

*Н.Е. Кушлинский, Ю.С. Тимофеев, Е.С. Герштейн, Ю.Н. Соловьев*

## **КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ RANK/RANKL/OPG ПРИ ПЕРВИЧНЫХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ**

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

Дисбаланс костного гомеостаза, связанный с нарушениями в системе RANK/RANKL/OPG, лежит в основе таких процессов как развитие метастазов, разрушение костей, прогрессирование опухоли. Нарушения в этой системе описаны при таких состояниях как рак молочной железы, рак предстательной железы, множественная миелома, плоскоклеточный рак, болезнь Ходжкина, метастазы в кости при раке легких и при других злокачественных заболеваниях. Имеются сведения о вовлеченности системы RANK/RANKL/OPG в патогенез первичных опухолей костей (остеосаркома, гигантоклеточная опухоль кости, хондробластома). Получены экспериментальные данные, согласно которым ингибиторы RANKL способны играть роль в уменьшении очагов поражения костей при множественной миеломе, раке молочной железы, простаты и легких. Представлены итоги клинических испытаний эффективности препаратов, модулирующих состояние системы RANK/RANKL/OPG, и результаты собственных исследований содержания компонентов этой системы и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных первичными опухолями костей.

**Ключевые слова:** RANK, RANKL, остеопроTEGERИН, опухоли, метастазы, кости

Опухоли костей — относительно редкие заболевания и среди других опухолей составляют около 1–2%. Чаще опухоли костей встречаются у пациентов молодого возраста, в том числе и у детей. Определенная роль в развитии опухолей костей принадлежит травме, хотя предполагается, что в основе их этиологии лежат генетические аномалии. Практически половина всех злокачественных новообразований костей приходится на остеосаркому (50–60%), несколько реже встречаются саркома Юинга, хондросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома. Значительные трудности в диагностике и лечении вызывают пограничные опухоли, такие как гигантоклеточная опухоль кости (ГКО), а также ряд доброкачественных новообразований. При других онкологических заболеваниях также

может иметь место разрушение костной ткани вследствие развития метастазов. Часто это наблюдается при раке молочной железы (РМЖ), предстательной железы (РПЖ), почки и множественной миеломе.

Кость состоит из белковой матрицы, содержащей преимущественно коллагеновые волокна I типа, покрытой слоем минерала, в основном фосфата кальция в виде кристаллов гидроксиапатита. В процессе роста организма, когда скелет достигает окончательных размеров путем структурного моделирования костной ткани, наблюдается согласованная деятельность синтеза и резорбции костной ткани с преобладанием синтеза. После окончания этапа роста тела скелет претерпевает процесс обновления костной ткани, который называют ремоделированием. Костное ремоделирование — непрерывный и хорошо скоординированный процесс, который помогает устранить микроповреждения в костном матриксе, возникающие в течение жизни, сохранить костную архитектуру и поддерживать костную прочность. Ремоделирование костной ткани является гомеостатическим, т.е. резорбция костей компенсируется образованием новой костной ткани. В процессе репарации кости ежегодно происходит обновление (без изменения объема костной массы) приблизительно 25% губчатой и 3% кортикальной кости [24].

При онкологических заболеваниях отмечается поражение костей, в основном представленное метастатическим поражением или остеопорозом, возникающим на фоне специфической противоопухолевой терапии. В основе остеопороза лежат процессы нарушения костного ремоделирования с повышением резорбции костной ткани и снижением синтеза кости [32]. Оба эти процесса в костной ткани тесно взаимосвязаны и являются результатом клеточного взаимодействия остеобластов (ОБ) и остеокластов (ОК), берущих начало от предшественников различных клеточных линий: ОБ — из мезенхимальных стволовых клеток, ОК — из макрофагально-моноцитарных клеток костного мозга.

Остеобласт — мононуклеарная клетка, участвующая в процессе образования кости и минерализации клеток костного матрикса.

Остеобласты играют фундаментальную роль в модуляции костного ремоделирования и регуляции метаболической активности других клеток костной ткани. Они секретируют ряд биологически активных веществ, посредством которых влияют на процесс созревания клетки-предшественницы ОК, превращая ее в большую многоядерную клетку, способную участвовать в резорбции, т.е. рассасывании костной ткани, действуя только на минерализованную кость и не изменяя собственно матрикса костной ткани [21]. На рост и функциональную способность ОБ оказывают влияние также паракринные и/или аутокринные факторы, регулирующие активность процессов внутриядерной транскрипции, синтез остеопонтина и остеокальцина. К ним относится ряд факторов роста клеток, модуляторы цитокинов, некоторые гормоны и гормоноподобные соединения [11]. Предположение о том, что активация и регуляция ремоделирования костной ткани являются следствием взаимодействия ОБ и ОК, получило четкое подтверждение [9].

Значительный прогресс в понимании процессов костного ремоделирования был достигнут с открытием цитокиновой RANKL-RANK-OPG системы, играющей ключевую роль в формировании, дифференцировке и активности ОК [40]. Открытие этой системы стало базой при оценке патогенеза остеопороза, остеокластогенеза и регуляции костной резорбции, а также других процессов, вовлеченных в локальное ремоделирование кости. Давно признано, что предшественники ОК циркулируют среди популяции моноцитов/макрофагов и дифференцируются в преостеокласты, которые сливаются, образуя гигантские зрелые ОК — клетки костной резорбции [45].

