnosis of neoplastic disease. The processes of bone turnover in normal bone and metastatic tumors as well as the significance of the most important cytokines in the development of osteolytic metastases and the possibility of

their use in the diagnosis of the most frequent cancers presenting bone metastases are described in this article.

**Key words:** cytokines • bone turnover markers • neoplastic osteolysis • bone metastases

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=873805>

**Word count:** 2653

**Tables:** 2

**Figures:** –

**References:** 55

**Adres autorki:** dr n. med. Magdalena Groblewska, Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Waszyngtona 15a, 15-269 Białystok; e-mail: bialka@umwb.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein); **BMU** – jednostka przebudowy kości (basic multicellular unit); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (granulocyte-macrophage – colony stimulating factor); **HGF** – hematopoetyczny czynnik wzrostu (hematopoietic growth factor); **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IL** – interleukina; **M-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagowych (macrophage – colony stimulating factor); **MMP** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinase); **OPG** – osteoprotegeryna (osteoprotegerin); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PTHrP** – białko podobne do parathormonu (parathyroid hormone related protein); **RANK** – receptor aktywujący jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-κB (receptor activating nuclear transcriptional factor NF-κB); **RANKL** – ligand RANK; **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β); **TNF** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); **TRAP** – winianooporna kwaśna fosfataza (tartare-resistant acid phosphatase).

## WSTĘP

Przerzuty nowotworowe do kości są częstym powikłaniem choroby nowotworowej. Występują najczęściej u chorych z rakiem piersi lub gruczołu krokowego (65–75%), tarczycy (60%), szyjki macicy (50%), pęcherza moczowego (42%), płuca (30–40%), nerki (20–25%), przetyku (6%) [16]. Ogniska przerzutowe obserwuje się głównie w kręgosłupie, żebrach, miednicy oraz w kościach udowych i ramieniowych. Przerzut nowotworu do kości jest wykrywany najczęściej po rozpoznaniu pierwotnego umiejscowienia choroby. Jednak istnieje pewna grupa chorych, u których dopiero ogniska przerzutowe w kościach są źródłem pierwszych objawów klinicznych raka. Stwierdzenie ich obecności jest podstawowym elementem prawidłowej oceny stopnia klinicznego zaawansowania nowotworu pierwotnego, a także wdrożenia odpowiedniej terapii. Rozpoznanie przerzutów do kości opiera się na diagnostyce radiologicznej i scyntygrafii kości. Są to techniki o dużej czułości diagnostycznej, jednak o dość małej swoistości. Co więcej, monitorowanie terapii i ocena skuteczności leczenia przerzutów tymi metodami mogą być utrudnione. Jedną z przyczyn jest to, że zwiększony wychwyty radionuklidów nie musi odzwierciedlać obecności aktywnych ognisk przerzutowych, a może być następstwem odbudowy kości w odpowiedzi na leczenie. Dlatego też poszukuje się nowych markerów przebudowy kości, które mogłyby być pomocne zarówno w rozpoznawaniu obecności przerzutów nowotworowych do układu kostnego, jak i w monitorowaniu terapii.

## PRZEBUDOWA KOŚCI W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH

Kość jest tkanką, w której w sposób ciągły i cykliczny zachodzi wewnętrzna przebudowa, składająca się z dwóch zasadniczych procesów: kościotworzenia przez osteoblasty i resorpcji z udziałem osteoklastów. Przebudowa kostna, dotycząca zarówno kości zbitych, jak i gąbczastej, odbywa się w tzw. jednostkach przebudowy kości (BMU). Proces ten rozpoczyna się wycofaniem z powierzchni kości komórek wyścielających i aktywacją prekursorów osteoklastów do dojrzewania i funkcjonowania. Osteoblasty aktywują czynniki pobudzające osteoklasty, a komórki te – po uruchomieniu osteolizy – mogą uwalniać czynniki hamujące osteoblasty. Osteoklasty drażą jamę resorpcyjną w „starej” kości, co trwa około 2–4 tygodni i kończy się apoptozą osteoklastów. Po tym okresie jama resorpcyjna zostaje wyścielona osteoblastami, wytwarzającymi w fazie kościotworzenia osteoid. Jest on następnie stopniowo mineralizowany. Po około 4–6 miesiącach fazy kościotworzenia BMU zostaje wypełniona w pełni zmineralizowaną kością [37].

Na procesy resorpcji i kościotworzenia wpływają różne czynniki działające endo- i parakrynnie. Należą do nich hormony, cytokiny i inne związki biologicznie czynne. Czynniki te można podzielić na stymulatory i inhibitory resorpcji lub kościotworzenia.

