

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Кушлинский Н.Е.¹, Алферов А.А.¹, Булычева И.В.¹, Тимофеев Ю.С.¹, Короткова Е.А.¹, Хван О.Т.¹, Кузьмин Ю.Б.¹, Кузнецов И.Н.¹, Бондарев А.В.², Щупак М.Ю.², Соколов Н.Ю.¹, Ефимова М.М.¹, Герштейн Е.С.¹, Сушенцов Е.А.¹, Алиев М.Д.³, Мусаев Э.Р.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ТИПИЧНЫМИ ОСТЕОСАРКОМОЙ И ХОНДРОСАРКОМОЙ КОСТИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²Московская городская онкологическая больница № 62, 143423, Московская область, Красногорский район, п/о Степановское, поселок Истра, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

Представлены результаты иммуноферментного исследования содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови до начала лечения у 133 больных новообразованиями костей в возрасте от 6 до 70 лет и 57 практически здоровых доноров 12-70 лет, составивших группу контроля. У 14 пациентов новообразования имели доброкачественный характер, у 16 диагностирована пограничная гигантоклеточная опухоль кости и у 103 больных были злокачественные поражения костей, в т. ч. остеосаркома – у 39, хондросаркома – у 42 пациентов. Концентрации рецептора sPD-1 в сыворотке крови группы контроля и больных первичными опухолями костей не различались, тогда как уровень sPD-L1 у больных опухолями костей был статистически значимо повышен ($p < 0,0000001$). С помощью построения кривой ROC выявлен порог концентрации sPD-L1, равный 16,5 нг/мл, при котором чувствительность теста относительно здорового контроля составляет 75,9%, специфичность – 75,4%. Однако, частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 нг/мл, у больных доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями костей примерно одинакова. Проанализировав особенности выявления sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными злокачественными поражениями костной ткани – остеосаркомой и хондросаркомой, – установили, что при обоих типах опухолей уровень sPD-L1 статистически значимо выше, чем в контроле, однако при хрящеобразующих опухолях в сыворотке крови циркулирует преимущественно растворимый лиганд sPD-L1, при костеобразующих – рецептор sPD-1. В частности, уровень sPD-1 статистически значимо выше у больных типичной остеосаркомой по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой ($p = 0,002437$), а соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркоме высоко значимо вдвое выше, чем при остеосаркоме (0,81 и 0,35 соответственно, $p = 0,000284$). Чувствительность теста sPD-L1 $\geq 16,5$ нг/мл в группе больных типичной остеосаркомой составляет всего 70,2%, а у больных типичной хондросаркомой – 84,6%. Сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 у больных остеосаркомой и хондросаркомой не были связаны с показателями распространенности опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухоли, локализацией новообразования в костях скелета и типом пораженной кости. Таким образом, соотношение растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути PD-1/PD-L различается у больных костеобразующими и хрящеобразующими саркомами костей, при этом sPD-L1 может иметь потенциальное диагностическое значение именно при хрящеобразующих саркомах.

Ключевые слова: опухоли костей; sPD-1, sPD-L1; остеосаркома; хондросаркома; сыворотка крови.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Булычева И.В., Тимофеев Ю.С., Короткова Е.А., Хван О.Т., Кузьмин Ю.Б., Кузнецов И.Н., Бондарев А.В., Щупак М.Ю., Соколов Н.Ю., Ефимова М.М., Герштейн Е.С., Сушенцов Е.А., Алиев М.Д., Мусаев Э.Р. Сравнительный анализ уровней растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 669-675. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-669-675>

Kushlinskii N.E.¹, Alferov A.A.¹, Boulytcheva I.V.¹, Timofeev Yu.S.¹, Korotkova E.A.¹, Khvan O.T.¹, Kuzmin Yu.B.¹, Kuznetsov I.N.¹, Bondarev A.V.², Shchupak M.Yu.², Sokolov N.Yu.¹, Efimova M.M.¹, Gershtein E.S.¹, Sushentsov E.A.¹, Aliev M.D.³, Musaev E.R.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE LEVELS OF SOLUBLE FORMS OF RECEPTOR AND LIGAND OF THE PD-1 / PD-L1 IMMUNE CHECKPOINT IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH TYPICAL BONE OSTEOSARCOMA AND CHONDROSARCOMA

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russia;

²Moscow City Oncological Hospital No. 62, 143423, Moscow Region, Krasnogorsk District, p / o Stepanovskoye, Istra settlement, Russia;

³National Medical Research Center of Radiology Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia

Results of ELISA investigation of the pretreatment sPD-1 and sPD-L1 content in blood serum of 133 bone neoplasms patients aged 6-70 years and 57 practically healthy control persons aged 12-70 years are described. In 14 patients the neoplasms were of a benign character, in 16 – borderline giant-cell bone tumor was diagnosed, and in 103 – malignant bone lesions including 39 osteosarcomas and 42 chondrosarcomas were revealed. The sPD-1 receptor concentrations in blood serum did not differ between control healthy persons and primary bone tumor patients, while serum sPD-L1 level in bone tumor patients was statistically significantly increased ($p < 0.0000001$). By means of ROC curve construction a cut-off sPD-L1 level of 16.5 pg/ml was found that imposed 75,9% sensitivity and 75,4% specificity in relation to healthy control. However, the frequency of sPD-L1 levels exceeding 16.5 pg/ml was approximately similar in benign, borderline and malignant bone tumor patients. Analysis of the pattern of sPD-1 and sPD-L1 circulation in the peripheral blood of patients with the most prevalent malignant bone tumors – osteosarcoma and chondrosarcoma – demonstrated that in both sarcoma types sPD-L1 level was significantly higher than in control, but in patients with chondrogenic tumors the soluble ligand sPD-L1 dominates in the circulation, while in those with osteogenic tumors – sPD-1 receptor prevails. In particular, sPD-1 level is statistically significantly higher in patients with typical osteosarcoma than in those with typical chondrosarcoma ($p = 0.002437$), and sPD-L1/sPD-1 concentration ratio in chondrosarcoma is highly significantly more than 2-fold higher than in osteosarcoma (0.81 and 0.35 respectively; $p = 0.000284$). The sensitivity of sPD-L1 ≥ 16.5 pg/ml test in typical osteosarcoma patients' group comprised only 70.2%, and in those with typical chondrosarcoma – 84.6%. Serum sPD-1 u sPD-L1 concentrations in osteosarcoma and chondrosarcoma patients were not associated with the indices of tumor advancement, its histological grade, localization in the osseous system, and type of affected bone. Thus, it can be concluded that the ratio between circulating soluble forms of the receptor and the ligand of PD-1/PD-L signaling pathway differs between patients with chondrogenic and those with osteogenic tumors, sPD-L1 being diagnostically valuable mostly for chondrogenic bone neoplasms.

Key words: bone tumors; sPD-1, sPD-L1; osteosarcoma; chondrosarcoma; serum.

For citation: Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Boulytcheva I.V., Timofeev Yu.S., Korotkova E.A., Khvan O.T., Kuzmin Yu.B., Kuznetsov I.N., Bondarev A.V., Shchupak M.Yu., Sokolov N.Yu., Efimova M.M., Gershtein E.S., Sushentsov E.A., Aliev M.D., Musaev E.R. Comparative analysis of the levels of soluble forms of receptor and ligand of the immunity control point PD-1 / PD-L1 in the blood serum of patients with typical bone osteosarcoma and chondrosarcoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(11): 669-675 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-669-675>

For correspondence: Kushlinskii Nikolay Evgenievich, Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Kushlinskii N.E. – <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;
Alferov A.A. – <https://orcid.org/0000-0003-3585-5693>;
Boulytcheva I.V. – <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249>;
Timofeev Yu.S. – <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>;
Korotkova E.A. – <https://orcid.org/0000-0002-2509-5232>;
Khvan O.T. – <https://orcid.org/0000-0002-2437-7457>;
Kuzmin Yu.B. – <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>;
Kuznetsov I.N. – <https://orcid.org/0000-0003-0866-5561>;
Bondarev A.V. – <https://orcid.org/0000-0001-5006-6962>;
Shchupak M.Yu. – <https://orcid.org/0000-0001-8518-4889>;
Sokolov N.Yu. – <http://orcid.org/0000-0002-0706-9575>;
Efimova M.M. – <http://orcid.org/0000-0002-1925-2457>;
Gershtein E.S. – <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>;
Sushentsov E.A. – <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>;
Aliev M.D. – <https://orcid.org/0000-0003-2706-4138>;
Musaev E.R. – <https://orcid.org/0000-0002-1241-3019>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was supported by RFBR grant N 18-03-00793.

Received 03.09.2020
Accepted 03.10.2020

Введение. Первичные опухоли костей – редкие и гетерогенные злокачественные новообразования. Саркомы костей – самое распространенное злокачественное поражение костной ткани – составляют менее 1% всех онкологических заболеваний у взрослых, у детей – до 2% [1]. Пристальный интерес онкологов к саркомам костей связан с тем, что эти опухоли, в особенности, остеосаркома, чаще встречаются у детей и молодых людей, отличаются крайне агрессивным клиническим течением, неблагоприятным прогнозом и во многих случаях резистентностью к проводимой терапии. Значимым методом лечения первичных опухолей костей по-прежнему остается хирургия, однако большинство пациентов имеют неблагоприятный прогноз из-за быстрой диссеминации опухолевого процесса в отдаленные органы, поэтому обязательным компонентом лечения сарком костей счи-

тается химиотерапия, но выраженные побочные эффекты и нехватка эффективных препаратов ограничивают ее применение [2].