Регуляция остеокластогенеза осуществляется в основном при помощи лиганда рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NFκB (RANKL) и остеопротегерина (OPG), свободного рецептора RANKL, препятствующего его связыванию с RANK на поверхности ОК на фоне перmissive действия макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) [9]. Молекулярная основа межклеточного взаимодействия с участием RANK-RANKL-OPG системы может быть представлена следующим образом: связывание RANKL с RANK инициирует передачу сигнала через ассоциированные с фактором некроза опухолей факторы TRAF6 и TRAF2 последовательно к NF-κB [5, 28], c-jun N-терминальной киназе JNK/cJun/Fos [37] и ядерному фактору, активируемому Т-лимфоцитами (NFAT) [58], что инициирует дифференцировку клетки-предшественника ОК в преостеокласт. Преостеокласты в конечном

счете сливаются друг с другом в зрелые многоядерные ОК. Дифференцированный ОК принимает определенное положение на поверхности кости и характеризуется специализированным цитоскелетом, что позволяет ему образовать изолированную полость резорбции — микросреду между ОК и костью [36]. Мембрана ОК, обращенная в образованную клеткой полость, формирует множество складок, приобретает гофрированный вид, что значительно увеличивает резорбирующую поверхность. Микросреда созданной полости резорбции подкисляется посредством подкачки в нее протонов. Внутриклеточный pH ОК поддерживается с участием карбоангидразы II посредством обмена ионами  $\text{HCO}_3/\text{Cl}$  через антирезорбтивную мембрану клетки. Ионизированный хлор по анионным каналам гофрированной резорбтивной мембраны проникает в микрополость резорбции, в результате чего pH в полости достигает величин 4,2–4,5. Кислая среда создает условия для мобилизации минеральной фазы кости и формирует оптимальные условия для деградации органического матрикса костной ткани при участии катепсина К, фермента, синтезируемого и высвобождаемого в полость резорбции «кислыми везикулами» ОК [53].

Центральная роль RANKL в образовании ОК и гомеостазе кости продемонстрирована на экспериментальных моделях животных, у которых делеция гена RANKL приводит к остеопетрозному фенотипу, характеризующемуся полным отсутствием ОК и отсутствием прорезывания зубов (процесса инициируемого ОК) [22]. Аналогично, ключ к физиологической роли OPG был найден в исследованиях у трансгенных мышей с делецией гена OPG, приводившей к появлению большого числа ОК и тяжелым эрозиям костей [4].

У человека результатом делеции/мутации в гене OPG (TNFRSF11B) могут быть ранняя костная болезнь Педжета и ювенильная болезнь Педжета [50–52]. Заболевания, связанные с мутациями в гене RANKL, редки, хотя мутации в гене TGF-β1 и мутационные изменения в гене TNFSF11, кодирующем RANKL, могут приводить к фенотипу костной ткани, присущему болезни Камурати-Энгельмана [53].

Многие типы клеток имеют потенциал для продукции RANKL и OPG, однако основным источником обоих этих факторов являются ОБ и их предшественники — клетки, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток, иногда называемые стромальными клетками костного мозга. Эти выводы, однако, в первую очередь сделаны на основе исследований *in vitro* и в настоящее время оспаривается вновь возникающими данными, полученными *in vivo* [55].

# **Роль системы RANK/RANKL/ OPG в канцерогенезе и механизмах метастазирования**

Изменения баланса костного ремоделирования и формирования ОК лежат в основе патологических процессов, ассоциированных с опухолевым ростом, в частности, костных метастазов. Сигналы, нарушающие нормальный баланс RANKL/OPG, могут быть крайне разнообразными и зависеть от типа опухоли, поражающей кость, а также от нозологических особенностей конкретной опухоли [31]. Это многообразие приводит к усилению остеокластогенеза и разрушению костной ткани в результате активности сигнального пути RANKL. Различные цитокины и молекулярные факторы, такие как IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, макрофагальный воспалительный протеин 1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , PTHrP, простагландин E, способны усиливать продукцию RANKL стромальными клетками костного микроокружения, включая остеобласты. В свою очередь, продукция опухолью OPG, выполняющего функцию «ловушки» для RANKL, может быть снижена путем уменьшения синтеза данного рецептора или активации его деградации [34].

Некоторые факторы при метастатическом поражении костей могут оказывать двойное влияние на соотношение RANKL/OPG. Такие вещества, как PTHrP, IL-1, простагландин E2 способны стимулировать активность ОК в костной строме как путем усиления действия RANKL, так и за счет снижения уровня OPG. Источником RANKL при костных метастазах могут также служить Т-лимфоциты [46]. Например, клетки множественной миеломы могут индуцировать усиление продукции RANKL Т-лимфоцитами [14]. Однако, доказательства влияния Т-лимфоцитов на развитие метастатического поражения костей в настоящее время немногочисленны и получены только на предклинических моделях.

Повышенная экспрессия RANKL была выявлена при РМЖ, РПЖ, раке почки и множественной миеломе. Продуцируемые опухолевыми клетками RANKL способен усиливать процессы остеокластогенеза *in vitro* [56], что позволяет предположить возможность прямого влияния опухолевых клеток, локализованных в костной ткани, на остеокластогенез. Также увеличение уровня RANKL наблюдали в клеточных линиях опухоли предстательной железы, обработанных TGF- $\beta$  [57]. Связь между высокой экспрессией RANKL при первичных опухолях и уровнем метастазирования была описана у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [39]. Высокое соотношение RANKL/OPG в сыворотке крови больных множественной миеломой соответствовало более значительному метастатиче-

скому поражению костей, что может говорить как о повышенной продукции RANKL клетками опухоли, так и о системной природе данного заболевания [45].