Do najważniejszych czynników stymulujących resorpcję kości (tabela 1) zalicza się m.in.: aktywną witaminę

Tabela 1. Czynniki stymulujące procesy resorpcji i kościotworzenia

Stymulatory resorpcji	Stymulatory kościotworzenia
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></li> <li>• parathormon</li> <li>• białko podobne do parathormonu (PTHrP)</li> <li>• RANKL</li> <li>• cytokiny hematopoetyczne: M-CSF, GM-CSF</li> <li>• czynniki wzrostu: PDGF, HGF, IGF-II, IGF-IV, TNF-α</li> <li>• prostaglandyny PGE<sub>2</sub></li> <li>• IL-1β, IL-6, IL-8</li> <li>• enzymy proteolityczne: metaloproteinazy (MMP-9) i katepsyny K, L, B</li> <li>• anhydraza węglanowa II</li> <li>• steroidy kory nadnerczy</li> <li>• hormony tarczycy – głównie T3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• endotelina 1</li> <li>• czynniki wzrostu: PDGF, TGF-β, IGF-I, IGF-II, FGFs</li> <li>• białka morfogenetyczne kości BMPs</li> </ul>

D<sub>3</sub> – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathormon i białko podobne do parathormonu, cytokiny hematopoetyczne, będące czynnikami wzrostowymi komórek linii makrofagowej (M-CSF) i linii granulocytarno-makrofagowej (GM-CSF), interleukiny 1, 6, 8 oraz RANKL – ligand RANK, a także prostaglandyny, w tym PGE<sub>2</sub>. W resorpcji kości bierze również udział anhydraza węglanowa, zakwaszająca środowisko zewnątrzkomórkowe, co aktywuje enzymy proteolityczne odpowiedzialne za degradację kolagenu – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-1, MMP-2, MMP-9 oraz katepsyny K, L i B. Głównymi inhibitorami resorpcji kości są osteoprotegereyna (OPG), transformujący czynnik wzrostu β (TGF-β), kalcytonina i estrogeny.

Wśród najważniejszych czynników stymulujących kościotworzenie (tabela 1) wyróżnia się płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), TGF-β oraz białka morfogenetyczne kości (BMP), należące do rodziny transformującego czynnika wzrostu. Do inhibitorów tego procesu zalicza się cytokiny z rodziny czynnika wzrostu fibroblastów (FGF – fibroblast growth factor) i prostaglandyny, a także glikokortykoidy. Niektóre z wymienionych cytokin, np. IL-1 lub FGF mogą odmiennie wpływać – w zależności od ich stężenia lub miejsca działania.

#### ZMIANY W OBREBIE KOŚCI W CHOROBIE NOWOTWOROWEJ

Warunkiem prawidłowego funkcjonowania kości jest zachowanie odpowiedniej równowagi między procesami resorpcji i kościotworzenia, która zależy od współdziałania wymienionych wyżej stymulatorów i inhibitorów obu procesów. W przebiegu choroby nowotworowej są wytwarzane różne cytokiny i czynniki wzrostowe, syntetyzowane zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki organizmu gospodarza. Może wówczas dojść do zaburzenia tej równowagi, zwłaszcza w chwili powstania ognisk przerzutowych w kościach.

Tworzenie przerzutów do kości przebiega początkowo podobnie jak powstawanie przerzutów nowotworowych do innych narządów. Kolejno następujące po sobie etapy obejmują naciekanie ściany naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe, przechodzenie do światła naczyń, wędrówkę z prądem krwi oraz przechodzenie do przestrzeni okołonaczyniowej [34]. Przerzuty do tkanki kostnej są następstwem

wzmoczonej aktywacji osteoklastów, a także stymulującego wpływu komórek podścieliska szpiku kostnego.

Można wyróżnić dwa typy przerzutów nowotworowych ze względu na mechanizm powstawania i rodzaj uszkodzenia kości: przerzuty osteolityczne lub osteosklerotyczne. W przerzutach typu osteosklerotycznego dochodzi do nadbudowy kości przez osteoblasty, a w przerzutach osteolitycznych – do wzmoczonej resorpcji kości przez osteoklasty. Komórki nowotworowe dodatkowo wydzielają czynniki wzrostu, które pobudzają osteoklasty do szybszego niszczenia struktury kostnej. Do osteolizy nowotworowej dochodzi najczęściej w przebiegu szpiczaka mnogiego, raka piersi, płuca i gruczołu krokowego, ale może ona wystąpić również w innych nowotworach. W bardziej zaawansowanych przypadkach może dojść do wystąpienia złamań patologicznych, głównie kompresyjnych trzonów kręgowych, a także kości udowej, czy ramiennej.

W procesie rozwoju przerzutów osteolitycznych do kośćca główną rolę odgrywają osteoklasty i komórki podścieliska szpiku kostnego, wpływające na ich aktywację. Obecność komórek nowotworowych w obrębie tkanki kostnej zaburza naturalną równowagę między resorpcją i kościotworzeniem, w czym ważną rolę pełnią czynniki stymulujące osteoklasty. Należą do nich PTHrP oraz interleukiny 1, 6 i 11, które pobudzają osteoklasty głównie przez oddziaływanie na osteoblasty i komórki podścieliska szpiku [14,29,32]. Pod wpływem tych czynników dochodzi do silnej ekspresji cząsteczek RANKL na powierzchni osteoblastów i komórek podścieliska. RANKL wiąże się ze swoim receptorem RANK na powierzchni osteoklastów i ich prekursorów, co aktywuje ekspresję wielu genów, która przyspiesza dojrzewanie prekursorów osteoklastów, jak i uaktywnia czynność osteolityczną dojrzałych postaci [29,40]. W nadmiernej aktywacji osteoklastów ważną rolę może także odgrywać niedobór osteoprotegereyny – rozpuszczalnego receptora, wiążącego się z RANKL [52].