Следовательно, традиционные подходы к лечению сарком костей имеют свои ограничения. Поэтому, в последнее время внимание исследователей и практических онкологов привлекают принципиально новые патогенетические подходы в лечении опухолей костей, которые основаны на современных достижениях биохимии, молекулярной биологии и иммунологии опухолей, в частности, новейших методов иммунотерапии, направленных на подавление контрольных точек иммунитета, контролирующих в физиологических условиях выраженность и длительность аутоиммунного ответа, предотвращая повреждение собственных тканей организма [3].

Одной из ключевых контрольных точек иммунитета является сигнальная система PD-1/PD-L, включающая рецептор программируемой гибели клетки PD-1 (programmed cell death protein 1) и два его лиганда (PD-L1 и PD-L2) [3]. PD-1 представляет собой мембранный рецептор I типа, принадлежит к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток и экспрессируется на их поверхности. Более значимым из лигандов является PD-L1, известный также как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1-го типа (B7-H1). В норме PD-L1 экспрессируется на антиген-презентирующих дендритных и макрофагоподобных клетках периферических органов, а также на клетках плаценты, островков поджелудочной железы и сетчатки, но его мРНК обнаружена в значительно более широком спектре тканей, а индуцированная экспрессия PD-L1 может наблюдаться на T и B лимфоцитах, естественных киллерах, макрофагах, мезенхимальных, стволовых и эпителиальных клетках.

Активация PD-1/PD-L1 пути стимулирует апоптоз антиген-специфичных T-лимфоцитов, обладающих противоопухолевым эффектом, и одновременно подавляет апоптоз регуляторных супрессорных T-клеток, что является одним из механизмов «ускользания» опухоли от действия иммунной системы организма. В связи с этим моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1, предотвращающие их взаимодействие друг с другом, находят сейчас активное применение в терапии многих онкологических заболеваний, в первую очередь, меланомы [4] и почечно-клеточной карциномы [3, 5]. Проводятся первые попытки использования подобных препаратов и при саркомах костей [6-8]. При этом надежных критериев для предсказания чувствительности к анти-PD-1/PD-L1 препаратам пока не существует. Наиболее очевидным критерием является экспрессия PD-1 и/или PD-L1 на опухолевых клетках и/или на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и других иммунных клетках, однако данные об эффективности этих показателей в качестве предикторов ответа на соответствующую терапию неоднозначны [9, 10]. PD-1 и PD-L1 рассматривают как молекулярные маркеры общего прогноза клинического течения и выживаемости пациентов с различными онкологическими заболеваниями [10-12], хотя результаты таких исследований пока также противоречивы.

В последнее время, большое внимание исследователей привлекают растворимые формы PD-1 (sPD-1) и PD-L1 (sPD-L1), обнаруженные относительно недавно в периферической крови, в том числе, и онкологических больных [13-18]. Происхождение этих растворимых молекул точно не установлено. Предполагают, что sPD-L1 образуется преимущественно в результате протеолитического отщепления внеклеточной части трансмембранного белка, а sPD-1 – в результате альтернативного сплайсинга соответствующей мРНК. Вопрос о клеточном происхождении и источнике (опухолевые, иммунные, дендритные клетки) циркулирующих в периферической крови sPD-1 и sPD-L1 также остается дискуссионным. Особый интерес представляет изучение динамики циркулирующих в периферической крови sPD-1 и sPD-L1 на фоне специфической анти-PD-1/PD-L терапии.

Исследование маркеров сигнального пути PD-1/PD-L, в особенности, их растворимых форм, у больных саркомами костей только начинается и представлено единичными публикациями [19-23]. Показано, что экспрессия PD-L1 широко варьирует в клеточных линиях остео-

саркомы, при этом варианты с лекарственной устойчивостью имеют тенденцию к более высокой экспрессии маркера по сравнению с их родительскими клеточными линиями [22]. В недавнем мета-анализе 14 клинико-лабораторных исследований с участием 868 больных остеосаркомой отмечена на 14–75% более высокая экспрессия PD-L1 в опухолях, которая статистически значимо коррелировала с метастазированием, высоким риском смертности и более низкими показателями общей выживаемости [23]. Усиление тканевой экспрессии PD-L1 и PD-1 обнаружено и при хондросаркоме [24-26].

Ранее нами впервые продемонстрировано, что уровень sPD-L1 в сыворотке крови статистически значимо повышены по сравнению с контролем при всех морфологических типах новообразований костей, тогда как sPD-1 – только при саркоме Юинга и гигантоклеточной опухоли кости [27].