Изучение функциональных связей RANKL и опухоль-индуцированных поражений костей проводили в экспериментальных исследованиях на крысах при помощи ингибиторов RANKL, таких как OPG и RANK-Fc. Ингибирование RANKL у животных с костными метастазами приводило и к уменьшению опухоль-ассоциированного воспаления, снижению пролиферации опухолевых клеток, усилению апоптоза, а также к увеличению показателя выживаемости [59]. Ингибирование RANKL было изучено на моде-

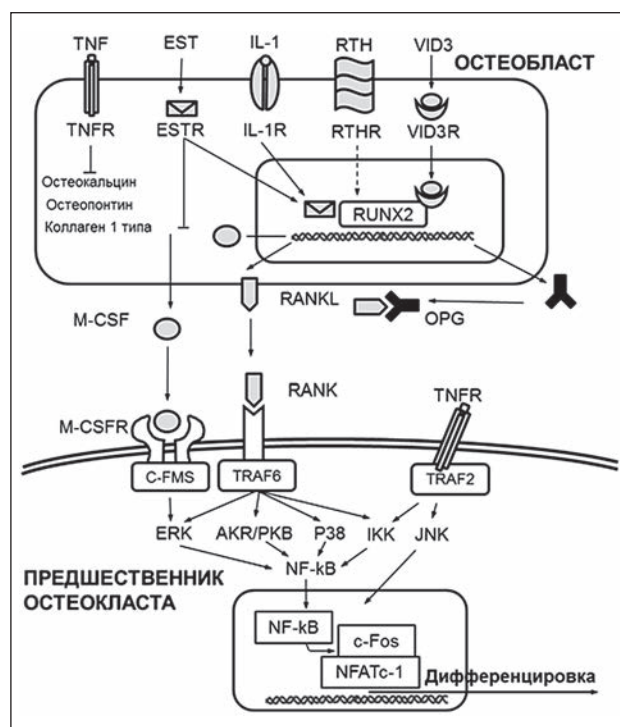


Рис. 1. Схема межклеточного (остеобласт-остеокласт) взаимодействия и роль цитокиновой RANKL-RANK-OPG системы в развитии остеокластогенеза (на основании данных литературы).

Условные обозначения:

TNF — фактор некроза опухоли и его рецептор (TNFR);  
EST — эстроген и его рецептор (ESTR);  
IL-1 — интерлейкин-1 и его рецептор (IL-1R);  
PTH — паратиреоидный гормон и его рецептор (PTHrP);  
Vit D3 — витамин D3 и его рецептор (VitD3R);  
ADC — аденилатциклаза;  
PKA — протеинкиназа A;  
RUNX2 — внутриядерный фактор транскрипции;  
OPG — остеопротегерин;  
RANK — рецептор активатора ядерного фактора каппа B;  
RANKL — лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа B;  
TRAF6 и TRAF2 — рецепторы TNF, сопряженные с RANK и TNF соответственно;  
NFATc1 — ядерный фактор, активируемый Т-лимфоцитом;  
M-CSF — макрофагальный колониестимулирующий фактор;  
c-fms — протеин, сопряженный с рецептором M-CSF;  
c-Fos — фактор транскрипции;  
ERK — протеин, переносящий сигнал от рецептора к ДНК, регулятор трансляции и транскрипции;  
AKT/PKB — протеины внутриклеточной сигнальной системы — протеинкиназа B и фосфоинозитид 3-киназа;  
p38 — митогенактивируемая протеинкиназа;  
IKK — комплекс ферментов, часть NF-kB каскада транскрипции;  
JNK — внутриклеточный регулятор экспрессии генов.

лях различных типов опухолей, таких как множественная миелома, РМЖ, РПЖ, рак легких, ободочной кишки и т.д., и практически во всех случаях отмечено уменьшение очагов опухолеиндуцированного поражения костей. Блокада RANKL также приводила к ослаблению связанных с опухолью состояний, таких как боль в костях и гиперкальциемия.

На животных также достаточно хорошо изучена роль RANKL в развитии отдаленных метастазов, причем не только костных. Так, например, ингибирование RANKL посредством RANK-Fc приводило к снижению частоты образования спонтанных метастазов в легких у трансгенных мышей MMTV-neu [42]. Снижение метастазирования в кости и легкие описано у животных с RANK-позитивной меланомой. Описан также и противоположный эффект: он наблюдался у мышей с повышенным уровнем RANKL и трансплантированными опухолевыми клетками (RANKL-позитивный человеческий РМЖ, полученный от мышей линии MMTV-neu) [19].

Анализ экспрессии RANK и воздействие с помощью RANKL на клетки *in vitro* показали наличие функциональной экспрессии этого рецептора на поверхности клеток РПЖ, РМЖ, меланомы, а также остеосаркомы. В большинстве подобных исследований RANKL не увеличивал пролиферативную активность RANK-экспрессирующих клеток [2], однако, в случае РМЖ наблюдали увеличение числа клеток опухоли в результате защиты от индуцированной повреждением ДНК клеточной гибели под действием химиотерапии или гамма-излучения [40].

Примечательно, что воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответственных за миграцию, инвазию и метастазирование. Так, воздействие RANKL на вызванные РМЖ остеолитические поражения приводило к индукции таких факторов, как: матриксные металлопротеиназы 1 и 9; фактор, индуцирующий матриксные металлопротеиназы EMMPRIN/CD47; ICAM-1, IL-6, IL-8, а также фактор роста эндотелия — VEGF [37].

В свою очередь, воздействие RANKL на клетки костных метастазов РП приводило к снижению экспрессии супрессора метастазов *serpin 5b/maspin* [26]. RANKL-зависимое усиление миграции и инвазии опухолевых клеток, наблюдавшееся в вышеописанных экспериментах, может приводить и к развитию отдаленных метастазов *in vivo*. В то же время, усиление экспрессии RANK линиями опухолевых клеток не является обязательным условием для их метастазирования в кости у экспериментальных животных. Точные механизмы, при которых уменьшаются показатели метастазирования при ингибировании RANKL, до сих пор недостаточно изучены. Известные механизмы взаимосвязи системы RANK/RANKL/OPG с другими клеточными системами представлены на следующей схеме (рис. 2).