#### ROLA CYTOKIN W TWORZENIU PRZERZUTÓW NOWOTWOROWYCH DO KOŚCI

Przerzuty osteolityczne do kości są związane ze stymulacją resorpcji przez różne czynniki, m.in. PTHrP, cytokiny z rodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF – tu

Tabela 2. Znaczenie cytokin w rozwoju i diagnostyce przerzutów nowotworowych do układu kostnego

Badany czynnik	Nowotwór	Wnioski	Autor
TGF- $\beta$	rak piersi (myszy)	obecność nieaktywnego receptora TGF- $\beta$ na komórkach wiązała się z wydłużeniem czasu przeżycia zwierząt, mniejszą destrukcją kości i mniejszą liczbą osteoklastów w obrębie guza przerzutowego wzrost ekspresji aktywnego receptora wywoływał nasilenie syntezy PTHrP, wzrost liczby przerzutów osteolitycznych, skrócenie czasu przeżycia zwierząt	[10]
	gruczolę krokowego	ekspresja TGF- $\beta$ 1 była zwiększona w ogniskach pierwotnych i guzach przerzutowych raka gruczolę krokowego stężenia w surowicy korelowały ze stężeniem PSA i były wyższe u chorych z nowotworem w porównaniu z osobami zdrowymi	[11]
	gruczolę krokowego	stężenia w surowicy korelowały ze stężeniem PSA i były wyższe u chorych z nowotworem w porównaniu z osobami zdrowymi	[1]
IL-6	nerki	ekspresja tkankowa TGF- $\beta$ i jego receptorów zwiększała się w przerzutach raka nerki do kości komórki nowotworu miały zdolność do wydzielania TGF- $\beta$ , potwierdzoną techniką Western-blot	[19]
	gruczolę krokowego	stężenia w surowicy korelowały ze stężeniem PSA i były wyższe u chorych z przerzutami do kości w porównaniu do osób zdrowych i pacjentów z niższymi stopniami zaawansowania nowotworu. U chorych z patologicznymi złamaniami stężenia IL-6 przekraczały 300 pg/ml	[1]
	nerki	stwierdzono ekspresję IL-6 i jej receptora w guzach przerzutowych raka nerki do kości oraz syntezę IL-6 <i>in vitro</i> przez komórki nowotworu, stymulowaną przez dodanie do hodowli TGF- $\beta$ i TGF- $\alpha$	[49]
M-CSF	nerki	podwyższone stężenia IL-6 w surowicy chorych były niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia	[29]
	piersi	M-CSF stymulował różnicowanie prekursorów osteoklastów i ich aktywację, co powodowało miejscową osteolizę i mogło ułatwiać osiedlanie komórek nowotworowych w tkance kostnej oraz w szpiku	[23]
TNF- $\alpha$	szpiczak (szczury)	stwierdzono hamowanie wzrostu komórek linii makrofagowej oraz zmniejszenie tworzenia formacji podobnych do osteoklastów zależne od dawki podanego inhibitora receptora dla M-CSF	[30]
IL-7	rak piersi	komórki raka piersi miały zdolność syntezy TNF- $\alpha$ , pobudzającego resorpcję kości przez osteoklasty	[31]
	różne guzy lite	w surowicy chorych na raka płuc drobno- i niedrobnokomórkowego, raka gruczolę krokowego, raka jelita grubego z przerzutami do kości stężenia IL-7 wzrastały w porównaniu z osobami zdrowymi i pacjentami bez przerzutów osteolitycznych	[37]

mor necrosis factor), RANKL, cytokiny hematopoetyczne: M-CSF i GM-CSF, interleukiny -1, -3, -6 (tabela 2).

### Transformujący czynnik wzrostu $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Charakterystyczną cechą kości jest magazynowanie w macierzy zewnątrzkomórkowej różnych czynników wzrostowych i cytokin w postaci nieaktywnej. Należą do nich TGF- $\beta$ , insulinopodobny czynnik wzrostu 1 i 2 (IGF – insulin-like growth factor), FGF-1 i FGF-2 i PDGF [15]. Osteoliza tkanki kostnej przez osteoklasty powoduje uwolnienie z macierzy międzykomórkowej dużych ilości tych czynników, głównie TGF- $\beta$  [34]. Z rodziny TGF- $\beta$  największe znaczenie w pobudzaniu różnicowania osteoklastów przypisuje się TGF- $\beta$ 1 [21]. Uwalnianie tych cytokin podczas osteolizy jest prawdopodobnie podstawowym elementem hipotezy tzw. „błędnego koła” [29,31], która za-

kląda istnienie dodatniego sprzężenia zwrotnego między komórkami nowotworowymi, osteoblastami, komórkami podścieliska szpiku kostnego i osteoklastami.