Цель данного исследования – сравнительный анализ уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными костеобразующими (остеосаркома) и хрящобразующими (хондросаркома) опухолями костей с учетом клинических и морфологических характеристик заболеваний.

Материал и методы. В исследование включены 133 больных новообразованиями костей в возрасте от 6 до 70 лет (77 мужчин и 56 женщин), проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина и в Московской городской онкологической больнице № 62 в период с 2016 по 2019 гг. У 14 пациентов новообразования имели доброкачественный характер, у 16 диагностирована пограничная гигантоклеточная опухоль кости, у 103 больных были злокачественные поражения костей: типичная остеосаркома – 37, периостальная остеосаркома – 1, паростальная остеосаркома – 1, типичная хондросаркома – 39, вторичная хондросаркома – 2, периостальная хондросаркома – 1, саркома Юинга – 9, хордома – 12, недифференцированная плеоморфная саркома кости – 1.

Среди больных злокачественными новообразованиями костей с типичной остеосаркомой было 37 пациентов в возрасте от 8 до 64 лет; старше 18 лет были 73% пациентов. В 64,9% случаев опухоль локализовалась в нижних конечностях, в 24,3% – в костях таза, 5,4% – в грудной клетке и 5,4% – в верхних конечностях. У 70,3% пациентов были поражены трубчатые, у 29,7% – плоские и губчатые кости.

У 39 больных в возрасте 20 до 67 лет выявлена типичная хондросаркома кости; все пациенты были старше 18 лет. В 46,1% наблюдений опухоль локализовалась в костях таза, по 23,1% – в нижних и в 20,5% – в верхних конечностях и в 10,3% – в грудной клетке. У 41% пациентов опухолью были поражены трубчатые кости, у 59% – плоские и губчатые.

У всех больных клинико-рентгенологический диагноз опухоли кости подтвержден данными ее гистологического исследования согласно Международной классификации опухолей костей (ВОЗ, 2013).

Группу контроля составили 57 практически здоровых доноров (20 мужчин и 37 женщин) в возрасте от 8 до 70 лет.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа «Human PD-L1 Platinum ELISA» и «Human PD-1 ELISA».

kit» (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и SPSS 20. Выбор основных характеристик и статистических критериев при сравнении показателей осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квантили и применяли непараметрические методы сравнения: для несвязанных признаков при количестве групп более двух – непараметрический тест Краскела-Уоллиса, при сопоставлении двух независимых групп – тест Манна-Уитни. Анализ корреляционных взаимосвязей проводили с помощью теста корреляции рангов Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для

расчета исходных пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей, а также определяли значимые пороговые уровни методом построения кривых ROC. В таблицах показаны пределы колебаний показателей (min – max), медианы (Me) и границы нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3).

Результаты и обсуждение. Для оценки потенциальной диагностической значимости sPD-1 и sPD-L1 на первом этапе сопоставили концентрации маркеров в сыворотке крови 57 практически здоровых доноров и общей группы из 133 больных первичными новообразованиями костей (табл. 1).

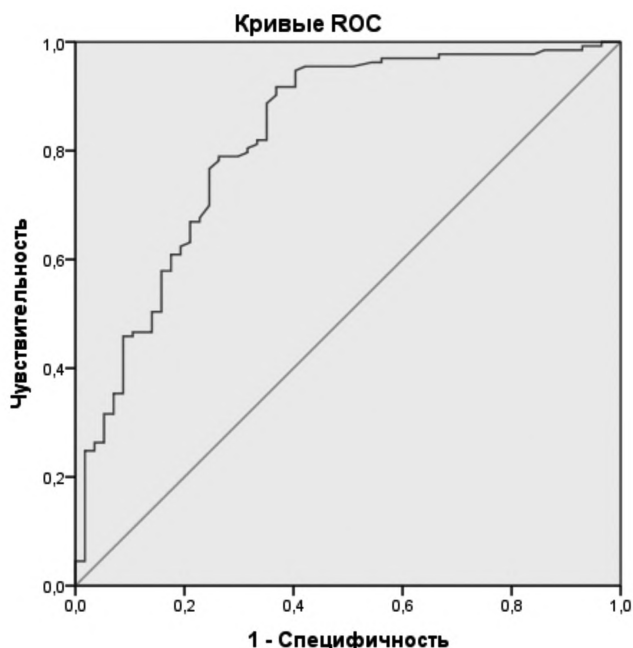
Концентрации рецептора sPD-1 в сыворотке крови практически здоровых доноров и общей группы больных первичными новообразованиями костей не различались, тогда как уровень sPD-L1 у больных опухолями костей был статистически значимо выше, чем в контроле ($p < 0,0000001$): медиана концентрации этого маркера в сыворотке крови пациентов составила 24 пг/мл, что в 2,6 раза превышало показатели группы контроля (9,2 пг/мл). У пациентов с новообразованиями костей также высоко значимо повышено по сравнению с контролем соотношение концентраций маркеров sPD-L1/sPD-1 (медианы соответственно 0,49 и 0,21; $p < 0,0000001$), стало быть соотношение между циркулирующими рецептором и лигандом повышается в пользу последнего.