Целенаправленное воздействие на RANKL для ингибирования опухолеиндуцированных ОК на предклинических моделях открывает некоторые возможности для лечения скелетных осложнений злокачественных опухолей, включая метастазирование в кости. Для оценки действия

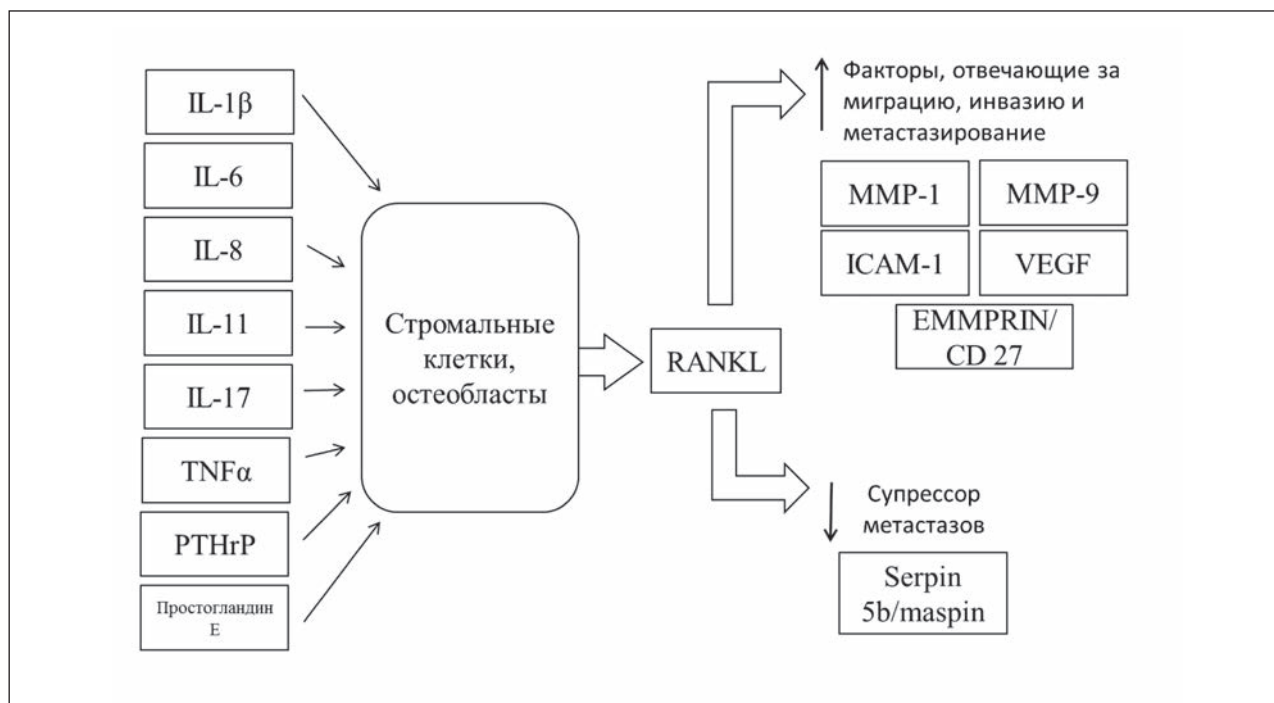


Рис. 2. Предполагаемая взаимосвязь системы RANK/RANKL/OPG с другими молекулярными факторами.

ингибиторов ОК полезна оценка фармакодинамики маркеров костной резорбции, таких как N-телопептид коллагена I типа (NTX), повышенные уровни которого ассоциируются с повышенным риском метастазирования в кости и более высоким уровнем смертности пациентов [7].

Одним из первых антагонистов RANKL является рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen). Впервые эффект этого ингибитора RANKL был продемонстрирован на пациентах с множественной миеломой и РМЖ с поражением костей. В ходе лечения отмечали снижение уровней биомаркеров резорбции (включая uNTX/Cr), однако дальнейшее клиническое использование Fc-OPG так и не получило развития из-за сравнительно короткого периода полураспада препарата, а также из-за возможного риска активации иммунного ответа на эндогенный OPG [3]. Был разработан другой препарат OPG — CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование I фазы тоже не увенчалось успехом [6].

Антитела к RANKL — ALX-0141 (Ablynx) были протестированы в клиническом исследовании I фазы на здоровых женщинах в постменопаузе [48], а человеческие антитела к RANKL — Denosumab (AMG 162), обладающие высокой селективностью к человеческому RANKL, в ходе клинического исследования I фазы приводили к снижению маркеров костной резорбции (uNTX/Cr) и не вызвали серьезных побочных эффектов. Исследования II фазы препарата Denosumab показали эффективность и безопасность его применения у больных РМЖ, осложненным поражением костей, а также при костных метастазах РПЖ и множественной миеломе [11].

В ряде исследований для лечения пациентов с метастатическим поражением костей при РМЖ [41], РП [12], множественной миеломе [17] применяли золедроновую кислоту (ZA), сравнивая ее с препаратом Denosumab. Во всех трех исследованиях выживаемость пациентов в группах, получавших Denosumab и ZA, была практически одинаковой. Уровень побочных эффектов также был примерно одинаковым, однако побочные эффекты, потенциально связанные с нефротоксичностью, чаще встречались у больных, получавших ZA, а у пациентов, получавших Denosumab, чаще наблюдали гипокальциемию.