Czynnik ten jest cytokiną o wielorakim wpływie na rozwój komórek, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych. Uważa się, że TGF- $\beta$ 1 działa raczej hamująco na wzrost prawidłowych komórek nabłonkowych i nowotworowych we wczesnych stadiach karcynogenezy [9]. Wykazano także, że w przypadku guzów o wysokim stopniu zaawansowania czynnik ten – paradoksalnie – działa pobudzająco ze względu na zmienione przekazywanie sygnału i powstawanie oporności na jego działanie inhibicyjne [10], co w konsekwencji ułatwia powstawanie przerzutów nowotworowych. Wszczepienie myszom komórek raka piersi linii MDA-MB-231, wykazujących ekspresję zmutowanego, nieaktywnego receptora TGF- $\beta$  typu II (T $\beta$ RRII $\Delta$ cyt), wią-

zało się z dłuższym czasem przeżycia zwierząt, mniejszą destrukcją kości i mniejszą liczbą osteoklastów w obrębie guza przerzutowego. Zahamowanie receptora T $\beta$ RII $\Delta$ cyt i zwiększona ekspresja aktywnego receptora TGF- $\beta$  typu I w wymienionych komórkach powodowały, że komórki nowotworu syntetyzowały duże ilości PTHrP, co zwiększało liczbę przerzutów osteolitycznych i skracało czas przeżycia myszy [54].

TGF- $\beta$  jest także jedną z cytokin związanych z rozwojem raka gruczołu krokowego. Wykazano jego zwiększoną ekspresję w komórkach raka gruczołu krokowego zarówno w ogniskach pierwotnych, jak i przerzutowych w węzłach chłonnych [11]. Stwierdzono, że stężenia TGF- $\beta$ 1 w osoczu chorych z tym nowotworem i przerzutami do kości były znamienne wyższe w porównaniu ze zdrowymi mężczyznami, korelowały również ze stężeniem PSA w surowicy [1].

W raku nerki czynnik ten odgrywa również znaczącą rolę w rozwoju nowotworu i tworzeniu przerzutów do kości, przy czym przekazywanie sygnału może się odbywać drogą bezpośrednią – przez receptory TGF- $\beta$ RI i TGF- $\beta$ RII lub pośrednią z udziałem IL-6. Wykazano tkankową ekspresję TGF- $\beta$  oraz jego receptorów obu typów, w przerzutach nowotworowych raka jasnokomórkowego nerki do kości, a także w hodowli komórek tego nowotworu [20]. Ci sami badacze stwierdzili, że komórki te są zdolne do wydzielania TGF- $\beta$ , którego obecność w medium z hodowli komórek było potwierdzone metodą ELISA i analizą Western-blot [20].

### Interleukina 6

Kolejnym czynnikiem, mającym istotny wpływ na resorpcję kości, jest interleukina 6. Cytokina ta odgrywa główną rolę w patogenezie i rozwoju nowotworów, działając jako auto- i parakryny czynnik wzrostowy. Stwierdzono, że ułatwia ona proliferację komórek raka jajnika i jelita grubego [6,49]. Ekspresję tej cytokiny oraz jej rozpuszczalnego receptora sIL-6R wykazano m.in. w tkankach raka piersi [13]. Podwyższone stężenia IL-6 w surowicy stwierdzono u chorych na raka płuc [19,45], trzonu macicy [4] i inne nowotwory złośliwe.

Uważa się, że pewne interakcje komórkowe między osteoblastami a progenitorami osteoklastów są konieczne do tego, by IL-6 mogła stymulować tworzenie osteoklastów w kościach. Cytokina ta pobudza rozwój progenitorów osteoklastów. Wykazano także, że w obecności IL-6 i jej rozpuszczalnego receptora nasila się tworzenie osteoklastów w hodowlach komórek szpiku kostnego zarówno ludzkich, jak i mysich [22,47].

W cytowanych wyżej badaniach Adlera i wsp. [1] wykazano, że stężenia IL-6 w surowicy chorych na raka gruczołu krokowego były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych i obecności przerzutów nowotworu do układu kostnego w porównaniu z niższymi stopniami zaawansowania. Poziomy stężenie tej cytokiny korelowały również ze stężeniem PSA. Ponadto stężenia IL-6 u chorych z patologicznymi złamaniami związanymi z obecnością guza przerzutowego i nasiloną osteolizą przekraczały 300 pg/ml, co może wskazywać na przydatność tej cytokiny w rozpoznawaniu przerzutów do kości.