Более перспективным для разделения здоровых доноров и пациентов с первичными опухолями костей оказался порог концентрации sPD-L1, полученный с помощью построения кривой ROC и равный 16,5 пг/мл (см. рисунок). При этом пороговом уровне чувствительность теста составила 75,9%, специфичность – 75,4%.

Сопоставив уровни исследованных маркеров в сыворотке крови больных опухолями костей с характером новообразования (доброкачественное, пограничное, злокачественное), мы обнаружили значимое различие уровня sPD-1 при злокачественных опухолях относительно пограничных новообразований кости ($p = 0,002482$; табл. 2).

Частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 пг/мл, в группе больных доброкачественными новообразованиями костей составила 78,5% (11 из 14), в группе больных пограничной опухолью кости 75% (12 из 16), в группе больных злокачественными опухолями (саркомами) костей – 75,7% (78 из 103), в группе больных типичной остеосаркомой – 70,2% (26 из 37), в группе больных типичной хондросаркомой – 84,6% (33 из 39). Таким образом, лиганд sPD-L1 не обладает диагностическим потенциалом в распознавании характера выявленной опухоли кости.

На следующем этапе исследования подробно проанализировали особенности уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными



ROC кривая для sPD-L1 при разделении группы контроля (здоровых доноров) и больных первичными новообразованиями костей.

Таблица 1

Концентрации и соотношение sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров (группа контроля) и общей группы больных опухолями костей

Группа	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл		sPD-L1/sPD-1	
		Min – max	Me Q1-Q3	Min – max	Me Q1-Q3	Min – max	Me Q1-Q3
Контроль	57	11,4-138	48,7 35,5-53,8	0,001-56,6	9,2 7,0-16,1	0,000017-1,23	0,21 0,13-0,40
Опухоли костей	133	7,5-154	48,2 27,9-69,0	3,4-1151	24,0 16,7-32,0	0,06-61,4	0,49 0,31-0,95
p	190		>0,05		<0,0000001		<0,0000001

злокачественными опухолями костей – типичными остеосаркомой и хондросаркомой, которые составили большинство в данной выборке, соответственно 37 и 39 пациентов. Прежде всего, следует подчеркнуть ключевые клинико-патологические различия между этими двумя типами костных опухолей, одна из которых (остеосаркома) происходит из костеобразующей, а другая (хондросаркома) – из хрящеобразующей ткани. Остеосаркома наиболее часто выявляется среди всех первичных злокачественных опухолей костей и преобладает у детей и подростков, крайне агрессивная по клиническому течению, склонная к раннему гематогенному метастазированию, отличается низкой чувствительностью к химиотерапии. Показатели выживаемости при неметастатической остеосаркомой варьируют от 65 до 70%. При метастатическом типе остеосаркомы 5-летняя выживаемость, даже при включении неoadъювантной и/или адъювантной химиотерапии, составляет менее 20%. В свою очередь, хондросаркомы – это гетерогенная группа хрящеобразующих злокачественных опухолей костей с различными морфологическими признаками и биологическим поведением. Наиболее часто хондросаркомы встречаются у взрослых с возрастающей частотой до 75 лет, они являются третьими наиболее распространенными злокачественными опухолями костей после миеломы и остеосаркомы. Хондросаркомы классифицируют как первичные, если они возникают *ex novo*, или как вторичные, если они возникают в результате ранее существовавшего хрящевого поражения кости, такого как энхондрома или костно-хрящевой экзостоз.

У обследованных нами пациентов остеосаркома и хондросаркома кости были представлены преимущественно типичными вариантами опухоли (37 и 39 соответственно; табл. 3), поэтому именно на них сосредоточен основной анализ исследованных маркеров. Уровень

sPD-1 статистически значимо выше (в 1,86 раза по медиане) у больных типичной остеосаркомой по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой ($p=0,002437$). Уровень sPD-L1, напротив, у больных типичной остеосаркомой достоверно ниже, чем у пациентов с хондросаркомой (медианы 22,3 и 26,2 пг/мл соответственно; $p=0,042245$). При этом соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркомой (0,16-61,4; медиана – 0,81) статистически значимо выше, чем при остеосаркомой (0,11-2,07; медиана – 0,35; $p=0,000284$). Таким образом, при хрящеобразующих опухолях костей в сыворотке крови пациентов циркулирует преимущественно лиганд sPD-L1, при костеобразующих – рецептор sPD-1.