### **Система RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей**

Первичные и вторичные опухоли костей являются весьма сложной в диагностике и лечении группой новообразований, патогенез которых связан с особенностями костной ткани и физиологическими параметрами костной микросреды.

Система RANK/RANKL/OPG как ключевой регулятор костного ремоделирования открывает ряд новых перспектив в изучении опухолей костей.

**Остеосаркома** — одна из самых распространенных злокачественных опухолей костей, поражающая преимущественно людей молодого возраста и обладающая крайне неблагоприятным прогнозом. В настоящее время роль системы RANK при остеосаркоме остается недостаточно изученной. При этом влияние клеток остеосаркомы на функцию ОК позволяет предположить тесную связь между агрессивностью остеосаркомы и активностью ОК. В культуре клеток остеосаркомы MG63 выявлена высокая экспрессия факторов, отвечающих за остеокластогенез: M-CSF и RANKL. Примечательно, что клетки линии MG63 показали способность паракринно индуцировать остеокластогенную активность. Понимание механизмов, лежащих в основе данного явления, может быть раскрыто в процессе изучения системы RANK/RANKL/OPG [8].

На моделях млекопитающих показано влияние OPG на развитие остеосаркомы. Введение OPG способствовало снижению роста опухоли и ассоциированного с опухолью воспаления, причем, опухолевые клетки, использованные в данных экспериментах, экспрессировали RANKL [30]. Авторы этого исследования, проводившегося на мышах, впоследствии провели анализ профиля экспрессии мРНК и белков в клетках остеосаркомы человека *in vitro* с использованием полученных *ex vivo* патологических тканей для оценки функциональной активности молекулярных путей, модулируемых RANKL. При помощи ПЦР и иммуногистохимического анализа было показано наличие экспрессии RANK в линиях человеческой остеосаркомы MNNG/HOS, Saos-2 и MG-63, в то время как в клетках остеосаркомы линии U-2 экспрессия RANK отсутствовала. При анализе биоптатов больных остеосаркомой также была обнаружена экспрессия RANK. Проведенный далее иммуноблоттинг показал значительную функциональную активность RANK, выражавшуюся в индукции в клетках остеосаркомы под действием RANKL фосфорилирования таких внутриклеточных сигнальных белков, как ERK1/2, p38, IκB. Подобные изменения выявлены в RANK-позитивных клетках остеосаркомы и могут рассматриваться как свидетельство вовлеченности системы RANK/RANKL/OPG в патогенез первичных новообразований костей [29].

Целенаправленное воздействие на данную систему изучали, используя в качестве ингибитора RANKL малые интерферирующие РНК (Rkl-siRNA) на моделях остеосаркомы у иммунокомпетентных и бестимусных мышей. Внутриопухолевое введение siRNA в комбина-

ции с липосомами RPR209120/DOPE приводило к локальному и системному снижению продукции RANKL и защите костной ткани от ассоциированного с опухолью остеолита. В то же время, отдельное введение siRNA не показало значимого эффекта на развитие опухоли в изучаемых моделях. Однако, при использовании комбинации siRNA с ифосфамидом наблюдали значимое снижение прогрессирования опухоли в сравнении с изолированным введением ифосфамида. Таким образом, siRNA, доставляемые посредством катионных липосом, способны ингибировать продукцию RANKL при оценке на экспериментальных моделях остеосаркомы [35], однако эти данные нуждаются в основательной клинической проверке.

J.A. Lee et al. была изучена связь экспрессии RANKL с эффективностью лечения больных остеосаркомой высокой степени злокачественности [24]. В исследовании был изучен материал от 40 больных локализованной высокозлокачественной остеосаркомой, у которых были взяты образцы тканей до лечения. У 75% пациентов наблюдали экспрессию RANKL в опухоли, причем, у 50% обследованных экспрессия RANKL достигала высокой степени ( $\geq 4$ ). При этом уровень экспрессии RANKL не был связан с возрастом и полом пациентов, локализацией опухоли, ее объемом и морфологическим типом, однако, имелась достоверная связь между высоким уровнем экспрессии RANKL и слабым ответом опухоли на последующую неoadьювантную химиотерапию. Кроме того, высокие уровни экспрессии RANKL были связаны с более низкими показателями 5-летней выживаемости [24].

**Саркома Юинга.** Другим новообразованием, при котором изучали роль системы RANK/RANKL/OPG, является саркома Юинга — первичная злокачественная мелко-круглоклеточная опухоль кости, способная вызывать быстрый и интенсивный остеолит. Клеточные механизмы, лежащие в основе данного явления, до сих пор мало изучены. В исследовании, проведенном R.Taylor et al. [43] на культуре клеток саркомы Юинга показано, что лакунарная резорбция обусловлена не CD99-положительными опухолевыми клетками, а CD68-положительными макрофагами и остеокластоподобными клетками, причем, в отсутствие RANKL. Иммуногистохимически и при помощи ПЦР показано, что клетки саркомы Юинга способны экспрессировать собственный RANKL, а также M-CSF, вырабатывая, таким образом, аутокринно два основных остеокластогенных фактора. Эти данные позволяют предположить, что клетки саркомы Юинга не оказывают резорбционного действия на костную ткань напрямую, а усиливают формирование ОК посредством активации системы RANKL.