IL-6 odgrywa również istotną rolę w rozwoju raka nerki i powstawaniu jego przerzutów do kości. Ekspresję mRNA tej cytokiny i jej syntezę wykazano w hodowli komórek raka nerki [26]. Również w guzach przerzutowych tego nowotworu do kości stwierdzono ekspresję IL-6 i jej receptora IL-6R [50]. Komórki nowotworowe wydzielają znaczne ilości IL-6, a dodanie jednego z czynników wzrostowych – TGF- $\beta$  lub TGF- $\alpha$  do hodowli komórek nowotworu powodowało 3-krotny wzrost jej sekrecji, zaś obu czynników jednocześnie wzrost 48-krotny [50]. Podwyższone stężenia IL-6 w surowicy chorych z tym nowotworem były także niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia pacjentów [30].

### Czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagowych (M-CSF)

Jedną z cytokin niezbędnych do dojrzewania i różnicowania osteoklastów jest M-CSF, czynnik wzrostowy linii makrofagowej, z której wywodzą się również komórki kościogubne. Stwierdzono, że cytokina ta stymuluje różnicowanie prekursorów osteoklastów i ich aktywację, co powoduje miejscową osteolizę i może ułatwiać osiedlanie komórek nowotworowych w tkance kostnej oraz w szpiku [24].

Wykazano, że M-CSF bierze również udział w rozwoju niektórych nowotworów nielimioidalnych. Ekspresję receptora tego czynnika stwierdzono m.in. w komórkach raka płuc [33], piersi [25,53] i gruczołu krokowego [41]. Wskazuje to, że M-CSF syntetyzowany przez komórki nowotworu może w sposób autokryny lub parakryny pobudzać wzrost guza [44]. Podwyższone stężenia M-CSF w surowicy stwierdzono u pacjentów z rakiem okrężnicy [27], niedrobnokomórkowym rakiem płuca [2,28,33], jajnika [2,42] oraz z mięsakami kości i tkanek miękkich [18]. Wykazano również, że u chorych na raka płuc stężenia tej cytokiny stanowiły niezależny czynnik prognostyczny przeżycia pacjentów [17].

Istotną rolę M-CSF w rozwoju przerzutów osteolitycznych potwierdzają badania Ohno i wsp. [31]. Badacze ci wykazali, że hamowanie wzrostu komórek linii makrofagowej i powstawania syncytiów komórkowych o cechach osteoklastów zależy od dawki podanego inhibitora kinazy tyrozynowej *c-fms* (receptora M-CSF). Oceniali również wpływ M-CSF i jego receptora na rozwój przerzutów do kości u szczurów, którym podano dosercowo komórki linii szpiczaka ludzkiego, co powodowało osiedlanie się komórek nowotworu w kościach i osteolizę. U zwierząt tych po podaniu inhibitora *c-fms* zmniejszyły się obszary osteolityczne, natomiast nie zaobserwowano zahamowania wzrostu komórek szpiczaka *in vitro*, być może dlatego, że na powierzchni komórek w hodowli występuje mniej receptorów M-CSF niż w komórkach znajdujących się w obrębie tkanki kostnej.

El Hajj Dib i wsp. [12] również wykazali, że stosowanie inhibitora receptora M-CSF, jakim jest imatinib, nasila apoptozę dojrzałych osteoklastów i hamuje ich aktywność resorpcyjną, co mogłoby być wykorzystane w leczeniu już powstałych i zapobieganiu tworzenia nowych przerzutów do kości. Zahamowanie nadmiernej resorpcji kości w przypadku przerzutów nowotworowych można osiągnąć przez redukcję różnicowania osteoklastów – wpływ na prekur-

sory lub przez hamowanie syntezy i ekspresji RANKL, a także przez przyspieszenie lub nasilenie apoptozy dojrzających osteoklastów. Na przeżycie osteoklastów wpływają białka syntetyzowane i prezentowane przez komórki linii osteoblastów, m.in. M-CSF. Imatinib – inhibitor receptora M-CSF na komórkach linii makrofagowej, z której wywodzą się osteoklasty, powinien modulować ich przeżycie i resorpcję kości. W hodowli oczyszczonych osteoklastów uzyskano zależny od dawki imatinibu wzrost apoptozy, natomiast w hodowli mieszanej komórek kości (osteoklasty, osteoblasty i komórki zrębu) z fragmentami zdrowej kości – zahamowanie resorpcji kości [12].

Wykazano także, że komórki nowotworowe raka piersi mogą bezpośrednio wpływać na osteoklastogenezę przez wydzielanie M-CSF i regulację układu RANK-RANKL w komórkach zrębu szpiku [24]. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli komórek linii MDA-MB-231. Są to ludzkie komórki raka piersi charakteryzujące się szczególnie dużą skłonnością do tworzenia przerzutów nowotworowych do kości w modelach zwierzęcych. Co prawda są dowody na to, że komórki nowotworowe bezpośrednio powodują destrukcję kości, w większości przypadków osteoliza następuje jednak przez aktywację natywnych osteoklastów, o czym może świadczyć ich zwiększona liczba w miejscu przerzutu. Ponieważ w tworzeniu osteoklastów największą rolę odgrywają M-CSF i RANKL, badacze ci prowadzili hodowlę komórek raka piersi MDA-MB-231, wykazujących ekspresję M-CSF, z komórkami zrębu szpiku. W hodowli uzyskali zwiększone wytwarzanie osteoklastów, co może świadczyć o stymulującym wpływie komórek nowotworowych na tworzenie i dojrzewanie osteoklastów. Wykazali oni również, że podanie rekombinowanych postaci M-CSF i RANKL w izolowanej hodowli komórek hematopoetycznych (bez komórek zrębu szpiku, będących endogennym źródłem tych czynników) powodowało różnicowanie komórek i powstawanie wielojądrzastych tworów, wykazujących ekspresję TRAP – swoistego markera osteoklastów. Może to być dowodem na bezpośredni wpływ komórek nowotworowych na stymulację osteoklastów, a tym samym pobudzenie osteolizy.