При обоих типах опухолей уровни sPD-L1 в сыворотке крови больных статистически значимо выше, чем в контроле ($p<0,0001$). Следует отметить, что чувствительность теста sPD-L1 $\geq 16,5$ пг/мл в группе больных типичной остеосаркомой составила всего 70,2% (26 из 37), а у больных типичной хондросаркомой – 84,6% (33 из 39). Соответственно, sPD-L1 имеет потенциальное диагностическое значение для хрящеобразующих опухолей костей.

Уровень sPD-1 у больных остеосаркомой кости (55,5 пг/мл) не отличался от здоровых доноров (48,7 пг/мл), а при хондросаркомой (29,9 пг/мл) был статистически значимо ниже, чем в контроле ($p=0,003661$). Соотношение sPD-L1/sPD-1 при типичной остеосаркомой (0,35) близко к показателю группы контроля (0,21; $p=0,001237$), а при хондросаркомой статистически значимо его превышает (0,81; $p<0,0000001$).

Четкой взаимосвязи уровней sPD-1 и sPD-L1 с возрастом пациентов не прослеживается. Однако при разделении больных остеосаркомой на две возрастные группы (<18 лет; 10 пациентов) и (≥ 18 лет; 27 пациентов) выяв-

Таблица 2

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей в зависимости от характера новообразования

Характер новообразований	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Min – max	Me Q1-Q3	Min – max	Me Q1-Q3
Доброкачественные	14	18,9-121	42,5 29,0-51,0	3,4-78,0	25,5 16,7-33,1
Пограничные	16	45,3-87,7	68,8 54,4-75,0	4,9-53,3	21,6 16,4-27,6
Злокачественные	103	7,5-154	45,8* 25,0-68,5	6,1-1151	24,0 17,6-33,2

Примечание. * – $p=0,002482$ относительно пограничных.

Таблица 3

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных остеосаркомой и хондросаркомой кости

Группа	n	sPD-1, пг/мл		sPD-L1, пг/мл	
		Min – max	Me Q1-Q3	Min – max	Me Q1-Q3
Типичная остеосаркома	37	14,5-121	55,5* 37,9-77,9	8,7-58,2	22,3** 15,4-29,3
Паростальная остеосаркома	1	48,2	-	46,3	-
Периостальная остеосаркома	1	28,0	-	18,7	-
Типичная хондросаркома	39	11,4-154	29,9* 19,4-52,0	10,3-1151	26,2** 19,4-39,1
Периостальная хондросаркома	1	39,9	-	28,5	-
Вторичная хондросаркома	2	16,3-26,1	29,4	47,1-53,6	50,4

Примечание. Достоверные отличия уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови между группами: * $p=0,002437$; ** $p=0,042245$.

лены более низкие медианы концентрации sPD-1 у детей по сравнению со взрослыми пациентами, соответственно 28,7 и 60,8 пг/мл ($p=0,006520$). Для sPD-L1 такой взаимосвязи не выявлено. Коэффициент соотношения sPD-L1/sPD-1 и уровни его колебания в группе больных типичной остеосаркомой кости также статистически значимо различались у взрослых и детей (0,35; 0,18-0,51 и 0,85; 0,56-1,26 соответственно; $p=0,008204$). В группе хондросаркомой кости пациентов в возрасте <18 лет не было.

В группе контроля уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови мужчин и женщин не различались (табл. 4). У больных типичной остеосаркомой различий в концентрациях исследованных маркеров в сыворотке крови с учетом пола также не выявлено, а у пациентов с типичной хондросаркомой кости медиана концентрации sPD-1 была статистически значимо выше у мужчин, по сравнению с женщинами (соответственно 36,6 и 24,9 пг/мл; $p=0,020437$).

Не выявлено статистически значимых различий уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных остеосаркомой и хондросаркомой кости в зависимости от типа и вида пораженной кости, локализации опухоли в различных отделах скелета.

Не отмечено зависимости уровней исследованных маркеров от стадии заболевания (табл.5) и отдельных показателей распространенности опухолевого процесса по системе TNM.

В группе больных типичной остеосаркомой кости связь содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови со степенью дифференцировки новообразований не анализировали ввиду преобладания G3 опухолей ($n=36$). В группе больных типичной хондросаркомой кости концентрации sPD-1 и sPD-L1 не зависели от степени дифференцировки первичной опухоли.