**Хондросаркома.** Экспрессия RANKL и RANK в тканях хондросаркомы человека выше, чем в нормальной хрящевой ткани. На культуре клеток хондросаркомы JJ012 получены данные, согласно которым RANKL отвечает за миграцию клеток хондросаркомы, а также за повышение экспрессии  $\beta 1$ -интегрина на клеточной поверхности. В свою очередь, введение ингибиторов MAP-киназы (MEK) — PD98059 или U012 приводило к ингибированию RANKL-опосредованной миграции. Стимуляция клеток хондросаркомы при помощи RANKL вызывала усиление фосфорилирования ключевых молекул клеточных сигнальных путей — MEK и ERK. На основании этого можно предполагать, что в клетках хондросаркомы RANKL действует через MAP-киназный сигнальный путь, который, в свою очередь, активирует IKK $\alpha/\beta$  и NF- $\kappa$ B. Происходящая в результате этого активация  $\beta 1$ -интегрина, в конечном счете, и усиливает миграцию клеток хондросаркомы [18]. Помимо вышеприведенных злокачественных опухолей костей, повышенную экспрессию RANKL, OPG и RANK также наблюдали в многоядерных гигантских клетках аневризмальной костной кисты [25].

#### Сывороточный OPG и растворимая форма RANKL (sRANKL)

Остеопротегерин (OPG) — гликопротеин, циркулирующий в крови в форме мономера или гомодимера, который может быть связан с RANKL. Помимо костей, OPG продуцируется в различных тканях и органах: коже, желудке, кишечнике, легких, сердце и плаценте, поэтому сывороточные концентрации OPG могут не точно отражать его уровень в пораженной кости. Стандартные иммуноферментные тест-системы обнаруживают все формы циркулирующих фрагментов OPG [15]. В свою очередь, методы, основанные на ПЦР, способны выявлять только гомодимерные формы OPG [13].

Примечательно, что сывороточный уровень OPG и RANKL зависит от ряда физиологических факторов, таких как время суток, возраст, пол, менопаузальный статус, что влияет на интерпретацию результатов определения данных факторов [16]. Некоторые исследователи [23] показали, что уровень OPG в сыворотке крови увеличивается с возрастом как у женщин, так и у мужчин. Уровень OPG у женщин с остеопорозом выше, чем в группе сравнения такого же возраста и пола [33]. Уровень OPG может быть значительно повышен у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе. В свою очередь, гормональные изменения в течение беременности и лактации приводят к снижению concentra-

ции OPG в сыворотке крови и могут обуславливать ускоренное remodelирование костной ткани в данных физиологических условиях. Важным фактом является то, что как бы не варьировали уровни OPG и RANKL в сыворотке крови, динамика этих двух параметров носит противоположный характер [20].

Клиническое значение определения OPG и RANKL может быть ограничено методологическими сложностями в связи с тем, что уровни данных факторов в сыворотке могут не отражать их уровень в ткани. С другой стороны, определение OPG и RANKL в сыворотке крови может применяться для оценки положения дел при различных патологических состояниях, в то время как их значимость для обследования отдельных пациентов еще предстоит изучать [49]. Также стоит отметить важность исследования соотношения OPG/RANKL, которое является более постоянным и показывает зависимость от характера клинического течения болезни.

В нашей лаборатории проведено сравнительное изучение компонентов системы RANK/RANKL/OPG, связанных с ней цитокинов, матриксной металлопротеиназы 2 (MMP-2) и кальцитонина в сыворотке крови пациентов с первичными новообразованиями костей и практически здоровых людей и осуществлен анализ взаимосвязи этих показателей с основными клинко-морфологическими характеристиками заболевания [1]. Обследовали 71 пациента с новообразованиями костей, проходившего лечение в Отделе общей онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, и 17 практически здоровых людей. Перед проведением биохимического исследования пациенты не получали специфического лечения, клинко-рентгенологический диагноз опухоли кости во всех случаях подтвержден данными морфологического исследования.

Выявлено достоверное повышение уровней RANK, OPG, IL-8, IL-6 и соотношения OPG/sRANKL, а также снижение уровня MMP-2 в сыворотке крови больных новообразованиями костей по сравнению с контрольной группой. Концентрация IL-16 в сыворотке крови больных остеосаркомой была достоверно ниже, чем у больных хондросаркомой. Ни для одного из исследованных показателей не выявлено достоверных различий между саркомами костей с высокой и низкой степенью злокачественности, и только уровень кальцитонина был связан с локализацией и типом пораженной опухоли кости.

Полученные нами данные о повышении сывороточных уровней RANK и OPG у больных остеогенной и хондросаркомой соответствуют данным литературы о высоком уровне экспрессии указанных факторов в тканях соответствующих

опухолей [8, 18, 24]. Увеличение сывороточных уровней RANK и OPG у больных доброкачественными новообразованиями костей по сравнению с показателями здоровых людей согласуется с данными B.Liu et al. [25], отметивших повышенную экспрессию данных белков в тканях доброкачественных опухолей костей. В то же время нами не выявлено увеличения уровня sRANKL в сыворотке крови при злокачественных, пограничных и доброкачественных новообразованиях костей по сравнению с контролем, хотя в приведенных выше работах отмечено повышение экспрессии sRANKL в тканях опухолей костного скелета. Тем не менее, сывороточный уровень sRANKL при пограничных опухолях (ГКО) был выше, чем у пациентов с доброкачественными новообразованиями костей. Продемонстрирована связь уровней IL-6 и IL-8 с гистологическими характеристиками опухоли, а наличие корреляционных взаимосвязей между уровнями данных интерлейкинов и компонентами системы RANK/RANKL/OPG может служить подтверждением имеющихся в литературе данных о взаимосвязи изучаемых систем [20]. Полагаем, что дальнейшие ретроспективные исследования позволят охарактеризовать роль комплекса маркеров, вовлеченных в процессы остеогенеза, в прогнозе и оценке эффективности лечения первичных опухолей костей.