### Czynnik martwicy nowotworów $\alpha$

Czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) jest wytwarzany głównie przez aktywowane monocyty i makrofagi, limfocyty B i T oraz fibroblasty, a także wiele innych rodzajów komórek. Wykazuje aktywność prozapalną, reguluje wzrost i różnicowanie wielu typów komórek. TNF- $\alpha$  jest także czynnikiem o silnym działaniu przeciwnowotworowym, które polega na bezpośrednim hamowaniu wzrostu nowotworów, immunomodulacji i wpływie na układ naczyniowy [23]. Jednak wykazano, że TNF- $\alpha$  jest wytwarzany przez komórki nowotworowe i może stymulować wzrost różnych nowotworów [23]. Stwierdzono obecność mRNA tego czynnika w hodowli komórek różnych nowotworów, m.in. raka jelita grubego [8], jajnika [46] i piersi [35]. Stężenia TNF- $\alpha$  w surowicy były zwiększone u chorych z rakiem piersi [5] i rakiem gruczołowym endome-

trium [43], a odsetek podwyższonych stężeń tego czynnika wzrastał ze stopniem zaawansowania nowotworu.

Stwierdzono, że obecność TNF- $\alpha$  jest niezbędna do tworzenia wielojądrzastych osteoklastów [3], a także, że czynnik ten działa synergicznie z RANKL, powodując zwiększoną destrukcję kości u myszy z niedoborem estrogenów [38]. W badaniu Pedersona i wsp. [32] wykazano, że komórki raka piersi MDA-MB-231 mają m.in. zdolność syntezy TNF- $\alpha$ , pobudzającego resorpcję kości przez osteoklasty – jednak rola tego czynnika w procesie destrukcji kości w warunkach *in vivo* nie została dokładnie poznana.

### Interleukina 7

Wykazano, że jednym z czynników pobudzających zależną od TNF- $\alpha$  osteoklastogenezę jest interleukina 7, syntetyzowana przez komórki zrębu szpiku [51]. Ekspresję mRNA IL-7 wykryto m.in. w komórkach raka nerki [48] oraz nowotworach ośrodkowego układu nerwowego i raka płuc [7], co sugeruje, że cytokina ta może odgrywać istotną rolę w rozwoju guzów litych. W surowicy chorych na różne nowotwory (rak płuc drobno- i niedrobnokomórkowy, gruczołu krokowego, jelita grubego) z przerzutami do kości stwierdzono podwyższone stężenia IL-7 w porównaniu z osobami zdrowymi i pacjentami bez przerzutów osteolitycznych [38]. Wykazano wytwarzanie tej cytokiny w hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, zwłaszcza monocytów i limfocytów B. We wszystkich hodowlach komórkowych dodanie IL-7 zwiększało osteoklastogenezę i syntezę TNF- $\alpha$ . Roato i wsp. [38] sugerują, że stężenie IL-7 w surowicy chorych na różne nowotwory może być klinicznym wskaźnikiem rozwoju choroby i zajęcia układu kostnego.