Таблица 4

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой, хондросаркомой кости и здоровых доноров с учетом пола

Группа	Пол	n	sPD-1, пг/мл	sPD-L1, пг/мл
Контроль	муж	20	49,7; 40,3-54,4	10,0; 6,3-15,8
	жен	37	47,1; 30,7-53,8	8,9; 7,0-20,9
Типичная остеосаркома	муж	24	58,6; 40,1-76,2	22,6; 14,4-29,7
	жен	13	50,4; 22,8-78,9	19,2; 17,5-27,0
Типичная хондросаркома	муж	18	36,6*; 27,8-67,0	26,2; 19,8-38,7
	жен	21	24,9*; 18,2-40,7	26,2; 19,4-39,1

Примечание. * – $p=0,020437$.

Сопоставили уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови в группах больных злокачественными опухолями костей с наличием (1 группа, $n=8$) и отсутствием сопутствующих осложнений (2 группа, $n=95$). Из общей группы 103 пациентов с злокачественными новообразованиями костей в группу 1 вошли 7 больных с патологическим переломом кости и 1 больной с тромбозом легочной артерии. Медиана концентрации sPD-1 была статистически значимо выше у пациентов 1 группы по сравнению с пациентами 2 группы (соответственно 81,9 и 40,7 пг/мл; $p=0,018803$). В то же время уровни sPD-L1 в выше указанных двух группах пациентов не различались.

Заключение. Подводя итоги сравнительного анализа концентраций растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей и практически здоровых доноров, можно выделить следующие особенности. Прежде всего, обнаружено статистически значимое повышение концентрации sPD-L1 в общей группе больных новообразованиями костей по сравнению с контролем. При этом уровни sPD-1 между указанными группами не различались. С помощью построения кривой ROC выявлен порог концентрации sPD-L1, равный 16,5 пг/мл, при котором чувствительность теста относительно контрольной группы составила 75,9%, специфичность – 75,4%. Кроме того, частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 пг/мл, была выше у больных хондросаркомой (84,6%), по сравнению с остеосаркомой (70,2%).

Проанализировав особенности выявления sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными злокачественными поражениями костной ткани – типичными остеосаркомой и хондросаркомой, установили, что при обоих типах опухолей уровень sPD-L1 статистически значимо выше, чем в контроле, но при хрящобразующих опухолях в периферической крови циркулирует преимущественно лиганд sPD-L1, а при костеобразующих – рецептор sPD-1. В частности, уровень sPD-1 статистически значимо выше у больных типичной остеосаркомой кости по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой, а соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркоме статистически значимо выше, чем при остеосаркоме. Вместе с тем, сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 у больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой не связаны с показателями распространенности опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухоли, ее локализацией в костях скелета и типом пораженной кости. Дальнейшие исследования покажут, являются ли данные маркеры значимыми

Таблица 5

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости с учетом стадии заболевания

Стадия	Типичная остеосаркома			Типичная хондросаркома		
	n	sPD-1, пг/мл	sPD-L1, пг/мл	n	sPD-1, пг/мл	sPD-L1, пг/мл
I	4	56,9 47,1-74,7	20,1 17,8-40,1	10	32,0 25,0-67,0	39,5 19,4-47,1
II	19	48,9 35,5-73,1	22,8 13,9-29,7	22	30,5 18,8-42,0	24,7 18,3-30,5
III	7	77,9 40,2-88,4	21,3 13,6-25,6	6	21,6 17,8-37,0	27,6 23,6-39,0
IV	7	45,8 34,7-91,8	22,9 18,7-30,1	1	85,0	41,1

факторами прогноза выживаемости больных саркомами костей, а также возможность их использования в качестве показателей эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии у данной категории пациентов.

Финансирование. Исследование поддержано РФФИ, грант № 18-03-00793.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1,2, 4-15, 19-26
см. REFERENCES)

- Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Морозов А.А., Герштейн Е.С., Кадагидзе З.Г., Матвеев В.В. Современные подходы к иммунотерапии рака почки. *Онкоурология*. 2018; 14(2): 54–67.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Уткин Д.О., Петрикова Н.А., Кушлинский Д.Н., Шабанов М.А. и др. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции. *Акушерство и гинекология*. 2020; 6: 80–8.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д. и др. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019; 15(1):15–22.
- Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Чанг В.Л., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Соколов Н.Ю. и др. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 347–52.
- Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Тимофеев Ю.С., Герштейн Е.С., Булычева И.В., Бондарев А.В. и др. Ключевые компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови при опухолях костей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(7): 79–83.