Таким образом, система RANK/RANKL/OPG является важным звеном ряда патологических процессов, в том числе и онкологических заболеваний, сопровождающихся поражением костной ткани. Изучение роли данной системы при первичных новообразованиях костей представляет собой актуальную задачу и открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и молекулярно-направленного химиотерапевтического лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кушлинский Н.Е., Тимофеев Ю.С., Соловьев Ю.Н. и др. Компоненты системы RANK/RANKL/OPG, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2 и кальцитонин в сыворотке крови больных с новообразованиями костей // Бюлл. экпер. биол. мед. — 2014. — Т. 157. № 4. — С. 522–526.
2. Armstrong A.P., Miller R.E., Jones J.C. et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes // Prostate. — 2008. — Vol. 68. — P. 92–104.
3. Body J.J., Greipp P., Coleman R.E. et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases // Cancer. — 2003. — Vol. 97. — P. 887–892.
4. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R. et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification // Genes and Development. — 1998. — Vol. 12. N 9. P. 1260–1268.

5. Choi H.J., Park Y.R., Nepal M. et al. Inhibition of osteoclastogenic differentiation by Ikariside A in RAW 264.7 cells via JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways // *Eur. J. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 636. N 1–3. — P. 28–35.
6. Clinical Trials.gov. Bethesda (MD): NIH. Single ascending-dose study to characterize the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of CEP-37251 in healthy postmenopausal women. 2010. Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01159873>.
7. Coleman R.E., Major P., Lipton A. et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 4925–4935.
8. Costa-Rodrigues J., Teixeira C.A., Fernandes M.H. Paracrine-mediated osteoclastogenesis by the osteosarcoma MG63 cell line: is RANKL/RANK signalling really important? // *Clin. Exp. Metastasis.* — 2011. — Vol. 28 (6). — P. 505–514.
9. Crockett J.C., Rogers M.J., Coxon F.P. et al. Bone remodeling at a glance // *J. Cell Sci.* — 2011. — Vol. 124. Suppl. 7. — P. 991–998.
10. Datta H.K., Ng W.F., Walker J.A. et al. The cell biology of bone metabolism // *J. Clin. Pathol.* — 2008. — Vol. 61. Suppl. 5. — P. 577–587.
11. Fizazi K., Lipton A., Mariette X. et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27. — P. 1564–1571.
12. Fizazi K., Carducci M., Smith M. et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study // *Lancet.* — 2011. — Vol. 377. — P. 813–822.
13. Furuya D., Kaneko R., Yagihashi A. et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47. — P. 1475–1477.
14. Giuliani N., Colla S., Sala R. et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease // *Blood.* — 2002. — Vol. 100. — P. 4615–4621.
15. Hannon R., Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover // *Osteoporos. Int.* — 2001. — Vol. 1(Suppl. 6). P. 30–40.
16. Hawa G., Brinskele-Schmal N., Glatz K. et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) in serum // *Clin. Lab.* — 2003. — Vol. 49. P. 461–463.
17. Henry D.H., Costa L., Goldwasser F. et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma // *J. Clin. Oncol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 1125–1132.
18. Hsu C.J., Lin T.Y., Kuo C.C. et al. Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration // *J. Cell. Biochem.* — 2010. — Vol. 111(1). — P. 138–47. doi: 10.1002/jcb.22677.
19. Jones D.H., Nakashima T., Sanchez O.H. et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL // *Nature.* — 2006. — Vol. 440. — P. 692–696.
20. Jorgensen H.L., Kusk P., Madsen B. et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios // *J. Bone Miner. Metab.* — 2004. — Vol. 22. — P. 132–138.
21. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by RUNX2 // *Osteoimmunology.* — 2010. — Vol. 658. Suppl. 1. — P. 43–49.
22. Kong Y.Y., Boyle W.J., Penninger J.M. Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development // *Immunol. Cell Biol.* — 1999. — Vol. 77. N 2. — P. 188–193.
23. Kudlacek S., Schneider B., Woloszczuk W. et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population // *Bone.* — 2003. — Vol. 32. — P. 681–686.
24. Lee J.A., Jung J.S., Kim D.H. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high -grade osteosarcoma // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2011. — Vol. 56(5). — P. 738–743.
25. Liu B., Yu S.F., Li T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts // *J. Oral. Pathol. Med.* — 2003. — Vol. 32(6). — P. 367–375.
26. Luo J.L., Tan W., Ricono J.M. et al. Nuclear cytokine-activated IKK $\alpha$  controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin // *Nature.* — 2007. — Vol. 446. — P. 690–694.
27. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis // *Endocrine Reviews.* — 2000. — Vol. 21. — N 2. — P. 115–137.
28. Maruyama T., Fukushima H., Nakao K. et al. Processing of the NF- $\kappa$ B2 precursor p100 to p52 is critical for RANKL-induced osteoclast differentiation // *J. Bone Miner. Res.* — 2010. — Vol. 25. N 5. — P. 1058–1067.
29. Mori K., Le Goff B., Berreur M. et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B // *J. Pathol.* — 2007. — Vol. 211(5). — P. 555–562.
30. Mori K., Ando K., Heymann D., Rédini F. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? // *Histol. Histopathol.* — 2009. — Vol. 24(2). — P. 235–242.
31. Mundy G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Cancer.* — 2002. — Vol. 2. — P. 584–593.
32. Raggatt L.J., Partridge N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285. Suppl. 33. — P. 25103–25108.
33. Riggs B.L., Khosla S., Atkinson E.J. et al. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency // *Osteoporos. Int.* — 2003. — Vol. 14. — P. 728–733.
34. Roodman G.D., Dougall W.C. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma // *Cancer Treat. Rev.* — 2008. — Vol. 34. — P. 92–101.
35. Rousseau J., Escriviou V., Lamoureux F. et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models // *J. Bone Miner. Res.* — 2011. — Vol. 26(10). — P. 2452–2462.
36. Rucci N. Molecular biology of bone remodeling // *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* — 2008. — Vol. 5. Suppl. 1. — P. 49–56.