### PODSUMOWANIE

W przebiegu wielu nowotworów złośliwych często występują przerzuty do kości. Nierzadko stanowią one pierwszy objaw kliniczny choroby nowotworowej. Rozpoznanie obecności guza przerzutowego w układzie kostnym za pomocą metod obrazowych, a zwłaszcza monitorowanie leczenia może sprawiać trudności diagnostyczne – nie zawsze zwiększone gromadzenie znacznika w badaniu scyntygraficznym świadczy o aktywności procesu osteolizy, czy występowaniu guza przerzutowego. W związku z tym poszukuje się nowych metod pozwalających na wczesne wykrywanie obecności przerzutów nowotworowych do kości, które charakteryzowałyby się większą czułością i swoistością diagnostyczną niż stosowane dotychczas. Obecnie duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem wskaźników biochemicznych, w tym cytokin, a zwłaszcza czynników wzrostowych, regulujących mechanizmy powstawania ognisk przerzutowych w układzie kostnym. Oznaczanie ich stężeń w surowicy lub osoczu chorych może być przydatne w diagnostyce przerzutów nowotworowych do kości, a także w określeniu rokowania i monitorowaniu przebiegu leczenia – konieczne są jednak dalsze badania w tym kierunku.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Adler H.L., McCurdy M.A., Kattan M.W., Timme T.L., Scardino P.T., Thompson T.C.: Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J. Urol.*, 1999; 161: 182–187
- [2] Asschert J.G., Vellenga E., Hollema H., van der Zee A.G., de Vries E.G.: Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interleukin-11 (IL-11) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in p53-characterised human ovarian carcinomas. *Eur. J. Cancer*, 1997; 33: 2246–2251
- [3] Azuma Y., Kaji K., Katogi R., Takeshita S., Kudo A.: Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4858–4864
- [4] Bellone S., Watts K., Cane' S., Palmieri M., Cannon M.J., Burnett A., Roman J.J., Pecorelli S., Santin A.D.: High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2005; 98: 92–98
- [5] Berberoglu U., Yildirim E., Celen O.: Serum levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  correlate with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2004; 19: 130–134
- [6] Brozek W., Bises G., Girsch T., Cross H.S., Kaiser H.E., Peterlik M.: Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur. J. Cancer*, 2005; 41: 2347–2354
- [7] Cosenza L., Gorgun G., Urbano A., Foss F.: Interleukin-7 receptor expression and activation in nonhaematopoietic neoplastic cell lines. *Cell Signal.*, 2002; 14: 317–325
- [8] Csiszár A., Szentes T., Haraszti B., Balázs A., Petrányi G.G., Pócsik E.: The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.*, 2004; 10: 109–116
- [9] Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A.: TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.*, 2001; 29: 117–129
- [10] Dumont N., Arteaga C.L.: Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell*, 2003; 3: 531–536
- [11] Eastham J.A., Truong L.D., Rogers E., Kattan M., Flanders K.C., Scardino P.T., Thompson T.C.: Transforming growth factor- $\beta$  1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. *Lab. Invest.*, 1995; 73: 628–635
- [12] El Hajj Dib I., Gallet M., Mentaverri R., Sévenet N., Brazier M., Kamel S.: Imatinib mesylate (Gleevec) enhances mature osteoclast apoptosis and suppresses osteoclast bone resorbing activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006; 551: 27–33
- [13] Garcia-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R., Royuela M.: IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and *in situ* human breast carcinoma. *Histopathology*, 2005; 47: 82–89
- [14] Guise T.A., Yin J.J., Taylor S.D., Kumagai Y., Dallas M., Boyce B.F., Yoneda T., Mundy G.R.: Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 1544–1549
- [15] Hauschka P.V., Chen T.L., Mavrakos A.E.: Polypeptide growth factors in bone matrix. *Ciba Found. Symp.*, 1988; 136: 207–225
- [16] Jambhekar N.A., Borges A.: Metastases involving bone pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. WHO Classification of Tumors IARC Press Lyon, 2002
- [17] Kamińska J., Kowalska M., Kotowicz B., Fuksiewicz M., Glogowski M., Wojcik E., Chechlińska M., Steffen J.: Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF – an independent prognostic factor. *Oncology*, 2006; 70: 115–125
- [18] Kamińska J., Kowalska M., Rysińska A.: Cytokiny w surowicy krwi u chorych na nowotwory złośliwe. *Nowotwory*, 1999; 49: 21–26
- [19] Katsumata N., Eguchi K., Fukuda M., Yamamoto N., Ohe Y., Oshita F., Tamura T., Shinkai T., Saijo N.: Serum levels of cytokines in patients with untreated primary lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 553–559
- [20] Kominsky S.L., Doucet M., Brady K., Weber K.L.: TGF- $\beta$  promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. *J. Bone Miner. Res.*, 2007; 22: 37–44
- [21] Koseki T., Gao Y., Okahashi N., Murase Y., Tsujisawa T., Sato T., Yamato K., Nishihara T.: Role of TGF- $\beta$  family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell. Signal.*, 2002; 14: 31–36
- [22] Kurihara N., Bertolini D., Suda T., Akiyama Y., Roodman G.D.: IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.*, 1990; 144: 4226–4230
- [23] Malik S.T.: Tumour necrosis factor: roles in cancer pathophysiology. *Semin. Cancer Biol.*, 1992; 3: 27–33
- [24] Mancino A.T., Klimberg V.S., Yamamoto M., Manolagas S.C., Abe E.: Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells. *J. Surg. Res.*, 2001; 100: 18–24
- [25] McDermott R.S., Deneux L., Mosseri V., Védrenne J., Clough K., Fourquet A., Rodriguez J., Cosset J.M., Sastre X., Beuzeboc P., Pouillart P., Scholl S.M.: Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression. *Eur. Cytokine Netw.*, 2002; 13: 121–127
- [26] Miki S., Iwano M., Miki Y., Yamamoto M., Tang B., Yokokawa K., Sonoda T., Hirano T., Kishimoto T.: Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.*, 1989; 250: 607–610
- [27] Mroczko B., Szmítkowski M.: Czynniki wzrostu kolonii makrofagowych (M-CSF) w diagnostyce i monitorowaniu niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2001; 105: 203–209
- [28] Mroczko B., Szmítkowski M., Okulczyk B.: Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) in colorectal cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002; 40: 351–355
- [29] Mundy G.R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 584–593
- [30] Negrier S., Perol D., Menetrier-Caux C., Escudier B., Pallardy M., Ravaud A., Douillard J.Y., Chevreaux C., Lasset C., Blay J.Y.; Groupe Français d'Immunotherapie: Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6 – from the Groupe Français d'Immunotherapie. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 2371–2378
- [31] Ohno H., Kubo K., Murooka H., Kobayashi Y., Nishitoba T., Shibuya M., Yoneda T., Ise T.: A c-fms tyrosine kinase inhibitor, Ki20227, suppresses osteoclast differentiation and osteolytic bone destruction in a bone metastasis model. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 2634–2643
- [32] Pederson L., Winding B., Foged N.T., Spelsberg T.C., Oursler M.J.: Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. *Cancer Res.*, 1999; 59: 5849–5855
- [33] Pei X.H., Nakanishi Y., Takayama K., Bai F., Hara N.: Granulocyte, granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors can stimulate the invasive capacity of human lung cancer cells. *Br. J. Cancer*, 1999; 79: 40–46
- [34] Pfeilschifter J., Mundy G.R.: Modulation of type  $\beta$  transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 2024–2028
- [35] Puztai L., Clover L.M., Cooper K., Starkey P.M., Lewis C.E., McGee J.O.: Expression of tumour necrosis factor  $\alpha$  and its receptors in carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer*, 1994; 70: 289–292
- [36] Rasmussen A.A., Cullen K.J.: Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998; 47: 219–233
- [37] Riggs B.L., Parfitt A.M.: Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.*, 2005; 20: 177–184
- [38] Roato I., Brunetti G., Gorassini E., Grano M., Colucci S., Bonello L., Buffoni L., Manfredi R., Ruffini E., Ottaviani D., Ciuffreda L., Mussa A., Ferracini R.: IL-7 up-regulates TNF-alpha-dependent osteoclastogenesis in patients affected by solid tumor. *PLoS ONE*, 2006; 1: e124
- [39] Roggia C., Gao Y., Cenci S., Weitzmann M.N., Toraldo G., Isaia G., Pacifici R.: Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 13960–13965
- [40] Roodman G.D.: Biology of osteoclast activation in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 3562–3571
- [41] Savarese D.M., Valinski H., Quesenberry P., Savarese T.: Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*, 1998; 34: 80–91