REFERENCES

- Group ESESNW. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014; 25 (Suppl. 3):113–23.
- Casali P.G., Abecassis N., S. Bauer S. et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2018; 29(Suppl. 4):51–67.
- Kushlinskii N.E., Fridman M.V., Morozov A.A., Gershtein E.S., Kadagidze Z.G., Matveev V.B. Modern approaches to the immunotherapy of kidney cancer. *Oncourologiya*. 2018; 14(2):54–67. (in Russian)
- Yun S., Vincelette N.D., Green M.R., Wahner Hendrickson A.E., Abraham I. Targeting immune checkpoints in unresectable metastatic cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 agents trials. *Cancer Med.* 2016; 5(7):1481–91.
- Massari F., Santoni M., Ciccicarese C., Santini D., Alfieri S., Martignoni G. et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treat. Rev.* 2015; 41(2):114–21.
- Shimizu T., Fuchimoto Y., Fukuda K., Okita H., Kitagawa Y., Kuroda T. The effect of immune checkpoint inhibitors on lung metastases of osteosarcoma. *J. Pediatr. Surg.* 2017; 52(12):2047–50.
- Zheng B., Ren T., Huang Y., Sun K., Wang S., Bao X., Liu K., Guo W. PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse. *J. Hematol. Oncol.* 2018; 11(1):16.
- Tawbi H.A., Burgess M., Bolejack V., Van Tine B.A., Schuetz S.M., Hu J. et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(11):1493–1501.
- Yuasa T., Masuda H., Yamamoto S., Numao N., Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017; 22(4):629–34.

- Zhang Y., Kang S., Shen J., He J., Jiang L., Wang W. et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(6):e515.
- Kim K.S., Sekar R.R., Patil D., Dimarco M.A., Kissick H.T., Bilen M.A. et al. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncimmunology*. 2018; 7(4):e1413519.
- Choi Y.Y., Kim H., Shin S.J., Kim H.Y., Lee J., Yang H.K. et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann. Surg.* 2019; 270(2):309–16.
- Zhu X., Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(57):97671–82.
- Ding Y., Sun C., Li J., Hu L., Li M., Liu J., Pu L., Xiong S. The Prognostic Significance of Soluble Programmed Death Ligand 1 Expression in Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scand. J. Immunol.* 2017; 86(5):361–67.
- Wei W., Xu B., Wang Y., Wu C., Jiang J., Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(3):e9617.
- Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Utkin D.O., Petrikova N.A., Kushlinsky D.N., Shabanov M.A. et al. Signaling pathway components of immune checkpoint PD-1/PD-L1 in blood plasma of patients with ovarian cancer and benign ovarian tumors: clinical and morphological correlations. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2020; 6: 80–8. (in Russian)
- Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryacheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D. et al. Soluble forms of the PD-1 immunity control point receptor and its PD-L1 ligand in the blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and morphological correlations. *Oncourologiya*. 2019; 15(1):15–22. (in Russian)
- Gershtein E.S., Ognerubov N.A., Chang V.L., Delektorskaya V.V., Kороткова Е.А., Соколов Н.Ю. et al. The content of the soluble forms PD-1 and PD-L1 in blood serum of patients with gastric cancer and their relationship with clinical and morphological characteristics of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 347–52. (in Russian)
- Huang X., Zhang W., Zhang Z., Shi D., Wu F., Zhong B., Shao Z. Prognostic Value of Programmed Cell Death 1 Ligand-1 (PD-L1) or PD-1 Expression in Patients with Osteosarcoma: A Meta-Analysis. *J. Cancer*. 2018; 9(14):2525–31.
- Kabir T.F., Chauhan A., Anthony L., Hildebrandt G.C. Immune Checkpoint Inhibitors in Pediatric Solid Tumors: Status in 2018. *Ochsner J. Winter*. 2018; 18(4):370–6.
- Raj S., Bui M., Gonzales R., Letson D., Antonia S.J. Impact of PDL1 expression on clinical outcomes in subtypes of sarcoma. *Ann. Oncol.* 2014; 25:494–510.
- Shen J.K., Cote G.M., Choy E., Yang P., Harmon D., Schwab J. et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2(7):690–8.
- Zhu Z., Jin Z., Zhang M., Tang Y., Yang G., Yuan X., Yao J., Sun D. Prognostic value of programmed death-ligand 1 in sarcoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(35):59570–80.
- Kostine M., Cleven A.H., de Miranda N.F., Italiano A., Cleton-Jansen A.M., Bovee J.V. Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod. Pathol.* 2016; 29(9):1028–37.
- Torabi A., Amaya C.N., Wians F.H. Jr., Bryan B.A. PD-1 and PD-L1 expression in bone and soft tissue sarcomas. *Pathology*. 2017; 49(5): 506–13.
- Yang X., Zhu G., Yang Z., Zeng K., Liu F., Sun J. Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int. J. Biol. Markers*. 2018; 33(4): 507–13.
- Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Timofeev Yu.S., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Bondarev A.V. et al. Key immune checkpoint PD-1/PD-L1 signaling pathway components in blood serum of bone tumor patients. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 170(7):79–83. (in Russian)

Поступила 03.09.20

Принята к печати 03.10.20