37. Rucci N., Millimaggi D., Mari M. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70. — P. 6150–6160.
38. Sagalovsky S., Schonert M. RANKL-RANK-OPG system and bone remodeling: a new approach to the treatment of osteoporosis // *Clin. Exp. Pathol.* — 2011. — Vol. 10. Suppl. 2. — P. 146–153.
39. Sasaki A., Ishikawa K., Haraguchi N. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis // *Ann. Surg. Oncol.* — 2007. — Vol. 14. — P. 1191–1199.
40. Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterone-driven mammary cancer // *Nature.* — 2010. — Vol. 468. — P. 98–102.
41. Stopeck A.T., Lipton A., Body J.J. et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study // *J. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 28. — P. 5132–5139.
42. Tan W., Zhang W., Strasner A. et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signaling // *Nature.* — 2011. — Vol. 470. — P. 548–553.
43. Taylor R., Knowles H.J., Athanasou N.A. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis // *J. Pathol.* — 2011. — Vol. 225(2). — P. 195–202.
44. Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclasts // *Science.* — 2000. — Vol. 289. N 5484. — P. 1504–1508.
45. Terpos E., Szydlo R., Apperley J.F. et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index // *Blood.* — 2003. — Vol. 102. — P. 1064–1069.
46. Totsuka T., Kanai T., Nemoto Y. et al. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic colitis // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 182. — P. 6079–6087.
47. Vaira S., Alhawagri M., Anwisy I. et al. RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice // *J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118. N 6. — P. 2088–2097.
48. van de Wetering de Rooij J., Lyssens C. et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of anti-RANKL nanobody ALX-0141 in healthy postmenopausal women // *Ann. Rheum. Dis.* — 2011. — Vol. 70. Suppl. 3. — P. 136.
49. Vega D., Maalouf N.M., Sakhaee K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2007. — Vol. 92(12). — P. 4514–4521.
50. Whyte M.P., Mumm S. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway // *J. Musculoskel. Neuronal Interact.* — 2004. — Vol. 4. N 3. — P. 254–267.
51. Whyte M.P., Obrecht S.E., Finnegan P.M. et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 347. N 3. — P. 175–184.
52. Whyte M.P., Singhellakis P.N., Petersen M.B. et al. Juvenile Paget's disease: the second reported, oldest patient is homozygous for the TNFRSF11B «Balkan» mutation (966\_969delTGACinsCTT), which elevates circulating immunoreactive osteoprotegerin levels // *J. Bone Miner. Res.* — 2007. — Vol. 22. N 6. — P. 938–946.
53. Whyte M.P., Totty W.G., Novack D.V. et al. Camurati-Engelmann disease: unique variant featuring a novel mutation in TGFβ1 encoding transforming growth factor beta 1 and a missense change in TNFSF11 encoding RANK ligand // *J. Bone Miner. Res.* — 2011. — Vol. 26. N 5. — P. 920–933.
54. Wilson S.R., Petersilso C., Saftig P., Bromme D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption // *J. Biol. Chem.* — 2009. — Vol. 284. Suppl. 4. — P. 2584–2592.
55. Xiong J., Onal M., Jilka R.L. et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation // *Nat. Med.* — 2011. — Vol. 17. — P. 1235–1241.
56. Zhang Y.H., Heulsmann A., Tondravi M.M. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 563–568.
57. Zhang J., Lu Y., Dai J. et al. In vivo real-time imaging of TGF-beta-induced transcriptional activation of the RANK ligand gene promoter in intraosseous prostate cancer // *Prostate.* — 2004. — Vol. 59. — P. 360–369.
58. Zhao Q., Wang X., Liu Y. et al. NFATc1: functions in osteoblasts // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2009. — Vol. 42. Suppl. 5. — P. 576–579.
59. Zheng Y., Zhou H., Brennan K. et al. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis // *Bone.* — 2007. — Vol. 40. — P. 471–478.

*N.E.Kushlinsky, Yu.S.Timofeev, E.S.Gershtein,  
Yu.N.Soloviev*

# **CLINICAL PROSPECTS OF RANK/RANKL/ OPG SYSTEM COMPONENTS STUDY IN PRIMARY AND METASTATIC BONE TUMOR**

N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Disbalance of bone homeostasis, associated with malfunctioning of RANK/RANKL/OPG system underlies the oncological processes such as the destruction of bone, metastasis development, tumor progression. Pathological activity of system was described in such conditions, as breast cancer, prostate cancer, multiple myeloma, squamous cell carcinoma, Hodgkin's disease, and also metastasis in bones from lung cancer and other malignant diseases. In the literature, there is evidence of involvement of RANK/RANKL/OPG system in the pathogenesis of bone tumors (osteosarcoma, giant cell tumor of bone, chondroblastoma). Experimental data show that RANKL inhibitors can play a role in reducing tumor-induced lesions of bone in multiple myeloma, breast cancer, prostate cancer and lung cancer. Also this review presents data from clinical studies of the drug efficacy targeted on RANK/RANKL/OPG system and results of authors' study of the levels of this system's components and proinflammatory cytokines in blood serum of primary bone sarcoma patients.

**Key words:** RANK, RANKL, osteoprotegerin, tumors, metastases, bones

Поступила в редакцию 15.06.2014 г.