- [42] Scholl S.M., Bascou C.H., Mosseri V., Olivares R., Magdelenat H., Dorval T., Palangié T., Validire P., Pouillart P., Stanley E.R.: Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 1994; 69: 342–346
- [43] Shaarawy M., Abdel-Aziz O.: Serum tumour necrosis factor  $\alpha$  levels in benign and malignant lesions of the endometrium in postmenopausal women. A preliminary study. *Acta Oncol.*, 1992; 31: 417–420
- [44] Sherr C.J.: Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood*, 1990; 75: 1–12
- [45] Songür N., Kuru B., Kalkan F., Ozdilekcan C., Cakmak H., Hizel N.: Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori*, 2004; 90: 196–200
- [46] Szlosarek P.W., Grimshaw M.J., Kulbe H., Wilson J.L., Wilbanks G.D., Burke F., Balkwill F.R.: Expression and regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 382–390
- [47] Tamura T., Udagawa N., Takahashi N., Miyaura C., Tanaka S., Yamada Y., Koishihara Y., Ohsugi Y., Kumaki K., Taga T., Kishimoto T., Suda T.: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 11924–11928
- [48] Trinder P., Seitzer U., Gerdes J., Seliger B., Maeurer M.: Constitutive and IFN- $\gamma$  regulated expression of IL-7 and IL-15 in human renal cell cancer. *Int. J. Oncol.*, 1999; 14: 23–31
- [49] Wang Y., Yang J., Gao Y., Du Y., Bao L., Niu W., Yao Z.: Regulatory effect of e2, IL-6 and IL-8 on the growth of epithelial ovarian cancer cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 2005; 2: 365–372
- [50] Weber K., Doucet M., Kominsky S.: Renal cell carcinoma bone metastasis – elucidating the molecular targets. *Cancer Metastasis Rev.*, 2007; 26: 691–704
- [51] Weitzmann M.N., Cenci S., Rifas L., Brown C., Pacifici R.: Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood*, 2000; 96: 1873–1878
- [52] Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K.: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998; 139: 1329–1337
- [53] Yee L.D., Liu L.: The constitutive production of colony stimulating factor 1 by invasive human breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 4379–4383
- [54] Yin J.J., Selander K., Chirgwin J.M., Dallas M., Grubbs B.G., Wieser R., Massagué J., Mundy G.R., Guise T.A.: TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.*, 1999; 103: 197–206
- [55] Yu H., Rohan T.: Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1472–1489